



UNIVERSITAT DE BARCELONA



FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE
FARMACOLOGIA I QUÍMICA TERAPÈUTICA

PAPER DE LA GSK3 I DE LA JNK EN LA REGULACIÓ DE LES VIES APOPTÒTIQUES EN CÈL·LULES GRANULARS DE CEREBEL

MARC YESTE VELASCO

2008



UNIVERSITAT DE BARCELONA



FACULTAT DE FARMÀCIA

**DEPARTAMENT DE
FARMACOLOGIA I QUÍMICA TERAPÈUTICA**

PROGRAMA DE DOCTORAT DE MEDICAMENTS, ALIMENTACIÓ I SALUT

BIENNI 2004-2006

PAPER DE LA GSK3 I DE LA JNK EN LA REGULACIÓ DE LES VIES APOPTÒTIQUES EN CÈL·LULES GRANULARS DE CEREBEL

Memòria presentada per Marc Yeste Velasco per optar al títol de doctor per la
Universitat de Barcelona

Directors

Dr. Antoni Camins Espuny

Dr. Jaume Folch López

Doctorand

Marc Yeste Velasco



Aquest treball ha estat realitzat en el Departament de Farmacologia i Química Terapèutica de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona i ha estat finançat per:

Ministerio de Educación y Ciencia (Fondos FEDER)

(projectes SAF2005-01604, SAF2005-05179 i SAF2006-13092);

Instituto de Salud Carlos III

(projectes FISS G03/137, FISS G03/167 i PI 041300);

Centro Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas

(CIBERNED);

Generalitat de Catalunya

(projecte 2005-SGR00893);

Fundació La Marató de TV3

(projecte 063-203)

EECC

(LSHB-CT-2004-512051)

A mi abuelo

"The most beautiful thing we can experience is the mysterious. It is the source of all true art and all science. He to whom this emotion is a stranger, who can no longer pause to wonder and stand rapt in awe, is as good as dead: his eyes are closed"

Albert Einstein

Mai hauria imaginat que acabaria realitzant una tesi doctoral...

Al finalitzar la carrera de biologia no tenia gens clar cap a on orientar la meua vida professional, tot i la meua resistència a conduir-la cap a la recerca, per una sèrie de circumstàncies vaig acabar realitzant un màster experimental al grup del Dr. Zorzano. Aquest primer contacte amb la investigació, encara que no vaig ser capaç d'adonar-me en aquell moment, va ser clau pel meu futur com a científic. Després d'un any molt enriquidor tant a nivell de conèixer el funcionament d'un laboratori, com intel·lectualment, vaig presentar el màster. Encara que la experiència va ser totalment positiva, em continuava resistint a entrar al complicat, en tots els sentits, món de la recerca, masses mals de caps! Així, un cop presentat el màster i no tenint clar ni la meua capacitat per realitzar una tesi i, ni tan sols, la meua vocació per la ciència, vaig decidir aparcar la investigació, per integrar-me al món laboral. Tot i això el meu subconscient, en aquest cas seria més apropiat dir "inconscient", em deia que acabaria tornant a la recerca. Així, ni un any després de la meua deserció i gràcies a la influència de la Txell i els meus pares, vaig deixar de banda totes les meves resistències i em vaig llençar definitivament al món de la ciència. La resta de la història ja la coneixeu...

Arribat a aquest punt voldria agrair a tota la gent que ha fet possible la realització d'aquesta tesi.

En primer lloc gràcies al Toni i a la Mercè per donar-me l'oportunitat de treballar al seu grup d'investigació i permetre que el somni de realitzar una tesi doctoral fos possible.

Al Toni, novament, i al Jaume per dirigir-me durant aquest anys i no deixar-me caure en el desànim.

Òbviament, un fort agraïment a tota la gent del "depar", no només per la vostra ajuda sinó també per la bona atmosfera que s'ha aconseguit crear. M'hauria agradat dedicar unes línies a cadascú de vosaltres, però degut a l'elevat nombre de persones que han format i formen part del "depar" i per evitar caure en el, més que probable, error d'oblidar-me a algú, he decidit fer general aquest agraïment. De fet, espero que el meu agraïment personal us l'hagi fet sentir en el dia a dia.

També gràcies a molta gent que segurament mai arribaran a llegir aquestes línies, però a les quals per diferents motius crec que he de mencionar. Al Dionís, el meu primer amic amb el que jugava a "butaneros" al patí de la llar d'infants i que encara, de tant en tant, em sorprèn amb una trucada o amb una "aparició". A la gent de l'hoquei,

només a la que realment val la pena, que no són gaires. A la gent del Graziel·la. Al Xavi Pinasa & Co. de Reference. Al Marc Mejías, un dels pocs amics que continuo veient de la uni. I, finalment, a moltes persones que últimament formen part de la meva vida, des de l'Alba i el Vincent a Berlín, a la Gemma, l'Eva & Co. de Vilanova, fins als "guiris" residents a Bcn: Matthew, Eli (mil gracias por la portada!), Stefie, Scot, Daniel... Amb una especial menció als "suegrus", Conxita i Ramon, per fer-me sentir un Rosell-Mañé més!!!

Un fort agraïment al "Grupo", en el sentit ampli de la paraula, per la gran quantitat de moments memorables que portem compartint des de fa un munt d'anys! Encara que ja fa un temps (massa!) que no ens veiem tant sovint, sé que sempre podré comptar amb vosaltres...

Al Wences, formas parte de la gentuza mencionada antes, pero por diferentes motivos te mereces ser mencionado también en solitario.

A Nuria y Manolo por los maravillosos ratos que hemos compartido y por vuestra influencia siempre enriquecedora.

A mis primas Iris y Marta por quererme y preocuparse por mí, pese a lo mal primo que soy! je je Por cierto Iris, date caña que quiero compartir rápidamente contigo el honor de ser los doctores de la familia!

A mi abuelo Manolo por hacerme sentir tan querido y por lo orgulloso que está de sus nietos.

A mi abuela por quererme tan loca e incondicionalmente y hacerme sentir el centro del universo! Mua!

A mi abuelo Mariano, hace tan poco que nos dejaste... se que dedicarte esta tesis no es nada en comparación a todo lo que me has querido y hecho por mí. No puedo evitar derramar unas lágrimas tristes al escribir esto pero espero que en el futuro, al recordarte, se conviertan en lágrimas de alegría. Tu cabeza de chorlito, como tanto te gustaba llamarme para hacerme rabiar, no dejará de pensar en ti nunca!

A mis padres a los cuales debo todo lo que soy. Ni esta tesis, ni ninguna de las cosas que he conseguido en mi vida habrían sido posibles sin vuestra educación, sin vuestros consejos y, por supuesto, sin vuestro amor. Habéis conseguido inculcarme todas

vuestras virtudes e inquietudes, que son muchas, y sobretodo habéis conseguido que sea feliz! Quiero que sepáis que estoy muy orgulloso de vosotros, tanto como vosotros de mí. ¿Eh, mama? Tu biologuito al final será doctor. “Todas esas preguntas e interrogatorios se deben a su espíritu científico” ¿no decías eso, papa?

I finalment a la Txell... Ja fa pràcticament cinc anys que vam començar la nostra odissea particular, no per tortuosa sinó per emocionant i increïble, durant la qual hem viscut innombrables experiències, sentiments, emocions... No he conegut mai cap persona tan afí a mi, encara que aparentment i en aspectes irrellevants no ho sembli, cap persona amb la qual pugui compartir tants aspectes de la vida, des de emocionar-nos amb una cançó dels Smiths o amb un relat de Cortázar, fins a quedar petrificats amb una posta de sol a Santorini, passant per esclatar en riures després de fer qualsevol subnormalitat de les nostres, en definitiva, cap persona que em faci sentir tan viu com tu. T'estimo i como dirían Jeff Tweedy y los suyos:

“Our love,
our love,
our love is all we have...”

Índex	17
Abreviatures	21
1. INTRODUCCIÓ	27
1.1. TIPUS DE MORT CEL·LULAR	27
1.1.1. La necrosi	28
1.1.2. La mort cel·lular programada	28
1.1.2.1. Apoptosi clàssica	29
1.1.2.2. MCP similar a l'apoptosi	30
1.1.2.3. MCP similar a la necrosi	30
· Autofàgia	30
· Paraptosi	30
1.1.2.4. Desencadenants fisiològics i patològics de la MCP en neurones	31
1.2. LA MITOCÒNDRIA I L'APOPTOSI	31
1.2.1. Mecanismes de permeabilització de la mitocòndria	31
1.2.1.1. Teoria del trencament de la membrana externa mitocondrial	32
· Hiperpolarització de la membrana interna mitocondrial	32
· Regulació a través del porus de permeabilitat transitòria	33
1.2.1.2. Teoria dels canals conductors de citocrom c	34
· Canals formats per membres de la família Bcl2	34
· Unió de Bax o Bak amb VDAC per formar canals	35
· Desestabilització de la membrana externa mitocondrial	35
1.2.2. Paper de la mitocòndria en l'homeòstasi del calci	36
1.2.3. Producció d'energia i generació de ROS en la mitocòndria	36
1.3. VIES I MOLÈCULES DE SENYALITZACIÓ PROMOTORES DE LA MCP EN NEURONES	39
1.3.1. Molècules efectores de la MCP neuronal	39
1.3.1.1. Les caspases	39
· La via extrínseca o via dels receptors de mort	40
· La via intrínseca o mitocondrial	41
· Reguladors de la mort cel·lular induïda per caspases	42
1.3.1.2. AIF i Endonucleasa G	43

1.3.1.3. HtrA2/Omi	44
1.3.1.4. Les catepsines	45
1.3.1.5. Les calpaïnes	47
1.3.2. Vies i molècules reguladores de la MCP neuronal	48
1.3.2.1. Els receptors de dependència	48
1.3.2.2. Proteïnes de la família Bcl2	49
1.3.2.3. Par-4	53
1.3.2.4. La p53 i altres proteïnes relacionades	53
1.3.2.5. GAPDH	56
1.3.2.6. Activació aberrant del cicle cel·lular	57
1.3.2.7. CDK5	61
1.3.2.8. GSK3	63
1.3.2.9. Vies de les MAPK, JNK i p38	68
· Via de la JNK	69
· Via de la p38	72
1.4. VIES I MOLÈCULES DE SENYALITZACIÓ PROMOTORES DE LA SUPERVIVÈNCIA NEURONAL	73
1.4.1. Via de la Raf-MEK-ERK	74
1.4.2. Via de la PI3-K/AKT	75
1.4.3. SGK	77
1.4.4. CREB	78
1.4.5. NF-κB	78
1.4.6. Sirtuïnes	80
1.5. MODEL EXPERIMENTAL: LA DEPRIVACIÓ DE SÈRUM I POTASSI EN NEURONES GRANULARS DE CEREBEL	82
1.5.1. Neurones granulars de cerebel	82
1.5.2. Deprivació de sèrum i potassi	83
1.6. MOLÈCULES UTILITZADES PER PREVENIR L'APOPTOSI	84
1.6.1. Inhibidors de la GSK3	84
1.6.1.1. Liti	85
1.6.1.2. SB-415286	85
1.6.1.3. AR-A014418	86
1.6.2. SP-600125	86
1.6.3. Resveratrol	86

1.6.4. Cafeïna	87
2. OBJECTIUS	91
3. MATERIALS I MÈTODES	95
3.1. Cultiu primari de cèl·lules granulars de cerebel	95
3.2. Tractaments dels cultius de CGC	98
3.3. Quantificació de l'apoptosi per citometria de flux	101
3.4. Detecció i comptatge de nuclis apoptòtics tenyits amb iodur de propidi	102
3.5. Quantificació de la viabilitat cel·lular per MTT	102
3.6. Quantificació de les espècies reactives d'oxigen	103
3.7. Quantificació de l'activitat enzimàtica de la caspasa 3	104
3.8. Immunoprecipitació i quantificació de l'activitat quinasa de la GSK3- β	106
3.9. Obtenció d'extractes proteics	107
3.9.1. Obtenció d'extractes proteics totals	107
3.9.2. Obtenció d'extractes proteics enriquits en mitocòndries	108
3.9.3. Determinació de la concentració proteica pel mètode de Bradford	109
3.10. Western-blot	109
3.10.1. Tampons i solucions	110
3.10.2. Preparació dels gels de poliacrilamida	112
3.10.3. Preparació de les mostres	113
3.10.4. Electroforesi	113
3.10.5. Transferència	113
3.10.6. Immunodetecció	114
3.11. Immunocitoquímica	115
3.12. Extracció d'ARN	116
3.13. Anàlisi de l'ARN per electroforesi en gel d'agarosa desnaturalitzant	118
3.14. Síntesi d'ADN complementari mitjançant la transcriptasa inversa	119
3.15. Reacció de PCR i electroforesi en gel d'agarosa	120
3.16. Real-Time PCR (SYBR Green)	122
3.17. Tractament de les dades i anàlisi estadística	124
4. RESULTATS	127
4.1. PUBLICACIÓ 1: <i>Evaluation of acute antiapoptotic effects of Li⁺ in neuronal cell cultures</i>	127

4.2. PUBLICACIÓ 2: <i>Glycogen synthase kinase-3 is involved in the regulation of the cell cycle in cerebellar granule cells</i>	141
4.3. PUBLICACIÓ 3: <i>GSK-3β inhibition and prevention of mitochondrial apoptosis inducing factor release are not involved in the antioxidant properties of SB-415286</i>	157
4.4. PUBLICACIÓ 4: <i>Neuroprotective effects of SB-415286 on hydrogen peroxide-induced cell death in B65 rat neuroblastoma cells and neurons</i>	165
4.5. PUBLICACIÓ 5: <i>Neuroprotection by SP600125 against potassium deprivation-induced apoptosis involves the AKT pathway</i>	175
4.6. PUBLICACIÓ 6: <i>Neuroprotective effects of caffeine against complex I inhibition-induced apoptosis are mediated by inhibition of the ATM/p53/E2F-1 path in cerebellar granule neurons</i>	219
4.7. PUBLICACIÓ 7: <i>Comparative analysis of the effects of resveratrol in two apoptotic models: inhibition of complex I and potassium deprivation in cerebellar granule neurons</i>	231
5. DISCUSSIÓ GENERAL	247
6. CONCLUSIONS	267
7. BIBLIOGRAFIA	271
8. ANNEX	301
8.1. <i>DNA low-density array analysis of colchicine neurotoxicity in rat cerebellar granular neurons</i>	301

AIF , Apoptosis inducing factor	DISC , Death-inducing signalling complex
AKT/PKB , AKT/Protein kinase B	DNA pol-α , DNA polymerase- α
ANT , Adenine-nucleotide translocator	DV S/K , Deprivació de sèrum i potassi
AP1/TRE , Activator protein 1/TRE	e⁻ , electró
Apaf-1 , Apoptosis-inducing factor-1	Endo G , Endonucleasa G
APP , Amyloid precursor protein	ERK , Extracellular signal-regulated kinase
ASK , Apoptosis stimulating kinase	Fas L , Fas ligand
ATF/CRE , Activating transcription factor/cAMP response element	FOXO , Forkhead box transcription factor
ATM , Ataxia-telangiectasia mutated	GADD45 , Grow arrest and DNA damage inducible gene 45
Bad , Bcl2 antagonist of cell death	GAPDH , Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Bak , Bcl2 antagonist killer	GDNF , Glial cell line-derived neurotrophic factor
Bax , Bcl2-associated X protein	GSK3 , Glycogen synthase kinase 3
Bcl2 , B-cell lymphoma 2	H⁺ , Protó
Bcl-X_L , Bcl2-related protein long isoform	H₂O₂ , Peròxid d'hidrogen o aigua oxigenada
BDNF , Brain-derived neurotrophic factor	HAT , Histone acetyltransferases
BH , Dominis d'homologia Bcl2	HDAC , Histone deacetylases
Bid , BH3-interacting domain death agonist	Hrk/DP5 , Harakiri/DP5
Bik , Bcl2-interacting killer	IAP , Inhibitor of apoptosis proteins
Bim , Bcl2-interacting protein	IC₅₀ , Inhibitory concentration 50
Bmf , Bcl2-modifying factor	ICAD , Inhibitor of apoptosis proteins
b.p. , Base pair	IGF-1 , Insulin growth factor-1
CAD , Caspase-activated DNase	IP , Iodur de propidi
Calpaïnes , Calcium-dependent non-lysosomal cysteine proteases	JIP , JNK interacting proteins
cAMP , Cyclic adenine mono-phosphate	JNK , c-Jun NH ₂ -terminal kinase
Caspases , Cysteiny l aspartate-specific proteases	MAPK , Mitogen-activated protein kinases
CBP/p300 , CREB binding protein/p300	Mcl1 , Myeloid cell leukemia
CDK , Cyclin-dependent kinases	Mdm2 , Mouse double minute 2
CGC , Cèl·lules granulars de cerebel	MEF2 , Myocyte enhancer factor 2
CREB , Cyclic AMP response element-binding protein	MLK , Mixed-lineage kinases
DD , Death domain	MCP , Mort cel·lular programada
DED , Death effector domain	

MPP+, 1-methyl-4-phenylpyridinium
NAD, Nicotine adenine dinucleotide
NF- κ B, Nuclear factor kappa-B
NGF, Nerve growth factor
O₂⁻, Anió superòxid
PARP-1, Poly(ADP-ribose) polymerase-1
PCNA, Proliferating cell nuclear antigen
PDK, Phosphoinositide-dependent
kinase
PI3-K, Phosphatidylinositol 3- kinase
PIP₂, Phosphatidylinositol biphosphate
PIP₃, Phosphatidylinositol triphosphate
PP2A, Phosphatase 2A
PTEN, Phosphatase and tensin homolog
deleted on chromosome 10
PTP, Permeability transition pore
Puma, p53-upregulated modulator of
apoptosis
Rb, Proteïna del retinoblastoma
RE, Reticle endoplasmàtic
ROS, Reactive oxigen species
SIRT, Sirtuïna
SMAC/Diablo, Second mitochondrial-
derived activator of caspases/direct
IAP binding protein of low pI
SOD, Superoxide dismutase
tBid, Truncated form of Bid
TNF α , Tumor necrosis factor α
Trk, Tropomyosin-related kinase
VDAC, Voltage-dependent anion
channel
 $\Delta\Psi_m$, Potencial transmembrana
mitochondrial

Introducció

1. INTRODUCCIÓ

Les malalties neurodegeneratives són un dels problemes sanitaris més importants de les societats avançades. En les últimes dècades, l'augment de l'esperança de vida ha fet incrementar la incidència de malalties com l'Alzheimer o el Parkinson, degut a que totes elles són malalties associades a l'envelliment. Aquestes malalties es caracteritzen per la pèrdua de neurones en determinades àrees cerebrals, que donarà lloc a un deteriorament progressiu de les diferents funcions del sistema nerviós, ja siguin de tipus motor, cognitiu o emocional. Actualment, la gran majoria de tractaments farmacològics són simptomàtics, és a dir, dirigits a millorar temporalment la qualitat de vida de les persones afectades, però ineficients en aturar la seva progressió.

La mort de les neurones pot ser desencadenada per dos processos ben diferenciats, com són la necrosi i la mort cel·lular programada. La forma més coneguda de mort cel·lular programada és l'apoptosi, que consisteix en una mena de suïcidi cel·lular que activa la pròpia cèl·lula en determinades condicions. Aquest tipus de mort es pot activar durant el desenvolupament de l'organisme per tal d'eliminar les cèl·lules innecessàries o quan una cèl·lula pateix una infecció o una mutació i l'organisme decideix eliminar-la per tal d'evitar els seus efectes nocius. Trastorns en el funcionament de l'apoptosi poden donar lloc a malalties, com per exemple en el cas del càncer, on l'apoptosi queda inactivada, i això permet la proliferació de les cèl·lules tumorals. De manera inversa, una activació excessiva de l'apoptosi també pot donar lloc a trastorns, és el cas de les malalties neurodegeneratives, on l'apoptosi s'activa per error i provoca la mort neuronal.

Així doncs, resulta de gran interès la utilització de models experimentals que ens permetin investigar les causes i els mecanismes implicats en l'apoptosi de les neurones, ja que ajudaran al desenvolupament de nous fàrmacs dirigits a aturar la degeneració neuronal.

1.1. TIPUS DE MORT CEL·LULAR

La classificació clàssica de la mort cel·lular en els organismes pluricel·lulars es divideix en dos grans grups: la necrosi i la mort cel·lular programada (MCP). No obstant això, actualment es coneixen alguns tipus de mort cel·lular programada que comparteixen alguna característica amb la necrosi.

1.1.1. La necrosi

La necrosi és una mort cel·lular passiva (no requereix consum d'energia), no fisiològica, que es dona en condicions patològiques quan la cèl·lula pateix una lesió. La necrosi es caracteritza pel trencament de les membranes de la cèl·lula, sovint induït per desequilibris osmòtics i per l'alliberament al medi dels continguts cel·lulars i de molècules pro inflammatòries, la qual cosa activa una resposta de tipus inflamatori. Així doncs, la mort no afecta a una única cèl·lula, sinó que també afecta a les cèl·lules veïnes produint un dany tissular. Les cèl·lules necròtiques exhibeixen canvis en la morfologia nuclear, però no es dona la condensació de la cromatina i la fragmentació de l'ADN típica de la mort apoptòtica (Edinger and Thompson 2004).

1.1.2. La mort cel·lular programada

La mort cel·lular programada és un procés actiu (requereix consum d'energia), que es dona tant en condicions fisiològiques com patològiques, i que afecta només a una única cèl·lula. Fisiològicament és un procés fonamental i comú en els organismes pluricel·lulars, ja que és imprescindible pel desenvolupament, la morfogènesi dels òrgans, l'homeòstasi dels teixits i per l'eliminació de cèl·lules danyades o infectades per patògens.

La nomenclatura relativa als diferents fenotips de MCP ha estat sempre confusa i actualment no hi ha una classificació consens. Una de les classificacions més restrictives, considerada però una de les més acurades, és la basada en el criteri de la morfologia nuclear. Aquesta classificació divideix la MCP en l'apoptosi clàssica, la MCP similar a l'apoptosi i la MCP similar a la necrosi (Fig. 1). En el primer cas la condensació nuclear de la cromatina té forma de mitja lluna, en el segon cas és parcial o perifèrica i en l'últim cas no hi ha condensació de la cromatina (Leist and Jaattela 2001).

Tot i això, els diferents tipus de MCP comparteixen algunes de les característiques que les identifiquen, així com l'ús comú de determinades rutes bioquímiques. De fet, es pot suggerir que els diferents tipus de mort cel·lular formen una mena de gradient continu situat entre els dos mecanismes més diferenciats: l'apoptosi i la necrosi. També es creu que la inhibició d'un tipus de mort pot provocar l'activació d'altres rutes, que conduiran a un altre tipus de mort cel·lular (Penaloza *et al.* 2006).

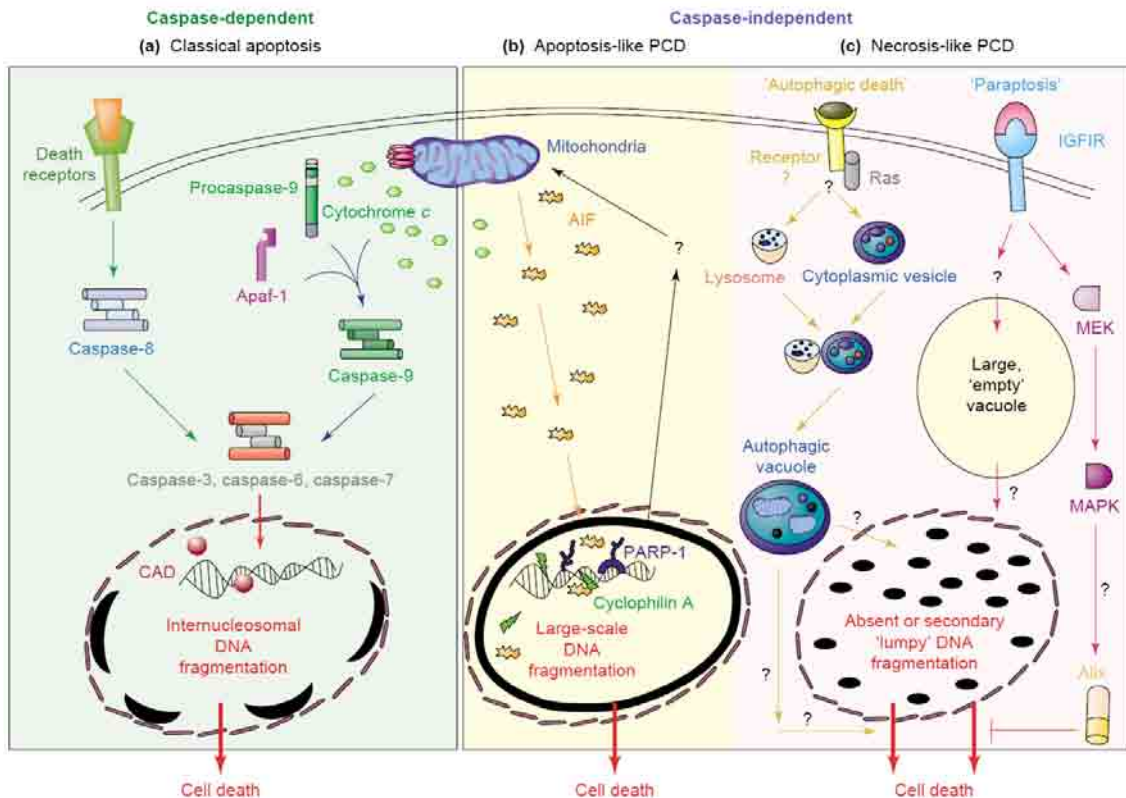


Figura 1. Classificació i principals rutes moleculars de la MCP o PCD (*Programmed cell death*) ((Krantic et al. 2005)

1.1.2.1. Apoptosi clàssica

Des del punt de vista morfològic, l'apoptosi clàssica es caracteritza per la contracció de la cèl·lula, la vacuolització de la membrana plasmàtica, la condensació de la cromatina i del nucli i la fragmentació de les molècules d'ADN en fragments de 100-200 bp (*base pair*). En el decurs del procés apoptòtic, la cèl·lula experimenta una degradació dels mecanismes d'adhesió a les cèl·lules veïnes i a la matriu extracel·lular. Paral·lelament a aquest processos, la cèl·lula mobilitza la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmàtica, la qual cosa serà un senyal que activarà la fagocitosi mediada per macròfags. El procés apoptòtic provocarà, finalment, la fragmentació de la cèl·lula en vacúols que, tot i això, preservaran la integritat de la membrana plasmàtica i, per tant, impediran l'alliberament del contingut cel·lular. Això donarà lloc als cossos apoptòtics que ràpidament seran fagocitats pels macròfags. Aquests canvis morfològics són el resultat de l'activació d'uns enzims amb activitat proteasa anomenats caspases (*Cysteiny/ aspartate-specific proteases*) (Kerr et al. 1972).

1.1.2.2. La MCP similar a l'apoptosi

És un tipus de mort independent de caspases, que necessita l'activació de la proteïna AIF (*Apoptosis-inducing factor*) i de la proteïna PARP-1 (*Poly-ADP-ribose polymerase-1*), és per això, que també es coneguda com MCP dependent d'AIF-PARP-1. Morfològicament es caracteritza per una lleugera condensació perifèrica de la cromatina, i per la fragmentació de l'ADN en fragments de mida gran (superior als 50 kpb) (Susin *et al.* 1999).

1.1.2.3. La MCP similar a la necrosi

És una altre tipus de mort independent de caspases, on la mort no es dirigida per la mitocòndria, sinó per altres orgànuls com els lisosomes o el reticle endoplasmàtic. Morfològicament es caracteritza per l'absència de condensació de la cromatina i de fragmentació de l'ADN, i per l'aparició de vacúols citoplasmàtics. Segons quin és l'orgànul que dirigeix la mort, es diferencien dos subtipus de mort :

· **Autofàgia**

Aquesta mort s'associa a la formació de vacúols citoplasmàtics derivats dels lisosomes i a l'activació d'unes proteases d'origen lisosomal anomenades catepsines. S'activa mitjançant la proteïna Ras (Broker *et al.* 2005).

· **Paraptosi**

En aquest cas l'orgànul que dirigeix la mort és el reticle endoplasmàtic (RE), que mitjançant l'alliberament de calci activarà a unes proteases anomenades calpaiïnes (*Calcium-dependent non-lysosomal cysteine proteases*). Morfològicament es caracteritza per l'aparició d'uns grans vacúols citoplasmàtics. Sembla ser que la via de les MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*) està implicada en aquest tipus de mort (Broker *et al.* 2005).

1.1.2.4. Desencadenants fisiològics i patològics de la MCP en neurones

Existeixen diferents senyals que poden iniciar la MCP en neurones. Un de els senyals més ben estudiades és la manca de factors neurotròfics, que pot desencadenar la MCP durant el desenvolupament del sistema nerviós i possiblement en els trastorns neurodegeneratius. A més, la supervivència de moltes poblacions neuronals, particularment en el sistema nerviós central, depèn de l'activitat elèctrica neuronal (Oppenheim 1991). La majoria de neurones del sistema nerviós central de mamífers posseeixen receptors per un neurotransmissor excitador amb capacitat per desencadenar la MCP: el glutamat. La sobreactivació dels receptors de glutamat pot induir la MCP mitjançant l'entrada de calci a la cèl·lula, l'anomenada excitotoxicitat. Aquesta pot donar-se en els atacs d'apoplexia, en la malaltia d'Alzheimer o en els trastorns del sistema motor (Choi 1992). Un altre desencadenant és l'estrès oxidatiu, on les espècies reactives d'oxigen (ROS, *reactive oxygen species*) provoquen danys en els lípids, proteïnes i àcids nucleics de la cèl·lula (Sastry and Rao 2000). Parlem d'estrès metabòlic quan disminueixen significativament els nivells de glucosa, d'oxigen i d'altres molècules implicades en el metabolisme energètic. Aquest es dona després de l'apoplexia o durant l'envelliment, i també pot iniciar la MCP (Beal 1995). Finalment, també es coneixen factors genètics i ambientals que poden desencadenar la MCP.

1.2. LA MITOCÒNDRIA I L'APOPTOSI

La mitocòndria és un orgànul citoplasmàtic que controla diferents funcions bàsiques de la cèl·lula, com són la producció d'energia en forma d'ATP i la regulació dels nivells de calci citoplasmàtics i de les ROS.

En els darrers anys, la mitocòndria estat objecte d'estudi per la seva implicació en la MCP, ja que és un punt de convergència de diferents vies intracel·lulars de senyalització de mort cel·lular. Aquest orgànul constitueix un reservori de proteïnes proapoptòtiques com són el citocrom c, la Smac/Diablo, l'AIF i l'endonucleasa G (Endo G). Així doncs, la manca de regulació de la permeabilitat de les seves membranes interna i externa, permetrà l'alliberament al citoplasma d'aquestes proteïnes que desencadenaran la mort cel·lular activant vies dependents o independents de caspases (Parone *et al.* 2002).

1.2.1. Mecanismes de permeabilització de la mitocòndria

Fins l'actualitat, s'han postulat dues teories per explicar la permeabilització de la membrana externa mitocondrial, que permetrà la sortida de proteïnes proapoptòtiques que es troben a l'espai intermembrana de la mitocòndria: el trencament inespecífic de la membrana mitocondrial externa i la formació de canals conductors. La permeabilització de la mitocòndria està controlada per membres de la família Bcl2 (*B-cell lymphoma 2*), la qual inclou membres proapoptòtics com Bax (*Bcl2-associated X protein*), Bak (*Bcl2 antagonist killer*) o tBid (*truncated form of Bid*), i membres antiapoptòtics com Bcl2 o Bcl-X_L (*Bcl2-related protein long isoform*) (veure apartat 1.3.2.2.) (Desagher and Martinou 2000).

1.2.1.1. Teoria del trencament de la membrana externa mitocondrial

Segons aquesta teoria, durant l'apoptosi es dona una entrada d'aigua i soluts a la matriu mitocondrial que provoca un inflament de la mitocòndria. Aquest canvi morfològic té com a conseqüència una expansió de la membrana interna mitocondrial que acaba trencant la membrana externa i, per tant, s'allibera tot el contingut de l'espai intermembrana al citosol (Vander Heiden *et al.* 1997).

S'han proposat dos models que poden conduir a l'inflament de la matriu mitocondrial:

• Hiperpolarització de la membrana interna mitocondrial

La hiperpolarització de la membrana interna podria estar originada pel bloqueig de l'intercanvi ATP mitocondrial per ADP citosòlic que es dona durant l'apoptosi. Aquest intercanvi normalment el realitza el VDAC (*Voltage-dependent anion channel*), que es troba a la membrana externa, i l'ANT (*Adenine-nucleotide translocator*), que es troba a la membrana interna. La incapacitat d'intercanvi d'ATP-ADP, provocat pel tancament del VDAC, inhibeix l'activitat ATPasa, que provoca una inhibició de la reentrada de protons (H⁺) a la matriu i contribueix a la hiperpolarització de la membrana interna. Aquest augment del potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) podria ser el causant de l'inflament osmòtic de la matriu (Vander Heiden *et al.* 1999) (Fig. 4 A).

· Regulació a través del porus de permeabilitat transitòria

El porus de permeabilitat transitòria (PTP, *permeability transition pore*) és un megacanal no selectiu, que es pot formar per la superposició de proteïnes transmembrana de les membranes mitocondrials interna i externa en els llocs de contacte entre les dues membranes. Es creu que el PTP està format per diferents proteïnes: l'ANT, el VDAC i el PBR (*Benzodiazepine peripheral receptor*), que són proteïnes transmembrana, a les que s'uneix una proteïna citosòlica, la HK (*Hexokinase*), una proteïna de l'espai intermembrana, la CK (*Creatine kinase*), i una proteïna de la matriu, la Cph. D (*Cyclophilin D*) (Fig. 2). L'obertura del PTP pot ser desencadenada per diferents estímuls com el calci, les ROS, una baixa concentració de nucleòtids d'adenina, els fosfats inorgànics, canvis en el pH i un $\Delta\Psi_m$ baix. L'obertura del PTP provoca un augment de la permeabilitat de la membrana interna, amb la conseqüent dissipació del $\Delta\Psi_m$, seguida de l'equilibri químic entre matriu i citosol, que provoca l'inflament de la primera, i que finalment acaba amb la disrupció de la membrana externa (Crompton 1999). Els membres de la família Bcl2 poden regular l'obertura del PTP: per una banda els membres antiapoptòtics, com Bcl2, la prevenen, i per una altra els membres proapoptòtics, com Bax, poden provocar-la (Marzo *et al.* 1998) (Fig. 4 B).

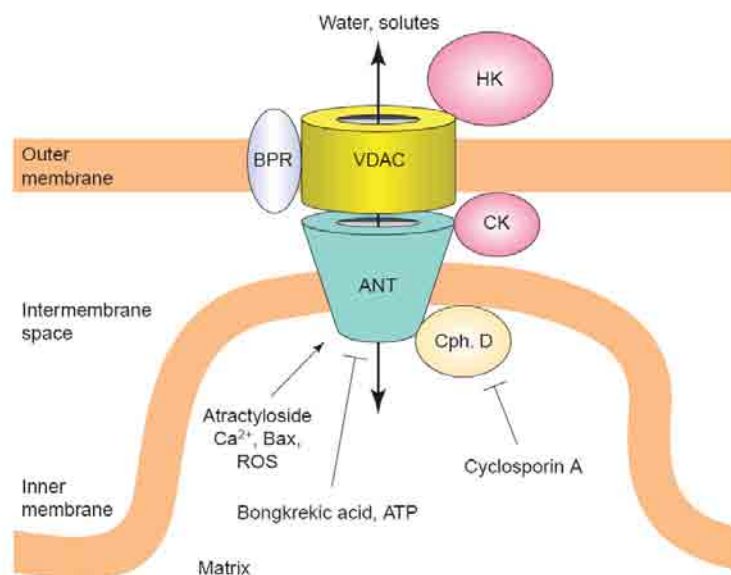


Figura 2. Components del PTP (Desagher and Martinou 2000)

Així doncs, el trencament de la membrana externa mitocondrial és una teoria plausible, perquè a més d'explicar l'alliberament del citocrom c, també

permet explicar la sortida d'altres proteïnes de l'espai intermembrana de pes molecular més elevat, com són l'AIF, la SMAC/Diablo o l'endonucleasa G. No obstant això, algunes dades suggereixen que aquest trencament no és la causa, sinó la conseqüència de l'alliberament del citocrom c, és a dir, que hi hauria altres mecanismes responsables d'un alliberament previ de citocrom c (Desagher and Martinou 2000).

1.2.1.2. Teoria dels canals conductors de citocrom c

Segons aquesta teoria, els membres de la família Bcl2 podrien intervenir en la formació de canals suficientment grans per permetre el pas de proteïnes solubles. S'han proposat tres models diferents (Desagher and Martinou 2000):

· Canals formats per membres de la família Bcl2

Aquest model es va proposar al demostrar-se que Bax, tBid, Bcl-X_L i Bcl2 podien formar canals iònics funcionals en membranes lipídiques sintètiques. Aquests canals tenen diferents estats de conductància, són sensibles al pH i al voltatge i mostren una baixa selectivitat iònica (Schendel *et al.* 1998; Schendel *et al.* 1999). Aquestes dades, juntament amb el fet que l'addició de Bax o Bak directament a la mitocòndria provoca alliberament de citocrom c, suggereix que els membres proapoptòtics de la família Bcl2 podrien formar canals mitocondrials, mitjançant la seva oligomerització (Antonsson *et al.* 2000) (Fig. 3 i 4 C). També s'ha demostrat que Bcl2 és capaç de prevenir la formació dels canals formats per Bax (Antonsson *et al.* 1997).

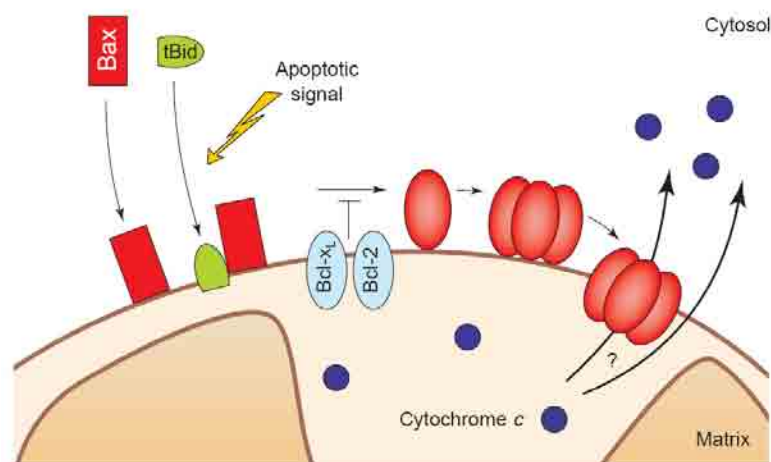


Figura 3. Oligomerització de Bax per formar canals (Desagher and Martinou 2000)

· Unió de Bax o Bak amb VDAC per formar canals

Estudis on es va reconstituir el VDAC en liposomes, Bax i Bak eren capaços de promoure l'obertura del canal i contràriament, Bcl-X_L facilitava el seu tancament. Es creu que Bax i Bak permeten el pas del citocrom c a través del VDAC, possiblement induint un canvi conformacional o cooperant amb el VDAC per formar una megaporus (Shimizu *et al.* 1999) (Fig. 4 D).

· Desestabilització de la membrana externa mitocondrial

Està demostrat que Bax i tBid poden disminuir l'estabilitat de bicapes planes fosfolipídiques, suggerint que aquestes proteïnes poden actuar directament per desestabilitzar la membrana externa mitocondrial. Bax i tBid al reduir la tensió lineal de la membrana, provoquen la formació d'un porus lipídic o d'un complex proteïna-lípid, suficientment gran per permetre el pas de proteïnes cap al citosol (Basanez *et al.* 1999; Kudla *et al.* 2000) (Fig. 4 E).

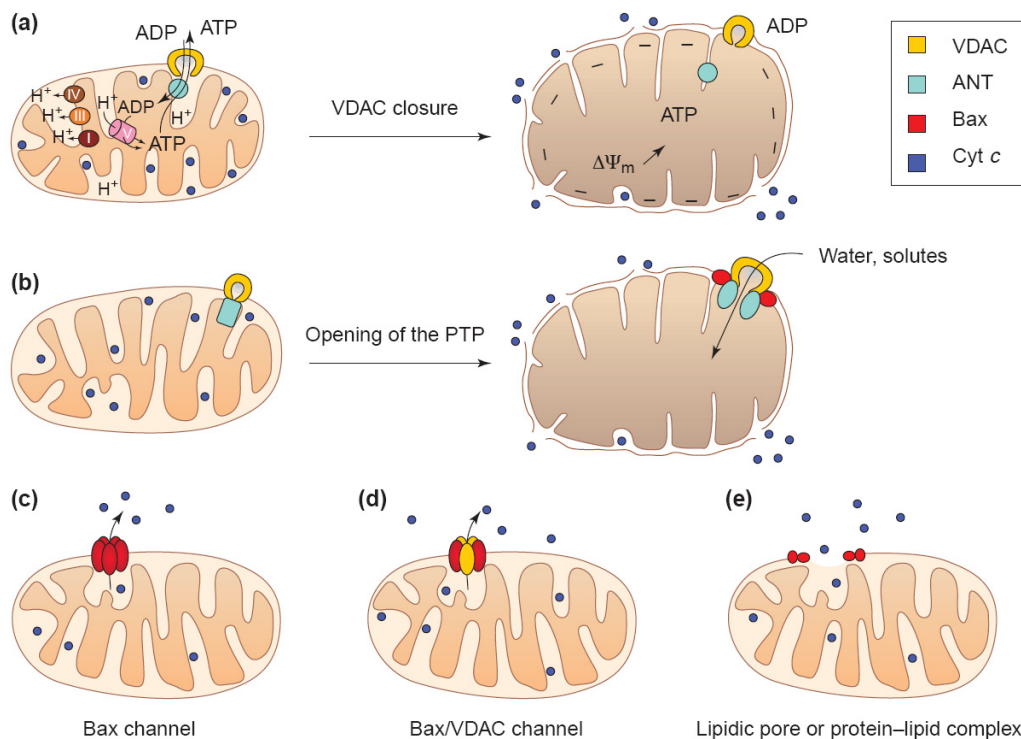


Figura 4. Models d'alliberament de citocrom c durant l'apoptosi (Desagher and Martinou 2000)

Així doncs, la teoria dels canals permet explicar el manteniment funcional de la mitocòndria durant el temps necessari per l'activació de les caspases, que és un procés que requereix ATP. Com també permet explicar l'alliberament de citocrom c previ al trencament de la membrana externa mitocondrial (Desagher and Martinou 2000).

1.2.2. Paper de la mitocòndria en l'homeòstasi del calci

La mitocòndria participa en la regulació del contingut de calci intracel·lular, el qual està involucrat en la resposta cel·lular front senyals apoptòtics. Un increment de calci citoplasmàtic pot ser neutralitzat per acumulació de calci en la mitocòndria, que permetrà amortir els increments citoplasmàtics de calci que es donen durant la senyalització intercel·lular.

El balanç de calci en la mitocòndria és molt delicat i depèn del tipus cel·lular, del nivell i la duració del senyal de calci o de la interacció amb elements del citoesquelet, entre altres factors. Existeixen diferents estímuls que provoquen una entrada de calci a la cèl·lula, com l'exposició a molècules tòxiques com el peròxid d'hidrogen (H_2O_2). La mitocòndria acumula calci en resposta a la seva entrada al citoplasma. Això pot provocar un augment del $\Delta\Psi_m$, però més sovint acaba en un augment de ROS, seguit d'una despolarització de la membrana, l'alliberament de citocrom c i finalment la mort cel·lular.

Es creu que la proteïna Bcl2 d'alguna manera pot regular la concentració de calci. També s'ha demostrat que la proteïna Bad, un membre proapoptòtic de la família Bcl2, es activa per la calcineurina quan s'incrementen els nivells de calci i es transloca a la mitocòndria, on té una funció apoptòtica (Parone *et al.* 2002).

1.2.3. Producció d'energia i generació de ROS en la mitocòndria

El paper principal de la mitocòndria dins de la cèl·lula és la producció d'energia en forma d'ATP mitjançant la fosforilació oxidativa. La cadena respiratòria es localitza en la membrana interna mitocondrial i consta de cinc complexes enzimàtics, que s'anomenen complex I, II, III, IV i V. Els complexes I, II, III i IV formen part de la cadena de transport d'electrons, mentre que el complex V catalitza la síntesi d'ATP (Fig. 5). Els complexes mitocondrials I (NADH deshidrogenasa) i II (Succinat deshidrogenasa) capten electrons (e^-) del NADH i del succinat respectivament, metabòlits que han estat produïts prèviament pel catabolisme dels glúcids, dels greixos

i de les proteïnes. Els electrons captats es transfereixen de manera seqüencial al complex III (Coenzim Q), després al citocrom c, després al complex IV (Citocrom c oxidasa) i finalment es combinen amb oxigen i H^+ per formar aigua. Els complexes I, II i IV utilitzen l'energia de transferència dels electrons per bombejar protons cap a l'espai intermembrana, creant així un gradient electroquímic o $\Delta\Psi_m$. Aquest permetrà que tornin a entrar els H^+ a la matriu mitocondrial a través del complex V (ATP sintasa), que condueix a la unió d'ADP amb fosfat inorgànic per generar ATP, que sortirà al citosol mitjançant l'intercanvi per ADP a través de l'ANT (Wallace 1999).

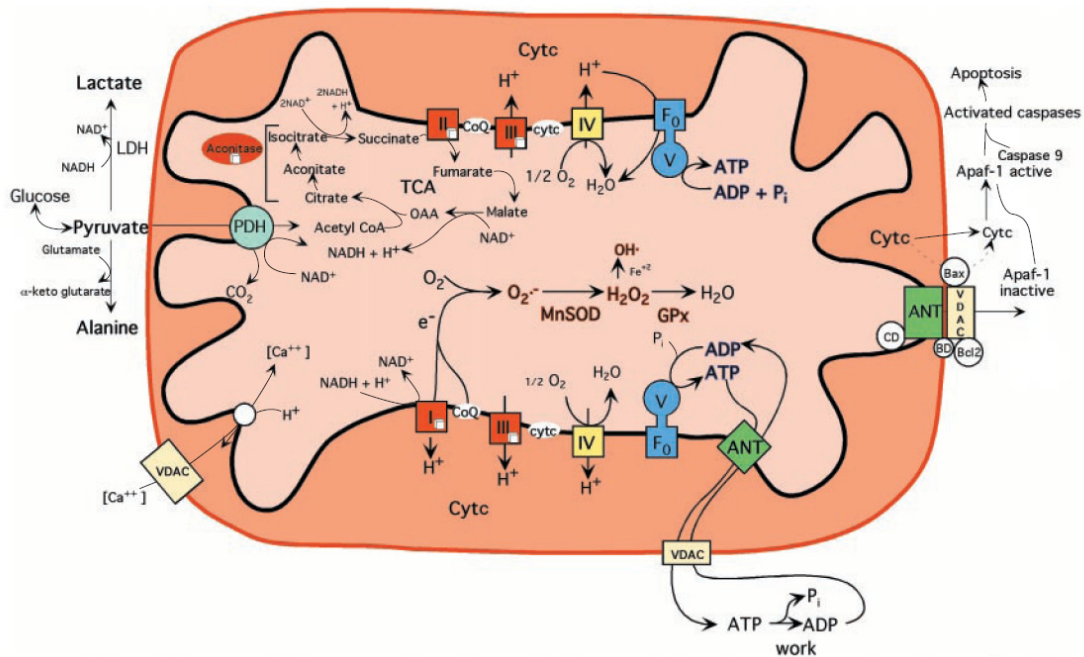


Figura 5. Cadena respiratòria mitocondrial i formació de ROS (Wallace 1999)

La fosforilació oxidativa és la major font endògena de ROS, que són productes tòxics produïts per la respiració cel·lular. Les ROS inclouen l'anió superòxid (O_2^-), el peròxid d'hidrogen (H_2O_2) i el radical hidroxil ($OH\cdot$) (Wallace 1999). La majoria de l'oxigen consumit durant la fosforilació oxidativa, és reduït a aigua en la cadena de transport d'electrons, però una petita proporció (1-2%) és transformada en O_2^- per la reducció parcial de l'oxigen. Aquest O_2^- degut a una dismutació espontània o per l'acció de la superòxid dismutasa (SOD) formarà el H_2O_2 , que es transformarà en H_2O mitjançant l'acció de la glutatió peroxidasa (GPx) o de la catalasa. En presència de metalls de transició reduïts i mitjançant la reacció de Fenton, el H_2O_2 també es pot convertir en l'ió $OH\cdot$, que és altament reactiu i tòxic (Fig. 6) (Valko *et al.* 2007). La formació de ROS es dona principalment en dos punts de la cadena de transport d'electrons, en el complex I i el III. Tanmateix, cal destacar que les ROS també es

poden formar per l'enzim α -cetoglutarat deshidrogenasa, que intervé en el cicle de Krebs, que es realitza en la matriu mitocondrial, o per les monoamino oxidases, que estan localitzades a la membrana mitocondrial externa (Turrens 2003).

La producció de ROS és inevitable durant el metabolisme oxidatiu, encara que es pot veure incrementada en condicions patològiques. La mitocondria té una gran capacitat d'eliminar ROS mitjançant la SOD, la catalasa i la GPx, però quan es dona un desequilibri entre la producció i l'eliminació de ROS o hi ha una reducció de la reparació de macromolècules oxidades, la cèl·lula pot patir dany oxidatiu (Andreyev *et al.* 2005). L'exposició crònica a les ROS pot produir un dany oxidatiu en les proteïnes (alterant enzims i proteïnes estructurals), lípids (alterant la integritat de les membranes mitjançant la peroxidació lipídica) i àcids nucleics de la cèl·lula. Una exposició aguda pot inactivar els centres ferro/sofre dels complexos I, II i III de la cadena respiratòria i de l'aconitasa del cicle de Krebs, provocant una aturada de la producció d'energia (Wallace 1999).

Les neurones són cèl·lules amb una gran demanda energètica i, per això, aquest problema es troba agreujat. S'ha proposat que l'acumulació de macromolècules oxidades pot alterar les funcions cel·lulars i desencadenar una progressiva mort cel·lular. Aquesta podria ser una de les bases etiològiques implicades en el desenvolupament de les malalties neurodegeneratives, al provocar una reducció crítica en el nombre de cèl·lules funcionals en determinades àrees cerebral (Mattson and Magnus 2006).

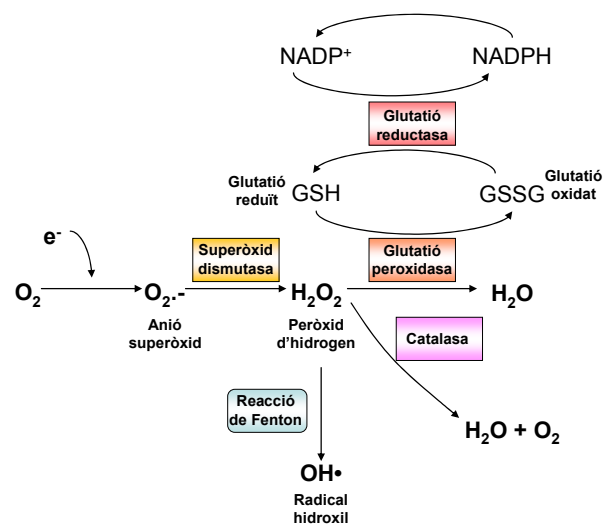


Figura 6. Vies de formació i d'eliminació de ROS

1.3. VIES DE SENYALITZACIÓ I MOLÈCULES PROMOTORES DE LA MCP EN NEURONES

La MCP és un procés essencial en el desenvolupament del sistema nerviós dels vertebrats, degut a que permet l'eliminació de les neurones supèrflues. Està demostrat que les neurones es generen en un excés i que aproximadament la meitat són eliminades abans de la formació del sistema nerviós central i perifèric (Levi-Montalcini 1987). La MCP s'inicia per l'activació d'un programa molecular intrínsec que va ser definit inicialment al nematode *Caenorhabditis elegans*, un organisme on 131 de les 1090 cèl·lules que es generen durant el desenvolupament són eliminades per MCP. Quatre components claus del programa molecular de la MCP a *C. elegans* són CED-3, CED-4, CED-9 i Egl-1 (Ellis and Horvitz 1986). En la MCP de mamífers hi participen molècules homòlogues a aquestes però a més, s'han identificat altres molècules implicades. Molts dels coneixements actuals sobre la MCP en neurones provenen dels estudis en diferents models *in vitro* d'inducció de l'apoptosi en cultius cel·lulars, com per exemple l'apoptosi provocada pel canvi d'un medi de cultiu despolaritzant a un de no despolaritzant en cèl·lules granulars de cerebel (CGC) (D'Mello *et al.* 1993).

A continuació es descriuen les diferents vies i molècules implicades en l'apoptosi neuronal. Per això, s'ha procedit a classificar-les en dos categories: la primera, on es descriuen les molècules efectores que actuen al final del procés produint la mort i, la segona, on es troben les molècules que actuen per sobre de les efectores regulant el procés de la MCP.

1.3.1. Molècules efectores de la MCP neuronal

En aquest apartat s'inclouen els diferents enzims responsables de les etapes finals de la MCP, on es dona una degradació de les proteïnes i de l'ADN, ja siguin proteases, com les caspases o les calpaïnes, o DNases, com l'AIF-Endo G o la CAD (*Caspase-activated DNase*).

1.3.1.1. Les caspases

Les caspases són una família de proteases que actuen a nivell de cisteïna i que, en mamífers, són les homòlogues del CED-3. Aquestes proteases són sintetitzades en totes les cèl·lules com zimogens (precursors inactius) i reben la denominació de procaspases. Les procaspases es tallen en resposta a senyals apoptòtics i passen a formar heterodímers de dues subunitats petites i dues subunitats grans, que és la forma activa de l'enzim (Fig. 7).

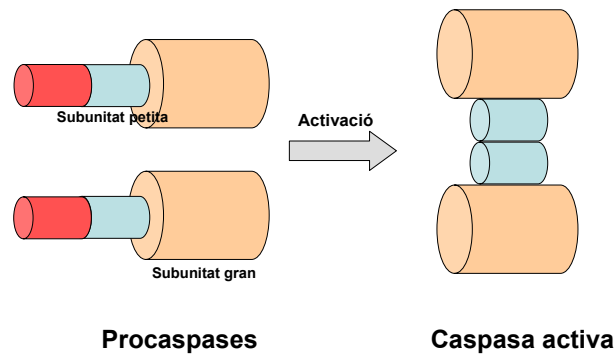


Figura 7. Mecanisme d'activació de les caspases

Fins l'actualitat s'han descobert 12 caspases en humans, les quals es divideixen en dos grups: les iniciadores i les efectores. Les iniciadores inclouen la caspasa 2, 8, 9 i 10, que es poden activar a elles mateixes. Un cop activades inicien una cascada que activa les caspases efectores que inclouen la 3, 6 i 7. Aquestes últimes també s'anomenen executores i són les responsables de processar una gran varietat de substrats cel·lulars, alterant així el funcionament de la cèl·lula, fet que condueix a la mort. Entre alguns dels seus substrats, es troba la ICAD (*Inhibitor of caspase-activated DNase*) que inhibeix la CAD, que és un enzim amb activitat DNasa causant de la fragmentació internucleosomal típica de l'apoptosi. La resta de caspases no intervenen en l'apoptosi, sinó en el processament de les citoquines proinflamàtòries, d'aquí el nom de caspases inflammatòries (Cohen 1997).

L'activació de les caspases té lloc principalment a través de dues vies, la via extrínseca, que s'activa quan són les condicions extracel·lulars les que determinen que la cèl·lula ha de morir, i la via intrínseca, que s'activa quan s'altera la permeabilitat mitocondrial (Fig. 8).

• La via extrínseca o via dels receptors de mort

Aquesta via es iniciada per la unió d'un determinat lligand extracel·lular, com $TNF\alpha$ (*Tumor necrosis factor α*) o FasL (*Fas ligand*), al seu receptor, TNFR (*Tumor necrosis factor receptor*) o Fas, respectivament. Aquests receptors es troben ancorats a la membrana citoplasmàtica, i es

caracteritzen per tenir un domini de mort (DD, *death domain*) en la seva part citoplasmàtica. Un cop s'uneix el lligand, els receptors trimeritzen i s'activen, conduint al reclutament de proteïnes adaptadores, com FADD (*Fas-associated with death domain*), que a través dels seus dominis efectors de mort (DED, *death effector domain*) s'uneixen als DD dels receptors. Posteriorment, els DED de les proteïnes adaptadores s'uneixen als DED de la procaspasa 8 i/o 10, formant el complex DISC (*Death-inducing signalling complex*), que permet que les procaspases estiguin prou juntes perquè s'autoactivin elles mateixes i així puguin activar les caspases efectores 3 i 7 (Barnhart *et al.* 2003). També s'ha demostrat que si la formació de DISC és petita i, per tant, insuficient per induir directament l'activació de la caspasa 3 o 7, la caspasa 8 pot tallar la proteïna proapoptòtica Bid (*BH3-interacting domain death agonist*) per formar tBid. La forma truncada de Bid es transloca a mitocondria on desencadena l'alliberament de citocrom c, que induirà l'activació de la caspasa 3 (Li *et al.* 2002b). Així doncs, tBid seria un nexa d'unió entre la via extrínseca i la intrínseca.

• La via intrínseca o mitocondrial

Aquesta via pot ser iniciada per diferents estímuls proapoptòtics, com poden ser el dany de l'ADN o l'estrès oxidatiu. Aquests estímuls condueixen al trencament de l'homeòstasi cel·lular i a la translocació de molècules proapoptòtiques, com Bax, cap al mitocondri on provocaran un augment de la seva permeabilitat (veure apartat 1.2.1.). Així doncs, es donarà un alliberament de citocrom c de l'espai intermembrana mitocondrial cap al citosol, on s'unirà a Apaf-1 (*Apoptotic protease-activating factor-1*), que és una proteïna adaptadora homòloga a CED-4 de *C. elegans*, i això facilitarà la unió d'ATP o de dATP que provocarà l'oligomerització d'Apaf-1 en un heptàmer que permet el reclutament de la procaspasa 9. El complex format per citocrom c, Apaf-1, ATP o dATP i procaspasa 9 és conegut com apoptosoma. Aquest permet que s'aproximin i oligomeritzin varies procaspases 9, conduint així a la seva activació. La caspasa 9 posteriorment activarà les caspases executores 3 i 7, les quals a la seva vegada activaran a la també executora caspasa 6 (Jiang and Wang 2000).

El RE també pot intervenir en l'activació de les caspases, ja que unida a la seva cara citosòlica s'hi troba la caspasa 12. Aquesta en resposta a la sortida de calci s'activarà, es creu que mitjançant el membre de la família Bcl2 Bim, i provocarà l'activació d'altres caspases i d'altres vies de mort mitocondrials (Morishima *et al.* 2004).

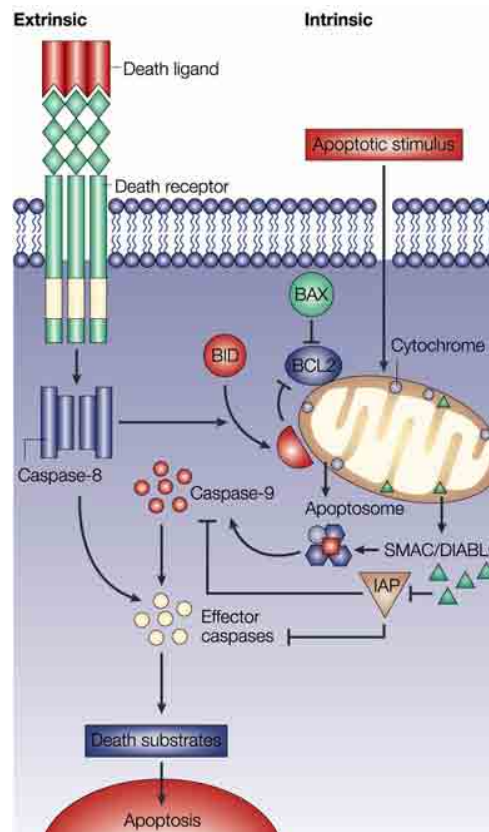


Figura 8. Vies d'activació de les caspases

· Reguladors de la mort cel·lular induïda per caspases

Unes de les proteïnes involucrades en la regulació de les caspases són les IAP (*Inhibitor of apoptosis proteins*), que van ser descobertes en baculovirus, i de les quals s'han identificat 8 tipus diferents en humans: c-IAP1, cIAP-2, NAIP, survivin, XIAP, Bruce, ILP-2 i Livin. Totes es caracteritzen per tenir un o més dominis BIR (*Baculovirus IAP repeat*), que són els que permeten la seva unió amb les caspases per inhibir-les (Prunell and Troy 2004). Aquesta inhibició de les caspases pot desfer-se a través de les proteïnes SMAC/Diablo (*Second mitochondrial-derived activator of caspases/direct IAP binding protein of low pI*) o HtrA2/Omi. La SMAC/Diablo

és una proteïna proapoptòtica que es troba a l'espai intermembrana mitocondrial, que conté un domini que li permet unir-se als dominis BIR de les IAP i això permet que s'activin les caspases (Shiozaki *et al.* 2003). La HtrA2/Omi és una proteïna amb activitat proteasa de serines, que també es troba localitzada a la mitocòndria, i que també té un domini d'unió a les IAP (Suzuki *et al.* 2001). A diferència de la SMAC/Diablo, la HtrA2/Omi talla les IAP i les deixa inactives (Yang *et al.* 2003). També s'ha demostrat que pot induir mort independent de caspases a través de la seva activitat proteasa, i això es dona independentment de la seva capacitat d'unir-se a IAPs (Suzuki *et al.* 2001).

Malgrat que el tipus de MCP que es dona més freqüentment és l'apoptosi clàssica, on les principals proteïnes implicades són les caspases i la DNasa CAD, existeixen altres tipus de proteases i DNases, que a banda de poder intervenir en l'apoptosi clàssica regulant a les anteriors, poden ser responsables d'altres tipus de MCP. Que es doni un tipus de mort o un altre, ve determinat per la rapidesa i la disponibilitat dels diferents programes de mort i encara que es puguin activar a la vegada diferents programes, només és evident la via de mort més ràpida i efectiva (Bursch 2001). A continuació es revisaran diferents proteases i DNases que intervenen en els diferents tipus de MCP independents de caspases, algunes de les quals són alliberades per la mitocòndria, però altres provenen dels lisosomes o estan controlades pel RE (Fig. 9).

1.3.1.2. AIF i Endonucleasa G

AIF és una flavoproteïna de 67 kDa que normalment es troba localitzada en la mitocòndria (Cregan *et al.* 2004), i que intervé en el tipus de MCP similar a l'apoptosi (veure apartat 1.1.2.2.). AIF conté un domini d'unió a FAD (*Flavin adenine dinucleotide*), que és similar al de l'oxidoreductasa bacteriana. Això fa pensar que en condicions fisiològiques AIF té una funció oxidoreductasa. El ratolí mutant *Harlequin*, que presenta una disminució severa d'AIF degut a una inserció proviral en el seu gen, és més sensible a l'estrès oxidatiu, suggerint que AIF podria tenir un paper com a *scavenger* de ROS (Klein *et al.* 2002). En cultius neuronals, estímuls apoptòtics com l'estrès oxidatiu, el dany de l'ADN o l'increment de calci intracel·lular, condueixen a la sortida d'AIF de la mitocòndria i a la seva translocació cap al nucli, on induïx condensació de la cromatina i fragmentació de l'ADN. AIF és capaç d'unir-se a l'ADN de manera independent de la seqüència i aquesta unió és necessària perquè es doni la

fragmentació (Ye *et al.* 2002), que genera fragments de mida gran (superiors als 50 kpb), diferents als generats en l'apoptosi clàssica que són de 100-200 bp (Susin *et al.* 1999). La translocació d'AIF al nucli també s'ha detectat en diferents models animals de neurodegeneració (Cregan *et al.* 2004). Els efectes proapoptòtics d'AIF estan controlats per la proteïna antiapoptòtica Hsp70 (*Heat shock protein 70*), que pot interactuar amb AIF i bloquejar-la (Ravagnan *et al.* 2001). El mecanisme pel qual AIF s'allibera de la mitocòndria encara no està clar, però varies evidències apunten a que la PARP-1 (*Poly(ADP-ribose) polymerase-1*) hi està implicada. La PARP-1 és una proteïna nuclear que normalment participa en la reparació de l'ADN, però la seva sobreactivació condueix a l'alliberament d'AIF i això succeeix sense la necessitat de que s'activin les caspases (Yu *et al.* 2002). Això es contradiu amb treballs on s'ha detectat que en resposta a certs estímuls l'alliberament d'AIF està per sota de la sortida de citocrom c, i que requereix de l'activació de caspases (Arnoult *et al.* 2003). Així doncs, sembla que AIF en certs paradigmes pot actuar com una resposta addicional per facilitar l'apoptosi dependent de caspases, mentre que en altres pot provocar l'apoptosi independentment de les caspases (Cregan *et al.* 2004).

AIF encara que és necessari per la fragmentació de l'ADN, és incapaç de trencar-lo per si mateix, fet que indica que ha de reclutar alguna endonucleasa perquè dugui a terme la fragmentació (Susin *et al.* 1999). Una possible candidata era l'Endo G, una nucleasa que com AIF es troba en la mitocòndria en condicions fisiològiques, i que durant l'apoptosi es pot translocar a nucli i causar fragmentació de l'ADN de manera independent de caspases. En estudis d'interacció es va determinar que aquestes dues proteïnes interactuen en *C.elegans*, però no en mamífers, dades que suggereixen que en mamífers la fragmentació d'ADN mitjançada per AIF requereix alguna altra endonucleasa. Així doncs, tant AIF com l'Endo G poden promoure la fragmentació de l'ADN de manera independent entre elles i també de manera independent a les caspases (Li *et al.* 2001).

1.3.1.3. HtrA2/Omi

Com s'ha esmentat anteriorment, HtrA2/Omi és una proteïna mitocondrial que participa en la regulació de la mort dependent de caspases, però que també pot actuar com una proteïna efectora en la MCP similar a la necrosi. Aquesta funció és independent de la seva activitat inhibidora de les

IAP, i té lloc a través de la seva activitat proteasa (Suzuki *et al.* 2001). No obstant, és difícil treure conclusions definitives sobre la contribució exacta de HtrA2/Omi en la mort cel·lular, degut a que la disminució de la seva expressió influeix tant en la seva funció fisiològica quan es troba en mitocòndria, com en el seu paper en la mort quan es troba a citoplasma (Saelens *et al.* 2004).

1.3.1.4. Les catepsines

Les catepsines són enzims proteolítics lisosomals amb una baixa especificitat de substrat, que en condicions fisiològiques es troben dins els lisosomes, però que en resposta a diferents senyals es poden alliberar al citoplasma i provocar la mort (Chwieralski *et al.* 2006). Durant molt temps es va considerar que els lisosomes només intervenien en la necrosi i l'autofàgia i que el seu paper en l'apoptosi es limitava a la digestió dels cossos apoptòtics (Ferri and Kroemer 2001). Actualment es creu que també intervenen en les vies de senyalització que regulen diferents models d'apoptosi, i que el factor que determina que es doni necrosi o apoptosi és la magnitud de la permeabilització dels lisosomes i la conseqüent quantitat de catepsines alliberades al citosol. Un trencament total de l'orgànul amb un gran alliberament de catepsines conduirà a una mort no regulada necròtica, en canvi una permeabilització parcial i selectiva conduirà a l'apoptosi (Li *et al.* 2000). A diferència d'altres vies, es creu que les catepsines no intervenen en l'apoptosi fisiològica que es dona durant el desenvolupament del sistema nerviós central, però en canvi es creu que si ho fan en diferents situacions patològiques (Yamashima *et al.* 1998).

Les catepsines es sintetitzen com a zimogens, que són glicosilats posttraduccionalment i dirigits cap als lisosomes, on aquests proenzims es processen i s'activen. Existeixen tres tipus de catepsines segons el seu residu catalític: proteases de cisteïna (catepsines B, C, H i L entre altres), proteases de serina (catepsines A i G) i proteases d'aspartat (catepsines D i E). Les catepsines B, D i L són les més abundants i s'expressen de manera ubiqua, a la vegada que juguen un paper important en la regulació de l'apoptosi (Chwieralski *et al.* 2006).

L'alliberament de les catepsines dels lisosomes cap al citoplasma és una condició necessària perquè intervinguin en la regulació de l'apoptosi. S'han descrit diferents mecanismes que condueixen a la permeabilització controlada i selectiva dels lisosomes. Un dels mecanismes és l'acumulació d'esfingosina

dins els lisosomes, fet que condueix a la permeabilització a través d'un mecanisme similar a l'acció d'un detergent (Kagedal *et al.* 2001). Un altre mecanisme podria ser la generació de ROS, que porta a un alliberament del contingut lisosomal possiblement com a conseqüència de processos oxidatius intralisosomals catalitzats pel ferro. A més, els enzims lisosomals promouen la generació de ROS mitocondrial, conduint a una retroalimentació que provocarà més permeabilització dels lisosomes (Zhao *et al.* 2003). També s'ha demostrat que el H₂O₂ pot induir el trencament dels lisosomes indirectament a través de la fosfolipasa A2, que provoca la desestabilització de les membranes dels orgànuls intracel·lulars, com els lisosomes o les mitocòndries, per la degradació dels fosfolípids de membrana (Zhao *et al.* 2001). Finalment, un altre possible mecanisme seria la translocació de membres proapoptòtics de la família Bcl2 a la membrana lisosomal, on podrien induir la formació de porus per mecanismes similars als que utilitzen en la mitocòndria (Zhao *et al.* 2001). Cal també esmentar que la Hsp70 forma part de la membrana lisosomal i que la seva disminució condueix a l'alliberament del contingut lisosomal (Nylandsted *et al.* 2002).

Actualment està acceptat que els lisosomes tenen un paper important en l'apoptosi, però els seus mecanismes i les seves interaccions amb altres vies apoptòtiques encara no estan clars. En molts casos la permeabilització lisosomal és un dels passos inicials que condueixen a l'apoptosi, en alguns models l'activació de l'apoptosi depèn únicament de les catepsines, però en d'altres són necessàries tant les catepsines com les caspases. Existeixen diferents hipòtesis que explicarien com les catepsines promourien l'apoptosi al ser alliberades al citosol. Un possible mecanisme seria el processament directe de les caspases conduint a la seva activació. Un altre, més probable, seria provocar la disfunció mitocondrial per conduir a l'alliberament de factors apoptòtics. Un candidat a realitzar aquesta acció és Bid, ja que després de l'alliberament lisosomal, es processada i es transloca a mitocòndria. També s'ha demostrat que les catepsines poden tallar i activar a Bax, provocant la seva translocació a la mitocòndria, on Bax conduiria a l'alliberament d'AIF (Guicciardi *et al.* 2004). Cal esmentar que la catepsina B és capaç de translocar-se al nucli i actuar com una proteasa efectora (Roberts *et al.* 1997). Així doncs, podem concloure que les catepsines no provoquen la MCP per una única via, sinó per múltiples vies que es poden superposar.

1.3.1.5. Les calpaïnes

Les calpaïnes són unes proteases de cisteïna citoplasmàtiques que s'activen pel calci intracel·lular, així doncs la seva activació està íntimament lligada al RE, ja que aquest és un orgànel que participa en la regulació del contingut de calci intracel·lular. Les dues formes predominants de calpaïnes en mamífers són les ubiques μ -calpaïnes i m-calpaïnes, que tenen els mateixos substrats, però que s'activen a concentracions baixes (μM) o altes (mM) de calci respectivament. Totes dues isoformes són heterodímers, amb una subunitat de 80 kDa i una de 29 kDa, que es troben dins la cèl·lula com a proenzims. Mitjançant un procés autocatalític es transformen en la forma activa, formada per una subunitat de 78 kDa i una de 18 kDa, on la subunitat gran conté el domini d'activitat proteasa i d'unió a calci, i la petita té una regió rica en glicines que permet interaccionar amb la membrana (Aoki *et al.* 1986). Fisiològicament, l'activitat d'aquestes calpaïnes també està regulada pel seu inhibidor endogen, anomenat calpastatin (Wang 2000).

Els primers estudis sobre calpaïnes es van centrar en el seu paper en la necrosi, però posteriorment es va descobrir que també participen en l'apoptosi, per exemple en el model apoptòtic de deprivació de potassi en CGC (Nath *et al.* 1996). La intervenció de les calpaïnes en l'apoptosi, es va descobrir inicialment a l'estudiar l'expressió de l' α -espectrina, que és una proteïna reguladora del citoesquelet. Aquesta proteïna és un substrat tant de les caspases com de les calpaïnes, però els productes generats per unes o altres tenen un mida diferent. Això va permetre demostrar que totes dues proteases poden activar-se simultàniament, és a dir, que les calpaïnes també actuen durant l'apoptosi. A més de l' α -espectrina, aquests dos tipus de proteases comparteixen altres substrats com: la proteïna Tau, que és una proteïna que s'uneix als microtúbuls i els estabilitza, la PARP, que intervé en la reparació de l'ADN, les quinases dependents de calmodulina, l'APP (*Amyloid precursor protein*), Bax, Bcl-2 o p35 entre altres (revisat per Wang 2000). També s'ha demostrat que l'activació de calpaïnes pot donar lloc a l'alliberament lisosomal de catepsines (Yamashima *et al.* 1998) i que en alguns models són capaces de provocar la mort de manera independent de caspases (Mathiasen *et al.* 2002). Així doncs, com en el cas de les catepsines, podem concloure que les calpaïnes a més de provocar la mort per elles mateixes, també poden regular i interaccionar amb altres vies.

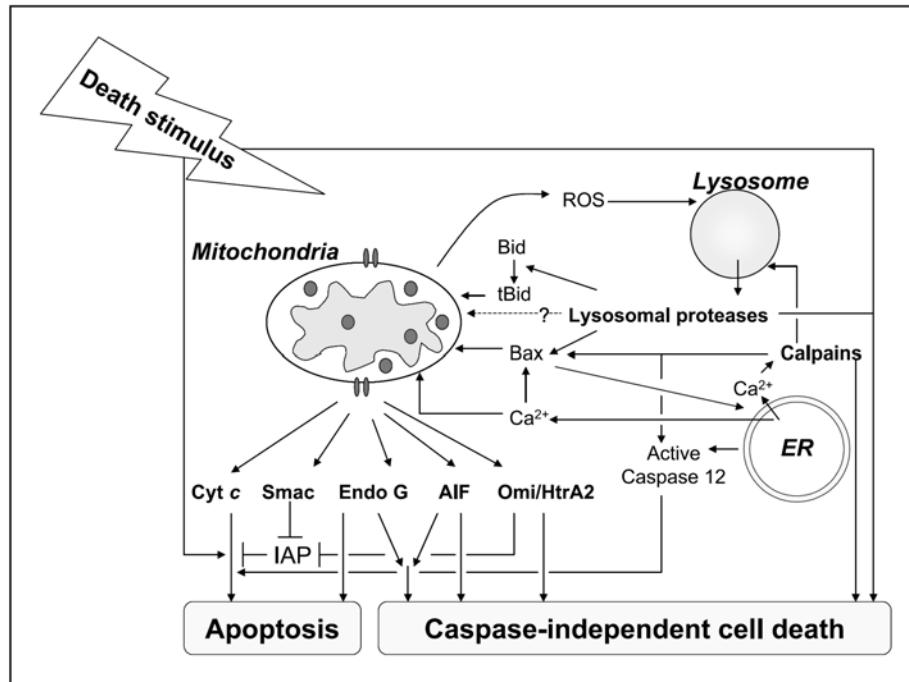


Figura 9. Interacció de les diferents vies efectores de la MCP (Broker *et al.* 2005)

1.3.2. Vies i molècules reguladores de la MCP neuronal

En aquest apartat s'inclouen les diferents molècules i vies reguladores que actuen per sobre de les molècules efectores per activar-les i per tant desencadenar la MCP.

1.3.2.1. Els receptors de dependència

Els receptors de dependència són un grup creixent de receptors no relacionats estructuralment, que estan implicats en diferents processos fonamentals pel desenvolupament del sistema nerviós, com són la diferenciació i la supervivència neuronal o l'orientació dels axons, però que en absència de lligand poden promoure la MCP. Alguns dels membres d'aquesta família són DCC i UNCH5, que són receptors de la netrina-1, RET, que és receptor de la família GDNF (*Glial cell line-derived neurotrophic factor*), i el Ptc, que és receptor de *Sonic hedgehog*. Una de les característiques que defineix a aquests receptors és que poden ser substrats de caspases, les quals els tallen en absència de lligand. Aquest tall té lloc en el domini citoplasmàtic dels receptors i té com a resultat l'exposició o alliberació d'un domini proapoptòtic anomenat ADD (*Addiction/dependence domain*), que és requerit i de vegades suficient per induir la MCP (Porter and Dhakshinamoorthy 2004). L'activitat de

les caspases és necessària per la MCP induïda per aquests receptors, ja que s'ha demostrat que en presència de inhibidors de caspases, fins i tot en absència de lligand, són incapaçs de provocar mort. La mutació del lloc de trencament per caspasa inhibeix la mort, confirmant la necessitat del processament per caspases (Llambi *et al.* 2001). Diferents evidències porten a pensar que la caspasa 3 és de particular importància (Porter and Janicke 1999), encara que no es pot descartar la participació d'altres caspases. Es creu que en absència d'unió de lligand, el receptor pateix un canvi de conformació que provoca el reclutament de la procaspasa 9, que després d'autoactivar-se activa a la caspasa 3. Els esdeveniments que es donen per sota de l'activació de les caspases i que condueixen a la mort, no són del tot coneguts i poden variar entre els diferents receptors (Liu *et al.* 2002).

1.3.2.2. Proteïnes de la família Bcl-2

Els membres de la família Bcl-2 són uns reguladors crítics de la MCP. En mamífers s'han descrit uns 25 membres, els quals comparteixen almenys un dels quatre dominis d'homologia Bcl-2 (BH), anomenats BH1, 2, 3 i 4. Aquesta família inclou un grup de membres antiapoptòtics i dos grups de membres proapoptòtics: les proteïnes BH3 i el grup de Bax (Cory and Adams 2002).

El grup de membres antiapoptòtics està format per Bcl2, Bcl-X_L, Bcl-w, A1 i Mcl1 (*Myeloid cell leukemia 1*), que són els homòlegs funcionals de CED-9 de *C.elegans*, i tots posseeixen els quatre dominis BH. Bcl2, Bcl-x_L i Bcl-w tenen un domini carboxiterminal hidrofòbic que els ajuda a dirigir-se a tres membranes intracel·lulars: la membrana externa mitocondrial, la del RE i a l'embolcall nuclear. Bcl2 és una proteïna integral de membrana, fins i tot en cèl·lules sanes (Janiak *et al.* 1994), mentre que Bcl-x_L i Bcl-w només s'associen amb la membrana després d'un senyal apoptòtic, indicant que pateixen un canvi conformacional (Wilson-Annan J. and Huang D., resultats no publicats). L'estructura tridimensional d'aquestes tres proteïnes està ben conservada i inclou un solc hidrofòbic format per residus dels dominis BH1, 2 i 3, que pot unir-se al domini BH3 de les proteïnes BH3 (Petros *et al.* 2001). Les menys estudiades A1 i Mcl1 sembla que tenen una activitat antiapoptòtica més dèbil i una seqüència més divergent, fets que poden ser indicatius de funcions addicionals (Cory and Adams 2002).

Les proteïnes BH3, com el seu nom indica, només contenen el domini BH3 i sembla que el seu paper és exercir de sentinelles, que provoquen la mort en resposta a senyals de desenvolupament o de dany intracel·lular (Huang and Strasser 2000). En mamífers s'han descrit vuit membres: Bad (*Bcl2 antagonist of cell death*), Bid, Bik (*Bcl2-interacting killer*), Bim (*Bcl2-interacting protein*), Bmf (*Bcl2-modifying factor*), Hrk/DP5 (*Harakiri*), Noxa i Puma (*p53-upregulated modulator of apoptosis*), que són els homòlegs d'EGL-1 en *C.elegans*. Amb la possible excepció de Bid i Bim, la resta es creu que actuen per unió i neutralització dels membres antiapoptòtics. Inicialment es creia que les proteïnes BH3 un cop activades s'unien inespecíficament a tots els membres antiapoptòtics, però posteriorment es va descobrir que existeixen diferents patrons d'unió. D'aquesta manera, Bim i Puma poden unir-se a tots els membres antiapoptòtics, Bad i Bmf s'uneixen preferentment a Bcl2, Bcl-x_L i Bcl-w, Bik i Hrk/DP5 a Bcl-x_L, Bcl-w i A1, i Noxa només a Mcl1 i A1 (Fig. 10). Això pot explicar la baixa activitat proapoptòtica d'algunes de les proteïnes BH3 (Chen *et al.* 2005). Tot i això, les proteïnes BH3 no són capaces de produir la mort en absència de Bax i Bak, això indica que actuen per sobre d'aquestes en la mateixa via (Zong *et al.* 2001). Aquest grup de proteïnes normalment es mantenen controlades per diferents mecanismes, per exemple Bad després de ser fosforilat per l'AKT/PKB (*AKT/Protein kinase B*) queda segrestat per la proteïna estructural 14-3-3, Bim i Bmf estan segrestats per proteïnes del citoesquelet, Bid és inactiu fins que no es talla per formar tBid i en canvi Noxa, Puma i DP5 és controlen primàriament a nivell de transcripcional (revisat per Cory and Adams 2002). Sembla que l'homeòstasi tissular depèn del balanç de membres antiapoptòtics i de proteïnes BH3.

Bid, a diferència de la resta que actuen unint-se i neutralitzant l'efecte dels membres antiapoptòtics, sembla que provoca la mort a través de l'activació de Bax i Bak, encara que també pot inactivar als membres antiapoptòtics (Zong *et al.* 2001). El seu domini BH3 es troba amagat i perquè sigui accessible és necessari que la proteïna sigui tallada en la seva regió aminoterminal, tall que pot ser dut a terme per caspases. Un cop tallada, migra a la mitocondria i un cop allà, si troba Bax o Bak, provoca ràpidament l'alliberament de citocrom c i l'apoptosi (Madesh *et al.* 2002). Pot ser que Bid actuï induint l'oligomerització de Bax o Bak per formar porus a la membrana (Grinberg *et al.* 2002).

Així doncs, les proteïnes BH3 es podrien dividir en repressores, que s'uneixen i neutralitzen l'acció de les antiapoptòtiques permetent indirectament l'activació de Bax o Bak, i en activadores, com Bid i Bim, que activen directament a Bax o Bak (Kuwana *et al.* 2005).

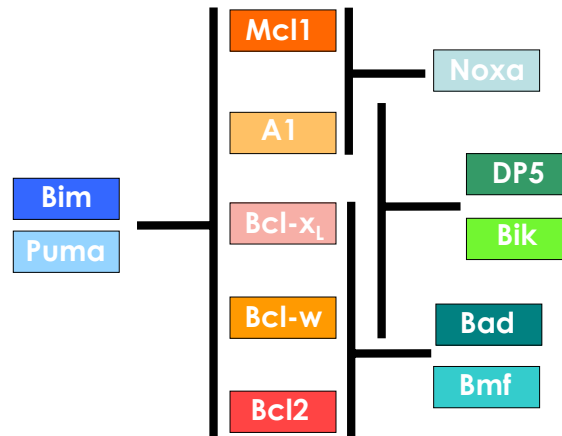


Figura 10. Especificitat de les proteïnes BH3

L'últim grup de membres de la família Bcl2 és el format per Bax i Bak, tots dos amb expressió ubiqüa, i pel poc estudiat Bok que es troba en els teixits reproductors. Aquestes proteïnes tenen tots els dominis BH, excepte el 4. La inactivació de Bax té un efecte molt lleuger sobre la mort i la disrupció de Bak no té cap efecte, en canvi la inactivació de tots dos provoca una inhibició de la mort en molts teixits, per tant sembla que la presència d'un dels dos és essencial per provocar la MCP (Wei *et al.* 2001). Es creu que Bax i Bak actuen principalment sobre la mitocondria, però també podrien actuar sobre el RE regulant la sortida de calci i l'activació de la caspasa 12 (Scorrano *et al.* 2003). Bax normalment es troba al citosol en forma de monòmer, però durant l'apoptosi canvia de conformació, s'integra a la membrana externa mitocondrial i oligomeritza (Antonsson *et al.* 2001). En canvi Bak és una proteïna oligomèrica integral de la membrana mitocondrial, però durant l'apoptosi pateix canvis conformationals que la porten a formar agregats més grans (Griffiths *et al.* 1999). Els oligòmers de Bax i Bak es creu que provoquen o contribueixen a la permeabilització de la membrana externa mitocondrial permetent la sortida de factors apoptogènics (veure apartat 1.2.1.). En el model apoptòtic de privació de potassi en CGC, Bax és el membre proapoptòtic Bcl2 més important, ja que la seva deficiència prevé de la mort cel·lular, i en canvi la deficiència de Bak, Bid, Bim i Bad no confereixen

protecció o almenys aquesta no és duradora (Miller *et al.* 1997; Putcha *et al.* 2001).

Així doncs, es pot resumir que el paper dels membres antiapoptòtics, com Bcl2, és mantenir la integritat de la membrana, ja que quan heterodimeritzen amb Bax i Bak impedeixen que aquests formin porus en la membrana externa mitocondrial. En canvi després d'un estímul apoptòtic les proteïnes BH3 s'activaran i ja sigui heterodimeritzant amb els membres antiapoptòtics l, per tant, provocant la seva separació de Bax o Bak que podran oligomeritzar, o a través de l'activació directa de Bax o Bak, en el cas de Bid i Bim, s'aconseguirà que Bax i Bak provoquin un augment de la permeabilitat mitocondrial que resultarà en un alliberament de factors apoptogènics que acabaran provocant la mort. Per tant, el balanç entre proteïnes proapoptòtiques i antiapoptòtiques serà el que determinarà que la cèl·lula visqui o mori (Fig. 11).

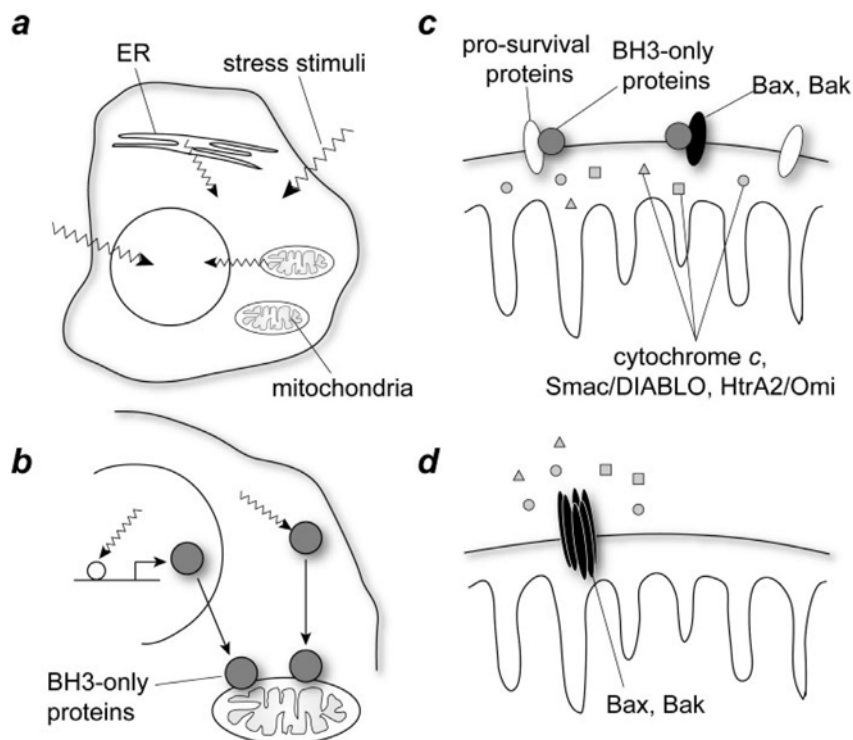


Figura 11. Paper dels membres de la família Bcl2 en la regulació de la permeabilitat de la membrana externa mitocondrial (Shibue and Taniguchi 2006)

1.3.2.3. Par-4

L'activació de Par-4 (*Prostate apoptosis response-4*) és un dels primers senyals que apareixen durant l'apoptosi en neurones i la seva expressió es troba augmentada en cervells de malalts d'Alzheimer i de Parkinson (Duan *et al.* 1999;Guo *et al.* 1998;Sells *et al.* 1994). S'expressa de manera ubíqua i interacciona amb un gran nombre de proteïnes a través del seu domini LZ (*Leucine zipper*), que és essencial per la seva acció proapoptòtica (Guo *et al.* 1998). Estudis de sobreexpressió de Par-4 demostren que el seu paper en l'apoptosi és, més que induir-la, facilitar-la, ja que regula el balanç de senyals pro i antiapoptòtics (Boehrer *et al.* 2006). Està descrit que Par-4 actua prèviament a la disfunció mitocondrial i a l'activació de les caspases i que facilita tant la via extrínseca com la intrínseca. Entre les seves accions es troben la translocació de Fas i Fas L a la membrana plasmàtica, impedir la funció antiapoptòtica de NF- κ B (*Nuclear factor kappa-B*) a través de la inhibició del seu activador PKC- ζ (*Protein kinase C-zeta*), fet que també provocarà una activació de la p38, disminuir la transcripció del gen de la proteïna Bcl2 a través de la interacció amb la proteïna WT1 (*Wilm's tumor 1*) i disminuir les IAP (Mundle 2006).

1.3.2.4. La p53 i altres proteïnes relacionades

El gen supressor de tumors p53 codifica per una fosfoproteïna nuclear que té un paper clau en la regulació de la reparació de l'ADN, en la progressió del cicle cel·lular i en l'apoptosi. La p53 s'activa en resposta a diferents senyals d'estrès com el dany de l'ADN, la hipòxia, l'estrès oxidatiu o la depleció de ribonucleòtids entre altres (Ko and Prives 1996). La p53 exerceix la seva funció bàsicament a través de la transactivació dels seus gens diana (Bates and Vousden 1996), però també pot induir l'apoptosi mitjançant la repressió d'alguns gens específics (Miyashita *et al.* 1994) o a través d'interaccions directes amb altres proteïnes (Gottlieb and Oren 1998). Diferents estudis han demostrat que la p53 juga un paper important en la mort neuronal induïda per diferents estímuls. Mitjançant estudis amb *knockouts* i oligonucleòtids *antisense* de p53 s'ha detectat que l'eliminació o la neutralització d'aquesta proteïna protegeix de la mort provocada pel dany de l'ADN, per la isquèmia, per l'excitotoxicitat per kainat o pel tractament amb MPP+. En canvi en altres models d'apoptosi neuronal, com el de la deprivació de factors tròfics o de potassi o el

de l'estauroesporina, la mort es dona per mecanismes independents a p53. (Revisat per D'Mello and Chin 2005).

La proteïna p53 està dividida estructuralment i funcionalment en diferents dominis: el domini de transactivació a l'extrem aminoterminal, el domini d'unió a l'ADN a la zona central, el domini d'oligomerització que li permet formar tetràmers i un domini sense funció a l'extrem carboxiterminal (Levine 1997). La p53 té una vida mitja curta, ja que en situacions fisiològiques es ubiquïtinitzada i després degradada pel proteosoma. La proteïna responsable d'aquesta ubiquïtinització és la lligasa d'ubiquïtina Mdm2 (*Mouse double minute 2*) que, a més, a l'unir-se al domini de transactivació de la p53 no permet que aquesta faci la seva funció. Existeix una altra molècula inhibidora de la p53 anomenada Mdm4, la qual només actua interferint la funció de p53, a l'unir-se al domini de transactivació (Francoz *et al.* 2006).

Quan la cèl·lula pateix un estrès o un estímul genotòxic, l'ATM (*Ataxia-telangiectasia mutated*) o l'ATR (*A-T related kinase*) s'activen i directament fosforilen la p53 al residu serina 15 o indirectament, després d'activar la Chk2 o la Chk1 respectivament, fan que aquestes la fosforilin a la serina 23. Això provoca que s'alliberin Mdm2 i 4, fet que permet l'estabilització de la p53 i la seva entrada a nucli, on pot patir altres modificacions posttraduccionals, com acetilacions o sumolitzacions (*SUMO, Small ubiquitin related modifier*), a més de fosforilacions addicionals, que provoquen la seva activació. A l'extrem aminoterminal hi ha molts residus que poden ser fosforilats per diferents quinases com la CKII (*Casein Kinase II*), la JNK (*c-Jun NH₂ terminal kinase*) o la p38 entre d'altres, que s'afegeixen als esmentats anteriorment. En canvi, l'extrem carboxiterminal conté alguns residus que poden ser fosforilats i també altres que poden ser acetilats i sumolitzats. Els responsables d'aquestes acetilacions són dues HAT (*Histone acetyltransferases*), la CBP/p300 (*CREB binding protein/p300*) que acetila els residus lisina 373 i 382, i la PCAF (*p300/CBP associated factor*) que acetila la lisina 320. Aquestes proteïnes s'uneixen a p53 i actuen com coactivadors, ja que l'acetilació de la p53 afavoreix la seva unió a l'ADN. Aquest procés està controlat per les HDAC (*Histone deacetylases*) I, II i III que al desacetilar la p53 la inactiven (Revisat per Appella and Anderson 2001), entre les HDAC III es troba la SIRT1 (Luo *et al.* 2001) (veure apartat 1.4.6.). Oposadament, la p53 pot ser inhibida per la via de l'AKT/PKB o per la via de l'ERK (*Extracellular signal-regulated kinase*), totes dues, vies de supervivència activades per factors de creixement (Morrison *et al.* 2003).

Un cop activada, la p53 pot induir la reparació de l'ADN, l'aturada del cicle cel·lular o l'apoptosi. La seva regulació del cicle cel·lular ve donada principalment per l'activació del gen que codifica per la proteïna p21 (WAF1, Cip-1), la qual regula el cicle cel·lular a través de la inhibició de les CDK (*Cyclin-dependent kinases*), que són necessàries per la progressió del cicle cel·lular. La p21 també s'uneix al PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*), inhibint el seu paper com a cofactor necessari per l'activació de polimerases, però no el seu paper en la reparació de l'ADN (Deng *et al.* 1995; el-Deiry *et al.* 1993). La p53 també pot regular el cicle cel·lular a través de la transrepressió de la CDK1 (Cdc2, p34) i de la ciclina B1, o transactivant a la proteïna 14-3-3, que segresta el complex ciclina B1-CDK1 fora del nucli, i a la GADD45 (*Growth arrest and DNA damage inducible gene 45*) que és capaç de separar el complex ciclina B1-CDK1. Aquesta última també té una paper en la reparació de l'ADN, ja que participa en el mecanisme de reparació per escissió de nucleòtids (Revisat per Taylor and Stark 2001). Per últim, la p53 també és capaç d'induir l'apoptosi a través de diferents mecanismes. Per una banda pot activar l'expressió de dues proteïnes involucrades en la via extrínseca d'activació de caspases, com són Fas i el receptor de mort DR5 (Chandrasekaran and Richburg 2005), i per una altra, pot activar l'expressió de Bax, Puma, Noxa i Apaf-1, totes elles proteïnes que actuen en la via intrínseca (Lozano and Zambetti 2005). Paral·lelament, pot reprimir gens antiapoptòtics com Bcl2 (Wu *et al.* 2001) i de manera independent a la transcripció, p53 es pot translocar a mitocòndria on formarà complexes amb Bcl2 i Bcl-XL, induint així la permeabilització de la membrana mitocondrial externa (Moll *et al.* 2006). També cal afegir que pot activar altres gens de proteïnes involucrades en l'apoptosi com Perp o GAPDH (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) (Attardi *et al.* 2000; Chen *et al.* 1999) o inhibir l'activitat de proteïnes antiapoptòtiques com NF- κ B (Webster and Perkins 1999) (Fig. 12).

Recentment, s'han descobert dos gens amb una gran homologia estructural amb p53, els anomenats p63 i p73, que també codifiquen per dos factors de transcripció que tenen els mateixos dominis estructurals que p53. No obstant això, tant p63 com p73, tenen una major complexitat molecular, ja que mentre que el gen de p53 només produeix un ARN missatger, p63 i p73 expressen diferents variants de *splicing* que codifiquen per varies isoformes. A més, p63 i p73 es poden transcriure des d'un segon promotor, donant lloc a una forma truncada sense el domini aminoterminal transactivador. La forma completa de p73 (TAp73) activa molts dels gens diana de p53 i per tant activa

l'apoptosi. En canvi, la forma truncada ($\Delta Np73$), que és la predominant en neurones en desenvolupament, és neuroprotectora, degut segurament a que antagonitza les funcions de TAp73 i potser de p53 (Revisat per D'Mello and Chin 2005).

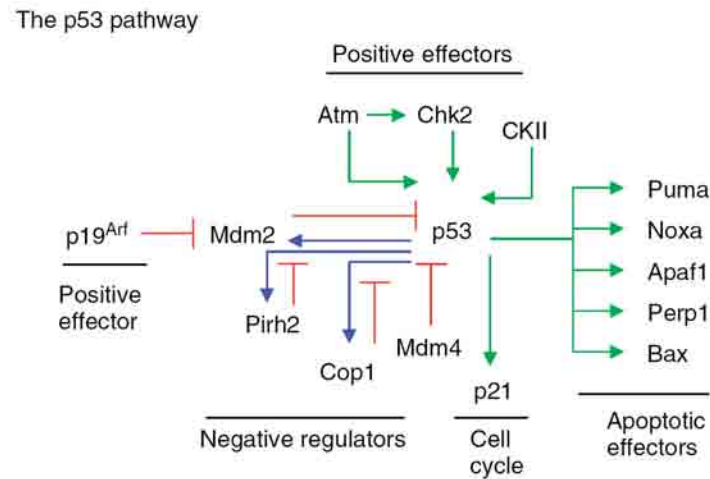


Figura 12. Regulació i efectes de la p53 (Lozano and Zambetti 2005)

1.3.2.5. GAPDH

Encara que més coneguda pel seu paper enzimàtic clau en la glicòlisi, la GAPDH és una proteïna complexa, localitzada en múltiples compartiments cel·lulars com el nucli, el citosol, la mitocòndria i la membrana plasmàtica, on participa en diverses funcions com l'endocitosi, la formació de microtúbuls, el transport de l'ARN de transferència i la replicació o reparació de l'ADN (Sirover 1999). Recentment, s'ha demostrat que la GAPDH pot estar involucrada en la promoció de l'apoptosi induïda per excitotoxicitat o per la citosina arabinosa en cultius de neurones, així com en alguns models de neurodegeneració *in vivo* (Tatton *et al.* 2000). En cultius de neurones tractades amb tòxics que produeixen dany de l'ADN, la condensació de la cromatina i la fragmentació nuclear va precedida per un augment de l'expressió de GAPDH i per la seva acumulació al nucli (Ishitani *et al.* 1996). Aquest augment de l'expressió de GAPDH es provocat per la p53 (Chen *et al.* 1999). Encara que no es coneix molt bé el mecanisme pel qual s'acumula GAPDH al nucli, estudis recents realitzats en cèl·lules no neuronals impliquen a un nou senyal d'exportació nuclear mediada per la CRM1/Exportin. Així, en condicions fisiològiques la GAPDH seria exportada fora del nucli, mecanisme que quedaria inhibit durant l'apoptosi. També cal dir, que la inducció de la GAPDH no es dona en tots els models d'apoptosi neuronal, com per exemple en la deprivació de potassi en CGC (Brown *et al.*

2004). Per últim, s'ha detectat que la GAPDH pot interaccionar amb proteïnes que formen agregats en diverses malalties neurodegeneratives, com per exemple la proteïna Huntingtina. Això porta a pensar, que pot ser que la GAPDH contribueixi a la patogènesi de malalties neurodegeneratives en humans (Burke *et al.* 1996).

1.3.2.6. Activació aberrant del cicle cel·lular

Durant l'apoptosi neuronal, sovint es dona una reactivació del cicle cel·lular, que pot contribuir a provocar la mort de les neurones durant el desenvolupament del cervell o durant la degeneració del cervell adult. Una de les característiques de les neurones diferenciades és que són postmitòtiques. Durant el desenvolupament del sistema nerviós central dels mamífers, les cèl·lules precursors neuronals proliferen i es diferencien a neurones dins de les zones germinals. Un cop els precursors neuronals surten del cicle cel·lular i entren dins l'estat postmitòtic, es transformen en neurones, que migren fora de les zones proliferatives i que es mantenen terminalment diferenciades fins la seva mort (Yoshikawa 2000). Un cop s'assoleix l'edat adulta, hi ha poca activitat neurogènica i aquesta queda restringida al *pool* de cèl·lules mare neurals del cervell. Per tant, la vida d'una neurona es correspon aproximadament a la vida de l'organisme, tret que aquesta mori per una lesió o una malaltia (Pevny and Rao 2003). Durant molt de temps es va pensar que les neurones un cop diferenciades no entraven mai més al cicle cel·lular i que les proteïnes del cicle cel·lular no s'expressaven en les neurones postmitòtiques. Contràriament a aquest dogma, moltes evidències indiquen que les neurones tenen la capacitat de reactivar el cicle cel·lular, però aquest fet enlloc de conduir a la proliferació neuronal, normalment condueix a l'apoptosi (Wartiovaara *et al.* 2002). La primera evidència *in vivo* que indicava que l'apoptosi podia ser el resultat de la reentrada aberrant al cicle cel·lular, venia de l'anàlisi d'un ratolí amb una disrupció del gen Rb (*Retinoblastoma protein*), que actua com a proteïna supressora de tumors, ja que arresta la cèl·lula en la fase G1 del cicle cel·lular. En aquests ratolins la síntesi d'ADN es donava juntament amb l'apoptosi, tant al sistema nerviós central com al perifèric (Jacks *et al.* 1992). Així doncs, aquest descobriment juntament amb altres, suggerien que els processos del cicle cel·lular estaven molt lligats a la mort de les neurones diferenciades i donaven peu a formular la hipòtesi que l'apoptosi pot ser el resultat d'un intent fallit de les neurones d'entrar al cicle cel·lular (Heintz 1993).

Els mecanismes relacionats amb el cicle cel·lular contribueixen a la mort neuronal en una gran varietat de models *in vitro* d'inducció d'apoptosi neuronal, que inclouen la deprivació de factors neurotròfics (Park *et al.* 1997), la manca d'activitat neuronal (Padmanabhan *et al.* 1999), el dany de l'ADN (Park *et al.* 1998), l'exposició al pèptid β -amiloide (Giovanni *et al.* 1999) i l'excitotoxicitat (Verdaguer *et al.* 2002). A més, també estan implicats en diferents malalties neurodegeneratives de ratolins i humans, com per exemple l'Alzheimer (Nagy *et al.* 1997).

La regulació del cicle cel·lular, igual que la de l'apoptosi, és un mecanisme altament conservat en les cèl·lules eucariotes. Un fet interessant és que tots dos processos comparteixen diferents molècules, com la Rb, el factor de transcripció E2F i la p53, i que en els dos processos les cèl·lules presenten similituds morfològiques, com l'arrodoniment cel·lular i la condensació de la cromatina. Això suggereix que tots dos processos podrien estar regulats per mecanismes similars. El cicle cel·lular es divideix en 4 fases: la G1 (*Gap 1*), on l'ADN es prepara per la seva replicació, la S (*DNA synthesis*), on es dona la replicació dels cromosomes, la G2 (*Gap 2*), on es reparen els errors produïts durant la replicació i la cèl·lula es prepara per la mitosis, i la M (mitosi), on es dona la repartició dels cromosomes i el citoplasma i que acaba amb la formació de les dues cèl·lules filles. La progressió a través de les fases està regulada per l'expressió, activació i inhibició seqüencial de les CDK (quinases de serina i treonina de ciclins), de les ciclins (que són les subunitats reguladores de les CDK) i de les CDKI (*Cyclin-dependent kinase inhibitors*). Les cèl·lules que surten del cicle cel·lular, com és el cas de les neurones, romanen en un estat quiescent anomenat G0. En les cèl·lules proliferatives, el progrés a través del cicle cel·lular està molt controlat per diferents punts de control, que funcionen com interruptors moleculars que asseguren que s'assoleixin els esdeveniments crítics de cada fase abans d'entrar a la següent. Les cèl·lules que queden arrestades als punts de control retornen a G0 i rediferencien o bé moren per apoptosi. Això últim és un mecanisme que assegura que les modificacions no reparables de l'ADN no passin a les cèl·lules filles.

Després d'un estímul mitogènic augmenta l'expressió de les ciclins D, les quals s'uniran i activaran la CDK4 i la CDK6, fet que permetrà a la cèl·lula sortir de G0 i entrar a G1. Més endavant s'activa la ciclina E, que activarà la CDK2. Tant aquest últim, com els complexos de la ciclina D amb la CDK4 i la 6, fosforilaran la Rb i altres proteïnes relacionades (p107, p130), que es trobaven

segrestant al factor de transcripció E2F, i això permetrà que aquest s'alliberi. Així E2F, que forma heterodímers amb els factors de transcripció DP, pot activar l'expressió dels seus gens diana, que inclouen gens involucrats en el cycle cel·lular que permeten el pas a la fase S, però també gens que intervenen en la reparació de l'ADN o en l'apoptosi. Els gens involucrats en el cycle cel·lular regulats per E2F són la ciclina A i la E, la CDK1/Cdc2 (*Cell division cycle 2*), el PCNA, la DNA pol- α (*DNA polymerase- α*) i la H2A (*Histone 2A*). El complex ciclina E-CDK2 permet el pas a la fase S, on s'activa el complex ciclina A-CDK2, que és necessari per la síntesi de l'ADN, i quan es completa la replicació, la ciclina A passa a formar un complex amb CDK1 que guia a la cèl·lula cap a la fase G2. Durant la transició G2/M la ciclina A es degrada i CDK1 s'associa amb la ciclina B, complex necessari per la progressió de la mitosis. La progressió del cycle cel·lular també està regulada a través de les CDKI, que inhibeixen l'activitat de les CDK i de les quals existeixen dues famílies. La família Kip/Cip, que inclou a p21, p27 i p57, que regulen l'activitat de les ciclins-CDK de la fase G1 a la vegada que al complex ciclina B/CDK1, i que ho fan unint-se al lloc d'unió a l'ATP. I la família INK4, que inclou a p16, p15, p19, i p18, que inhibeixen específicament a la CDK4 i la CDK6, i que ho fan bloquejant la unió de les ciclins. Com en el cas de les CDK i les ciclins, la expressió de les CDKI està altament controlada, tant a nivell de transcripció i traducció, com a nivell de proteolisi. La disminució de l'expressió de les CDK i les ciclins, així com la inducció de les CDKI, condueixen a la sortida del cycle cel·lular i a la diferenciació i permeten mantenir l'estat quiescent de les neurones (Fig. 13). (Revisat per Becker and Bonni 2004).

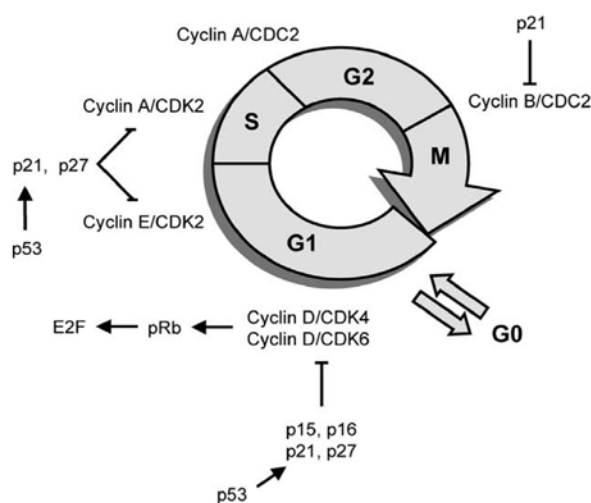


Figura 13. Regulació del cycle cel·lular (Becker and Bonni 2004)

Cal afegir que els complexos ciclines-CDK poden ser regulats per diferents quinases i fosfatases. Per l'activació de les CDK, es necessari que aquestes siguin fosforilades per la proteïna CAK (*CDK-activating kinase*) i a la vegada que la fosfatasa Cdc25 (*Cell division cycle 25*) defosforili els residus fosforilats per les proteïnes Wee1 i Myt1 (Fig.14) (Rudolph 2007).

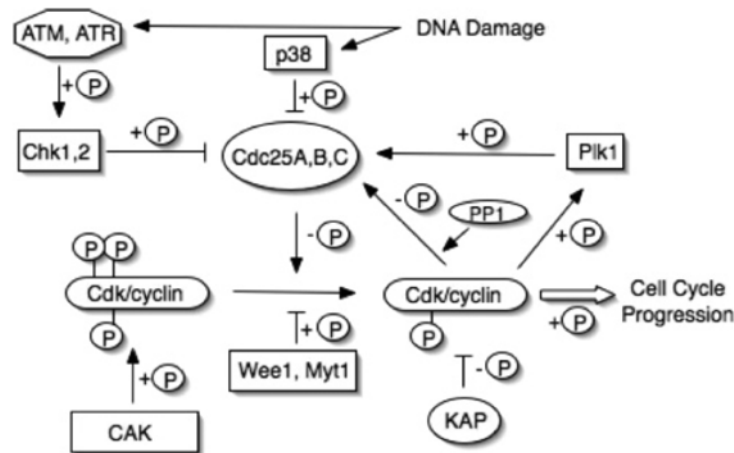


Figura 14. Regulació de les CDK (Rudolph 2007)

Existeixen diferents mecanismes pels quals alguns elements del cicle cel·lular poden activar la mort neuronal i que varien segons a quina fase del cicle cel·lular s'arribi. En alguns models neuronals d'inducció de l'apoptosi, per exemple mitjançant l'exposició al pèptid β -amiloide, les cèl·lules arriben fins la fase S del cicle cel·lular, la qual cosa s'ha suggerit que seria letal per les neurones. Això es deu a que, a diferència de les cèl·lules proliferatives, les neurones no expressen la DNA pol- α , la qual és essencial per l'expressió canònica de l'ADN, i en lloc d'aquesta expressen la DNA pol- β i la seva proteïna auxiliar PCNA. La DNA pol- β activa la via no canònica d'expressió d'ADN en neurones i aquesta al no tenir activitat exonucleasa no pot reparar els errors produïts durant la replicació, la qual cosa produirà un dany de l'ADN addicional, que activarà la p53 i conseqüentment la mort (Herrup *et al.* 2004). Un altre mecanisme per induir la mort involucra a les CDK, per exemple s'ha demostrat que la CDK4 induïx l'expressió de Bim en l'apoptosi induïda per trombina en cultius primaris de corticals (Rao *et al.* 2007), que el complex CDK2-ciclina A si surt al citoplasma pot induir un augment de l'activitat de la caspasa 3 de manera independent a p53 (Hiromura *et al.* 2002) o que la CDK1 pot fosforilar directament a Bad i això permet que s'alliberi de 14-3-3 en l'apoptosi induïda per manca d'activitat en CGC (Konishi *et al.* 2002). La proteïna Rb també intervé en la mort, ja que al ser fosforilada per les CDK, les proteïnes que

segrestava s'alliberen. És el cas de la proteïna c-Abl, que podrà formar un complex actiu amb p53 i que pot activar la via de la JNK (Van Etten 1999), o el cas de la Mdm2, que a l'alliberar-se serà més fàcilment degradada i, per tant, no inhibirà a p53 (Trinh *et al.* 2001). Però sens dubte, la proteïna del cicle cel·lular més important per induir la mort cel·lular és el factor de transcripció E2F, que també es troba segrestat per Rb. S'ha descrit que la família de proteïnes E2F està formada per 6 membres, dels quals només un, l'E2F-1, participa en el procés de l'apoptosi (Mundle and Saberwal 2003). Aquesta proteïna a l'alliberar-se, pot induir l'apoptosi neuronal per diferents mecanismes. Molts cops es a través p53, ja que activa la transcripció de *p19^{ARF}* que estabilitza p53 a l'unir-se a Mdm2 (Sherr and Weber 2000). En absència de p53 funcional, E2F-1 pot activar la transcripció de p73 (Lohrum and Vousden 2000). Altres gens induïts per E2F-1 són els de les caspases 3, 7, 8 i 9, el de l'Apaf (Nahle *et al.* 2002), els de les proteïnes BH3 Puma, Noxa, Bim i DP5 (Hershko and Ginsberg 2004) o el de SIVA, que és una proteïna proapoptòtica que conté un domini DED i que interactua amb membres de la família TNFR i amb membres antiapoptòtics de la família Bcl2 (Fortin *et al.* 2004). Alguns cops E2F-1 enlloc d'activar la transcripció directament, actua activant la desrepressió de gens, com és el cas de B-myb i C-myb en l'apoptosi induïda per dany de l'ADN o per la deprivació de NGF (*Nerve growth factor*) en neurones corticals (Liu and Greene 2001). E2F-1 també pot promoure la mort per mecanismes no transcripcionals, mitjançant la inhibició de l'activació de senyals antiapoptòtics com NF-κB (Phillips *et al.* 1999).

1.3.2.7. CDK5

Dins la família de les CDK, hi ha un membre que no intervé en la progressió del cicle cel·lular, l'anomenada CDK5. Aquesta proteïna s'expressa molt a cervell i es necessària pel seu desenvolupament, ja que intervé en processos com la migració neuronal i el creixement axonal. A diferència de la resta de CDK, no s'activa per ciclines, sinó per la p35 o la p39 (Zheng *et al.* 1998). Tot i que no intervé directament en la progressió del cicle cel·lular, sembla ser que pot fosforilar la proteïna Rb, fet que explicaria la forta correlació entre la desregulació de la CDK5 i la disfunció del cicle cel·lular observada en diferents models d'apoptosi neuronals (Hamdane *et al.* 2005).

Els seus activadors, p35 i p39, s'expressen específicament en neurones, per tant l'activitat de CDK5 està restringida a aquest tipus de cèl·lules (Nguyen *et al.* 2001). Tot i la seva importància en el desenvolupament embrionari del cervell, la sobreactivació de la CDK5 condueix a la mort neuronal (Kusakawa *et al.* 2000). Un dels mecanismes responsables d'aquesta sobreactivació és el trencament proteolític de la p35 mitjançant les calpaïnes, que s'activen pel calci. La forma resultant és la p25, que és més estable i que activa constitutivament la CDK5 (Patrick *et al.* 1999). A més, a la p25 li manca un lloc miristilat, que normalment mantenia unit el complex p35-CDK5 a la membrana plasmàtica i, per tant, la CDK5 a més de sobreactivar-se, canvia la seva localització. La forma p25 normalment no es troba present en les neurones, però diferents estímuls apoptòtics, com el glutamat o el H₂O₂ en cultius primaris de corticals, poden provocar la seva formació (Lee *et al.* 2000). Així el tractament amb inhibidors de calpaïnes és neuroprotector en alguns models (Patzke and Tsai 2002). A més de l'associació amb p25, poden donar-se altres mecanismes posttraduccionals, com la fosforilació al residu tirosina 15, que produeixen un augment de l'activitat de la CDK5 (Zukerberg *et al.* 2000). De la mateixa manera que la p35, la p39 pot ser tallada per formar una forma més petita, la p29 (Patzke and Tsai 2002).

La CDK5 sobreactivada pot conduir a l'apoptosi per diferents mecanismes segons la seva localització cel·lular. Quan el complex p25-CDK5 s'allibera de la membrana plasmàtica i es queda al citoplasma, pot hiperfosforilar diferents proteïnes associades als microtúbuls, com per exemple la proteïna Tau, provocant la seva separació dels microtúbuls i conduint a la disrupció del citoesquelet, fet que pot induir l'apoptosi. En cervells de malalts d'Alzheimer s'ha observat acumulació de la forma p25 en els cabdells neurofibril·lars típics de la malaltia, que es formen per acumulació de proteïna Tau hiperfosforilada (Patrick *et al.* 1999). També al citoplasma pot fosforilar a la β -catenina, fet que provocarà la degradació d'aquesta. La β -catenina és una proteïna que participa en l'adhesió cel·lular, ja que interacciona amb les cadherines que són molècules d'adhesió cel·lular (Smith *et al.* 2001), però quan transloca a nucli també pot actuar com un coactivador transcripcional del factor de transcripció TCF/LEF, que activa gens que promouen la supervivència (Beurel and Jope 2006). També hi ha algun estudi que relaciona la CDK5 citoplasmàtica amb l'activació de la JNK i la p38 (Otth *et al.* 2003). Quan la CDK5 transloca a nucli pot fosforilar a MEF2 (*Myocyte enhancer factor 2*), que és un factor de transcripció que promou l'expressió de gens de supervivència

neuronal. La fosforilació del domini de transactivació de MEF2 per la CDK5, provoca la seva inhibició i per tant afavoreix la mort de la neurona (Gong *et al.* 2003). Finalment, alguns dels efectes nocius de la CDK5 sobreactivada venen donats per no trobar-se en la seva localització original, que és la membrana plasmàtica i, per tant, no fosforilar els seus substrats habituals com Pak-1, la sinapsina o DARP32 entre altres (Patrick *et al.* 1999) (Fig.15). Fins i tot està demostrat que la CDK5 quan es troba unida a p35 i, per tant, localitzada a la membrana plasmàtica, activa diferents vies de supervivència, com l'AKT/PKB (Li *et al.* 2003) o l'ERK (Wang *et al.* 2006b), o inhibeix vies apoptòtiques com la JNK (Li *et al.* 2002a). Així doncs, que la CDK5 promogui la supervivència o l'apoptosi, ve determinat pel seu activador. Quan s'uneix a la p35, que es troba a la membrana plasmàtica, es promou la supervivència i quan s'uneix a la forma trencada p25, que es troba a citoplasma o nucli i que al ser més estable produeix una sobreactivació de la CDK5, es promou l'apoptosi.

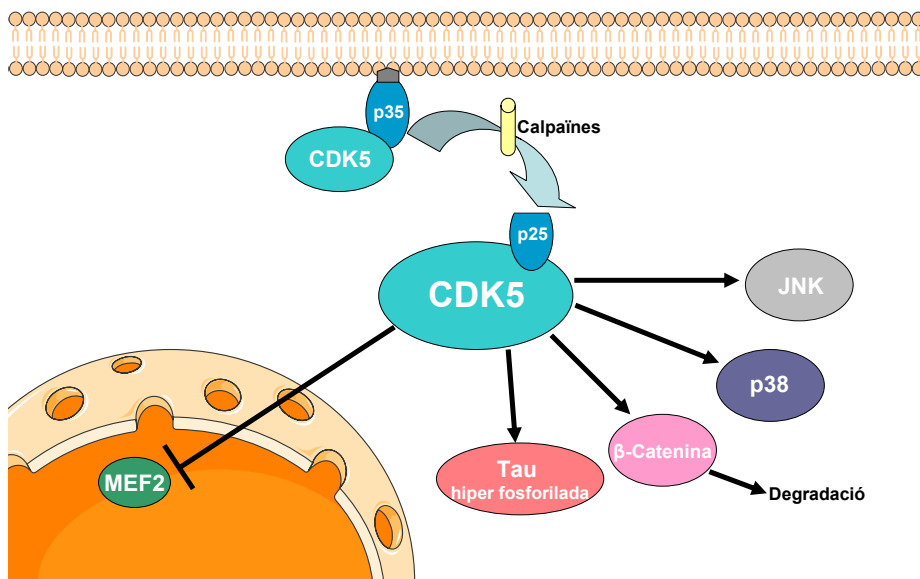


Figura 15. Accions proapoptòtiques del complex p25-CDK5

1.3.2.8. GSK3

La GSK3 (*Glycogen synthase kinase 3*) és una quinasa de serina i treonina ubiqua, que va ser identificada inicialment com un enzim capaç de fosforilar la glicogen sintasa provocant la seva inhibició (Embi *et al.* 1980), però que posteriorment es va demostrar que pot fosforilar aproximadament uns 50 substrats (Jope and Johnson 2004). Fosforilant aquests substrats la GSK3 pot modular diferents processos, que inclouen el metabolisme del glicogen,

l'estructura cel·lular, l'expressió gènica i l'apoptosi (Grimes and Jope 2001). Existeixen dues isoformes de la GSK3, la GSK3 α i la GSK3 β , de 51 i 47 kDa respectivament (Woodgett 1990). Totes dues proteïnes tenen una estructura similar, encara que funcionalment són diferents, d'aquesta manera la GSK3 α no sembla jugar un paper massa important en l'apoptosi i en canvi la GSK3 β si.

Totes dues isoformes es troben constitutivament actives dins la cèl·lula, però les seves accions estan molt controlades mitjançant diferents mecanismes. El mecanisme de regulació més conegut es dona a través de la fosforilació de la GSK3 β en el residu serina 9 i de la GSK3 α en el residu serina 21, que inhibeixen la seva activitat. La principal quinasa responsable d'aquestes fosforilacions és l'AKT/PKB, tot i que existeixen altres quinases involucrades (Grimes and Jope 2001). De manera contrària, la fosforilació de la GSK3 β en el residu tirosina 216 i de la GSK3 α en el residu tirosina 279, produeixen una activació de la GSK3. Encara que els mecanismes que regulen aquesta modificació no estan ben definits, es creu que la quinasa ZAK1 hi podria estar involucrada (Kim *et al.* 1999b) i que la quinasa dependent de calci PYK2 podria fosforilar a GSK3 β (Hartigan *et al.* 2001). Un altre mecanisme de regulació és la seva localització cel·lular, ja que encara que normalment està a citoplasma, també pot trobar-se a nucli o mitocòndria. A més, la GSK3 es pot unir a altres proteïnes per formar complexos proteics i, aquest fet, juntament amb la seva localització, determinarà quins seran els substrats als que fosforilarà. Addicionalment, l'acció de la GSK3 pot estar controlada indirectament per l'estat de fosforilació del seu substrat, ja que molts substrats han d'estar prèviament preparats, mitjançant una prefosforilació en un residu proper al de la GSK3, per tal que la GSK3 els pugui fosforilar (Fig.16) (Jope and Johnson 2004). Per tant, això ens demostra que la regulació de la GSK3 és molt important i que conseqüentment la seva desregulació pot contribuir a una gran varietat de patologies, com les malalties neurodegeneratives, el càncer o la diabetis (Eldar-Finkelman and Ilouz 2003; Ferrer *et al.* 2005; Manoukian and Woodgett 2002).

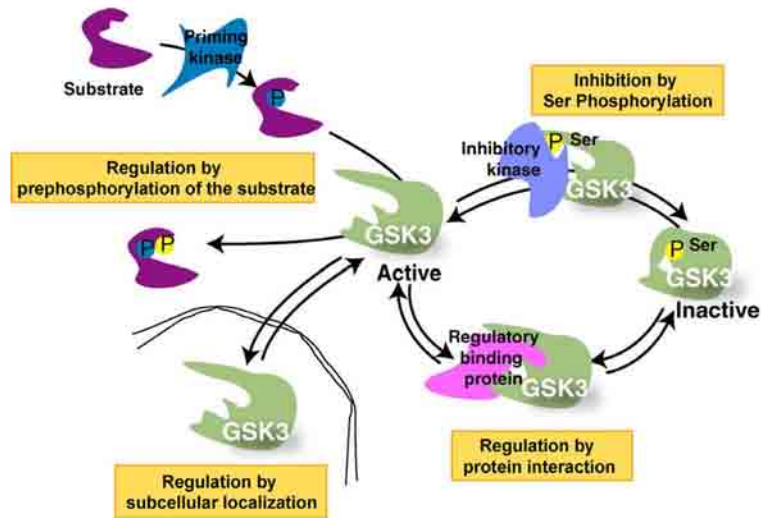


Figura 16. Regulació de la GSK3 (Beurel and Jope 2006)

Una de les funcions més importants de la GSK3 és la regulació de l'apoptosi. Paradoxalment, la GSK3 pot promoure la via apoptòtica intrínseca mitocondrial, però també és capaç d'inhibir la via apoptòtica extrínseca dels receptors de mort. Està demostrat que la via intrínseca mitocondrial pot ser amplificada per la GSK3, després de ser activada per diferents tipus d'estímuls, com per exemple la privació de factors tròfics, la inhibició de la via de la PI3-K (*Phosphatidylinositol 3-kinase*)/AKT, el dany de l'ADN, l'estrès oxidatiu, l'excitotoxicitat per glutamat o la hipòxia. La sobreexpressió de la GSK3 en cèl·lules PC12 o en fibroblasts Rat 1 és suficient, sense necessitat de cap estímul apoptòtic, per induir l'apoptosi (Pap and Cooper 1998), fet que posteriorment es va demostrar en altres models. Cal dir però, que els nivells d'activitat de la GSK3 aconseguits mitjançant la seva sobreexpressió són molt més elevats que els fisiològics i aquesta dada juntament amb el fet que ratolins modificats genèticament per evitar la inhibició de la GSK3 no presentaven el mateix fenotip que els ratolins on la GSK3 està sobreexpressada (McManus *et al.* 2005), ens indiquen que la GSK3 activada constitutivament no és suficient per provocar l'apoptosi. Això potser es degut a que els mecanismes i molècules que condueixen a l'apoptosi quan es sobreexpressa la GSK3, poden ser diferents als que es donen en condicions fisiològiques. Tot això porta a pensar que la GSK3 a nivells fisiològics, més que tenir un paper inductor de l'apoptosi, té un paper facilitador i que segons la idea que l'apoptosi es produeix quan el balanç de senyals proapoptòtics guanya al d'antiapoptòtics, la GSK3, a

l'activar les primeres i inhibir les segones, el que faria es disminuir el llindar necessari per què es produeixi l'apoptosi (Beurel and Jope 2006).

La GSK3 regula diferents processos de la via intrínseca i un d'ells és la disrupció de la mitocòndria, en la qual hi participa mitjançant diferents accions. Per una banda es creu que la GSK3 mitocondrial pot intervenir d'alguna manera en el procés, ja que s'ha observat un augment de la seva activitat durant l'apoptosi, però encara no s'ha determinat quins són els seus substrats intramitocondrials. El que si es coneix és que la GSK3 citosòlica pot activar Bax al fosforilar-la al residu serina 163, que pot promoure la degradació de la proteïna Bcl2 antiapoptòtica Mcl1 després de fosforilar-la, que és necessària per la inducció de Bim i que fosforila a la proteïna VDAC, prevenint l'associació d'aquesta amb l'hexoquinasa II i per tant afavorint la seva unió a proteïnes Bcl2 proapoptòtiques (Revisat per Beurel and Jope 2006).

D'altra banda, la GSK3 també pot regular l'activitat de diferents factors de transcripció. Alguns d'ells es regulen a nivell citosòlic, però altres a nivell nuclear, a on es troba una petita, però molt activa, part de la GSK3 β . Un dels factors de transcripció que regula és la p53, ho fa a tres nivells: unint-se directament a ella, fet que encara no està clar quins efectes produeix, fosforilant-la als residus serina 33, 315 i 376 o fosforilant a Mdm2. També cal dir, que degut a que la p53 a més d'activar la transcripció, pot actuar unint-se directament a proteïnes mitocondrials, la GSK3 β pot unir-se a p53 a la mitocòndria i contribuir a les seves accions. Cal afegir, que simultàniament la p53, a l'estar unida a GSK3, activa a aquesta última, donant-se un fenomen de cooperació. Un altre factor de transcripció regulat per la GSK3 és la β -catenina, a la qual fosforila i, com ja s'ha explicat en l'apartat anterior, això promou la seva degradació impeding els seus efectes promotors de la supervivència. El factor de transcripció HSF1 (*Heat shock factor-1*) també es inhibeix per la GSK3, aquest factor de transcripció induïx l'expressió de diferents *heat shock proteins* que protegeixen les cèl·lules de diferents agressions. La GSK3 pot inhibir també a CREB (*cyclic AMP response element-binding protein*), factor que promou l'expressió del gen de Bcl2 entre altres. També s'ha demostrat que la GSK3 regula al factor de transcripció Myc, el qual pot promoure apoptosi o proliferació segons les condicions cel·lulars. Per últim, la GSK3 també pot regular al NF- κ B, que és un cas similar a l'anterior, ja que també pot promoure o inhibir l'apoptosi segons les circumstàncies. La GSK3 a més de regular l'expressió gènica, també pot regular la traducció, ja que mitjançant la fosforilació i

inhibició d'eIF2B (*Eukaryotic translation initiation factor 2B*), pot inhibir la síntesi proteica, fet que contribueix a induir l'apoptosi (Revisat per Beurel and Jope 2006).

A més de tot això, GSK3 pot fosforilar proteïnes que regulen l'estructura cel·lular. Diferents proteïnes associades als microtúbuls poden ser substrats de la GSK3, per exemple la proteïna Tau, la qual al ser fosforilada es dissocia dels microtúbuls, que es desestabilitzen, permetent això alguns canvis estructurals que es donen durant l'apoptosi. A més, la hiperfosforilació de Tau contribueix a la formació dels cabdells neurofibril·lars. Un altre substrat estructural de la GSK3 és la quinesina, proteïna que intervé en el transport intracel·lular (Revisat per Beurel and Jope 2006).

Finalment, s'ha demostrat la fosforilació de l'APP per la GSK3 α , fet que contribueix al processament d'aquesta per formar el pèptid neurotòxic β -amiloide, que es pot acumular, formant les plaques amiloides típiques de la malaltia d'Alzheimer (Phiel *et al.* 2003). Per altra banda, la inhibició metabòlica de la piruvat deshidrogenasa per la GSK3, pot produir una disfunció neuronal selectiva, ja que aquest enzim proporciona l'acetilCoA necessari per la síntesi d'acetilcolina, la qual es deficitària en la malaltia d'Alzheimer (Fig. 17) (Hoshi *et al.* 1997).

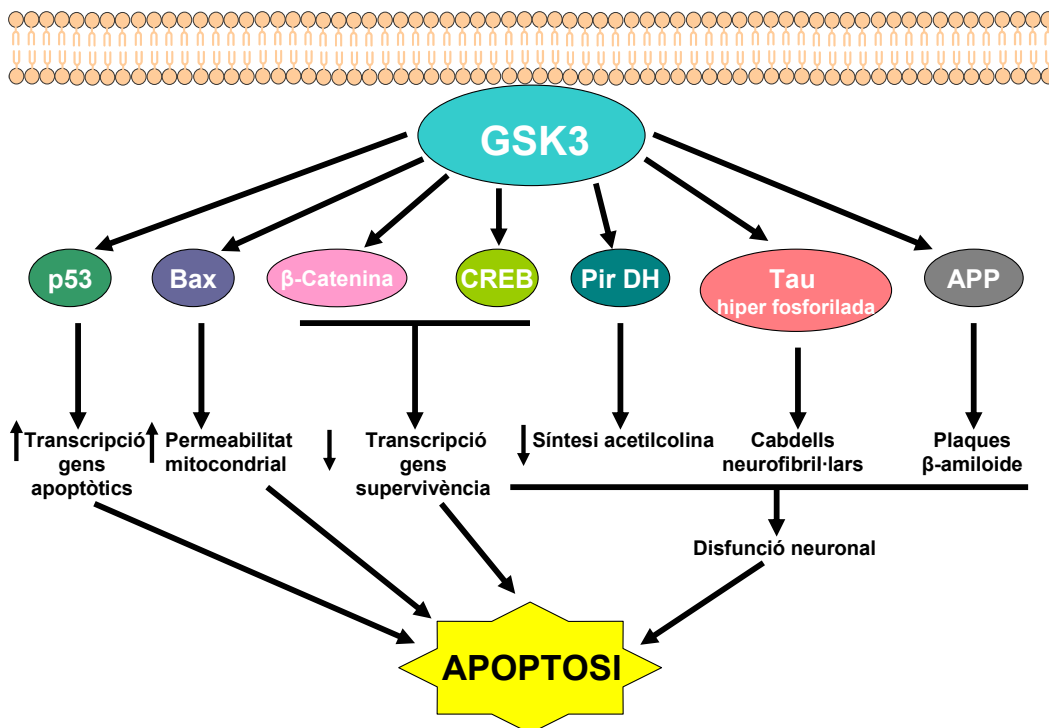


Figura 17. Accions proapoptòtiques de la GSK3

Sorprenentment, com ja s'ha esmentat al principi d'aquest apartat, la GSK3 en l'apoptosi activada per la via extrínseca té l'efecte oposat, és a dir, és antiapoptòtica. Això va quedar patent, a l'observar-se que el liti, un conegut inhibidor de la GSK3, augmentava la citotoxicitat mitjançada per TNF en diferents models *in vitro* i *in vivo* (Beyaert *et al.* 1989) i posteriorment amb l'observació que el ratolí *knockout* de GSK3 β produïa la mort de l'embrió degut a una hipersensibilitat al TNF al fetge (Hoeflich *et al.* 2000). Al principi es va pensar que aquesta acció antiapoptòtica de la GSK3 es produïa a través de la inducció de la supervivència per NF- κ B, però finalment es va descartar degut a que mentre en alguns models GSK3 activava NF- κ B, en altres no, conclouent que depenia del context i del tipus cel·lular i que, per tant, el mecanisme de protecció deuria ser un altre. Encara es desconeix exactament quin és el mecanisme implicat, però el que si es coneix, és que la GSK3 actua al principi de la via, abans de l'activació de la caspasa iniciadora 8. Aquest fet descarta qualsevol tipus de superposició o interferència per part de la via intrínseca, sobre la inhibició de la via extrínseca per part de la GSK3. A l'actuar a l'inici de la via s'impedeix que en els casos on la via extrínseca mitjançant Bid activa la via intrínseca per donar la mort (veure apartat 1.3.1.1.), la GSK3 no pugui inhibir l'apoptosi. De manera inversa, la inhibició de l'activació de la caspasa 8 no influeix en l'activació de la via intrínseca per GSK3, ja que aquesta no intervé en la via intrínseca. Per tant, queda clar que existeix una clara segregació de les accions de la GSK3 sobre aquestes dues vies, fet que permet que pugui regular cada via de manera individual i en direccions oposades. Aquesta visió global, ens permet comprendre els efectes oposats de la GSK3, que al principi podien sorprendre o semblar una paradoxa (Revisat per Beurel and Jope 2006).

1.3.2.9. Vies de les MAPK, JNK i p38

Les vies de les MAPK estan conservades en tots els organismes eucariotes i són les responsables de transformar els senyals externs que arriben a la cèl·lula en respostes específiques, com poden ser la migració, la proliferació, la diferenciació i la mort cel·lular. Aquestes vies van ser identificades gràcies a estudis genètics realitzats en el llevat *Saccharomyces cerevisiae* i estan formades per una MAPK que es fosforilada per una MAPK quinasa (MAPKK), que a la vegada es fosforilada per una MAPKK quinasa (MAPKKK) (Schaeffer and Weber 1999). Estudis posteriors van demostrar l'existència de tres vies principals mitjançades per MAPK, dues de les quals, la de la JNK i la de la p38, actuen en les respostes activades per l'estrès ambiental que condueixen a la mort de la

cèl·lula, mentre que la tercera, la de l'ERK, transforma els senyals extracel·lulars en senyals de supervivència i diferenciació cel·lular (D'Mello and Chin 2005).

• Via de la JNK

La via de la JNK és, amb diferència, la més estudiada en neurones. La JNK inicialment es va identificar com una quinasa de serina i treonina activada per estrès, que fosforila al factor de transcripció c-Jun en dos llocs: la serina 63 i la 73, que es troben dins el domini d'activació aminoterminal (Derijard *et al.* 1994). En cervells d'humans adults s'expressen 10 isoformes amb pesos moleculars d'aproximadament 46 o 55 kDa, que es generen per *splicing* alternatiu de 3 gens diferents: *jnk1*, *jnk2* i *jnk3*. L'expressió de la JNK1 i la 2 és ubiqua, mentre que la JNK3 està restringida principalment al cervell, però també al cor i als testicles (Davis 2000). Encara que els *knockouts* individuals de cada gen no presenten anormalitats obvies, estudis amb diferents combinacions de *knockouts* dels tres gens demostren el requeriment de la JNK1 i 2 en l'apoptosi d'àrees específiques del cervell durant el desenvolupament (Kuan *et al.* 1999) i de la JNK3 en la neurodegeneració induïda per estrès (Yang *et al.* 1997). S'ha demostrat que la via de la JNK s'activa en neurones després de la privació de factors tròfics (Eilers *et al.* 1998) i de potassi (Le-Niculescu *et al.* 1999) i que la inhibició d'aquesta via en aquests models bloqueja la mort.

La regulació de les JNK pot donar-se a diferents nivells, el primer dels quals són les MAPKKK. Les MAPKKK que condueixen a l'activació de les JNK inclouen membres de les subfamílies MEKK (*MAPK/ERK kinase kinase*), MLK (*Mixed-lineage kinases*), ASK (*Apoptosis stimulating kinase*), DLK (*Dual leucine-zipper kinases*), Tpl-2 i TAK (*Transforming growth factor β -activated kinase*). En l'activació de la JNK durant l'apoptosi neuronal és molt important el paper de la MLK-3 (Weston and Davis 2002). Les MAPKKK un cop activades poden fosforilar i activar les MAPKK. Les dues MAPKK implicades en l'activació de la JNK són la MKK4 (*Mitogen-activated protein kinase kinase 4*) i la 7. Aquestes són quinasas de especificitat dual, ja que poden fosforilar a la JNK tant en residus treonina com tirosina (Davis 2000). Un nivell addicional de regulació el donen les JIP (*JNK interacting proteins*), que són proteïnes adaptadores, que segresten les MLK, les MKK i les JNK i permeten que totes elles estiguin suficientment a prop per activar-se (Kim *et al.* 1999a). A més, les JIP tenen altres funcions, com la localització

intracel·lular de la JNK, ja que interactuen amb les quinesines motores dels microtúbuls (Goldstein 2001), o permetre la interacció de la JNK amb l'APP (Matsuda *et al.* 2001). En contrast amb les JIP, que interactuen amb totes les isoformes de les JNK, una altra proteïna adaptadora, la β -arrestin 2, només interactua amb la JNK3 (McDonald and Lefkowitz 2001) (Fig. 18).

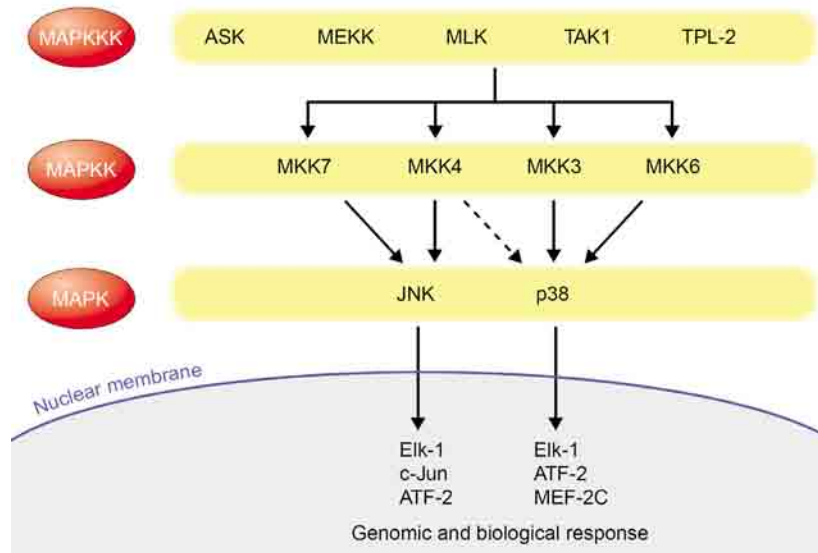


Figura 18. Regulació de la JNK i la p38 (Weston and Davis 2002)

La JNK un cop s'activa pot conduir a la mort mitjançant la unió i fosforilació de substrats del citoesquelet, com la proteïna Tau, de la mitocòndria, com Bim, i del nucli, com c-Jun, ATF-2 o Elk-1 (Herdegen and Waetzig 2001). Les accions de la JNK poden ser directes, mitjançant la fosforilació de diferents substrats, o indirectes, mitjançant la fosforilació de factors de transcripció, els quals activaran l'expressió de diferents gens. Dins dels efectes directes de la JNK, trobem la fosforilació de Bim que permet la seva dissociació del complex motor dineïna possibilitant el seu paper activador de la via apoptòtica mitocondrial (Lei and Davis 2003). La JNK també pot fosforilar directament Bad al residu serina 128, provocant la seva separació de la proteïna 14-3-3 i, per tant, promovent la seva associació a Bcl2 i Bcl-xL, fet que inhibeix l'acció antiapoptòtica d'aquestes últimes (Donovan *et al.* 2002). Paral·lelament, la JNK pot fosforilar a la proteïna 14-3-3 permetent l'alliberació de Bad i de FOXO3 (*Forkhead box transcription factor 3*), perquè aquests puguin dur a terme les seves accions proapoptòtiques (Sunayama *et al.* 2005). Altres accions directes de la JNK són contribuir a la hiperfosforilació de la proteïna Tau, fosforilar la cadena pesada dels neurofilaments amb el consegüent increment de la

vulnerabilitat a l'estrès, l'antagonització de Bcl2 possiblement a través de la seva fosforilació, la inhibició de la transcripció mediada pel receptor de glucocorticoides mitjançant la fosforilació d'aquest i la fosforilació de MADD (*Mitogen-activated kinase activating death domain protein*) (Revisat per Mielke and Herdegen 2000).

La JNK també pot tenir efectes indirectes a través de la fosforilació de factors de transcripció. El cas més conegut és el del c-Jun, que juntament amb altres membres de la família Jun i Fos, poden formar homo i heterodímers, donant lloc a l'AP1/TRE (*Activator protein 1/TRE*). Principalment existeixen dues classes d'elements de control que contribueixen a la regulació de gens per senyals extracel·lulars, són el llocs d'unió de l'AP1/TRE i el de l'ATF/CRE (*Activating transcription factor/cAMP response element*) (Angel and Karin 1991; Montminy 1997). Tan les proteïnes d'unió a AP1/TRE com les d'ATF/CRE, preferencialment reconeixen els seus llocs d'unió corresponents, però també poden donar-se dimeritzacions de membres de diferents famílies, com el cas de Jun-ATF-2 (Hai and Curran 1991) (Fig.19). La JNK sembla ser la única quinasa que fosforila c-Jun als residus serina 63 i 73 produint un augment de la seva activitat, encara que existeixen altres mecanismes d'activació de c-Jun, com per exemple per fosforilacions dependents de calci en altres residus (Cruzalegui *et al.* 1999). Un cop activat, c-Jun pot activar la transcripció de diferents gens involucrats en l'apoptosi com Bim i DP5 (Harris and Johnson, Jr. 2001), Fas (Kuan *et al.* 2003) i FasL (Le-Niculescu *et al.* 1999). També cal dir que c-Jun pot activar la transcripció del seu propi gen, el qual també està controlat per ATF-2 o MEF2C. Altres factors de transcripció regulats per la JNK són ATF-2, al que fosforila en les treonines 69 i 71, Elk-1, al que fosforila en les serines 383 i 389 (Revisat per Mielke and Herdegen 2000), p53, al que estableix al fosforilar-lo (Fuchs *et al.* 1998) i c-Myc, al que fosforila a la serina 62 i a la treonina 71 (Noguchi *et al.* 1999).

A més d'un paper en l'activació de l'apoptosi, les JNK també tenen una funció fisiològica, fet que explica l'elevada activitat basal d'aquestes proteïnes. Els estudis mitjançant *knockouts* han permès demostrar que la JNK1 té un paper en la modulació de l'estabilitat i la flexibilitat del citoesquelet, mitjançant la fosforilació de proteïnes associades als microtúbuls (Chang *et al.* 2003). Així doncs, sembla que en general la JNK1 tindria una funció fisiològica, mentre que la JNK2 i sobretot la JNK3

intervindrien més en la funció apoptòtica. Això no es compleix sempre, ja que per exemple s'ha determinat que la JNK3 juga un paper important en la formació de les neurites en cèl·lules PC12 després del tractament amb NGF (Waetzig and Herdegen 2003).

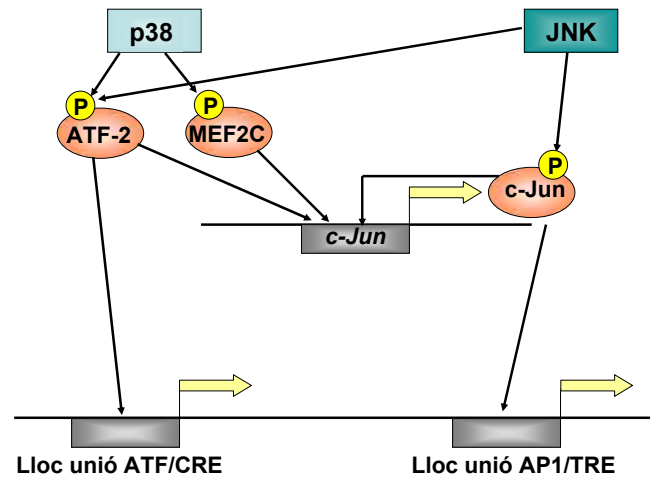


Figura 19. Llocs d'unió AP1/TRE i ATF/CRE

· Via de la p38

La via de la p38 també està implicada en l'apoptosi neuronal, tot i que comparat amb la via de la JNK, el seu paper no és tan important. Igual que la JNK, la p38 està altament conservada i originalment va ser identificada per contribuir a la inflamació en resposta a les citoquines. La p38 té quatre isoformes diferents: la p38 α , la p38 β , la p38 γ i la p38 δ (Revisat per Kumar *et al.* 2003). L'expressió de les isoformes p38 α i la p38 β és ubíqua, però la seva expressió és més elevada a cervell que a la resta de teixits, en canvi les altres dues isoformes sembla que són exclusives de cervell (Johnson and Bailey 2003).

La p38 està regulada principalment per les MAPKKK ASK-1, TAK-1 i MEKK-4, les quals també regulen la JNK, i en menor grau també pot estar regulada per les MLK i la Tpl-2, encara que aquestes principalment regulen la JNK. Per sota de les anteriors es troben les MAPKK, que en el cas de la p38 són la MKK3 i la MKK6 i sembla ser que també la MKK4, la qual compartiria amb la JNK (Revisat per Takeda and Ichijo 2002). Les MAPKK activen la p38

fosforilant-la dualment a la treonina 180 i a la tirosina 182 (Raugeaud *et al.* 1995) (Fig. 18).

La p38, igual que la JNK, pot tenir efectes directes a través de la fosforilació de diferents substrats i indirectes a través de la fosforilació de factors de transcripció. Dins d'aquest últim grup tenim al factor de transcripció ATF-2, el qual pot contribuir a l'activació de l'expressió de c-Jun, ja que pot unir-se als llocs AP-1/TRE del promotor del gen de c-Jun. També tenim a MEF2C, que també regula al gen de c-Jun (Fig. 19), a CHOP (*CREB homologous protein*), a GADD153 (*Grow arrest and DNA damage inducible gene 153*) (Revisat per Mielke and Herdegen 2000) i als TCF (*Ternary complex factors*), com Elk-1, que activen l'expressió de c-Fos (Whitmarsh *et al.* 1997). Alguns treballs proposen que la p38 també és responsable de la fosforilació de la c-Jun induïda per la deprivació de potassi (Yamagishi *et al.* 2001), però això contradiu altres treballs que descriuen que la p38 no fosforila c-Jun (Watson *et al.* 1998; Coffey *et al.* 2002). En quant als efectes directes de la p38, aquesta pot fosforilar diferents substrats citoplasmàtics com la proteïna Tau (Reynolds *et al.* 1997), les MAPKAPK (*MAPK-activated protein kinase*) 2, 3 i 5 (Tan *et al.* 1996; McLaughlin *et al.* 1996; Ni *et al.* 1998), les Mnk (*MAPK-interacting kinase*) 1 i 2 (Han *et al.* 1997; Waskiewicz *et al.* 1997), la PRAK (*p38-regulated/activated kinase*) (New *et al.* 1998) i les MSK (*Mitogen- and stress-activated protein kinases*) 1 i 2 (Deak *et al.* 1998; Caivano and Cohen 2000). Finalment, encara que la p38 està implicada en l'apoptosi, en algunes situacions també pot estar implicada en la supervivència, com s'ha observat en el model de supervivència dependent d'activitat en CGC (Mao *et al.* 1999).

1.4. VIES DE SENYALITZACIÓ I MOLÈCULES PROMOTORES DE LA SUPERVIVÈNCIA NEURONAL

Les neurones poden estar sotmeses a senyals de supervivència o de mort cel·lular, el balanç entre les unes i les altres és el que determina el destí de la neurona. Els senyals de supervivència neuronals poden estar promogudes per factors com l'activitat neuronal o la presència de factors tròfics, els quals activen diferents molècules i vies de senyalització intracel·lulars que conduiran a la supervivència. A

continuació es descriuen les molècules i vies que intervenen en la supervivència neuronal.

1.4.1. Via de la Raf-MEK-ERK

La via Raf-MEK-ERK és una de les tres vies de les MAPKs i és necessària per la senyalització mitjançant factors tròfics. Aquesta via s'inicia a nivell de membrana, mitjançant la unió dels factors neurotròfics als membres de la família de receptors quinases de tirosina Trk (*Tropomyosin-related kinase*), dels que s'han descrit tres tipus: TrkA, TrkB i TrkC. Els factors neurotròfics formen part de diferents famílies, una de les quals és la de les neurotrofines, que està formada per el NGF, el BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*), la NT (*Neurotrophin*)-3 i la NT-4. Una altra és la de les citoquines que inclou al GDNF, al CNTF (*Ciliary neurotrophic factor*) i al HGF (*Hepatocyte growth factor*). L'última és la de les hormones, com l'IGF-I (*Insulin growth factor I*) (Revisat per Frebel and Wiese 2006). Les neurotrofines tenen diferents afinitats a l'hora d'unir-se als Trk, així NGF s'uneix a TrkA, BDNF i NT-4 s'uneixen a TrkB, i NT-3 a TrkC, encara que amb menys eficiència també a TrkA i TrkB (Reichardt 2006).

La unió dels factors neurotròfics als Trk provoquen la dimerització dels últims, possibilitant que es fosforilin entre ells. Un cop fosforilats s'hi poden unir diferents proteïnes adaptadores que acabaran activant les proteïnes Ras. Aquestes últimes, són proteïnes monomèriques G, que són petites GTPases que poden activar la via Raf/MEK/ERK, així com també a una altra via de supervivència molt important, com és la via PI3-K/AKT (Kaplan and Miller 2000). Cal dir que les proteïnes Ras, també es poden activar mitjançant l'entrada de calci a la cèl·lula (Weissman and Aaronson 1985). El següent pas en la via de senyalització es que les proteïnes Ras activin les Raf, que són unes quinases de serina i treonina. La família Raf està formada per tres membres: A-Raf, B-Raf i C-Raf/Raf1; totes elles fosforilen i activen a les MEK1 i 2, les quals, al seu torn, acabaran fosforilant i activant a ERK. Raf no només té MEK com a substrat, també es creu que pot fosforilar i inhibir p53, Bad i Rb (D'Mello and Chin 2005). MEK 1 i 2 fosforilen dualment a ERK en un residu tirosina i en un treonina, fet que condueix a l'activació d'ERK, la qual pot estar localitzada a citosol o nucli (Ferrell, Jr. and Bhatt 1997).

ERK és la proteïna clau en aquesta via de senyalització, especialment ERK1 i 2, que tenen un pes molecular de 44 i 42 kDa, respectivament, i que presenten una homologia del 85% (Boulton *et al.* 1991). Existeixen altres factors que poden activar les ERK, un dels més estudiats és el cAMP (*Cyclic adenine mono-phosphate*) (Frodin *et al.*

1994). Les ERK1/2 poden conduir a la supervivència a través de diferents accions, com la fosforilació i inhibició de Bim (Ewings *et al.* 2007), la fosforilació i activació de MSK1, la qual posteriorment activarà al factor de supervivència CREB (Arthur and Cohen 2000) o la fosforilació i activació de Rsk2 la qual també activarà CREB, a la vegada que també pot inhibir Bad i la GSK3 (Xing *et al.* 1996; Jin *et al.* 2002; Sutherland *et al.* 1993).

Encara que està àmpliament acceptat el paper promotor de la supervivència de les ERK1/2, un creixent nombre d'estudis en diferents models de neurodegeneració impliquen a les ERK1/2 en la promoció de la mort neuronal (Stanciu and DeFranco 2002; Stanciu *et al.* 2000). En el model de mort induïda per privació de potassi en CGC, s'ha descrit la implicació de les ERK1/2 (Subramaniam *et al.* 2004), encara que existeixen altres estudis que diuen el contrari (Chin *et al.* 2004). També s'ha observat *in vivo* una implicació de les ERK1/2 en la neurodegeneració, com per exemple en el dany traumàtic cerebral (Mori *et al.* 2002). Així doncs, s'ha suggerit que la duració de l'activació de les ERK1/2, així com la seva localització dins la cèl·lula, podria determinar que el seu paper sigui protector o apoptòtic (Thomas and Le 2004)

1.4.2. Via de la PI3-K/AKT

Aquesta via pot estar activada per diferents estímuls, encara que el més ben estudiat és la senyalització mitjançant factors de creixement, en el cas de les neurones els factors neurotròfics. La PI3-K està formada per una subunitat reguladora, la p85, que es troba associada a la subunitat catalítica, la p110, que la inhibeix. La unió dels factors neurotròfics als seus receptors Trk activa a aquests últims, conduint al reclutament de la p85 juntament amb la p110 (Kaplan and Miller 2000). Aquest reclutament de la PI3-K es dona a través dels residus tirosina fosforilats de les cues citoplasmàtiques dels receptors i pot ser directe, tot i que és més freqüent que sigui indirecte, mitjançant proteïnes adaptadores com Shc, Grb-2 i IRS1/2. La unió de p85 al Trk produeix un canvi conformacional del complex p85/p110, que impedeix l'efecte inhibitor de la p85 sobre la p110. Paral·lelament, la unió de PI3-K al Trk aproxima la subunitat catalítica als substrats lipídics de membrana sobre els que actuarà (Simpson and Parsons 2001). L'activació de la PI3-K també pot ser a través de Ras, ja que la PI3-K conté un domini RBD (*Ras binding domain*) (Sjolander *et al.* 1991). Un cop activa, la PI3-K fosforila el PIP₂ (*Phosphatidylinositol biphosphate*) i el transforma en PIP₃ (*Phosphatidylinositol triphosphate*), que s'uneix als dominis PH (*Pleckstrin homology*) de les seves proteïnes diana, com la PDK (*Phosphoinositide-dependent kinase*) i l'AKT/PKB, a les quals recluta cap a la membrana plasmàtica, quedant pròximes l'una a l'altra, i això permet que la PDK activi l'AKT/PKB mitjançant la fosforilació del residu treonina 308. (Alessi *et al.* 1997).

La fosforilació del residu serina 473 mitjançant la proteïna mTor també provoca una activació de l'AKT/PKB (Sarbasov *et al.* 2005). Recentment s'ha demostrat en cèl·lules no neuronals que l'AKT/PKB es pot activar mitjançant fosforilacions en residus diferents als anteriors, com les tirosines 315 i 326, que es fosforilen després del tractament amb EGF (*Epidermal growth factor*), o la tirosina 474, que es fosforila després del tractament amb IGF (Chen *et al.* 2001; Conus *et al.* 2002). L'activació de l'AKT/PKB pot estar regulada negativament per diferents fosfatases, que controlen la duració d'aquesta activació convertint PIP₃ en PIP₂. La més coneguda és la proteïna supressora de tumors PTEN (*Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*), encara hi ha altres com per exemple SHIP (*Src homology 2 domain-containing inositol phosphatase*) (Huber *et al.* 1999; Leever *et al.* 1999). La proteïna CTMP (*Carboxy-terminal modulator protein*) també inactiva l'AKT/PKB, ja que interactua físicament amb aquesta, produint una disminució de la fosforilació en els residus treonina 308 i serina 473 (Maira *et al.* 2001).

Durant els últims anys s'han identificat un gran nombre de substrats de l'AKT/PKB, que actuen com mediadors del seu efecte activador de la supervivència. Un dels seus substrats són proteïnes proapoptòtiques a les quals inactiva mitjançant fosforilació, entre els quals es troben els membres de la família FOXO. La fosforilació de FOXO per l'AKT/PKB, fa que aquest quedi retingut al citoplasma i no pugui entrar a nucli, on activaria la transcripció de gens proapoptòtics, com per exemple FasL (Brunet *et al.* 1999) o Bim (Linseman *et al.* 2002). Un altre substrat proapoptòtic és Bad, al qual fosforila a la serina 36, provocant que s'hi uneixi la proteïna 14-3-3, que el segrestarà al citosol i no permetrà que heterodimeritzi amb Bcl-2 i Bcl-X_L (Datta *et al.* 1997). També pot inhibir la caspasa 9 al fosforilar-la, impeding així l'activació de la cascada apoptòtica (Cardone *et al.* 1998), tot i que el lloc on la fosforila no està conservat en totes les espècies, per exemple existeix en humans però no en rates i, per tant, és un efecte que depèn d'espècie (Fujita *et al.* 1999). La GSK3 també pot ser fosforilada al residu serina 9 i inactivada per l'AKT/PKB (Hetman *et al.* 2000). És interessant afegir que l'AKT/PKB també fosforila la MLK3 i l'ASK1, totes dues proteïnes implicades en l'activació de la JNK (Barthwal *et al.* 2003; Kim *et al.* 2001).

Uns altres substrats de l'AKT/PKB són les proteïnes antiapoptòtiques, a les que activa mitjançant fosforilació, com per exemple CREB al que fosforila al residu serina 133 (Du and Montminy 1998). També fosforila a la IKK (*IκB kinase*), la qual activarà a NF-κB, un factor de transcripció que promou la supervivència (Romashkova and Makarov 1999).

Finalment, l'AKT/PKB també pot promoure la supervivència de manera indirecta. Per exemple es pot unir a la proteïna adaptadora JIP1, impedit que aquesta s'associï amb JNK i que aquesta es pugui activar (Kim *et al.* 2002). L'associació d'AKT/PKB amb JIP1, a més d'impedir l'activació de la JNK, també promou l'activació de l'AKT/PKB, ja que facilita la fosforilació d'aquesta per la PDK1 (Kim *et al.* 2003) (Fig. 20).

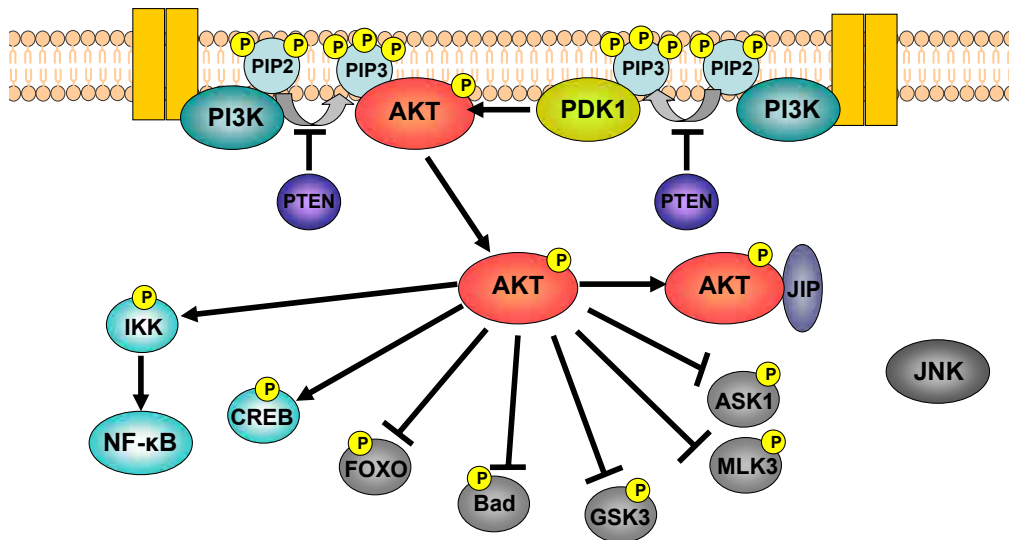


Figura 20. Via de l'AKT/PKB (Adaptat de D'Mello and Chin 2005)

1.4.3. SGK

Recentment s'ha demostrat que la quinasa SGK (*Serum- and glucocorticoid inducible kinase*), que té una gran similitud amb l'AKT/PKB, pot promoure la supervivència en neurones i altres tipus cel·lulars (Leong *et al.* 2003). Com l'AKT/PKB, la SGK es fosforilada i activada per la PDK1, que pertany a la via de senyalització de la PI3-K (Park *et al.* 1999). A diferència de l'AKT/PKB, la SGK també es regula a nivell transcripcional per estímuls com els glucocorticoides, els factors de creixement o el calci (Lang and Cohen 2001). Entre les seves dianes es troben la GSK3 (Dai *et al.* 2002), el B-Raf (Zhang *et al.* 2001) i FOXO, a aquest últim el fosforila en un residu diferent al de l'AKT/PKB (Brunet *et al.* 2001).

1.4.4. CREB

CREB és un factor de transcripció molt important per la supervivència neuronal, com ho demostra el fet que les dues vies principals de supervivència en neurones, la Raf-MEK-ERK i la PI3-K/AKT, l'activen. En cervell promou la plasticitat sinàptica dependent d'activitat neuronal i la supervivència dependent de factors tròfics. S'ha descrit que CREB activa la transcripció de gens que tenen llocs d'unió CRE en els seus promotors. La seva forma activa és la fosforilada en el residu serina 133 i aquesta fosforilació pot venir donada per diferents quinases, que s'activen per estímuls com l'augment de cAMP, que activa la PKA, l'entrada de calci, que activa les CaMK, o la unió de factors neurotròfics, que activa les ERK1/2. Un cop actiu s'uneix a la CBP/p300, que actua com a coactivador transcripcional. Entre els gens que activa per promoure la supervivència, es troba el del BDNF (Revisat per West *et al.* 2001) o el de Bcl2 (Lonze and Ginty 2002) (Fig. 21).

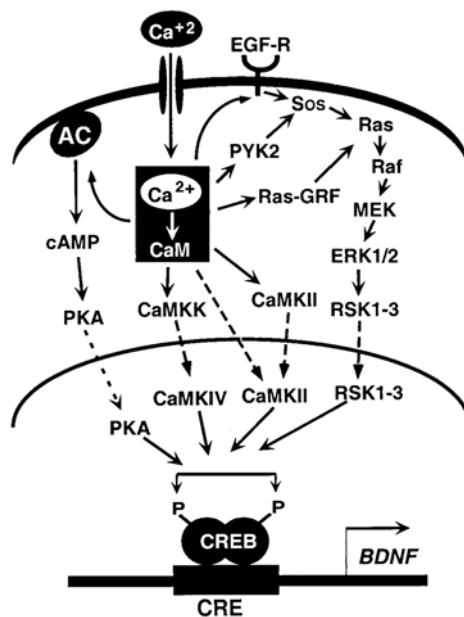


Figura 21. Activació de CREB

1.4.5. NF- κ B

Les proteïnes de la família NF- κ B són uns factors de transcripció induïbles que s'expressen de manera ubiqua i que regulen l'expressió de gens involucrats en diferents processos com la immunitat i la inflamació, el creixement, el desenvolupament i la regulació de la mort cel·lular. En mamífers existeixen 5 proteïnes

NF- κ B: p50 (producte del tall de NF- κ B1/p105), p52 (producte del tall de NF- κ B2/p100), p65 (RelA), RelB i c-Rel. El NF- κ B està format per homodímers i heterodímers d'aquestes proteïnes, normalment p65:p50, els quals es troben retinguts al citoplasma per les proteïnes inhibidores I κ B, que quan es troben unides al NF- κ B oculten el seu senyal de localització nuclear.

L'activació del NF- κ B és el resultat de la fosforilació d'I κ B pel complex IKK, que condueix a la degradació d'I κ B, que pot venir donada per ubiquitinització i posterior degradació al proteosoma o alternativament per calpaines. Això permet que NF- κ B transloqui al nucli i activi la transcripció dels seus gens diana que contenen la seqüència consens κ B. Existeixen diferents proteïnes I κ B: I κ B α , I κ B β , I κ B γ i I κ B ϵ , de les quals les dues primeres són les més estudiades. Apart, el NF- κ B també es pot regular a altres nivells com per la fosforilació de p65 que produeix un augment de la seva activitat transcripcional o per la interacció amb el coactivador transcripcional CBP/p300, que en alguns casos s'ha observat que també augmenta l'activitat de p65.

El paper del NF- κ B en la regulació de la supervivència neuronal és complex. S'ha demostrat que es troba involucrat en els efectes inductors de la supervivència del NGF i de les citoquines i que la seva activació està associada amb la neuroprotecció contra diferents estímuls de mort, com l'exposició a la proteïna β -amiloide, l'estrès oxidatiu i l'òxid nítric. En el model apoptòtic de privació de potassi en CGC, s'ha demostrat que aquest estímul va acompanyat d'una disminució de la fosforilació de I κ B β i que l'activació del NF- κ B és necessària per induir supervivència. En canvi, en alguns casos el NF- κ B pot promoure la mort neuronal. Així, s'ha detectat l'activació de NF- κ B *in vitro* després de l'exposició a alguns estímuls apoptòtics i *in vivo* després de processos d'isquèmia global, d'atacs d'apoplexia induïts per kainat o de danys traumàtics de la medulla espinal. A més, s'han detectat nivells elevats d'activitat del NF- κ B en regions vulnerables del sistema nerviós central en malalts d'Alzheimer, de Parkinson i d'esclerosi lateral amiotròfica.

Que el NF- κ B inhibeixi o promogui l'apoptosi podria dependre del tipus cel·lular i de la natura de l'estímul apoptòtic. També es creu que la composició dels homo o heterodímers que formen el NF- κ B podria determinar la seva acció, ja que s'ha observat que l'activació de p65 augmenta la supervivència en molts casos, mentre que el c-Rel s'associa més amb l'apoptosi. No està gaire clar com el NF- κ B regula la supervivència cel·lular, però podria ser a través de la inducció de diferents gens antiapoptòtics com Bcl2, Bcl-X_L i A1, d'alguns membres dels IAP i d'enzims implicats en el metabolisme de les ROS com la MnSOD (*Manganese superoxide dismutase*). També

s'ha demostrat que pot activar gens proapoptòtics com el de la p53, el de C-myc o el de Fas (Revisat per Aleyasin *et al.* 2004; Koulich *et al.* 2001).

1.4.6. Sirtuïnes

Les sirtuïnes són unes proteïnes desacetilases depenents de NAD (*Nicotine adenine dinucleotide*), conservades des de bacteris fins a humans. En eucariotes, les sirtuïnes regulen diferents processos com la repressió transcripcional, la recombinació, el cicle cel·lular, l'organització dels microtúbuls, les respostes cel·lulars contra el dany de l'ADN i l'envelliment (North and Verdin 2004). Inicialment, les sirtuïnes van ser estudiades pel paper que juguen en l'increment d'esperança de vida provocat per la restricció calòrica (Lin *et al.* 2000)

El procés d'acetilació de proteïnes regula una gran varietat de funcions cel·lulars, com el reconeixement de l'ADN per proteïnes, les interaccions proteïna-proteïna i l'estabilitat de les proteïnes (Kouzarides 2000). La modificació posttraduccional de les proteïnes en els residus lisina per acetilació reversible, es catalitzada per les activitats oposades de les acetiltransferases d'histones HAT i de les desacetilases d'histones HDAC. Tot i el seu nom, els seus substrats no són només les histones. Les HDAC es divideixen en tres grups, les de classe I, II i III. Les dues primeres són molt homòlogues entre elles, mentre que les terceres no ho són. Les HDAC III són homòlogues al repressor transcripcional Sir2 (*Silent information regulator 2*) del llevat *Saccharomyces cerevisiae* i d'aquí prové el nom de sirtuïnes (de Ruijter *et al.* 2003).

En humans s'han descrit 7 sirtuïnes que presenten una alta homologia de seqüència. Totes comparteixen un domini catalític, format per dos dominis diferents, un d'unió al NAD i un altre d'unió al substrat acetil-lisina. A més, totes contenen dominis variables en els extrems amino i carboxiterminal, que regulen la seva localització cel·lular i la seva activitat catalítica (North and Verdin 2004). Tot i la similitud de la seves seqüències, s'han dividit en 4 grups filogenètics, la classe I, que inclou la SIRT1, 2 i 3, la classe II, que inclou la SIRT4, la classe III, que inclou la SIRT5, i la classe IV, que inclou la SIRT6 i 7. També es poden classificar segons la seva localització cel·lular, així les SIRT1, 3, 6 i 7 són nuclears, encara que amb diferents distribucions, la SIRT1 no està mai a nuclèol, la SIRT6 sempre està associada a heterocromatina i la SIRT7 es troba nuclèol. La SIRT2 normalment es troba a citoplasma, però durant la fase G2/M s'uneix a la cromatina dins el nucli. Per últim, la SIRT3, a més de trobar-se nucli, també pot trobar-se a mitocòndria, a on també es troben la SIRT4 i la 5. Un altra possible classificació seria a nivell funcional, ja que totes actuen com desacetilases, a excepció de la SIRT4 i la 6,

que actuen com transferases d'ADP ribosilat. Totes s'expressen de manera ubiqua, encara que els nivells d'expressió més alts es donen a cervell (Revisat per Yamamoto *et al.* 2007).

En el context de la mort neuronal les sirtuïnes poden tenir diferents efectes protectors. Un dels més importants és a nivell del dany de l'ADN on poden afavorir la seva reparació. Les histones, segons les modificacions que experimenten (acetilació, metilació, ribosilació d'ADP, ubiquïtinització o fosforilació), permeten modificar l'estructura de la cromatina. Quan la fibra de cromatina s'acetila es relaxa i, per tant, queda transcripcionalment activa. En canvi, la desacetilació dóna peu a la metilació que provoca una condensació de la cromatina, quedant aquesta silenciada (Revisat per Mohrmann and Verrijzer 2005) i al mateix temps en alguns casos permet la reparació de l'ADN (Fernandez-Capetillo and Nussenzweig 2004). A més, la SIRT1 pot inhibir l'apoptosi a través de diferents accions com, per exemple, desacetilant i reprimint l'activitat de la p53 (Vaziri *et al.* 2001). També pot regular als factors de transcripció FOXO, els quals un cop desfosforilats poden translocar a nucli, on induiran l'activitat transcripcional dels seus gens dianes. Aquesta inducció pot ser inhibida si els FOXO són acetilats per PCAF o per CBP/p300, ja que a l'acetilar-se queden inhibits. Tant SIRT1 com les HDAC I i II, poden desacetilar als FOXO i tornar-los transcripcionalment actius de nou. Així, SIRT1 activa la capacitat dels FOXO per induir l'aturada del cicle cel·lular i la resistència a l'estrès oxidatiu, mitjançant gens com p27, GADD45 i MnSOD, i a la vegada inhibeix la capacitat dels FOXO per induir la mort cel·lular (Brunet *et al.* 2004). SIRT1 també pot desacetilar a la subunitat Ku70 de la DNA-PK, que intervé en la reparació de l'ADN, i això provoca que el Ku70 s'uneixi a Bax i no permet que aquest arribi a la mitocondria (Jeong *et al.* 2007). Una altra acció de SIRT1 es sobre E2F, aquest s'uneix al promotor de SIRT1 i activa la seva transcripció i en canvi SIRT1 inhibeix a E2F (Wang *et al.* 2006a). La SIRT2, al ser citosòlica, pot inhibir a la p53 quan aquesta es troba en aquest compartiment cel·lular. Per últim, afegir que un altre possible mecanisme de protecció enfront de la mort neuronal, podria ser a través de la SIRT3 mitocondrial, que podria interaccionar amb algunes proteïnes de la mitocondria per disminuir la producció de ROS (Anekonda and Reddy 2006).

1.5. MODEL EXPERIMENTAL: LA DEPRIVACIÓ DE SÈRUM I POTASSI EN NEURONES GRANULARS DE CEREBEL

El desenvolupament de models *in vitro* vàlids per a l'estudi dels processos de la mort cel·lular programada en neurones és complicat. Un dels models més utilitzats és el dels cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel. Més concretament, el model experimental que s'ha escollit ha estat la deprivació de sèrum i potassi (DV S/K) en CGC.

1.5.1. Neurones granulars de cerebel

El cerebel és una regió de l'encèfal que juga un paper important en la integració de la percepció sensorial i el control motor. Anatòmicament està dividit en dues zones, la substància gris, que engloba als nuclis profunds i l'escorça cerebel·lar externa, i la substància blanca que es troba a la part interna envoltant als nuclis. La escorça cerebel·lar està formada per tres capes, la capa molecular que és la més superficial i està formada principalment per axons de les CGC i dendrites d'altres neurones, la capa de les cèl·lules de Purkinje, que són unes neurones de grans dimensions i la capa més interna, que és la capa granular, que conté els somes i les dendrites de les CGC. A més d'aquestes neurones, en el còrtex cerebel·lar es poden trobar altres tipus neuronals, com les cèl·lules de Golgi o les cèl·lules estrellades.

Existeix un número molt elevat de CGC, que són les neurones més petites del sistema nerviós humà i que es troben densament empaquetades dins la capa granular. Durant el desenvolupament, aquestes neurones proliferen dins la capa granular externa, d'on posteriorment migren cap a l'interior per formar la capa granular interna present al cerebel adult (Ryder and Cepko 1994).

El cerebel és una de les àrees de l'encèfal on el fenomen de l'apoptosi durant el desenvolupament és més dramàtic. Només aproximadament la meitat de les CGC generades arriben a ser neurones madures, l'altra meitat es perd en el procés apoptòtic que es dona tant a la capa granular externa com a la interna (Wood *et al.* 1993). Les CGC que no estableixen sinapsi amb les fibres molsoses durant la migració moren per apoptosi, ja que aquestes fibres aporten constantment estímuls excitadors imprescindibles per la seva supervivència, proliferació, migració i desenvolupament (Williams and Herrup 1988; Wood *et al.* 1993).

Aquest procés de maduració es pot mimetitzar *in vitro* realitzant un cultiu primari de CGC, el que permetrà obtenir un bon model per caracteritzar i estudiar el fenomen de l'apoptosi. Les CGC s'obtenen a partir de cerebels de cries de rata de 7-8 dies. El rendiment és molt alt, uns 20 milions per cada animal. Les CGC es poden mantenir vives en cultiu més enllà del dia 7 de cultiu, si al medi de cultiu amb sèrum hi afegim concentracions despolaritzants de potassi (25 mM, enlloc de la fisiològica que és 5 mM) (Gallo *et al.* 1987) o concentracions baixes de NMDA (Balazs *et al.* 1988). Es creu que tant el potassi com el NMDA imitarien l'activitat excitatòria endògena necessària per la supervivència (Burgoyne *et al.* 1993) i que això podria ser a través de l'entrada de calci (Pearson *et al.* 1992). Durant els dos primers dies de cultiu les CGC encara són immadures i fins passat 6 dies no seran totalment madures. La puresa d'aquest tipus de cultiu primari és alta, ja que el 95% de les cèl·lules del cultiu seran CGC, la resta majoritàriament seran astròcits (Thangnipon *et al.* 1983). També s'ha demostrat que alguns factors tròfics com l'IGF-1 o el BDNF, poden protegir de la mort apoptòtica produïda pel creixement de les CGC en concentracions fisiològiques de potassi (5mM) (D'Mello *et al.* 1993; Kubo *et al.* 1995).

1.5.2. Deprivació de sèrum i potassi

En cultius de CGC la DV S/K és un estímul que condueix a una mort morfològicament apoptòtica, amb fragmentació de l'ADN i depenent de síntesi macromolecular (D'Mello *et al.* 1993). Encara que generalment referit com a deprivació de potassi, el procediment publicat per D'Mello l'any 1993, inclou també la deprivació sèrum. De fet s'ha demostrat que existeixen dues poblacions de CGC, les que moren durant les primeres hores com a resultat de la deprivació del sèrum, que representen un 20%, i les que triguen més en morir, que a les 96 hores representen el 50% i que són la conseqüència de la deprivació de potassi. Així doncs, encara que el model de DV S/K és més complex, degut a que retirem del medi dues fonts de suport tròfic simultàniament, és més correcte que només retirar un dels dos factors, ja que aquests no provocarien la mort de totes les cèl·lules i, per tant, hi hauria contaminació amb cèl·lules vives (Miller and Johnson, Jr. 1996).

En quant a les vies que activen la mort en aquest model, està demostrat que la DV S/K en CGC activa la caspasa 3 i que ho fa mitjançant la caspasa 9, deixant aparentment sense funció a la caspasa 8 (Gerhardt *et al.* 2001). Això permet formular la hipòtesi de que la DV S/K activa la via mitocondrial. De fet, s'ha determinat que es dóna una baixada del $\Delta\Psi_m$, tot i que aquesta no explica la sortida de citocrom c, ja que es dóna posteriorment (Wigdal *et al.* 2002). També s'ha demostrat que la DV S/K

activa a diferents proteïnes reguladores de la via mitocondrial com la JNK, que a la seva vegada activa a c-Jun i a les proteïnes BH3 DP5 i Bim (Harris and Johnson, Jr. 2001). També s'activa la p38 (Yamagishi *et al.* 2001), la NP1 (*Neuronal pentraxin1*) (Enguita *et al.* 2005) i la GSK-3 β , que regularà la translocació de Bax a la mitocòndria (Linseman *et al.* 2004). Paral·lelament poden activar-se vies de mort independent de caspases com la de l'AIF (Slagsvold *et al.* 2003), la de les calpàines (Nath *et al.* 1996) o l'autofàgia i les catepsines (Canu *et al.* 2005;Kaasik *et al.* 2005).

La mort induïda per la DV S/K en CGC, no només es relaciona amb l'activació de les vies de mort, sinó que també es relaciona amb la inhibició de les vies de supervivència. Està demostrat que en aquest model la via de la PI3-K/AKT està inhibida i que els efectes protectors del potassi a 25 mM, del NMDA i de l'IGF-1 poden venir donats, en part, per l'activació que provoquen d'aquesta via. En el cas del potassi 25 mM, l'AKT/PKB s'activa, però no a través de la PI3-K (Lafon-Cazal *et al.* 2002;Xifro *et al.* 2005;D'Mello *et al.* 1997). En general s'accepta que la via Raf-MEK-ERK també és important per la supervivència neuronal, tot i que existeix una certa controvèrsia, ja que segons quines són les condicions ERK també pot induir la mort. En el model de la DV S/K alguns treballs indiquen que ERK activaria la mort i en canvi altres diuen el contrari (veure apartat 1.4.1.). Finalment, també cal esmentar al NF- κ B, que generalment també indueix la supervivència i que en aquest model té la seva activitat disminuïda (Koulich *et al.* 2001).

1.6. MOLÈCULES UTILITZADES PER PREVENIR L'APOPTOSI

Actualment existeixen diferents teràpies simptomàtiques per algunes malalties neurodegeneratives, però en canvi hi ha una manca de fàrmacs que previnguin la mort neuronal. Un millor coneixement dels mecanismes i de les vies de senyalització que provoquen la mort neuronal, han facilitat la identificació de diferents molècules moduladores d'aquestes vies. En aquest apartat es descriuen les diferents molècules que s'han utilitzat en aquest treball de tesi doctoral per prevenir la mort apoptòtica induïda per la DV S/K en CGC.

1.6.1. Inhibidors de la GSK3

La GSK3 s'activa durant l'apoptosi neuronal i com ja s'ha explicat en l'apartat 1.3.2.8., activa diferents proteïnes que conduiran a la mort. Els inhibidors de la GSK3 utilitzats han estat el liti, el SB-415286 i l' AR-A014418.

1.6.1.1. Liti

El liti és un catió monovalent que s'administra en forma de clorur de liti. Actualment s'utilitza com a fàrmac pel tractament dels trastorns bipolars (Li *et al.* 2002c), però també s'ha determinat que té propietats neuroprotectores en cultius neuronals (Nonaka and Chuang 1998).

El liti pot inhibir la GSK3 per dos mecanismes diferents, directament competint amb el magnesi (Klein and Melton 1996) i indirectament inhibint la PP2A (*Phosphatase 2A*), que per tant no inhibirà l'AKT/PKB, que fosforilarà i inhibirà la GSK3 β en la serina 9 i la GSK3 α en la 21 (Mora *et al.* 2002). La seva IC₅₀ (*Inhibitory concentration 50*) és 2 mM.

El principal problema del liti, a l'hora d'estudiar els efectes de la GSK3, és la seva inespecificitat, ja que a més d'inhibir la GSK3, també pot activar l'AKT/PKB, la qual té un gran nombre de substrats, o inhibir altres quinases com la MAPKAPK-2 (Davies *et al.* 2000) o a les monofosfoesterases (Gould *et al.* 2004).

1.6.1.2. SB-415286

El SB-415286 és un derivat de les maleïmides, més concretament una anilinomaleïmida, que inhibeix la GSK3 al competir amb l'ATP pel seu lloc d'unió. És un inhibidor molt potent, amb una IC₅₀ de 130 nM, i bastant específic (Coghlan *et al.* 2000)(Fig. 22).

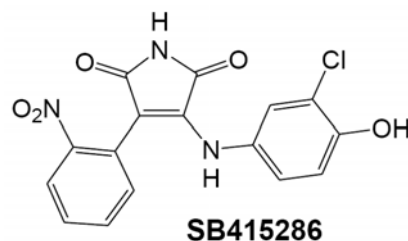


Figura 22. Estructura química del SB-415286 (Meijer *et al.* 2004)

1.6.1.3. AR-A014418

L'AR-A014418 és un tiazol que inhibeix la GSK3 al competir pel lloc d'unió a l'ATP. És un inhibidor molt potent, fins i tot, una mica més que el SB-415286, ja que la seva IC_{50} és de 104 nM. És un dels inhibidors més específics de la GSK3 (Meijer *et al.* 2004) (Fig. 23).

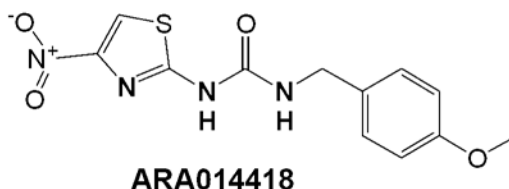


Figura 23. Estructura química del AR-A014418 (Meijer *et al.* 2004)

1.6.2. SP-600125

La JNK també s'activa durant l'apoptosi neuronal i regula diferents vies implicades en la mort (veure apartat 1.3.2.9). El SP-600125 és un derivat de l'antrapirazolona que inhibeix la JNK al competir pel seu lloc d'unió a l'ATP. És bastant potent, ja que la seva IC_{50} és de 40 nM per la JNK1 i la JNK2 i de 90nM per la JNK3. També és molt específic, ja que no inhibeix les altres MAPK, p38 i ERK, fins que no s'augmenta unes 300 vegades la seva concentració (Bennett *et al.* 2001). Tot i això, s'ha observat que a concentracions d'entre 1 i 1,5 μ M pot inhibir les MKK3 i 6, que també activen la p38 (Kuan and Burke 2005), però no es fins la concentració de 50 μ M, que això es veu reflectit en una disminució de la fosforilació de la p38 (Fig. 24) (Bennett *et al.* 2001).

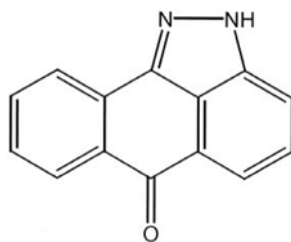


Figura 24. Estructura química del SP-600125 (Bennett *et al.* 2001)

1.6.3. Resveratrol

El resveratrol és una fitoalexina produïda per diferents plantes en resposta a l'atac per fongs o bacteris. Està demostrat que el resveratrol pot prevenir o endarrerir

diferents malalties com el càncer, les malalties cardiovasculars o els danys derivats de l'isquèmia, així com augmentar la resistència a l'estrès oxidatiu i expandir l'esperança de vida de diferents organismes, que van dels llevats als vertebrats. El resveratrol es troba present a la pell del raïm i, en conseqüència, al vi (Revisat per Baur and Sinclair 2006). Aquest compost s'ha demostrat que té propietats antioxidants (De *et al.* 2000), així com la capacitat d'activar a la SIRT1 (Howitz *et al.* 2003). Aquestes dues propietats podrien explicar els seus efectes neuroprotectors (Anekonda and Reddy 2006) (Fig. 25).

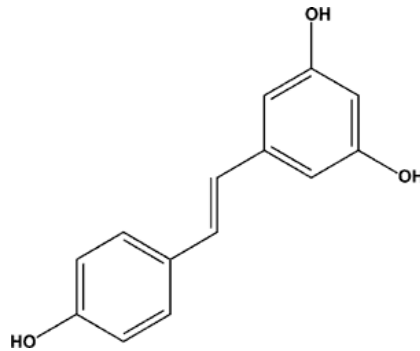


Figura 25. Estructura química del resveratrol

1.6.4. Cafeïna

La cafeïna és un derivat alcaloide del grup de les xantines, que es troba en els grans i les fulles del cafè, però també en fulles, llavors i fruits de unes 60 plantes, on actua com a pesticida natural.

Aquest compost és un estimulants del sistema nerviós central i els seus principals mecanismes d'acció són antagonitzar els receptors d'adenosina i inhibir la fosfodiesterasa del cAMP. També s'ha demostrat que pot inhibir l'ATM (Nehlig *et al.* 1992) (Fig. 26).

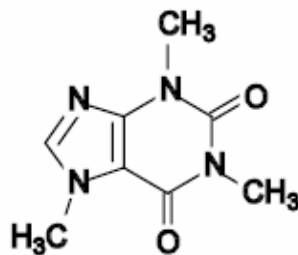


Figura 26. Estructura química de la cafeïna

Objectius

2. OBJECTIUS

L'objectiu general d'aquest treball ha estat estudiar la regulació de les vies implicades en els processos de senyalització intracel·lular durant l'apoptosi neuronal. Més concretament, els objectius han estat els següents:

1. Estudiar el paper de la GSK3 en l'apoptosi induïda per la deprivació de sèrum i potassi en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel.

1.1. Determinar si la GSK3 està implicada en l'activació aberrant del cicle cel·lular.

1.2. Avaluar el paper de la GSK3 en situacions d'estrès oxidatiu.

1.3. Estudiar el paper de la GSK3 en l'alliberament mitocondrial d'AIF.

2. Estudiar el paper de la JNK en l'apoptosi induïda per la deprivació de sèrum i potassi en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel.

2.1. Determinar la interacció de la JNK amb altres vies de senyalització intracel·lular relacionades amb l'apoptosi o amb la supervivència neuronal.

3. Avaluar l'efecte de la inhibició de l'ATM en l'apoptosi induïda per la deprivació de sèrum i potassi en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel.

4. Estudiar el paper de la sirtuïna 1 en l'apoptosi induïda per la deprivació de sèrum i potassi en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel.

Materials i mètodes

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1. CULTIU PRIMARI DE CÈL·LULES GRANULARS DE CEREBEL

Els cultius primaris de CGC es preparen a partir d'una llodrigada de 10 cries de rata de la soca *Sprague-Dawley* de 7 a 8 dies d'edat.

3.1.1. Solucions

- Solució Krebs estoc (10 X) per a cultius

Substàncies	Quantitats
NaCl	17,65 g
KCl	0,9 g
KH ₂ PO ₄	0,415 g
D-Glucosa	6,425 g
NaHCO ₃	5,35 g
Roig Fenol	0,025 g

Es porta a 250 ml amb aigua bidestil·lada (H₂O Milli-Q) i es guarda a 4°C.

- Solució estoc de MgSO₄ al 3,82%

Pesar 3,82 g de MgSO₄ (anhidre) i dissoldre en 100 ml d'H₂O Milli-Q i es guarda a 4°C.

- Solució estoc de CaCl₂ al 0,18%

Pesar 0,18 g de CaCl₂ i dissoldre en 100 ml d'H₂O Milli-Q i es guarda a 4°C.

- Medi BME (*Basal medium Eagle*) sense glutamina (41010, GIBCO)

- Sèrum fetal boví (FBS, *Foetal bovine serum*) inactivat (10108-165, Invitrogen)

- Solucions preparades just abans de la dissecció (per a una camada de deu cries)

- Solució A

- 300 mg d'albumina sèrica bovina (BSA, *Bovine serum albumin*) (P5405, Sigma)

- 10 ml de Krebs estoc
- 0,8 ml MgSO₄
- Enrasar fins a 100 ml amb H₂O Milli-Q

Cal afegir lentament la BSA sobre uns 60 ml de líquid, sense agitar, per no fer escuma.

- Solució B

- 3,12 mg de tripsina (T9201, Sigma)
- 12,5 ml amb solució A

- Solució C

- 1,25 mg desoxiribonucleasa (D5025-150KU, Sigma)
- 3,9 mg de inhibidor de la tripsina (T9003, Sigma)
- 75 µl de MgSO₄ estoc
- 7,5 ml de solució A

- Solució D

- 2 ml de la solució C
- 10,5 ml de la solució A

- Solució E

- 6,25 ml de la solució A
- 50 µl de MgSO₄ estoc
- 50 µl de CaCl₂ estoc

3.1.2. Preparació de les plaques de poli-L-lisina

Un dia abans de la preparació del cultiu cal recobrir la superfície de les plaques amb poli-L-lisina (P6282, Sigma) per facilitar l'adherència de les cèl·lules. Aquest tractament també s'ha de dur a terme quan s'empren cobreobjectes.

El procediment a seguir és el següent (sempre treballant dins la campana de flux laminar):

- 1- Afegir 50 ml d'H₂O estèril en una ampolla de poli-L-lisina liofilitzada (5mg).
- 2- Pipetejar 25 ml i passar-los a un flascó estèril de plàstic de 250 ml.
- 3- Afegir 225 ml d'H₂O (concentració final de 0,01mg/ml).
- 4- Distribuir amb una pipeta estèril a les plaques, segons el tipus de placa:
 - 0,2 ml per pou d'una placa de 96 pous.

- 0,5 ml per pou d'una placa de 24 pous.
- 2,5 ml per pou d'una placa de 6 pous.
- 8 ml per placa de 100 mm de diàmetre.

5- Al cap de 30-45 minuts aspirar el contingut i posar les plaques a l'incubador. Cal eixugar bé les plaques per aspiració o evaporació.

3.1.3. Protocol de preparació del cultiu

Els cultius primaris de CGC es van preparar seguint el següent protocol, sempre treballant en condicions d'esterilitat.

- 1- Preparar les solucions A, B, C, D i E i filtrar-les amb un filtre estèril de 0.22 µm.
- 2- Distribuir 2 ml de solució estèril A en dues plaques de 35 mm. Decapitar tres cries de rata i extreure el cerebel el qual es diposita en una de les plaques. Netejar convenientment les meninges adherides al cerebel i passar els cerebels nets a l'altra placa. Repetir aquests passos amb totes les cries.
- 3- Un cop tenim nets els cerebels, es deixen sobre una placa de 100 mm de diàmetre i es fan una sèrie de talls en direccions oposades amb una fulla d'afaitar estèril.
- 4- Es transfereixen els bocins amb una pipeta Pasteur a un tub de 50 ml que conté uns 50 ml de solució A i es centrifuguen durant 2 minuts a 1000 r.p.m. .
- 5- Aspirar el sobrenadant, afegir la solució B i es passa a un flascó de 250 ml estèril, que es deixa en un bany a 37°C amb agitació enèrgica durant 15 minuts.
- 6- Afegir el contingut del tub D i dispersar el col·loide que es formi amb una pipeta Pasteur estèril. Es transfereix al tub D i es centrifuga durant 3 minuts a 1000 r.p.m.
- 7- Aspirar amb cura el sobrenadant amb una pipeta de 10 ml, deixant al flascó uns dos mil límetres de solució.
- 8- Afegir la meitat del volum total que tenim de solució C. Resuspendre el precipitat i es pipeteja 25-30 vegades amb una pipeta Pasteur. Acabem d'afegir el que queda de la solució C, tornem a pipetejar 15 vegades més i es deixa sedimentar 10 minuts.
- 9- Aspirar el sobrenadant, on es troben les cèl·lules dissociades, i es porta al tub amb la solució E amb una pipeta Pasteur, deixant uns 3 ml sobre el sediment. Es disgrega el sediment pujant i baixant amb la pipeta unes deu vegades i es transfereix al tub E, vigilant que tot quedi ben triturat, i es deixa sedimentar uns 10 minuts més.

10- El sobrenadant es passa a un tub de 50 ml i es centrifuga 7 minuts a 1000 r.p.m.

11- Durant aquest interval de temps es prepara el medi complet de cultiu, es pesen 12,5 mg gentamicina (G-1264, Sigma), 73 mg de glutamina (69273, Sigma) i 412,5 mg de KCl (P4505, Sigma) i es dipositen en un tub de 50 ml, on es dissoldran amb 50 ml de BME. Això es filtra en un flascó de 250 ml amb un filtre de 0.22 µm. S'afegeixen 25 ml de FBS i es completa amb BME fins a 250 ml. La concentració final de potassi és de 25 mM, la qual permet la despolarització de les cèl·lules, que és necessària per la seva supervivència.

12- Després de centrifugar, es descarta el sobrenadant per aspiració, es resuspèn el sediment en 10 ml de medi complet i es fa el comptatge de les cèl·lules. La densitat final ha de ser de $0,6 \times 10^6$ cèl·lules/ml. Es sembren 0,2 ml per pou d'una placa de 96 pous, 0,5 ml per pou d'una placa de 24 pous, 2,5 ml per pou d'una placa de 6 pous i 10 ml per placa de 100 mm de diàmetre. Les cèl·lules es mantenen en un incubador a 37°C i a 5% CO₂.

13- Al cap de 16-18 hores, s'afegeix citosin-arabinòsid (C6645, Sigma) a una concentració de 10 µM per placa, amb la finalitat d'inhibir el creixement de cèl·lules no neuronals.

3.2. TRACTAMENTS DELS CULTIUS DE CGC

3.2.1. Pretractaments

Als 7 dies de cultiu *in vitro* les cèl·lules es pretracten amb els següents compostos potencialment neuroprotectors:

- Clorur de liti (5679, Merck)

Inhibidor de la GSK3 utilitzat a una concentració de 10 mM. El mateix dia del tractament es prepara una solució mare de 160 mM en medi BME a partir de la qual es tracta a les cèl·lules.

-SB-415286 (S3567, Sigma)

Inhibidor de la GSK3 utilitzat a una concentració de 20 µM. Solució mare de 20 mM preparada en DMSO, que es guarda alíquotada a -20°C.

- AR-014418 (A3230, Sigma)

Inhibidor de la GSK3 utilitzat a una concentració de 20 μ M. Solució mare de 16 mM preparada en DMSO, que es guarda aliquidada a -20°C.

- SP-600125 (S5567, Sigma)

Inhibidor de la JNK utilitzat a una concentració de 10 μ M. Solució mare de 20 mM preparada en DMSO, que es guarda aliquidada a -20°C.

- Cafeïna (C0750, Sigma)

Inhibidor de l'ATM utilitzat a una concentració de 1,5 i 10 mM. El mateix dia del tractament es prepara una solució mare de 100 mM en medi BME a partir de la qual es tracta a les cèl·lules.

- Resveratrol (R5010, Sigma)

Activador de la SIRT1 i antioxidant utilitzat a una concentració de 100 μ M. Solució mare de 5 mM preparada en etanol, que es guarda aliquidada a -20°C.

- z-VAD-FMK (N-1560, Bachem)

Inhibidor de les caspases utilitzat a una concentració de 100 μ M. Solució mare de 20 mM preparada en DMSO que es guarda aliquidada a -20°C.

Altres compostos utilitzats als 7 dies de cultiu *in vitro*:

- LY-294,002 (L9908, Sigma)

Inhibidor de la PI3K utilitzat a una concentració de 30 μ M. Solució mare de 14,5 mM preparada en DMSO, que es guarda aliquidada a -20°C.

- K252a (05288, Fluka)

Inhibidor dels receptors Trk utilitzat a una concentració de 100 nM. Solució mare de 1,07 mM preparada en DMSO, que es guarda aliquidada a -20°C.

- MK-801 (M107, Sigma)

Antagonista del receptor NMDA utilitzat a una concentració de 10 μ M. Solució mare de 2,96 mM preparada en etanol, que es guarda aliquidada a -20°C.

- PP2 (529573, Calbiochem)

Inhibidor de la quinasa Src utilitzat a una concentració de 5 μM . Solució mare de 3,31 mM preparada en DMSO, que es guarda al·liquotada a -20°C .

3.2.2. Tractaments inductors de l'apoptosi

Als 8 dies de cultiu *in vitro*, 24 hores després del pretractament, les cèl·lules eren sotmeses als següents tractaments per induir la mort per apoptosi de les CGC:

- Deprivació de sèrum i potassi

Es retira el medi complet de cultiu i les cèl·lules es mantenen durant 12 hores en un medi sense sèrum i amb concentracions fisiològiques de potassi (5 mM, enlloc de la concentració despolaritzant de 25 mM del medi complet). El medi deprivat de sèrum i potassi de les cèl·lules que s'havien pretractat amb algun compost, ha d'incorporar aquest compost.

- H_2O_2 (202460250, Acros Organics)

Es tracten les cèl·lules durant 30 minuts amb H_2O_2 , que queda a una concentració final de 100 μM , després dels quals es retira el medi i les cèl·lules es mantenen en medi de cultiu complet (a on s'incorpora els compostos del pretractament quan s'escau) durant 24 hores.

- Kainat (ASC-100, Ascent Scientific)

Es tracten les cèl·lules durant 24 hores amb aquest agonista dels receptors kainat de glutamat utilitzat a una concentració de 500 μM .

- Nocodazol (M1404, Sigma)

Es tracten les cèl·lules durant 24 hores amb aquest agent disruptor del citoesquelet utilitzat a una concentració de 10 mM.

- MPP+ (D048, Sigma)

Es tracten les cèl·lules durant 48 hores amb aquest compost, que inhibeix el complex I de la cadena transportadora d'electrons mitocondrial utilitzat a 200 μM .

3.3. QUANTIFICACIÓ DE L'APOPTOSI PER CITOMETRIA DE FLUX

La citometria de flux permet detectar, mitjançant la utilització de fluorocroms selectius, diferents paràmetres òptics sobre una població cel·lular en suspensió. Aquests són analitzats per cada cèl·lula a temps real i amb gran rapidesa, permetent l'estudi de la seva grandària, granularitat o fluorescència. El fet que es tracti d'un sistema dinàmic permet una ràpida velocitat d'anàlisi (fins a 30000 partícules/segon) de manera automatitzada i mesurant diferents paràmetres alhora. Les dades són tractades i emmagatzemades en un ordinador de forma que és possible seleccionar un nombre determinat de cèl·lules i ser analitzades posteriorment.

El sistema d'anàlisi d'un citòmetre de flux es basa en que les cèl·lules o partícules en suspensió són injectades de manera alineada en un flux laminar, de tal forma que flueixen una darrera l'altra. La intersecció de cada una d'aquestes cèl·lules amb un feix de llum d'elevada intensitat (generalment làser) provoca l'emissió de dos tipus de radiació electromagnètica: una de dispersió (*scattered*) i l'altra fluorescent. Ambdues radiacions són dirigides a fotomultiplicadors que recullen la llum concentrada per sistemes de lents i la transformen en impulsos elèctrics de diferents intensitats en funció del nombre de fotons incidents.

El marcatge per iodur de propidi (IP) pot ser un indicador de mort cel·lular, ja que només penetra si la membrana cel·lular està deteriorada o pels porus de les cèl·lules mortes, fixant-se a l'ADN. Però en el cas de les cèl·lules permeabilitzades, on es trenquen totalment les membranes cel·lulars, el marcatge amb IP s'utilitza per quantificar material nucleic. El marcatge per IP ens permetrà diferenciar les cèl·lules vives, amb un contingut normal d'àcids nucleics, de les apoptòtiques, que degut a la fragmentació de l'ADN típica de l'apoptosi han perdut part del material nucleic.

3.3.1. Protocol

- 1- Afegir a cada pou de la placa de 96 pous Triton-X-100 (T-9284, Sigma), que queda a una concentració final del 0.5%, i IP (P4170, Sigma), que queda a una concentració de 25 µg/ml. El Triton-X-100 és un detergent que trenca la membrana de les cèl·lules i facilita la posterior incorporació del IP a l'ADN.
- 2- Es deixa la placa una hora a temperatura ambient (R.T., *Room temperature*) protegida del contacte amb la llum.

3- Recollir el medi de cada pou per aspiració amb un pipeta automàtica i es diposita en tubs d'assaig per a la lectura en el citòmetre de flux (Epics XL, Beckman Coulter).

3.4. DETECCIÓ I COMPTATGE DE NUCLIS APOPTÒTICS TENYITS AMB IODUR DE PROPIDI

Aquesta tècnica ens permet observar la morfologia dels nuclis neuronals després de la tinció amb IP, detectant els canvis morfològics que es donen durant l'apoptosi. Els nuclis de les cèl·lules apoptòtiques estan més contrets i són més brillants, en comparació amb les cèl·lules no apoptòtiques, degut a que tenen la cromatina condensada.

3.4.1. Protocol

- 1- Les cèl·lules cultivades en plaques de 96 pous es fixen amb una solució de paraformaldehid al 4% en PBS durant una hora a R.T. .
- 2- Rentar les cèl·lules amb PBS
- 3- Incubar 5 minuts a R.T. amb IP (solució final 25 µg/ml).
- 4- Visualitzar en un microscopi de fluorescència (Eclipse TE200, Nikon) a 200 augments (objectiu 20x). El microscopi està equipat amb una càmera digital que permet captar les imatges representatives de la morfologia nuclear (programa Image Kappa Base). El percentatge de cèl·lules apoptòtiques es calcula després de comptar almenys 500 cèl·lules en cada mostra de tres experiments independents.

3.5. QUANTIFICACIÓ DE LA VIABILITAT CEL·LULAR PER MTT

Per determinar la viabilitat dels cultius de CGC utilitzem el mètode del MTT (bromur de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium). Aquest colorant s'incorpora a les cèl·lules vives i es redueix a nivell mitocondrial en formazan (Hansen *et al.* 1989), substància de color blau fosc que pot quantificar-se en un espectrofotòmetre. A partir de l'absorbància es calcula la viabilitat de les cèl·lules tractades respecte a les control.

3.5.1. Protocol

- 1- Preparar una solució mare de MTT (M2128, Sigma) de 2,5 mg/ml en PBS. Aquesta solució es pot conservar fins a un mes a 4°C protegida de la llum.
- 2- Afegir 4 µl de la solució mare a cada pou de la placa de 96 pous i mantenir les cèl·lules a l'incubador a 37°C i 5% de CO₂ durant una hora, temps que permet a les cèl·lules vives incorporar el colorant.
- 3- Aspirar el medi i afegir 0,2 ml de solució de decoloració per pou. La solució decolorant consisteix en una solució al 10% de SDS (dodecail sulfat sòdic) (161-0302, Bio-Rad) en DMSO, amb 57,2 µl d'àcid acètic glacial per cada 10 ml de la solució. Per tal que es dissolgui totalment, es posa al bany d'ultrasons on s'acabarà d'homogeneïtzar.
- 4-Llegir l'absorbància a 570 nm en l'espectrofotòmetre lector de microplaques (Microplate reader Model 550, Bio-Rad). Els valors obtinguts en les cèl·lules tractades es comparen amb els dels pous no tractats o controls, que es consideren el 100% de la viabilitat, obtenint així el percentatge de la viabilitat.

3.6. QUANTIFICACIÓ DE LES ESPÈCIES REACTIVES D'OXIGEN

Els nivells intracel·lulars de les espècies reactives d'oxigen (ROS) es van detectar utilitzant un compost anomenat H₂DCF-DA (2,7-dichlorodihidrofluoresceïn diacetate). El H₂DCF-DA és un compost no fluorescent, que es transporta a través de la membrana plasmàtica i desacetilat per esterases per formar H₂DCF, el qual queda atrapat dins les cèl·lules i reacciona amb les ROS, oxidant-se a la forma fluorescent DCF. La quantitat de fluorescència detectada és proporcional a la quantitat de ROS.

3.6.1. Protocol

- 1- Preparar una solució mare de 10 mM de H₂DCF-DA (D-6883, Sigma). en DMSO i afegir a les cèl·lules de manera que la concentració final sigui 10 µM.
- 2- Mantenir les cèl·lules durant una hora a l'incubador a 37°C i 5% de CO₂ protegides del contacte amb la llum.
- 3- Llegir la fluorescència a una longitud d'ona d'excitació de 488 nm i a una longitud d'ona d'emissió de 510 nm en un fluorímetre (Victor 3, Perkin Elmer).

3.7. QUANTIFICACIÓ DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA DE LA CASPASA 3

L'activitat de la caspasa 3 pot ser mesurada amb un assaig colorimètric que consisteix en la detecció espectrofotomètrica del cromòfor p-nitroanilina (pNA). Aquest cromòfor es troba unit a la seqüència d'aminoàcids DEVD (Asp-Glu-Val-Asp), que la caspasa 3 talla específicament en el residu Asp de l'extrem carboxi terminal. Un cop el cromòfor Ac-DEVD-pNA es tallat per la caspasa 3, el pNA pot emetre llum. L'emissió de llum per el pNA pot ser quantificada mitjançant un espectrofotòmetre i es proporcional a l'activitat de la caspasa 3. La comparació de l'absorbància de pNA d'una mostra sotmesa a un estímul apoptòtic amb una mostra control, permet la determinació d'un canvi de l'activitat de la caspasa 3.

3.7.1. Protocol

1- Obtenir l'extracte proteic de les cèl·lules i separar l'extracte nuclear del citoplasmàtic. Aquest últim és el que utilitzarem per mesurar l'activitat de la caspasa 3.

- 1.1- Dipositar les plaques en una safata amb gel.
- 1.2- Aspirar el medi de cultiu de les plaques, afegir 0,5 ml de PBS i rascar les cèl·lules amb un rascador.
- 1.3- Amb una pipeta recollir la suspensió cel·lular .
- 1.4- Centrifugar durant 10 minuts a 1500 r.p.m. .
- 1.5- Descartar el sobrenedant i afegir 100 µl del tampó de lisi.
- 1.6- Deixar les mostres en gel durant 10 minuts.
- 1.7- Centrifugar durant un minut a 15000 r.p.m. .
- 1.8- Recollir el sobrenedant, que contindrà majoritàriament citoplasma, i descartar el precipitat, que contindrà l'extracte nuclear. Si volem aprofitar l'extracte nuclear per alguna altra determinació, podem resuspendre el precipitat en 100 µl del tampó Tris HCl-IP. Les mostres es poden conservar a -80°C.

Tampó de lisi:

Hepes	50 nM
NaCl	100 mM
CHAPS	0,1%
EDTA	0,1 mM

Tampó Tris-HCl + Inhibidors de proteases:

	Concentració final	Volum (μ l)
Tris HCl	50 mM	4 ml
PMSF 0,1M	0,1mM	4 μ l
OVNa 1M	1mM	4 μ l
Aprotinina	3 μ g/ml	12 μ l

PMSF: Fluorur de fenilmetilsulfonil

OVNa: Ortovanadat sòdic

2- Determinar la concentració proteica de les mostres mitjançant el mètode BCA (*bicinchoninic acid*) (BCA Protein Assay Kit, 23225, Pierce Chemical). La raó d'utilitzar aquest mètode enlloc del de Bradford és la presència del detergent CHAPS en el tampó de lisi, utilitzat en l'obtenció de l'extracte proteic, que ens interfereix amb el reactiu del mètode de Bradford. Aquest mètode es basa en la reducció del Cu^{2+} a Cu^{1+} , provocada per la presència de proteïna en un medi alcalí, i en la detecció colorimètrica del Cu^{1+} pel BCA, que és altament sensible i selectiva.

2.1- Fer una dilució 1:5 de les mostres amb H_2O Milli-Q i posar 10 μ l de cadascuna en un pou d'una placa de 96 pous.

2.2- Preparar una recta patró amb BSA a diferents concentracions: de 0,25 a 15 μ g/10 μ l. A partir d'una solució mare de 2 mg BSA/ml, fer un banc de dilucions i posar 10 μ l d'aquestes dilucions a cada pou per obtenir les concentracions anteriors.

2.3- Afegir 190 μ l del reactiu del *kit* a cada pou.

2.4- Incubar la placa durant 30 minuts a 37°C.

2.5- Llegir l'absorbància a 562 nm en un aparell lector de microplaques.

2.6- A partir de la mitja de l'absorbància de les mostres de la recta patró construir una recta de regressió. Interpolar les absorbàncies de les mostres problema en aquesta recta, per obtenir el valor de la concentració proteica de cadascuna de les mostres.

3- Diluir 50 μ g de l'extracte proteic citosòlic en 50 μ l de tampó de lisi cel·lular.

4- Afegir 50 μ l del tampó de reacció i 5 μ l de substrat 4 mM Ac-DEVD-pNA (BV-K106-3, Medical & Biological Laboratories) a cada mostra.

5- Incubar a 37°C durant 24 h.

6- Llegir l'absorbància a 405 nm en un aparell lector de microplaques.

Tampó de reacció

Hepes	50 mM
NaCl	100 mM
CHAPS	0,1 %
EDTA	0,1 mM
DTT	10 mM

DTT: Dithiothreitol (D9779, Sigma)

3.8. IMMUNOPRECIPITACIÓ I QUANTIFICACIÓ DE L'ACTIVITAT QUINASA DE LA GSK3- β

L'activitat de la GSK3- β es determina segons el mètode descrit per Bijur i Jope (Bijur *et al.* 2000).

3.8.1. Protocol

1- Obtenir l'extracte proteic de les cèl·lules. Durant aquest procés treballar sempre amb les mostres sobre gel.

1.1- Aspirar medi de les cèl·lules.

1.2- Rentar les cèl·lules amb PBS.

1.3- Lisar les cèl·lules afegint 200 μ l de tampó de lisi a cada pou d'una placa de 6 pous i rascar-les. El tampó de lisi està compostat per: Tris-HCl 20 mM pH 7.5, Nonidet P-40 (A-360, Sigma) 0,2%, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, NaF 100 mM (S-7920, Sigma), OVNa 1 mM, PMSF 100 μ M, leupeptina 10 μ g/ml, aprotinina (A6279, Sigma) 10 μ g/ml, pepstatina 5 μ g/ml, àcid okadaic 1 nM i glicogen (G0885, Sigma) 1 mg/ml.

1.4- Passar els lisats cel·lulars a través d'una xeringa de 23G 5 cops.

1.5- Deixar les mostres 10 minuts en gel.

1.6- Centrifugar les mostres 15 minuts a 14000 rpm a 4°C.

1.7- Agafar el sobrenedant i determinar la concentració proteica de les mostres mitjançant el mètode BCA (Veure apartat 3.7.).

2- Immunoprecipitar la GSK3- β .

2.1- Agafar 100 μ g de proteïna de cada mostra i afegir 40 μ l de proteïna G-sefarosa, deixar 90 minuts a 4°C.

2.2- Afegir 1,2 μ g d'anticòs contra la GSK3- β (BD Biosciences PharMingen) i deixar a 4°C durant tota la nit (O.N., *overnight*).

2.3- Rentar els immunocomplexes tres cops amb el tampó de lisi i un cop amb un tampó Tris-Hcl 20 mM pH 7.5, MgCl₂ 5 mM i DTT 1 mM.

2.4- L'eficiència de la immunoprecipitació s'examina immunodetectant la GSK3- β per Western Blot (Veure apartat 3.10.).

3- Determinar l'activitat de la GSK3- β .

3.1- Afegir als immunocomplexes de cada mostra 15 μ l del tampó quinasa compostat per: Tris-Hcl 20 mM pH 7.5, MgCl₂ 5 mM, DTT 1 mM, ATP 1.4 μ Ci de [γ -³²P]ATP 250 μ M i pèptid-2 de la fosfoglicogen sintasa (YRRAAVPPSPSLSRHSSPHQSEDEEE, Upstate Biotechnology). El tampó quinasa sense el pèptid s'utilitza com a control.

3.2- Incubar les mostres durant 30 minuts a 30°C.

3.3- Posar mostres en gel 3 minuts.

3.4- Centrifugar 3 minuts a 1800 x g.

3.5- Agafar els sobrenedants i posar 5 μ l de cada mostra en un paper de filtre P81 de 1 x 2 cm (Upstate Biotechnology).

3.6- Rentar els filtres 4 cops en àcid fosfòric al 0.5% durant una hora i un cop en etanol al 95% durant dos minuts.

3.7- Assecar els filtres i comptar en un comptador d'escentelleig líquid. El valor de l'activitat de la GSK3- β obtingut per cada mostra es corregeix pel valor de densitat òptica de la immunodetecció obtingut en el pas 2.4. .

3.9 OBTENCIÓ D'EXTRACTES PROTEICS

3.9.1. Obtenció d'extractes proteics totals

Aquest mètode ens permetrà obtenir l'extracte proteic de tota la cèl·lula. Cultivem les CGC en plaques de 100 mm de diàmetre i es recomana utilitzar almenys tres plaques per cada punt experimental. Durant tot el procés les mostres han d'estar en gel.

1- Aspirar el medi de cultiu de les cèl·lules.

2- Rentar cèl·lules amb PBS.

3- Afegir 150 μ l de tampó de lisi a la primera placa d'un dels punts experimentals i rascar les cèl·lules. Passar aquest lisat cel·lular a la següent placa i rascar les cèl·lules. Repetir aquest procés en totes les plaques del mateix punt experimental. El tampó de lisi està compostat per: PBS pH 7.4, Triton-

X-100 0,1%, PMSF 0,1 mM, OVNa 1 mM, aprotinina 5 µg/ml, còctel d'inhibidors de fosfatases 5 µl/ml PBS (P2850, Sigma).

4- Centrifugar durant dos minuts a 1000 x g a 4 °C.

5- Descartar el precipitat i recollir el sobrenedant.

6- Determinar la concentració proteica de les mostres mitjançant el mètode de Bradford (veure apartat 3.9.3.).

3.9.2. Obtenció d'extractes proteics enriquits en mitocondries

Aquest mètode ens permetrà fer fraccionaments subcel·lulars per obtenir extractes proteics enriquits en mitocondries, enriquits en nuclis i extractes citoplasmàtics. Cultivem les CGC en plaques de 100 mm de diàmetre i es recomana utilitzar almenys tres plaques per cada punt experimental. Durant tot el procés les mostres han d'estar en gel.

1- Aspirar el medi de cultiu de les cèl·lules.

2- Rentar les cèl·lules amb PBS.

3- Afegir 150 µl de tampó de lisi a la primera placa d'un dels punts experimentals i rascar les cèl·lules. Passar aquest lisat cel·lular a la següent placa i rascar les cèl·lules. Repetir aquest procés en totes les plaques del mateix punt experimental. El tampó de lisi està compost per: Hepes KOH pH 7.5, KCl 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM, DTT 1mM, PMSF 1 mM i aprotinina 2 µg/ml.

4- Lisar la suspensió cel·lular obtinguda amb un homogenitzador Potter-Elvehjem.

5- Centrifugar el lisat cel·lular durant 5 minuts a 500 x g a 4°C.

6- Agafar el sobrenedant i centrifugar durant 30 minuts a 10000 x g a 4°C. Si ens interessa obtenir l'extracte nuclear podem resuspendre el precipitat, que contindrà els nuclis, en 100 µl de Tris Hcl 50 mM, PMSF 0,1 mM, OVNa 1 mM i aprotinina 5 µg/ml.

7- El precipitat resultant és la fracció enriquida amb mitocondries, la qual resuspendrem en 50 µl de tampó de lisi. El sobrenedant és la fracció citosòlica, que es pot tornar a centrifugar durant 30 minuts a 10000 x g a 4°C, per tal de minimitzar la contaminació amb mitocondries.

6- Determinar la concentració proteica de les mostres mitjançant el mètode de Bradford.

3.9.3 Determinació de la concentració proteica pel mètode de Bradford

Aquest mètode de determinació de la concentració proteica es basa en una reacció colorimètrica amb el colorant Comassie Brilliant Blue G250, que té la capacitat d'unir-se a les proteïnes. L'absorbància màxima d'aquest colorant es desplaça d'una longitud d'ona de 465 nm a una de 595 nm quan s'uneix a les proteïnes. L'absorbància a 595 nm és directament proporcional a la quantitat de proteïna present en la mostra (Bradford 1976).

- 1- Fer una dilució 1:5 o 1:10 (segons la quantitat de mostra de partida) de les mostres amb H₂O Milli-Q i posar 10 µl de cadascuna en un pou d'una placa de 96 pous.
- 2- Preparar una recta patró amb BSA a diferents concentracions: de 1 a 5 µg/10 µl. A partir d'una solució mare de 2mg BSA/ml, fer un banc de dilucions i posar 10 µl d'aquestes dilucions a cada pou per obtenir les concentracions anteriors.
- 3- Afegir 190 µl del reactiu que conté el colorant (500-0006, Bio-Rad) a cada pou.
- 4- Incubar la placa durant 5 minuts a R.T..
- 5- Llegir l'absorbància a 595 nm en un aparell lector de microplaques.
- 6- A partir de la mitja de l'absorbància de les mostres de la recta patró construir una recta de regressió. Interpol·lar les absorbàncies de les mostres problema en aquesta recta, per obtenir el valor de la concentració proteica de cadascuna de les mostres.

3.10. WESTERN-BLOT

Aquesta tècnica ens permet immobilitzar les proteïnes en membranes sintètiques, a on les podem detectar amb anticossos específics. Primer les proteïnes es separen en un gel desnaturalitzant de poliàcrilamida per electroforesi. El camp elèctric aplicat fa que les proteïnes migrin per dins la matriu d'acrilamida, les de pes molecular més petit recorreran més distància que les de pes molecular més alt. A continuació les proteïnes es transfereixen a una membrana de fluorur de polivinilidè (PVDF), aquesta membrana s'incubarà amb un anticòs específic contra aquesta proteïna i la unió de l'anticòs amb la proteïna es detectarà per quimioluminiscència.

3.10.1 Tampons i solucions

- Tampó de mostra 2X (SB 2X)

Es dilueix 1:2 amb la mostra per quedri a 1X, serveix per desnaturalitzar les proteïnes i permetre la càrrega en el gel.

Tris-HCl 1M, pH 6.8	0,625 ml
SDS al 10%	2 ml
Glicerol	1 ml
β -mercaptoetanol (M7154,Sigma)	0,5 ml
Blau de bromofenol al 0,1%	0,6 ml
H ₂ O Milli-Q	0,275 ml

- Tampó Tris-HCl 1,5M pH 8.8

Tris base	18,16 g
H ₂ O Milli-Q	100 ml

Tris base (161-0719, Bio-Rad)

- Tampó Tris-HCl 1M pH 6.8

Tris base	12,1 g
H ₂ O Milli-Q	100 ml

- SDS al 10%

SDS	10 g
H ₂ O Milli-Q	100 ml

- Tampó de migració (*electrode/running buffer*)

	Concentració 1X	
Tris base	25 mM	3 g
Glicina	192 mM	14,4 g
SDS	0,1%	1g
H ₂ O Milli-Q		1 litre

Glicina (161-0718, Bio-Rad)

- Tampó de transferència 1 X

	Concentració 1X	
Tris base	25 mM	3,03 g
Glicina	192 mM	14,4 g
Metanol	10%	200 ml
H ₂ O Milli-Q		1 litre

- Tampó TBS

	Concentració 1X	
Tris base	50 mM	2,425 g
NaCl	2%	8 g
H ₂ O Milli-Q		1 litre

- Tampó TBS-Tween

TBS 1X	1 litre
Tween 20	0,5 ml

Tween 20 (TW00200250, Scharlau)

3.10.2. Preparació dels gels de poliacrilamida

Per la preparació dels gels utilitzem el sistema Mini-Protean II de Bio-Rad. Els gels estan formats per dues fases, la superior que es coneguda com la fase de concentració, que permet que totes les proteïnes arribin a la fase de separació a la vegada, i la inferior que es coneguda com fase de separació, que permet que les proteïnes es separin segons el seu pes molecular.

- Gel de separació

A la següent taula es mostren els reactius necessaris per preparar dos gels de separació de 0,75 mm d'amplada a diferents concentracions de poliacrilamida (161-0146, Bio-Rad). L'elecció de la concentració del gel dependrà del pes molecular de la proteïna que volem estudiar.

Concentració poliacrilamida	5%	7,5%	10%	12%	15%
Acrilamida 40%	1,9 ml	2,85 ml	3,8 ml	4,5 ml	5,7 ml
Tris-HCl 1,5M pH 8.8	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml
SDS al 10%	0,17 ml	0,17 ml	0,17 ml	0,17 ml	0,17 ml
H ₂ O Milli-Q	9,07 ml	8,12 ml	7,17 ml	6,47 ml	5,27 ml
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
APS al 10%	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml

El N,N,N',N',-Tetra-metil-etilendiamina (TEMED) (T9281, Sigma) i el persulfat d'amoni al 10% (APS) (A3678, Sigma) s'afegeixen al final, ja que són els que catalitzen la polimerització de l'acrilamida.

Abocar la barreja entre els dos vidres, deixant 1,5-2 cm lliures a la part superior. Deixar polimeritzar durant uns 20 minuts i procedir a la preparació del gel de concentració de poliacrilamida al 5% (*stacking gel*).

- Gel de separació

A la següent taula es mostren els reactius necessaris per preparar dos gels de concentració de 0,75 mm d'amplada al 5% de poliacrilamida.

Acrilamida al 40%	0,625 ml
Tris-HCl 1M, pH 6.8	0,625 ml
SDS al 10%	50 µl
H ₂ O Milli-Q	3,67 ml
TEMED	5 µl
APS al 10%	25 µl

Abocar sobre el gel de separació i deixar polimeritzar durant 20 minuts amb la pinta posada per a la formació de pous.

3.10.3. Preparació de les mostres

Les mostres es preparen en el tampó de mostra 2X, encara que depenent de la concentració de la mostra es poden utilitzar tamps de mostra més concentrats, com 3X, 4X o 5X. A partir de les concentracions conegudes de les mostres, es calcula el volum necessari per tenir de 20 a 40 µg de proteïna, depenent de l'expressió relativa de cada proteïna. Es bullen les mostres en un bany sec (Techne Dri-Block DB-2A) a 100°C durant tres minuts.

3.10.4. Electroforesi

Un cop les mostres estan preparades es carreguen als pous del gel de poliacrilamida. A cada gel també es carrega un pou amb els estàndards de pes molecular (10748-010, Invitrogen; 161-0324, Bio-Rad).

Introduir els gels en una cubeta d'electroforesi Mini-Protean de Bio-Rad, plena de tampó de migració (161-0772, Bio-Rad). Es connecta a una font de corrent (Power PAC 200, Bio-Rad) i s'inicia la separació a 100 V durant el temps necessari per separar la proteïna d'interès.

3.10.5. Transferència

Un cop acabada l'electroforesi, es transfereixen les proteïnes del gel a una membrana de PVDF (Immobilon TM-P, Millipore). Degut al caràcter hidròfob de la membrana de PVDF, aquesta s'ha de tractar amb metanol durant un minut per tornar-la hidròfila, rentar-la un minut amb H₂O i finalment posar-la en tampó de transferència per equilibrar-la. Les membranes PVDF presenten l'avantatge que un cop seques, l'anticòs només podrà reaccionar amb les zones de la membrana que continguin proteïnes, que retenen H₂O.

Per tal de transferir les proteïnes a la membrana, cal preparar un sandvitx que consta d'un suport on s'hi col·loca una esponja, al damunt dos papers absorbents (GB002, Schleicher & Schuell), el gel, la membrana, dos papers absorbents més i una altra esponja. S'introdueix el sandvitx dins una cubeta de transferència Trans-Blot de

Bio-Rad i s'omple de tampó de transferència. Es connecta a la font de corrent i es sotmet a una intensitat constant de 0,2 A durant 90 minuts a 4°C.

3.10.6. Immunodetecció

La membrana que conté les proteïnes s'ha de bloquejar, per evitar la unió inespecífica dels anticossos a les zones lliures de proteïna. La membrana es bloqueja durant una hora a R.T. en una solució de bloqueig de TBS-Tween amb llet en pols al 5%.

Un cop bloquejada la membrana, aquesta s'incuba amb l'anticòs primari específic contra la proteïna a estudiar. L'anticòs primari es prepara en una solució de TBS-Tween al 5% de llet en pols o de BSA (A7906, Sigma), segons l'anticòs, i amb azida sòdica (S2002, Sigma) al 2%. Si l'anticòs està preparat en BSA, abans de la incubació la membrana es renta tres cops durant 5 minuts en agitació amb TBS-Tween. Un cop neta la membrana, s'incuba amb l'anticòs primari. El temps i la temperatura d'incubació varia segons l'anticòs (veure taula d'anticossos primaris). Després de la incubació amb el primari es fan dos rentats de 5 minuts amb TBS-Tween i s'incuba amb l'anticòs secundari. L'anticòs secundari va dirigit contra l'espècie d'origen de l'anticòs primari i porta lligat un enzim peroxidasa, que permetrà la seva detecció per quimioluminiscència (NA931V (Antimouse), NA934V (Antirabbit), Amersham; P0449 (Antigoat), DakoCytomation). La incubació amb el secundari dura una hora a R.T. en agitació constant, després de la qual es fan tres rentats més de 5 minuts amb TBS-Tween.

Anticòs primari	Referència	Espècie	Dilució	Condicions
β-Actin	A5441, Sigma	Mouse	1:20000	1 hora R.T.
AIF	RB-1652, Neomarker	Rabbit	1:500	3 hores R.T.
AKT	9272, Cell Signaling	Rabbit	1:1000	O.N. 4°C
P-AKT (Ser473)	9271, Cell Signaling	Rabbit	1:1000	O.N. 4°C
Cyclin D1	2926, Cell Signaling	Mouse	1:500	O.N. 4°C
Cyclin E	sc-481, Santa Cruz	Rabbit	1:500	3 hores R.T.
β-Catenin	sc-1496, Santa Cruz	Goat	1:1000	O.N. 4°C
P-CREB (Ser133)	9198, Cell Signaling	Rabbit	1:1000	O.N. 4°C
COX IV	Chemicon	Rabbit	1:8000	3 hores R.T.
E2F-1	sc-251, Santa Cruz	Mouse	1:200	3 hores R.T.
P-FOXO1 (Ser256)	9461, Cell Signaling	Rabbit	1:1000	O.N. 4°C
GSK3-β	9315, Cell Signaling	Rabbit	1:1000	O.N. 4°C

P-GSK3-β (Ser9)	9336, Cell Signaling	Rabbit	1:1000	O.N. 4°C
P-c-Jun (Ser73)	9164, Cell Signaling	Rabbit	1:1000	O.N. 4°C
p35	2673, Cell Signaling	Rabbit	1:1000	O.N. 4°C
Acetyl-p53 (Lys379)	2570, Cell Signaling	Rabbit	1:1000	O.N. 4°C
PTEN	9552, Cell Signaling	Rabbit	1:1000	O.N. 4°C
P-Rb (Ser780)	9307, Cell Signaling	Rabbit	1:1000	O.N. 4°C
SIRT1	05-707, Upstate	Mouse	1:1000	3 hores R.T.
α-spectrin	MAB1622, Chemicon	Mouse	1:1000	3 hores R.T.

La reacció de quimioluminiscència es realitza posant en contacte durant un minut i mig la membrana amb el reactiu del *kit* ECL (*Enhanced chemi-luminescence*) (WBKLS0500, Millipore). La quimioluminiscència emesa es detecta amb l'aparell Chemidoc-XRS (Bio-Rad) i es quantifica amb el programa Quantity One (Bio-Rad). Els valors obtinguts per cada proteïna es corregeixen pels valors obtinguts en la immunodetecció de la β -actina, que utilitzem com a control de càrrega, ja que la seva expressió no es veu afectada pels tractaments aplicats a les cèl·lules. En els extractes mitocondrials la proteïna que utilitzem com a control de càrrega és la COX IV. En el cas del tractament amb nocodazol, que és un agent disruptor del citoesquelet que pot afectar l'expressió de la β -actina, per corregir els errors de càrrega tenim les membranes amb el colorant Roig de Ponceau (P7170, Sigma) que tenyeix les proteïnes.

3.11. IMMUNOCITOQUÍMICA

3.11.1. Protocol

- 1- Aspirar el medi de cultiu de les CGC, que han crescut sobre cobreobjectes estèrils en plaques de 24 pous.
- 2- Fixar les cèl·lules amb 0,5 ml d'una solució de paraformaldèhid al 4% en PBS durant una hora a R.T. .
- 3- Rentar les cèl·lules amb 0,5 ml de PBS.
- 4- Bloquejar la preparació durant 15 minuts amb PBS amb Triton-X-100 al 0,3% i NHS (*Normal horse serum*) (16050, Invitrogen) al 30% a R.T. .
- 5- Incubar O.N. les cèl·lules amb 10 μ l de l'anticòs primari en una cambra humida a 4°C.
- 6- Rentar les cèl·lules dos cops durant 10 minuts amb 0,5 ml de PBS amb Triton-X-100 al 0,3% i NHS al 5%.

- 7- Incubar amb 10 µl d'anticòs secundari marcat amb fluorescència (F4151 (Rabbit), F8264 (Mouse), Sigma) durant una hora a R.T. i protegit de la llum.
- 8- Rentar dues vegades amb 0,5 ml de PBS durant 15 minuts.
- 9- Muntar els cobreobjectes en el medi de muntatge Mowiol® 4-88 (475904, Calbiochem)
- 10- Analitzar la senyal fluorescent de l'anticòs mitjançant un microscopi de fluorescència a 100 augments (objectiu 10x). El microscopi està equipat amb una càmera digital que permet captar imatges.

3.12. EXTRACCIÓ D'ARN

Per procedir a l'extracció de l'ARN total de les cèl·lules es va utilitzar el reactiu TRIzol® (15596-026, Invitrogen), que és una solució de fenol i isotiocianat de guanidina, que manté la integritat de l'ARN mentre lisa les cèl·lules i dissol els components cel·lulars.

3.12.1. Protocol

- 1- Aspirar el medi de cultiu de les cèl·lules cultivades en plaques de 100 mm de diàmetre.
- 2- Afegir 0,666 ml de TRIzol® a cada placa i deixar actuar uns minuts. Es recomanable utilitzar dues plaques per cada punt experimental, el que significa que tindrem un volum total de 1,33 ml de TRIzol®.
- 3- Rascar les cèl·lules en TRIzol® amb la punta de la pipeta i ajuntar el volum de les dues plaques en un tub.
- 4- Centrifugar les mostres durant 7 minuts a 12000 x g a 8°C.
- 5- Descartar el precipitat i passar el sobrenedant a un altre tub.
- 6- Afegir 0,266 ml de cloroform al tub, barrejar el contingut dels tubs per inversió d'aquests 15 vegades i deixar reposar durant tres minuts a R.T. .
- 7- Centrifugar les mostres durant 15 minuts a 12000 x g a 8°C.
- 8- Després de la centrifugació la mostra es reparteix en tres fases: la fase inferior vermellosa, que és la fase orgànica d'on es poden extreure les proteïnes, la interfase blanquinosa d'on es pot extreure l'ADN i la fase superior transparent, que és la fase aquosa on es troba l'ARN. Agafar la fase aquosa (0,5-1 ml aproximadament), intentant no agafar el contingut de les altres fases, i passar-la a un altre tub.

9- Afegir 0,666 ml d'isopropanol al tub per fer precipitar l'ARN, barrejar el contingut dels tubs per inversió d'aquests 5 vegades i deixar reposar durant 10 minuts a R.T. .

10- Centrifugar les mostres durant 10 minuts a 12000 x g a 8°C.

11- Descartar el sobrenedant abocant de cop i ràpid per inversió el contingut del tub.

12- Rentar el precipitat amb 1,33 ml d'etanol al 75%, que es troba a 4°C, i donar copets al tub perquè salti el precipitat.

13- Centrifugar les mostres durant 5 minuts a 7500 x g a 8°C.

14- Descartar el sobrenedant abocant de cop i ràpid per inversió el contingut del tub i deixar assecar el precipitat durant 5-10 minuts. És important no deixar assecar massa el precipitat (que no arribi a passar de ser blanquinós a transparent), ja que això dificultaria la seva localització per ressuspendre'l i disminuiria la seva solubilitat.

15- Ressuspendre el precipitat d'ARN en 20 µl de H₂O tractada amb DEPC (D5758, Sigma) al 0,1%, homogeneïtzar bé el precipitat pujant i baixant amb la pipeta.

16- Un cop extret l'ARN s'ha de valorar la seva qualitat i concentració.

16.1- Fer una dilució 1:200 de la mostra amb H₂O DEPC: 2 µl d'ARN en 400 µl d'H₂O DEPC. Aquesta dilució s'ha de tenir en compte al calcular la concentració.

16.2- Llegir l'absorbància de la mostra a 260 nm (absorbància de l'ARN) i a 280 nm (absorbància de les proteïnes) amb un espectrofotòmetre (UV/VIS Spectrometer Lambda 45, Perkin Elmer).

16.3- Per determinar la qualitat de l'ARN extret s'ha de calcular la proporció (*ratio*) de l'absorbància a 260 nm respecte a 280 nm. El *ratio* ideal estaria entre 1,8 i 2. Un *ratio* inferior a 1,8 es podria explicar per una contaminació amb proteïnes, mentre que un *ratio* per sobre de 2 es podria explicar per una degradació de l'ARN.

16.4- Per determinar la concentració de l'ARN extret s'ha d'utilitzar la següent fórmula:

$$\text{Concentració } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{Abs } 260 \text{ nm} \times 40 \times 200 / 1000$$

3.13. ANÀLISI DE L'ARN PER ELECTROFORÈSI EN GEL D'AGAROSA DESNATURALITZANT

Un cop acabada l'extracció d'ARN total, per comprovar la qualitat de l'ARN extret es prepara un gel d'agarosa a l'1% desnaturalitzant. L'ARN es separa per electroforesi, es tenyeix amb bromur d'etidi i es comprova l'aparició de les dues bandes d'ARN ribosomal, fet que confirma que l'ARN no està degradat.

3.13.1. Tampons i solucions

- Tampó MOPS 10X pH 7.4
 - MOPS 200 mM
 - Acetat sòdic 50 mM
 - EDTA 5 mM
 - 23,12 g MOPS (M9381, Sigma)
 - 2,050 g Acetat sòdic
 - 5 ml EDTA 0,5 M
 - 500 ml H₂O DEPC

Ajustar pH a 7.4 i autoclavar.

- Tampó de càrrega 6X
 - Blau bromofenol al 0,25%
 - Glicerol al 30%
 - H₂O DEPC

3.13.2. Protocol

- 1- Preparar el gel agarosa a l'1%.
 - 1.1- Pesar 350 mg agarosa (AG-200, Ecogen).
 - 1.2- Afegir 29,68 ml d' H₂O Milli-Q.
 - 1.3- Portar a ebullició i agitar fins obtenir una solució homogènia.
 - 1.4- Un cop refredat, però abans que gelifiqui, afegir 3,5 ml de MOPS 10X, 1,82 ml de formaldehid al 37% i 2 µl de bromur d'etidi (46067, Sigma). El formaldehid queda a una concentració final del 1,9% i és el responsable de la desnaturalització de l'ARN. El bromur d'etidi és un colorant fluorescent que tenyeix els àcids nucleics a l'intercalar-se entre els seus parells de bases nitrogenades, aquesta tinció es detectable sota llum ultraviolada (U.V.) .
 - 1.5- Abocar la solució a la cubeta d'electroforesi, posar la pinta per formar els pous on carregarem la mostra i deixar solidificar.
- 2- Preparar les mostres.

- 1 µg d'ARN
- 0,6 µl MOPS 10X
- 1 µl tampó de càrrega 6X
- H₂O DEPC fins 6 µl

3- Separar les mostres per electroforesi.

3.1- Posar el gel dins una cubeta plena de tampó MOPS 1X.

3.2- Carregar les mostres.

3.3- Córrer les mostres a un voltatge constant de 60-70 V durant 45-60 minuts. Els àcids nucleics estan carregats negativament, per tant, correran cap el càtode (pol positiu).

4- Un cop separades les mostres, es mira el gel amb llum U.V. per poder observar l'ARN i es realitza una fotografia mitjançant una càmera acoblada al transil·luminador de llum U.V. . Si l'ARN està en bones condicions s'haurien de veure les dues bandes d'ARN ribosòmic, la de 28S i la de 18S. La de 28S al tenir una mida més gran corre menys durant l'electroforesi i, normalment, la seva detecció és dues vegades més intensa que la 18S.

3.14. SÍNTESI D'ADN COMPLEMENTARI MITJANÇANT LA TRANSCRIPTASA INVERSA

Un cop tenim l'ARN total és transforma l'ARN missatger (ARNm) en el seu ADN complementari (ADNc), que és més estable que l'ARN, i que s'utilitzarà per fer reaccions de PCR (*Polymerase chain reaction*), que permetran detectar i quantificar l'activitat transcripcional dels gens d'interès. Prèviament a la reacció de transcripció inversa (RT-PCR, *Reverse transcriptase PCR*) per obtenir l'ADNc, la mostra d'ARN es tracta amb desoxiribonucleasa (DNasa), per eliminar les possibles contaminacions amb ADN genòmic. L'ADN genòmic podria afectar a la quantificació de l'activitat transcripcional, ja que durant la reacció de PCR s'amplificaria juntament amb l'ADNc.

3.14.1. Protocol

Per realitzar el tractament de DNasa es va utilitzar el *kit Deoxyribonuclease I, Amplification Grade* (18068-015, Invitrogen) i per realitzar la transcripció inversa es va utilitzar el *kit ThermoScript RT-PCR System* (11146-024, Invitrogen). Durant tots dos processos treballarem amb les mostres en gel.

1- Partint de 4 µg d'ARN total, afegir 1 µl de tampó DNasa 10X, 1 µl de DNasa i el volum d'H₂O DEPC necessari per tenir un volum total de 10 µl.

2- Incubar durant 5 minuts a R.T. .

3- La meitat del volum, és a dir, 5 µl que contindran 2 µg d'ARN, s'utilitzaran per fer la RT-PCR, mentre que l'altre meitat, després d'inactivar la DNasa, s'utilitzarà com a control de l'eficiència del tractament DNasa. Agafar 5 µl i passar-los a un tub nou, que conté 1 µl d'*oligo (dT)₂₀* (*primers* que s'uneixen a la cua poli A de tots els ARNm), 2 µl de desoxinucleòtids, 1 µl d'EDTA i 3 µl d'H₂O DEPC. Als 5 µl restants només els afegirem 1 µl d'EDTA.

4- Incubar durant 5 minuts a 65°C en un termociclador (MJ Mini, Bio-Rad). Aquesta incubació permet que l'EDTA inactivi la DNasa i en els tubs a on es farà la RT-PCR, provoca l'obertura dels ARN.

5- Els tubs que s'utilitzaran com a controls de l'eficiència de la DNasa es guarden a -80°C. Als tubs on es farà la RT-PCR s'han de posar ràpidament en gel, perquè no es tornin a tancar les cadenes d'ARN, i afegir 4 µl del tampó ADNc, 1 µl de DTT, 1 µl de *RNaseOUT*, 1 µl de *ThermoScript RT* (transcriptasa inversa) i 1 µl d'H₂O DEPC.

6- Incubar durant 30 minuts a 50°C. Al finalitzar aquesta incubació tots els ARNm s'hauran transformat en ADNc. Les mostres es poden conservar a -80°C.

3.15. REACCIÓ DE PCR I ELECTROFORESI EN GEL D'AGAROSA

Per quantificar l'activitat transcripcional dels gens a estudiar utilitzem la tècnica de Real-time PCR (veure apartat 3.16.), però degut a que els *primers* que utilitzem han estat dissenyats per nosaltres (mitjançant el programa *Primer Express*, Applied Biosystems), utilitzem la tècnica de PCR convencional per comprovar el seu bon funcionament. Primer amplifiquem un fragment del nostre gen d'interès per PCR, després el producte generat el separem mitjançant una electroforesi en un gel d'agarosa i per últim el detectem mitjançant la tinció amb bromur d'etidi. Aquest procediment ens permet detectar si els nostres *primers* són funcionals, si s'amplifica el producte desitjat, si es generen productes addicionals i també si els *primers* formen dímers entre ells.

3.15.1. Protocol

1- Per realitzar la reacció de PCR es va utilitzar el *kit REDTaq Genomic DNA Polymerase SuperPak* (D6063, Sigma).

1.1- Introduir els següents components en un tub:

- 5 µl de tampó de PCR

- 1 µl de desoxinucleòtids
- 2,5 µl d'ADN polimerasa
- 1 µl de *forward primer*
- 1 µl de *reverse primer*
- 1 µl d'ADNc (de la solució 2 µg d'ARN total/50 µl)
- 38,5 µl H₂O DEPC

El dissenys dels *primers* utilitzats es troben a la taula inferior.

1.2- Programar el termociclador per fer el següent programa:

- 3 minuts a 100°C
- 40 cicles de:
 - 1 minut a 95°C
 - 1 minut a 60°C
 - 2 minuts a 72°C
 - 7 minuts a 72°C

Gen	Forward (5'a 3')	Reverse (5'a 3')	Mida
β-Actin	ATG GAT GAC GAT ATC GCT GCG	CAG GGT CAG GAT GCC TCT CTT	200 b.p.
Bax	AAG AAG CTG AGC GAG TGT CTC	CCA GTT GAA GTT GCC ATC AGC	150 b.p.
E2F-1	ACT CAG CTG ATG GTG TTG TTG	GGA CAT TGG TGA TGT CAT AGA TGC	86 b.p.
DP5	TTC CGT ATC TGT GCA TGC CTG	CAA AGT CTC AGA GTT CAC ATC G	104 b.p.
SIRT1	ATC CTT TCA GAA CCA CCA AAG C	TAT CCC ACA GGA AAC AGA AAC C	127 b.p.

2- Electroforesi en gel d'agarosa.

2.1- Preparar un gel d'agarosa al 2% en tampó TBE (5,4 g Tris base, 2,75 g àcid bòric i 2 ml EDTA 0,5 M en 500 ml de H₂O Milli-Q) i afegir 2 µl de bromur d'etidi.

2.2- Col·locar el gel dins la cubeta d'electroforesi plena de tampó TBE.

2.3- Carregar 4 µl de mostra obtinguda de la PCR a cada pou i en un dels pous carregar 4 µl de *DNA ladder* (S7025, Sigma), que ens permetrà determinar la mida en parells de bases (*b.p.*, *base pair*) dels productes generats durant la PCR.

2.4- Còrrer la mostra durant 30-45 minuts a un voltatge constant de 90-100 V.

2.5- Un cop separades les mostres, es mira el gel amb llum U.V. per poder observar l'ADN i es realitza una fotografia mitjançant una càmera acoblada al transil·luminador de llum U.V. . Si els *primers* han funcionat bé s'hauria de detectar un únic producte de la mida esperada. En el cas que el producte tingui una mida diferent a la esperada, que apareguin productes addicionals o que els *primers* formin dímers, s'hauran de dissenyar nous *primers*.

3.16. REAL-TIME PCR (SYBR GREEN)

La quantificació de l'activitat transcripcional dels gens estudiats o el que és el mateix, la quantitat d'ARN m generat, es va realitzar mitjançant la tècnica de Real-Time PCR. Aquesta tècnica, a diferència de la PCR convencional, és quantitativa, en el nostre cas semi quantitativa, ja que no es fa una valoració absoluta de la quantitat d'ARNm generat, sinó una valoració relativa. Comparant els diferents grups experimentals, es determina quants cops més o menys s'expressa un gen en els grup tractats respecte al grup control. Amb la tècnica de PCR convencional es detecta la quantitat de producte format al final de la reacció d'amplificació, quan aquesta ja està saturada i, per tant, no es poden determinar les possibles diferències d'expressió gènica entre els grups experimentals. La tècnica de Real-Time PCR, en canvi, permet fer un seguiment de la reacció d'amplificació durant el temps. Aquesta reacció abans de saturar-se, segueix una fase lineal durant la qual es poden determinar les diferències d'expressió entre els diferents grups experimentals.

Existeixen dos mètodes per realitzar Real-Time PCR, un que utilitza sondes fluorogèniques que s'uneixen específicament al gen d'interès i un altre que utilitza un colorant fluorogènic, anomenat *SYBR Green*, que s'uneix a tot l'ADN de doble cadena format durant la reacció d'amplificació. En tots dos mètodes la generació del producte es quantifica detectant la quantitat de fluorescència emesa, que és proporcional a la quantitat d'ARNm expressat.

S'ha utilitzat el mètode del colorant *SYBR Green*, que té l'inconvenient que a l'unir-se a tot l'ADN de doble cadena generat, també pot detectar productes no específics. Per tant, els primers que s'utilitzaran, que han estat prèviament dissenyats per nosaltres, s'han de validar per PCR convencional per descartar la generació de productes addicionals o dímers (veure apartat 3.15.), que produirien una fluorescència no desitjada que afectaria a la quantificació. A més de la validació prèvia dels

primers, per descartar la formació de productes no específics al final de la reacció de PCR a temps real, es realitzarà la reacció de *melting*, que et permet detectar que realment s'hagi amplificat únicament el producte desitjat.

3.16.1. Protocol

1- Per realitzar la reacció de PCR i la detecció de la fluorescència es va utilitzar el *kit QuantiTect SYBR Green PCR* (204143, Qiagen), en plaques de 96 pous especials per aquesta tècnica (4306737, Applied Biosystems).

1.1- Introduir els següents components a cada pou de la placa:

- 12,5 µl de *master mix*
- 0,5 µl de *forward primer*
- 0,5 µl de *reverse primer*
- 0,8 µl d'ADN c (de la solució 2 µg d'ARN total/50 µl)
- 10,7 µl H₂O DEPC

1.2- Tapar els pous de la placa amb tires de taps (4323032, Applied Biosystems).

1.3- Programar el termociclador i detector de fluorescència (ABI Prism 7700, Applied Biosystems) per fer el següent programa:

- 15 minuts a 95°C
- 40 cicles de:
 - 15 segons a 95°C
 - 30 segons a 60°C
 - 30 segons a 72°C

2- Al finalitzar la reacció de PCR fer la reacció de *melting*.

1.2- Programar el termociclador i detector de fluorescència (ABI Prism 7700, Applied Biosystems) per fer el següent programa:

- 1 minut a 95°C
- 1 minut a 60°C i pujar la temperatura gradualment fins 95°C durant 20 minuts

3- Calcular la quantitat relativa d'ARN m mitjançant el mètode de les corbes d'estàndards.

Els diferents gens a estudiar i el de la β -Actin, que s'utilitza com a control de càrrega (*Housekeeping gene*), es van amplificar en pous diferents. Cada gen de cada grup experimental es va amplificar per triplicat, en tres pous diferents. A més, per cada gen es van generar les seves corbes estàndards

d'amplificació, amb 5 concentracions diferents, que es van generar fent una sèrie de dilucions de l'ADNc de partida del grup control. Cada punt de la corba es va amplificar per duplicat, en dos pous diferents.

Les corbes patró de cada gen permeten extrapolar la concentració de cada punt experimental, que s'ha de corregir per la concentració del gen de la β -Actin. A continuació les concentracions de tots els punts experimentals es divideixen per la del grup control (*calibrator*), així el valor del grup control sempre serà 1, i els de la resta de punts experimentals sempre es compararan amb el valor 1.

Per descartar que els diferents reactius estiguin contaminats amb ADN extern, per cada gen generem un pou control, a on els 0,8 μ l d'ADN c es substitueixen per H₂O DEPC. Per descartar la contaminació amb ADN genòmic de la mostra d'ARN inicial, per cada gen generem un pou control, a on els 0,8 μ l d'ADNc es substitueixen per 0,8 μ l d'ARN tractat amb DNasa no sotmesos a la RT-PCR (veure apartat 3.14.).

3.17. TRACTAMENT DE LES DADES I ANÀLISI ESTADÍSTIC

Els resultats s'expressen com la mitja \pm l'error estàndard de la mitja (SEM) dels valors obtinguts per cada grup experimental d'almenys tres experiments independents. Les diferències entre els valors han estat determinades mitjançant l'anàlisi de variància (ANOVA) i posterior test de Tukey. Un valor de $p < 0,05$ s'ha considerat significatiu. Representant en les gràfiques les significàncies per: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$.

Resultats

Publicació 1

**EVALUATION OF ACUTE ANTIAPOPTOTIC EFFECTS OF Li⁺
IN NEURONAL CELL CULTURES**

Marc Yeste, Daniel Alvira, Ester Verdaguer, Marta Tajés, Jaume Folch, Víctor Rimbau, Mercè Pallàs, Antoni Camins

Journal of Neural Transmisión (2007) 114: 405-416

Evaluation of acute antiapoptotic effects of Li⁺ in neuronal cell cultures

M. Yeste¹, D. Alvira¹, E. Verdaguer², M. Tajés¹, J. Folch³, V. Rimbau¹, M. Pallàs¹, A. Camins¹

¹ Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Nucli Universitari de Pedralbes, Barcelona, Spain

² Department of Pharmacology and Toxicology, IIBB-CSIC, IDIBAPS, Barcelona, Spain

³ Unitat de Bioquímica, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili Reus, Spain

Received: April 26, 2006 / Accepted: July 6, 2006 / Published online: August 17, 2006

© Springer-Verlag 2006

Summary Li⁺ exerts protective effect against several neurotoxins in neuronal cell preparations. Here we examined the antiapoptotic effects of GSK3 β in cerebellar granule neurons (CGNs) in the presence of several neurotoxins. Acute treatment with Li⁺ protected neurons against nocodazole and serum/potassium (S/K) deprivation, but were ineffective against kainic acid and MPP⁺. Li⁺ 5 mM also decreased caspase-3 activation induced by nocodazole and S/K deprivation as measured by Ac-DEVD-p-nitroaniline and the breakdown of α -spectrin. All the neurotoxins used in the present study activated GSK3 β , evaluated with a specific antibody phospho-GSK-3 β (Ser9) by Western-blot and immunocytochemistry and were always inhibited by Li⁺ 5 mM. Our results implicate Li⁺ in the regulation of apoptosis mediated by caspase activation (Type I). Furthermore inhibition of GSK3 β by acute treatment with Li⁺ 5 mM is not an indicator of neuroprotection. The acute antiapoptotic function of Li⁺ is discussed in terms of its inhibition of Type I pathway, the intrinsic (mitochondrial) apoptotic pathway in cerebellar granule cells.

Introduction

Lithium (Li⁺) is a widely used for the treatment of manic depression (Alvarez et al., 2004; Li et al., 2002; Joje et al., 2004). However, a new interesting era began several years ago when Nonaka et al. demonstrate the neuroprotective properties of Li⁺ in neuronal cell cultures (Nonaka et al., 1998). They showed that chronic treatment of neurons with Li⁺ protects cortical neurons from excitotoxicity mediated by activation of NMDA receptors, but also attenuates neuronal cell death mediated by non-NMDA receptors. These protective effects have been studied *in vivo* and *in vitro* (Eldar-Finkelman, 2002).

Thus the neuroprotective properties of Li⁺ could be due to an increase in the expression of antiapoptotic Bcl-2 proteins family or a decrease of Bax protein (Youdim and Arraf, 2004). Furthermore, Li⁺ decrease the expression of p53, a pro-apoptotic protein (Lu et al., 1999; Li and El-Mallah, 2000).

Another pro-apoptotic target inhibited by Li⁺ is the glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β), a serine/threonine protein kinase involved in numerous intracellular processes associated with several pathologies (Li and El-Mallah, 2000; Perez et al., 2003; Rowe and Chuang, 2004). Li⁺ could inhibit GSK-3 β by two potential mechanisms, one directly inhibiting the enzyme and indirectly increasing the phosphorylation in serine-9 (Chuang, 2004; Chen et al., 2004). Moreover, when GSK-3 β is activated, it phosphorylates tau, a protein involved in microtubule organization but also promotes the formation of paired helical filaments (PHF) composed of polymerized tau protein (Elyaman et al., 2002). A major hallmark of Alzheimer's disease is aberrant tau phosphorylation, which induces the formation of neurofibrillary tangles (Alvarez et al., 2004; Bhat et al., 2004; Rametti et al., 2004).

In the same way, activated mitogen-activated protein kinases (MAPKs) serve as key mediators of the neuronal apoptotic process. Recently, it has been demonstrated that Li⁺ could inhibit the activity of c-JUN apoptotic pathway in cerebellar granule neurons (Hongisto et al., 2003).

The inhibition of phosphatase-2A (PP2A) is an apoptotic pathway suggested by Mora et al. to explain the neuroprotective properties of Li⁺ (Mora et al., 2002). So, the inhibition of PP2A regulates the dephosphorylation of GSK-3 β

Correspondence: Antoni Camins, Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Nucli Universitari de Pedralbes, 08028 Barcelona, Spain
e-mail: camins@ub.edu

thereby causing decrease GSK-3 β activity (Mora et al., 2002).

Likewise, it has been suggested that Li⁺ could offer neuroprotective effects against glutamate excitotoxicity by decreasing the intracellular calcium mediated by the stimulation of NMDA receptors (Nonaka et al., 1998; Rowe and Chuang, 2004; Chuang, 2004).

Moreover, in recent years, mounting data demonstrate the neuroprotective properties of Li⁺ against β -amyloid neurotoxicity in cortical cell cultures (Alvarez et al., 2004), oxidative stress stimuli (King and Jope, 2005), colchicine-induced apoptosis in CGNs (Jorda et al., 2004), potassium deprivation-induced apoptosis (Linseman et al., 2003; Mora et al., 1999, 2002; Jin et al., 2005), mouse neuronal progenitor cells (Shimomura et al., 2003) and thapsigargin neurotoxicity, which cause endoplasmic reticulum stress and activates caspase-3 (Song et al., 2002). Unfortunately, Li⁺ does not offer neuroprotection against all neurotoxic stimuli. Thus, it has been reported that Li⁺ did not protect against ionomycin, veratridine or staurosporine (Nonaka et al., 1998).

There is evidence that chronic Li⁺ treatment protects neurons in cultures. Nevertheless, we and others have demonstrated that Li⁺ affords neuroprotection after an acute treatment with the drug (Nonaka et al., 1998; Jorda et al., 2004; Linseman et al., 2003; Mora et al., 1999, 2002). The most logical and feasible explanation is that chronic treatment may be necessary when the neuroprotective effects are mediated by the novo synthesis or inhibition of proteins. Likewise chronic treatment of neuronal cell cultures with Li⁺, as previously implicated in the decrease of intracellular calcium levels after a neurotoxic insult (Chuang, 2004; Kang et al., 2003).

Here we examined protection provided by acute treatment with Li⁺ against four neurotoxic stimuli: (1) nocodazole, which induces cytoskeletal alteration (Segura-Aguilar and Kostrzawa, 2004); (2) erum and potassium deprivation (De Gregorio-Rocasolano et al., 2001); (3) MPP⁺, used as a *in vitro* model of Parkinson's disease; (4) kainic acid, a neurotoxic which induce an activation of non-NMDA receptors (Segura-Aguilar and Kostrzawa, 2004). The main objective of the present study was to answer the question if the inhibition of GSK-3 β is the main target involved in the neuroprotective properties of Li⁺.

Materials and methods

Materials

The following agents were used: KA was purchased from m Ocean Produce International (Shelburne, Nova Scotia, Canada); MPP⁺ and nocodazole,

were from Calbiochem; cell culture media and fetal calf serum (FCS) were obtained from GIBCO (Life Technologies, Paisley, U.K.); Lithium chloride, cell culture salts, enzymes, Mowiol[®] 4–88 and TritonX-100 were acquired from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.); other chemical reagents were of analytical quality and purchased from Panreac Química (Barcelona, Spain).

Cell cultures

Primary cultures of cerebellar granule cells were prepared from 7 day-old Sprague Dawley rat pups according to the method of Verdaguer et al. (2002). Cerebella, freed of meninges, were trypsinized and treated with DNase. Cell density in solution was adjusted to 8.0×10^5 cells/ml and cells were then plated on poly-L-lysine-coated 24 well plates (FALCON) at a density 3.2×10^5 cells/cm². Cultures were grown in Eagle's medium (Eagle's basal medium, BME) containing 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 0.1 mg/ml gentamicin and 25 mM KCl. Cytosine arabinoside (10 μ M) was added 16–18 hours after plating in order to inhibit the growth of non-neuronal cells. Cultures prepared using this method were enriched in granule neurons by more than 95%.

Treatment of CGCs and viability assay

CGCs were used after 7–10 days *in vitro*. To investigate the effect of Li⁺, the inhibitor was added to the medium, at defined concentrations, 24 h before nocodazole, kainic acid, MPP⁺ or replacement of complete medium by another one without serum and containing 5 mM KCl (this is referred S/K deprived medium). To assess the loss of cell viability, we used the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium] method. MTT was added to the cells at a final concentration of 250 μ M and incubated for 1 h to allow the reduction of MTT to produce a dark blue formazan product. Media were removed, and cells were dissolved in dimethylsulfoxide. The production of formazan was measured by absorbency change at 595 nm using a microplate reader (BioRad Laboratories, CA, USA). Viability results were expressed as percentages. The absorbance measured from non-treated cells was taken to be 100%.

Analysis of DNA fragmentation by flow cytometry

Apoptosis was measured 24 after neurotoxic stimuli. In brief, the culture medium was removed; cells were collected from culture plates by pipetting and then washed with PBS. Flow cytometry experiments were carried out using an Epics XL flow cytometer, adding propidium iodide (10 μ g/ml) 30 min before analysis. The instrument was set up with a standard configuration: excitation of the sample was performed using a 488 nm air-cooled argon-ion laser at 15 mW power. Forward scatter (FSC), side scatter (SSC) and red (620 nm) fluorescence for PI were acquired. Optical alignment was based on optimised signal from 10 nm fluorescent beads (Immunocheck, Epics Division). Time was used as a control of the instrument stability; red fluorescence was projected on a 1024 monoparametrical histogram. Aggregates were excluded, gating single cells by their area vs. peak fluorescence signal.

Detection of condensed nuclei by microscopic cell counting

PI staining was used to evaluate morphological evidence of apoptosis (e.g., condensed nuclei). CGCs were grown on glass coverslips. After corresponding treatment, cells were fixed in 4% paraformaldehyde/phosphate-buffered saline solution (PBS), pH 7.4, for 1 h at room temperature. After washing with PBS, they were incubated for 3 min with a solution of PI in PBS (10 μ g/ml). Coverslips were mounted in Mowiol[®] 4–88. Stained cells were visualized under UV illumination using the 20 \times objective of a Nikon Eclipse fuuomicroscope and digitized images were captured.

Apoptotic cells contained shrunken, brightly fluorescent apoptotic nuclei with condensed chromatin, compared with non-apoptotic cells. Apoptotic

cells were scored by counting at least 500 cells for each sample in three different experiments.

Assay of caspase-3, -6 and -9 enzymatic activity

We used the colorimetric substrate Ac-DEVD-p-nitroaniline for the determination of caspase-3, Ac-VEID-pNA for caspase-6 and Ac-LEHD-pNA for caspase-9 according to the following method: 24 h after treatments,

CGCs were collected in a lysis buffer (50 mM Hepes, 100 mM NaCl, 0.1% CHAPS, 0.1 mM EDTA, pH 7.4) and 0.5 µg/µl of protein was incubated with 200 µM of colorimetric substrate in assay buffer (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 0.1% CHAPS, 10 mM dithiothreitol, 0.1 mM EDTA, pH 7.4) in 96-well plates at 37°C for 24 h. Absorbance of the cleaved product was measured at 405 nm in a microplate reader (BioRad). Results were expressed as a percentage of sample absorbency over control values.

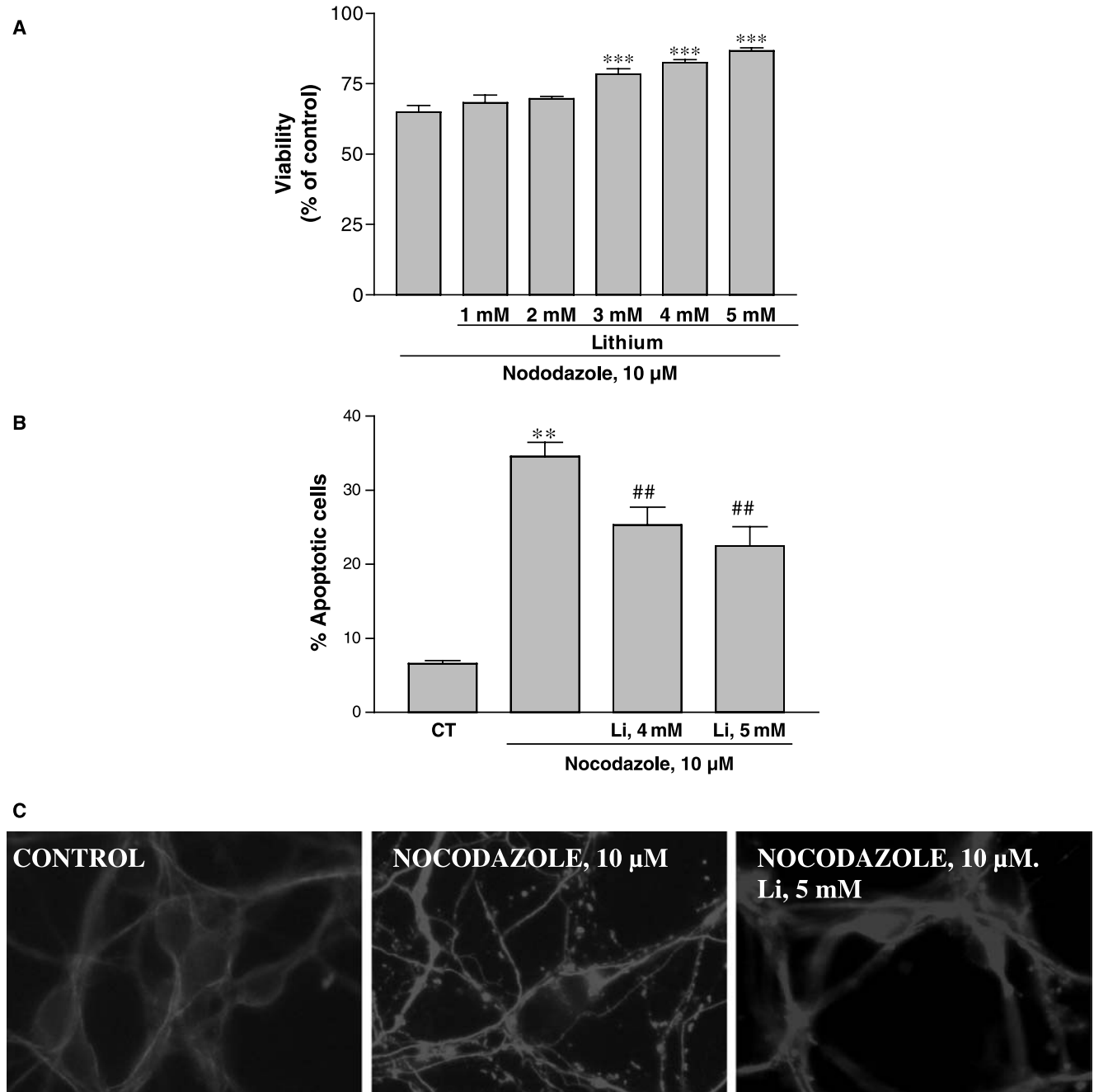


Fig. 1. **A)** Lithium increase neuronal cell viability measured by MTT. **B)** Antiapoptotic effects of lithium measured by flow cytometry. Concentration-response curve showing the effect of 24 h exposure Li⁺ on CGNs treated with nocodazole (10 µM). Each point represents the mean ± S.E.M. of 5 to 6 cultures carried out in quadruplicate. The statistical analysis used was one-way ANOVA followed by Tukey's test, ***p* < 0.01 vs. colchicine. **C)** Immunofluorescence images of CGNs stained by β-tubulin; one can observe the cytoskeletal rupture induced by Nocodazole and the recovery in presence of Li⁺ (5 mM)

Western-blot analysis

Aliquots of cell homogenate, containing 30 μ g or 5 μ g (α -spectrin) of protein per sample were analyzed by Western blot. In brief, samples were placed in sample buffer [0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 10% glycerol, 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) 2- β -mercaptoethanol, 0.05% bromophenol blue and denatured by boiling at 95–100°C for 5 min. Samples were separated by electrophoresis on 10% acrylamide gels. Thereafter, proteins were transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) sheets (ImmobilonTM-P, Millipore Corp., Bedford, MA) using a transblot apparatus (BioRad). Membranes were blocked overnight with 5% non-fat milk dissolved in TBS-T buffer (50 mM Tris; 1.5% NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.5). They were then incubated with primary monoclonal antibodies against phospho-GSK-3 β (Ser9) (1:400, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) or α -spectrin. After

90 min, blots were washed thoroughly in TBS-T buffer and incubated for 1 h with a peroxidase-conjugated IgG secondary antibody (Amersham Corp., Arlington Heights, IL). Immunoreactive protein was visualized using a chemiluminescence-based detection kit following the manufacturer's protocol (ECL kit; Amersham Corp.). Protein load was monitored using phenol red staining of the blot membrane or immunodetection of α -tubulin.

Immunocytochemistry against GSK-3 β

CGNs were grown on sterile glass slides. After stimuli, cells were washed twice in PBS and fixed in 4% paraformaldehyde/PBS, pH 7.4 for 1 h at room temperature. They were pre-incubated for 30 min with PBS containing 0.3% TritonX-100 and 30% normal horse serum at room temperature.

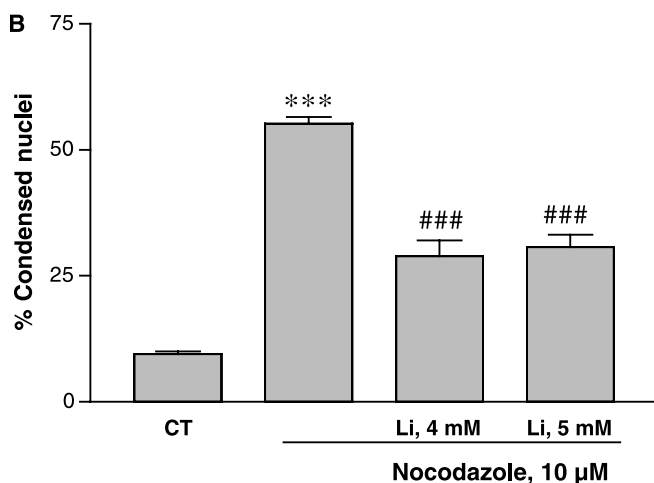
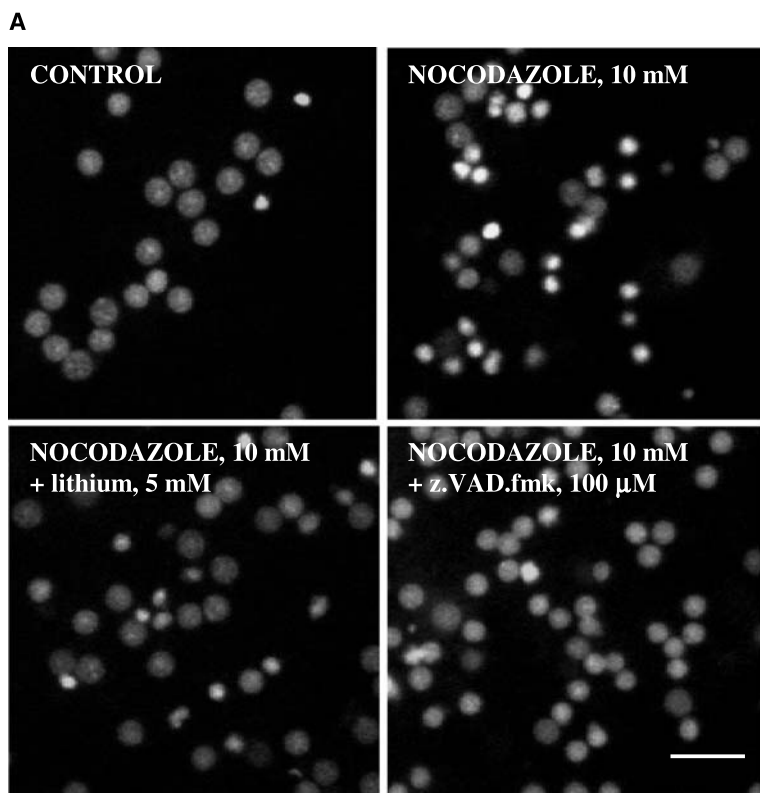


Fig. 2. **A** Percentage apoptotic nuclei induced by 10 μ M nocodazole and the effect of 24 h exposure to Li⁺ (4–5 mM) CGNs. **B** Quantification of 10 μ M nocodazole-induced condensed nuclei staining with iodide followed by fluorescence microscopy in CGNs. Pre-treatment 24 h with Li⁺ (4–5 mM) prevented chromatin condensation. The values represent the average from counts of at least 500 nuclei in four or more random microscope fields per condition. **C** PI staining of DNA from the nuclei of CGNs under different experimental conditions using a fluorescence microscope. Calibration bar, 10 μ m. The numerical values represent the average of three to four independent experiments, and error bars represent the S.E.M. The statistical analysis used was one-way ANOVA followed by Tukey's test *** p < 0.001 vs. controls. # p < 0.05, ## p < 0.01, ### p < 0.001 vs. Nocodazole

After blocking, they were incubated with an antibody against phospho-GSK-3 β (Ser9) (1:400, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) in PBS containing 0.3% TritonX-100 and 5% normal horse serum, overnight at 4°C. They were then washed extensively and incubated with fluorescent secondary antibody, for 1 h at room temperature. Coverslips were thoroughly washed and mounted in Mowiol[®] 4–88 and immunosignal analysis was performed using fluorescence microscopy at 100 \times magnification (Nikon Eclipse).

Statistical analysis

Data are given as mean \pm S.E.M. from at least quadruplicate experiments across 4–6 independent cultures. Data were analyzed by ANOVA followed by Tukey-Kramer multiple comparisons test.

Results

Nocodazole is a neurotoxin that induces cytoskeletal alteration and apoptosis in neuronal cell cultures (Volbracht et al., 1999). Incubation of CGNs with nocodazole (10 μ M) for 24 h induced neurotoxicity, decreasing neuron viability to 64.8 ± 2.3 (percentage of survival cells) (Fig. 1A). Li⁺ (5 mM) increased cell viability up to 86.6 ± 1.18 (Fig. 1A). We also analyze the effects of Li⁺ 5 mM on nocodazole-induced disruption of the cytoskeleton by immunocytochemistry using an antibody against β -tubulin. Twenty-four hours after exposure to nocodazole (10 μ M), fragmentation of the cytoskeleton was evident on the loss of immunostaining (Fig. 1C). A decrease in cytoskeleton disassembly was observed after treatment with Li⁺ (5 mM). Since treatment of CGNs with different concentrations of Li⁺ (1–5 mM) over 24 h attenuates nocodazole-induced neurotoxicity, we evaluated the antiapoptotic properties of 5 mM Li⁺ measuring DNA fragmentation by flow cytometry, condensed chromatin nuclei, and caspase pathway activation, all hallmarks of apoptosis.

Evaluation of DNA fragmentation by flow cytometry indicated that in control sample the percentage of nuclei with subdiploid peak was about 6%. After treatment with 10 μ M nocodazole the percentage of apoptotic nuclei increased up to 36% (Fig. 1B). Pretreatment of CGNs with Li⁺ 5 mM significantly attenuated the nuclear DNA fragmentation up to 18% (Fig. 1B). Apoptotic experiments were carried out to determine the number of condensed nuclei. The percentage of condensed nuclei in control samples was about 9.4%, in presence of nocodazole condensed nuclei increased up to 55.24%. Pretreatment with Li⁺ 4 and 5 mM significantly reduced the condensed nuclei up to 28 and 30%, respectively (Figs. 1B and 2A). These data indicate that at a concentration of 5 mM Li⁺ protects from apoptosis induced by nocodazole.

Treatment of CGNs with 10 μ M nocodazole induced an increase in the activity of three caspases tested, caspase-3,

-6 and -9, pretreatment with Li⁺ 5 mM attenuated the increase in the activity of these cystein-proteases (Fig. 3A). These data suggest that the activation of intrinsic apoptotic pathway is involved in this apoptotic model. To confirm that the intrinsic apoptotic pathway is involved in

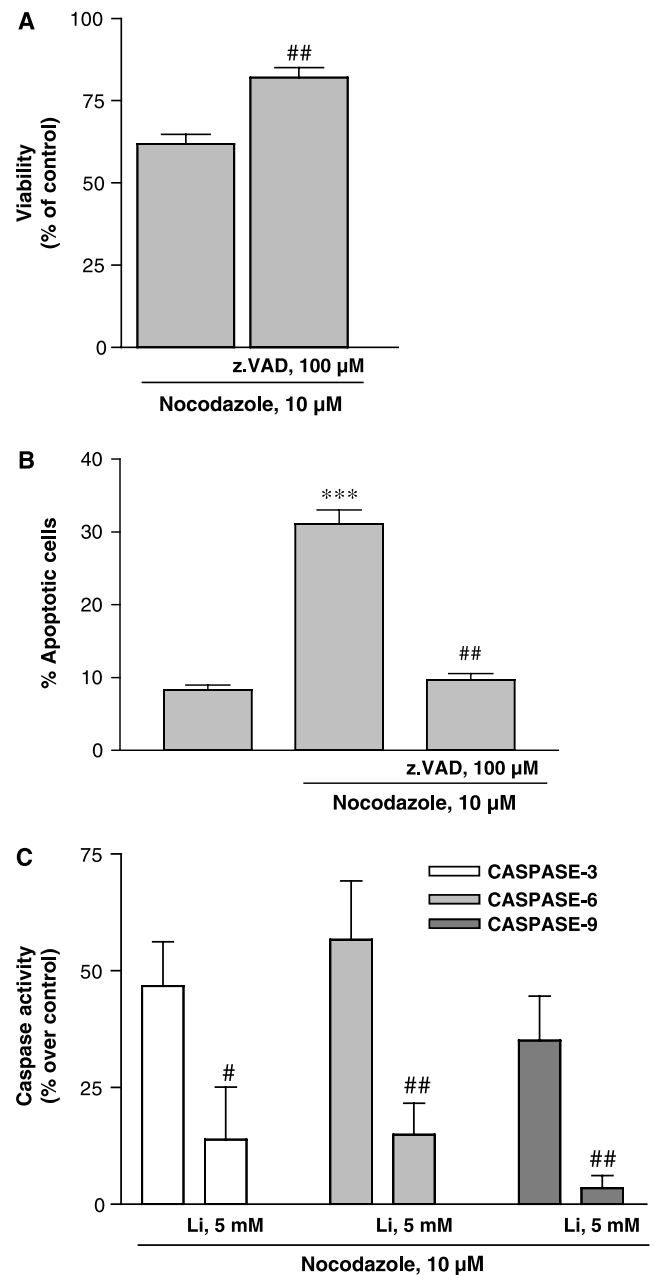


Fig. 3. Inhibitory action of z.VAD.fmk on neurotoxicity induced by nocodazole (10 μ M) on CGNs: **A** Loss of viability measured by MTT analysis) **B** Cell apoptosis using Flow cytometry method. **C** Bar chart shows caspase-3, -6 and -9 activity in CGNs exposed to nocodazole (10 μ M) in the absence or presence of Li⁺ (5 mM). Results are mean \pm S.E.M. of 3 different cultures. The statistical analysis was carried out with the one-way ANOVA followed by Tukey's test *** p < 0.05 vs. control. # p < 0.05, ## p < 0.01 vs. nocodazole

Table 1. Measures of caspase-3 activity in the different experimental conditions tested

Caspase-3 activity	Control	Without Li ⁺	With Li ⁺ , 5 mM
Nocodazole, 10 μ M	0.103 \pm 0.021 (5)	0.165 \pm 0.025** (5) (55%)	0.119 \pm 0.020 [#] (5) (15.65%)
S/K deprivation	0.076 \pm 0.002 (3)	0.114 \pm 0.005** (3) (50%)	0.0825 \pm 0.001 ^{##} (3) (11.19%)
Kainate, 500 μ M	0.097 \pm 0.01 (4)	0.106 \pm 0.01* (3) (9.27%)	n.d.
MPP ⁺ , 200 μ M	0.152 \pm 0.011 (4)	0.185 \pm 0.025* (4) (21.71%)	n.d.

Results are mean \pm S.E.M. of absorbencies at 350 nm of (*n*) experiments carried out in duplicate. Bold values represent the percentage of activation over control. The statistical analysis used was one-way ANOVA followed by Tukey's test ***p* < 0.01 vs. controls. [#]*p* < 0.05, ^{##}*p* < 0.01 vs. stimuli.

nocodazole-induced apoptosis we evaluated the effects of z-VAD-fmk on nocodazole neurotoxicity. zVAD-fmk protects against MTT decrease and from apoptosis induction mediated by nocodazole (Fig. 3B). Therefore, our results demonstrated an acute neuroprotective property of Li⁺ against nocodazole-induced apoptosis in CGNs.

One of the main antiapoptotic targets inhibited by Li⁺ is GSK-3 β . Thus we examined the effect of nocodazole on GSK-3 β expression. Western-blot results showed that 24 h of nocodazole treatment decreased phosphor-Ser9-GSK3 β levels in CGNs, indicating an increase in the activity of the enzyme (Fig. 6). Li⁺ (5 mM) treatment afforded a complete protection from nocodazole 10 μ M, returning this protein to control levels (Fig. 6). Furthermore immunocytochemical studies were used to examine in further detail the effects of Li⁺ on phosphor-Ser-9-GSK3 β neuronal staining. Thus, we confirm that Li⁺ 5 mM prevented loss of phosphor-Ser-9-GSK3 β immunosignal (Fig. 6).

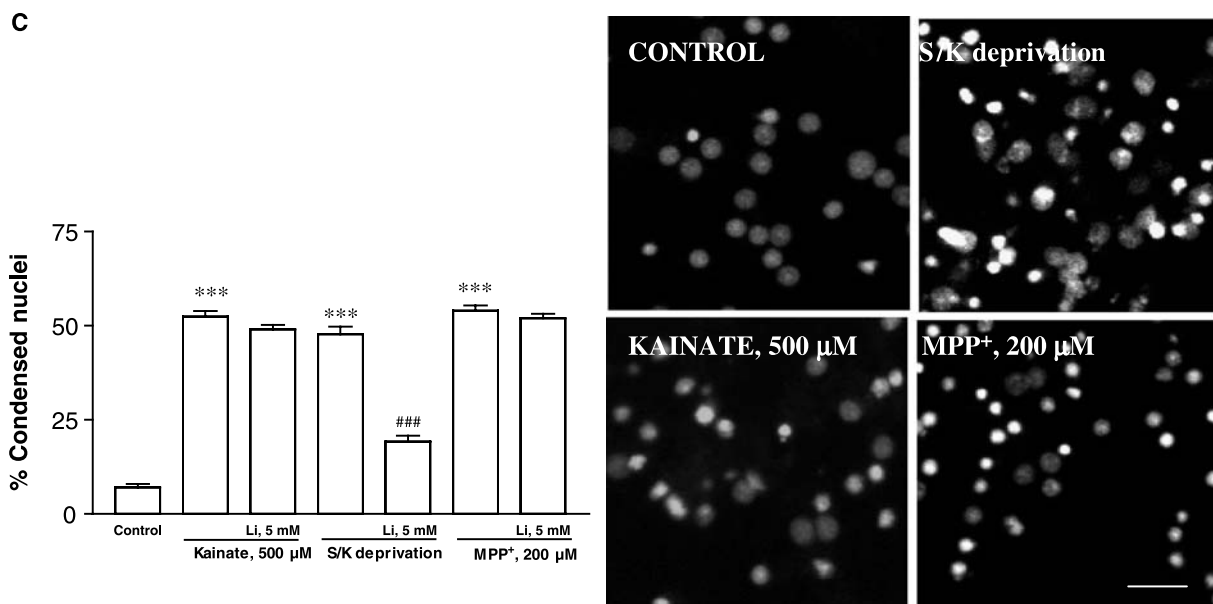
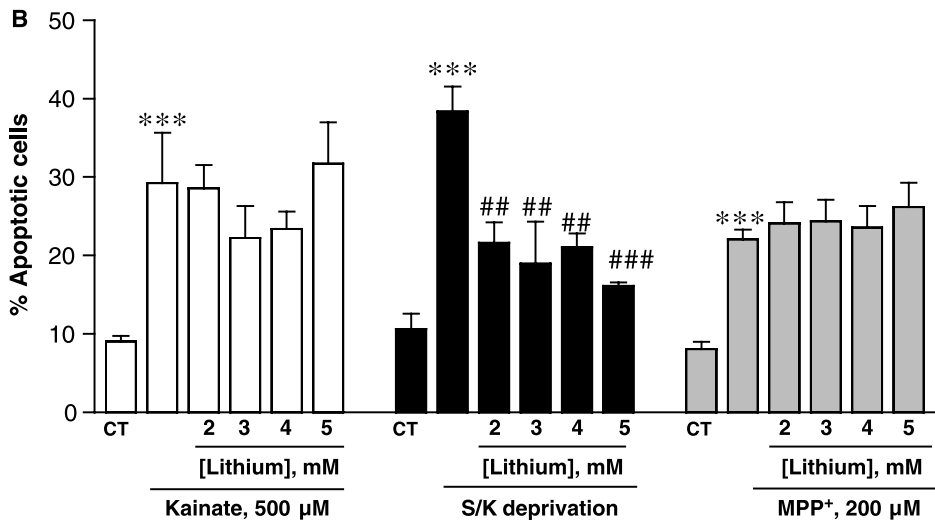
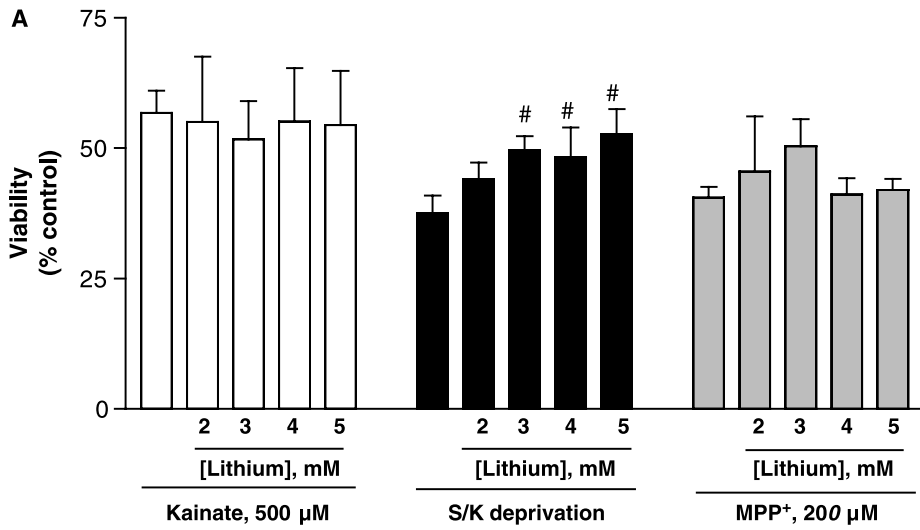
It is well known that potassium deprivation-induced apoptosis in CGNs is mediated through activation of GSK-3 β . Therefore, we corroborate that an acute treatment of CGNs with Li⁺ 5 mM attenuated the decrease in cell viability induced by S/K deprivation (Fig. 5A), but also attenuated apoptosis measured by different methods (Fig. 5B, C), we evaluated changes in the activation of the apoptotic pathway by using caspase-3 activity measures, such as a specific chromogenic substrate and α -spectrin breakdown. Therefore, S/K deprivation induced an increase in caspase-3 activities (Table 1) and the formation of the specific 120 kDa fragment from α -spectrin which is indicative of caspase-3 activation (Fig. 5). On the other hand, Li⁺ did not induce any changes in the 145 kDa fragment, an indicator of calpain activation. S/K deprivation induced an

activation of GSK-3 β measured by a decrease in serine-9 phosphorylation, evident in both Western blot analysis and immunocytochemistry studies. Treatment of CGNs with Li⁺ 5 mM increased GSK3 β phosphorylation in Ser-9 indicating the inhibition of this enzyme.

Our subsequent experiments were focused on evaluating acute effects of Li⁺ on kainic acid-induced apoptosis in CGNs. Treatment of CGNs with KA induced a decrease not only in neuronal viability measured by MTT method but also in apoptosis evaluated by DNA fragmentation using flow cytometry (Fig. 4A–C). In previous studies, we have demonstrated that KA treatment induced a slight increase in caspase-3 activity (Table 1). In additions, we confirm the activation of caspase-3 by measuring the formation of 120 kD of α -spectrin breakdown (Fig. 5). However, KA induced activation of GSK-3 β measured by Western blot and immunohistochemistry based on dephosphorylation of GSK-3 β (Fig. 6). Likewise, acute treatment (24 h) of CGNs with Li⁺ 5 mM increased the phosphorylation on serine 9 (Fig. 6), indicating that Li⁺ 5 mM rendered the GSK-3 β enzyme in an inactivate state, despite KA treatment.

Treatment of CGNs with MPP⁺ induced a significant increase in cell death measured by MTT method (Fig. 4A). It also induced an increase in cell apoptosis (Fig. 4B, C), accompanied by a slight increase in caspase-3 activation, measured by specific chromogenic substrate (Table 1) or by breakdown of α -spectrin and the visualization of 120 kDa specific fragment. When levels of GSK3 β (Ser9) were studied by Western blot or immunocytochemistry, a decrease (i.e., an inactivation) in this kinase was observed following MPP⁺ treatment (Fig. 6A, B). In any case, when neurons were treated with different concentrations of Li⁺ (1–5 mM), this cation did not protect them against MPP⁺ insult

Fig. 4. **A** Concentration-response curve showing the effect of 24 h exposure to Li⁺ (2–5 mM) on CGNs cell viability treated with kainate (500 μ M), S/K deprivation and MPP⁺ (200 μ M). **B** Bar chart shows quantification of hypodiploid or apoptotic nuclei induced by kainate (500 μ M), S/K deprivation and MPP⁺ (200 μ M) and the lack of effect of 24 h exposure to Li⁺ (2–5 mM) on CGNs. **C** Quantification of condensed nuclei in control, KA-treated, S/K deprivation and MPP⁺ toxicity in absence or presence of Li⁺ (5 mM). Representative images of PI staining under different experimental conditions. Calibration bar, 10 μ m. Each point is the mean \pm S.E.M. of 5 to 6 cultures, carried out in quadruplicate. The statistical analysis used was one-way ANOVA followed by Tukey's test **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 vs. control. [#]*p* < 0.05, ^{##}*p* < 0.01, ^{###}*p* < 0.001 vs. neurotoxic stimuli



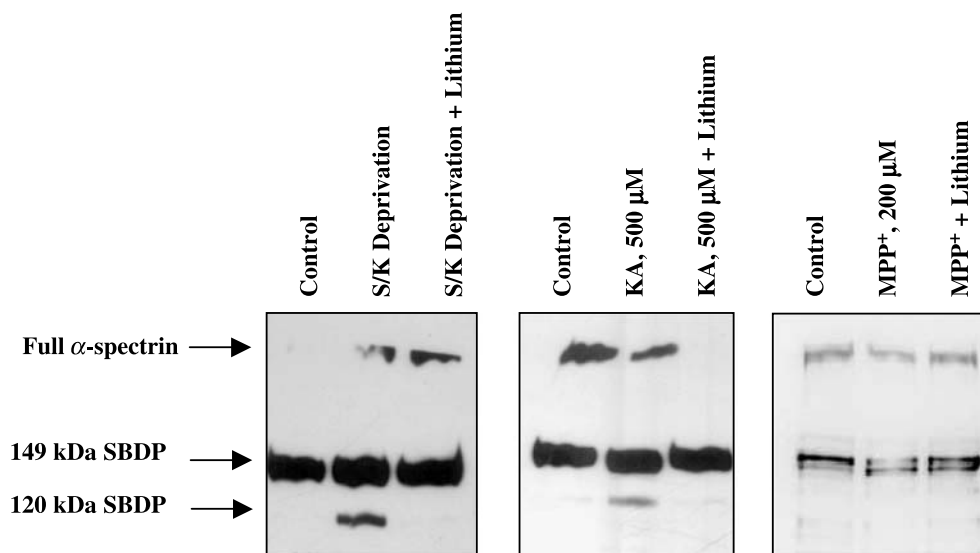


Fig. 5. Representative protein immunoblot studies of α -spectrin breakdown in CGNs after S/K withdrawal, Kainate, 500 μ M and MPP⁺ (200 μ M) alone or with Li⁺ (5 mM). In S/K deprivation, one can observe the strong 120 kDa specific fragment indicative of caspase-3 activation and effect of Li⁺ preventing it. KA induced a slight increase in this specific band and MPP⁺ samples showed the undetectable specific 120 kDa band. Analyses were carried out at least in duplicate on 3 different cultures

(Fig. 4A). Furthermore, acute treatment with Li⁺ (1–5 mM) was not effective in preventing DNA fragmentation measured by flow cytometry and inhibition of nuclear condensation (Fig. 4B, C). However, when we evaluated the activation of GSK-3 β by MPP⁺, as well as its inhibition by Li⁺ we observed changes in the expression of GSK3 β (Ser9) in the absence (signal decrease) and presence (recovery of immunosignal) of Li⁺ 5 mM (Fig. 6A).

Discussion

The aim of the present research was to study in depth the role of GSK-3 β inhibition by Li⁺ in CGNs after several neurotoxic stimuli. To this end, we confirm that Li⁺ did not always afford neuroprotection against several neurotoxic drugs that induce apoptosis in CGNs. It is well known that GSK-3 β is not only involved, but also facilitates the apoptotic process (Chuang, 2004; Cohen and Goedert, 2004; Facci et al., 2003; Goodenough et al., 2005). In this way, GSK-3 β is involved in neuronal apoptosis following excitotoxic treatment (Nonaka et al., 1998; Senatorov et al., 2004), staurosporin-induced apoptosis (Bijur et al., 2000), β -amyloid treatment and others insults (Alvarez et al., 2004). However, the present study was carried out to determine whether acute Li⁺ treatment offers neuroprotection in four different apoptotic stimuli via the inhibition of GSK-3 β . Therefore, we selected four well-known neurotoxins nocodazole, S/K deprivation, KA and MPP⁺. We found initially several differences among the apoptotic mechanism underlying neuronal

cell death. While nocodazole and S/K deprivation induced apoptosis through a robust activation of the mitochondrial-caspase-3 pathway, under our experimental conditions KA acid and MPP⁺ induced a slight increase in caspase-3, albeit to a lesser extent than that induced by nocodazole and S/K deprivation. These data on caspase-3 activation, in tandem with evidence that z.VAD-fmk, a pan-caspase inhibitor, did not prevent apoptosis mediated by MPP⁺ and KA, suggest the existence of different apoptotic routes, thereby implicating these neurotoxins in neuronal cell death (Verdaguer et al., 2002a, b; Leist et al., 1998). Studies have mainly proposed the existence of three mechanisms of neuronal cell death (Yuang et al., 2003; Stefanis, 2005). Type I cell death is the classical apoptotic pathway. In this route, the activation of a family of cystein-proteases, caspases, plays a prominent role; likewise caspase inhibitors prevent or attenuate this process. Moreover, the role of other cystein-proteases regulating the apoptotic process, such as calpains remains to be clarified. Type II neuronal cell death is mediated by the activation of lysosomal pathways and is known as autophagia (Stefanis, 2005). Finally, Type III is known as necrosis. The main characteristic of Types II and III is that these constitute caspase-independent cell death or in the case of autophagic cell death other cysteine proteases are involved (Yuang et al., 2003).

In reference to nocodazol in the present work, we demonstrated that the intrinsic apoptotic pathway (caspase activation) is involved. We also prove that Li⁺ 5 mM is neuroprotective in this apoptotic model. Since inhibition of

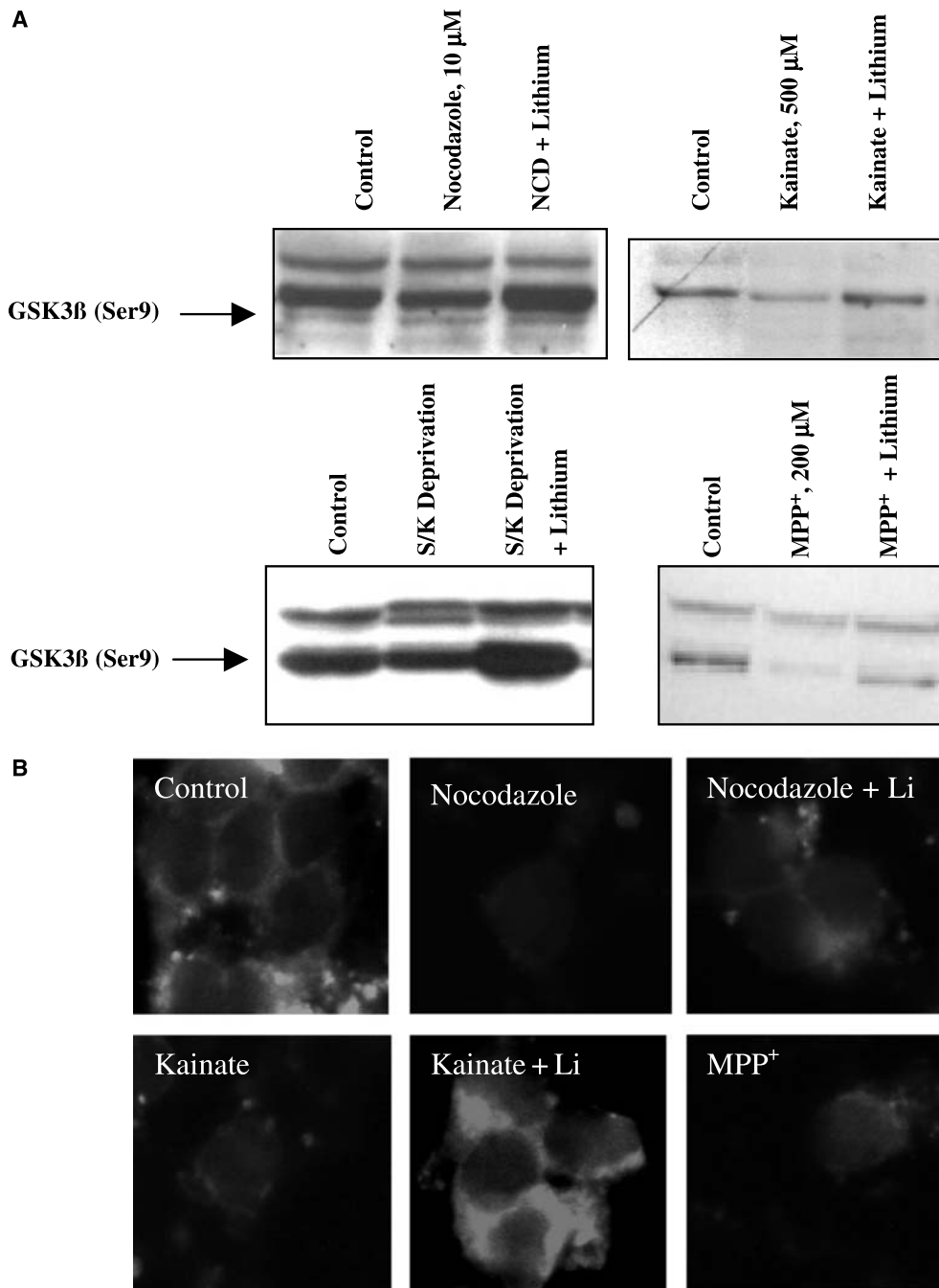


Fig. 6. **A** Western blot of phospo-GSK3β (ser9) under the different conditions tested in CGN. Evidence that its decrease after nocodazole (10 μM, B), kainate (500 μM), S/K deprivation and MPP⁺ (200 μM) and returns to control in the presence of Li⁺ (5 mM). **B** Immunostaining of CGN for phospo-GSK3β (ser9). Representative images of nocodazole (10 μM), kainate (500 μM), S/K deprivation, MPP⁺ (200 μM), nocodazole and kainate in the presence of Li⁺ (5 mM). Pre-incubation with Li⁺ returns the immunostaining to control levels. All experiments (western blot and immunostaining) were carried out at least in duplicate on 3 different cultures. Calibration bar, 5 μm

caspases with zVAD-fmk (a broad non-selective caspase inhibitor) also inhibits apoptosis, we concluded that nocodazole-induced apoptosis in CGNs could be classified as apoptotic Type I. Furthermore, GSK-3β has been impli-

cated in this apoptotic process, how GSK-3β orchestrate this process remains to be studied in detail.

On the other hand, it has been demonstrated that potassium deprivation induced apoptosis in CGNs is mediated

through the activation of GSK-3 β and Jun-kinase pathway (Enguita et al., 2005; Chen et al., 2003). Although previous studies suggest that potassium deprivation induce apoptosis by multiple pathways (e.g., re-entry in the cell cycle (Konishi and Bonni, 2003; Verdaguer et al., 2004)), calpain activation (Movsesyan et al., 2001) and calmodulin activation (See et al., 2001), it appears that activation of the intrinsic apoptotic pathway plays a prominent role (Type I). Recently, however, it has been proven that autophagic cell death is also involved (Type II) (Canu et al., 2005). Thus, more studies are necessary to understand the potential interactions and connections among the three different mechanisms of neuronal cell death.

It is well known that mitochondria regulate the apoptotic process (Stefanis, 2005). Therefore, we studied the effects of a mitochondrial neurotoxin, MPP⁺, which is an inhibitor of the mitochondrial complex I and a model of Parkinson's disease on CGNs (Leist et al., 1998). The addition of MPP⁺ to neuronal cell cultures induced apoptosis. When we evaluate caspase-3 activation under our experimental conditions, we found a slight increase. Indeed the α -spectrin breakdown also indicated a slight increase in the formation of 120 kD fragment (specific to caspase-3) and an increase in the 145 kD band (specific for calpain). These data suggest that the cysteine protease mainly implicated in the apoptotic process mediated by MPP⁺ in CGNs is calpain and in this case, pretreatment of CGNs with Li⁺ 5 mM was unable to attenuate neuronal cell death. Likewise, MPP⁺ decreased the phosphorylation of Ser-9 while Li⁺ prevented activation of this enzyme.

With respect to KA, previous results in our laboratory demonstrated that induced apoptosis through a slight increase in caspase-3 activation. In agreement with others authors we suggest that activation of cell cycle proteins could be implicated (Verdaguer et al., 2002). In the present study, consistent with Nonaka et al. (1998), we confirm that acute treatment with Li⁺ was not neuroprotective measured by MTT. Furthermore acute Li⁺ treatment did not reveal any antiapoptotic effects. However, in agreement with recent studies KA induce a decrease in the phosphorylation of Ser-9, thereby activating GSK-3 β (Goodenough et al., 2005; Verdaguer et al., 2002). In addition, Li⁺ showed neuroprotective effects against KA in organotypic slice preparations, in CGNs did not show any neuroprotective effects (although in both preparations inhibit GSK-3 β). This data suggest that an additional mechanism independent of GSK-3 β may be implicated in the neuroprotective properties of Li⁺. Of note, selective inhibitors of GSK-3 β , such as SB-216763 and SB-415286, also displayed neuroprotective properties against excitotoxicity when added to

chronic treatment in neuronal cultures (Takadera and Ohyashiki, 2004).

Previous studies demonstrated that Li⁺ has a neuroprotective effect in neuronal cell cultures against different stimuli, although the role of GSK-3 β inhibition, has not been evaluated (Li et al., 2002; Nonaka et al., 1998; Jope, 2004; Chen et al., 2004; Bhat et al., 2004; Chin et al., 2005). Thus, one of the main conclusions of the present study is that all neurotoxic stimuli induce the activation of GSK-3 β as measured by dephosphorylation of GSK-3 β . Moreover, acute treatment with Li⁺ 5 mM prevented it. Therefore, we have concluded that inhibition of GSK-3 β is not always synonymous with neuroprotection in CGNs (Chin et al., 2005).

Several authors have demonstrated that GSK-3 β is a key neuronal enzyme implicated in neuronal apoptosis. Furthermore, GSK-3 β could phosphorylate and thus regulate numerous targets such as tau and transcription factors (e.g., heat shock factor-1) (Chuang, 2004; Bhat et al., 2004; Linseman et al., 2003; Jin et al., 2005; Benedito et al., 2005; Gould et al., 2004; Hennion et al., 2002; Li, 2004; Maggirwar et al., 2000; Meijer et al., 2004). Therefore, the proapoptotic effects of GSK-3 β are attributed to cytoplasmic and nuclear changes. In this way, our results allow us to hypothesize that *in vitro* Li⁺ could exert an acute neuroprotective effect against neurotoxins that induce neuronal cell death by caspase activation (i.e., Type I cell death). Thus, we propose that GSK-3 β could constitute an active signal in neuronal cell death, acute Li⁺ treatment is only neuroprotective when caspase-3 executed the apoptotic program.

Acknowledgements

The authors thank Maria Teresa Iglesias for excellent technical assistance. The excellent secretarial support of Ms. Mar Morales is greatly appreciated. We thank the Language Assessment Service of the University of Barcelona for revising the manuscript. This study was supported by grants SAF2005-01604, SAF2005-05179 from Ministerio de Educación y Ciencia, FISS G03/137, FISS G03/167 and PI 041300 from Instituto de Salud Carlos III (FEDER FUNDS) and Generalitat de Catalunya 2005/SGR00893.

References

- Alvarez AR, Godoy JA, Mullendorff K, Olivares GH, Bronfman M, Inestrosa NC (2004) Wnt-3a overcomes beta-amyloid toxicity in rat hippocampal neurons. *Exp Cell Res* 297: 186–196
- Alvarez G, Munoz-Montano JR, Satrustegui J, Avila J, Bogonez E, Diaz-Nido J (2002) Regulation of tau phosphorylation and protection against beta-amyloid-induced neurodegeneration by Li⁺. Possible implications for Alzheimer's disease. *Bipolar Disord* 4: 153–165
- Benedito AB, Lehtinen M, Massol R, Lopes UG, Kirchhausen T, Rao A, Bonni A (2005) The transcription factor NFAT3 mediates neuronal survival. *J Biol Chem* 280: 2818–2825

- Bhat RV, Budd Haerberlein SL, Avila J (2004) Glycogen synthase kinase 3: a drug target for CNS therapies. *J Neurochem* 89: 1313–1317
- Bijur GN, De Sarno P, Jope RS (2000) Glycogen synthase kinase-3 β facilitates staurosporine- and heat shock-induced apoptosis. Protection by Li⁺. *J Biol Chem* 275: 7583–7590
- Canu N, Tufi R, Serafino AL, Amadoro G, Ciotti MT, Calissano P (2005) Role of the autophagic-lysosomal system on low potassium-induced apoptosis in cultured cerebellar granule cells. *J Neurochem* 92: 1228–1242
- Chen G, Bower KA, Ma C, Fang S, Thiele CJ, Luo J (2004) Glycogen synthase kinase-3 β mediates 6-hydroxydopamine-induced neuronal death. *FASEB J* 18: 1162–1164
- Chen RW, Qin ZH, Ren M, Kanai H, Chalecka-Franaszek E, Leeds P, Chuang DM (2003) Regulation of c-Jun N-terminal kinase, p38 kinase and AP-1 DNA binding in cultured brain neurons: roles in glutamate excitotoxicity and Li⁺ neuroprotection. *J Neurochem* 84: 566–575
- Chin PC, Majdzadeh N, D'Mello SR (2005) Inhibition of GSK3 β is a common event in neuroprotection by different survival factors. *Brain Res Mol Brain Res* 137: 193–201
- Chuang DM (2004) Neuroprotective and neurotrophic actions of the mood stabilizer Li⁺: can it be used to treat neurodegenerative diseases? *Crit Rev Neurobiol* 16: 83–90
- Cohen P, Goedert M (2004) GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* 3: 479–487
- De Gregorio-Rocasolano N, Gasull T, Trullas R (2001) Overexpression of neuronal pentraxin 1 is involved in neuronal death evoked by low K(+) in cerebellar granule cells. *J Biol Chem* 276: 796–803
- Eldar-Finkelman H (2002) Glycogen synthase kinase 3: an emerging therapeutic target. *Trends Mol Med* 8: 126–132
- Elyaman W, Terro F, Wong NS, Hugon J (2002) In vivo activation and nuclear translocation of phosphorylated glycogen synthase kinase-3 β in neuronal apoptosis: links to tau phosphorylation. *Eur J Neurosci* 15: 651–660
- Enguita M, DeGregorio-Rocasolano N, Abad A, Trullas R (2005) Glycogen synthase kinase 3 activity mediates neuronal pentraxin 1 expression and cell death induced by potassium deprivation in cerebellar granule cells. *Mol Pharmacol* 67: 1237–1246
- Facci L, Stevens DA, Skaper SD (2003) Glycogen synthase kinase-3 inhibitors protect central neurons against excitotoxicity. *Neuroreport* 14: 1467–1470
- Goodenough S, Conrad S, Skutella T, Behl C (2004) Inactivation of glycogen synthase kinase-3 β Protects against kainic acid induced neurotoxicity in vivo. *Brain Res* 1026: 116–125
- Goodenough S, Schleusner D, Pietrzik C, Skutella T, Behl C (2005) Glycogen synthase kinase 3 β links neuroprotection by 17 β -estradiol to key Alzheimer processes. *Neuroscience* 132: 581–589
- Gould TD, Zarate CA, Husseini K, Manji MD (2004) Glycogen Synthase Kinase-3: A target for novel bipolar disorder treatments. *J Clin Psychiat* 65: 10–21
- Hennion JP, el-Masri MA, Huff MO, el-Mailakh RS (2002) Evaluation of neuroprotection by Li⁺ and valproic acid against ouabain-induced cell damage. *Bipolar Disord* 4: 201–206
- Hongisto V, Smeds N, Brecht S, Herdegen T, Courtney MJ, Coffey ET (2003) Li⁺ blocks the c-Jun stress response and protects neurons via its action on glycogen synthase kinase 3. *Mol Cell Biol* 23: 6027–6036
- Jin N, Kovacs AD, Sui Z, Dewhurst S, Maggirwar SB (2005) Opposite effects of Li⁺ and valproic acid on trophic factor deprivation-induced glycogen synthase kinase-3 activation, c-Jun expression and neuronal cell death. *Neuropharmacology* 48: 576–583
- Jope RS (2004) Inhibition of glycogen synthase kinase-3: a potential therapeutic target of Li⁺. *Clin Neurosci Res* 4: 171–179
- Jorda EG, Verdaguer E, Morano A, Jimenez A, Canudas AM, Camins A, Pallas M (2004) Li⁺ prevents colchicine-induced apoptosis in rat cerebellar granule neurons. *Bipolar Disord* 6: 144–149
- Kang HJ, Noh JS, Bae YS, Gwag BJ (2003) Calcium-dependent prevention of neuronal apoptosis by Li⁺ ion: essential role of phosphoinositide 3-kinase and phospholipase C gamma. *Mol Pharmacol* 64: 228–334
- King TD, Jope RS (2005) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 protects cells from intrinsic but not extrinsic oxidative stress. *Neuroreport* 16: 597–601
- Konishi Y, Bonni A (2003) The E2F-Cdc2 cell-cycle pathway specifically mediates activity deprivation-induced apoptosis of postmitotic neurons. *J Neurosci* 23: 1649–1658
- Leist M, Volbracht C, Fava E, Nicotera P (1998) Methyl-4-phenylpyridinium induces autocrine excitotoxicity, protease activation, and neuronal apoptosis. *Mol Pharmacol* 54: 789–801
- Li PP (2004) Transcriptional mechanisms of Li⁺ action: therapeutic implications. *Clin Neurosci Res* 4: 271–278
- Li R, El-Mallakh RS (2000) A novel evidence of different mechanisms of Li⁺ and valproate neuroprotective action on human SY5Y neuroblastoma cells: caspase-3 dependency. *Neurosci Lett* 294: 147–150
- Li X, Bijur GN, Jope RS (2002) Glycogen synthase kinase-3 β , mood stabilizers, and neuroprotection. *Bipolar Disord* 4: 137–144
- Linseman DA, Cornejo BJ, Le SS, Meintzer MK, Laessig TA, Bouchard RJ, Heidenreich KA (2003) A myocyte enhancer factor 2D (MEF2D) kinase activated during neuronal apoptosis is a novel target inhibited by Li⁺. *J Neurochem* 85: 1488–1499
- Lu R, Song L, Jope RS (1999) Li⁺ attenuates p53 levels in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neuroreport* 10: 1123–1125
- Maggirwar SB, Tong N, Ramirez S, Gelbard HA, Dewhurst S (2000) HIV-1 Tat-mediated activation of glycogen synthase kinase-3 β contributes to Tat-mediated neurotoxicity. *J Neurochem* 73: 578–586
- Meijer L, Flajolet M, Greengard P (2004) Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3. *Trends Pharmacol Sci* 25: 471–480
- Mora A, Gonzalez-Polo RA, Fuentes JM, Alonso JC, Soler G, Centeno F (1999) Different mechanisms of protection against apoptosis by valproate and Li⁺. *Eur J Biochem* 266: 886–891
- Mora A, Sabio G, Alonso JC, Soler G, Centeno F (2002) Different dependence of Li⁺ and valproate on PI3K/PKB pathway. *Bipolar Disord* 4: 195–200
- Mora A, Sabio G, Risco AM, Cuenda A, Alonso JC, Soler G, Centeno F (2002) Li⁺ blocks the PKB and GSK3 dephosphorylation induced by ceramide through protein phosphatase-2A. *Cell Signal* 14: 557–562
- Movsesyan VA, Yakovlev AG, Fan L, Faden AI (2001) Effect of serine protease inhibitors on posttraumatic brain injury and neuronal apoptosis. *Exp Neurol* 167: 366–375
- Nonaka S, Hough CJ, Chuang DM (1998a) Chronic Li⁺ treatment robustly protects neurons in the central nervous system against excitotoxicity by inhibiting N-methyl-D-aspartate receptor-mediated calcium influx. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 2642–2647
- Nonaka S, Katsube N, Chuang DM (1998b) Li⁺ protects rat cerebellar granule cells against apoptosis induced by anticonvulsants, phenytoin and carbamazepine. *J Pharmacol Exp Ther* 286: 539–547
- Perez M, Rojo AI, Wandosell F, Diaz-Nido J, Avila J (2003) Prion peptide induces neuronal cell death through a pathway involving glycogen synthase kinase 3. *Biochem J* 372: 129–136
- Rametti A, Esclaire F, Yardin C, Terro F (2004) Linking alterations in tau phosphorylation and cleavage during neuronal apoptosis. *J Biol Chem* 279: 54518–54528
- Rowe MK, Chuang DM (2004) Li⁺ neuroprotection: molecular mechanisms and clinical implications. *Expert Rev Mol Med* 6: 1–18
- See V, Boutillier AL, Bito H, Loeffler JP (2001) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV (CaMKIV) inhibits apoptosis induced by potassium deprivation in cerebellar granule neurons. *FASEB J* 15: 134–144
- Segura-Aguilar J, Kostrzawa R (2004) Neurotoxins and neurotoxic species implicated in neurodegeneration. *Neurotox Res* 67: 615–630

- Senatorov VV, Ren M, Kanai H, Wei H, Chuang DM (2004) Short-term Li⁺ treatment promotes neuronal survival and proliferation in rat striatum infused with quinolinic acid, an excitotoxic model of Huntington's disease. *Mol Psychiatry* 9: 371–385
- Shimomura A, Nomura R, Senda T (2003) Li⁺ inhibits apoptosis of mouse neural progenitor cells. *Neuroreport* 14: 1779–1782
- Song L, Zhou T, Jope RS (2002) Central role of glycogen synthase kinase-3 β in endoplasmic reticulum stress-induced caspase-3 activation. *J Biol Chem* 277: 44701–44708
- Stefanis L (2005) Caspase-dependent and -independent neuronal death: two distinct pathways to neuronal injury. *Neuroscientist* 11: 50–62
- Takadera T, Ohyashiki T (2004) Glycogen synthase kinase-3 inhibitors prevent caspase-dependent apoptosis induced by ethanol in cultured rat cortical neurons. *Eur J Pharmacol* 9: 239–245
- Verdaguer E, Garcia-Jorda E, Canudas AM, Jimenez A, Canudas AM, Escubedo E, Camarasa J, Pallas M, Camins A (2002a) Kainic acid-induced apoptosis in cerebellar granule neurons: an attempt at cell cycle re-entry. *Neuroreport* 13: 413–416
- Verdaguer E, Garcia-Jorda E, Jimenez A, Stranges A, Sureda FX, Canudas AM, Escubedo E, Camarasa J, Pallas M, Camins A (2002b) Kainic acid-induced neuronal cell death in cerebellar granule cells is not prevented by caspase inhibitors. *Br J Pharmacol* 135: 1297–1307
- Verdaguer E, Jorda EG, Canudas AM, Jiménez A, Escubedo E, Camarasa J, Pallas M, Camins A (2004) Antiapoptotic effects of roscovitine in cerebellar granule cells deprived of serum and potassium: a cell cycle-related mechanism. *Neurochem Int* 44: 251–261
- Volbracht C, Leist M, Nicotera P (1999) ATP controls neuronal apoptosis triggered by microtubule breakdown or potassium deprivation. *Mol Med* 5: 477–489
- Youdim MB, Arraf Z (2004) Prevention of MPTP (N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) dopaminergic neurotoxicity in mice by chronic Li⁺: involvements of Bcl-2 and Bax. *Neuropharmacology* 46: 1130–1140
- Yuang J, Lipinski M, Degtrev A (2003) Diversity in the mechanisms of neuronal cell death. *Neuron* 40: 401–413

Publicació 2

**GLYCOGEN SYNTHASE KINASE-3 IS INVOLVED IN THE
REGULATION OF THE CELL CYCLE IN CEREBELLAR
GRANULE CELLS**

Marc Yeste-Velasco, Jaume Folch, Ramon Trullàs, Maria Alba Abad, Marta Enguita, Mercè Pallàs, Antoni Camins

Neuropharmacology (2007) 53: 295-307

Glycogen synthase kinase-3 is involved in the regulation of the cell cycle in cerebellar granule cells

M. Yeste-Velasco^{a,d,1}, J. Folch^{b,1}, R. Trullàs^c, M.A. Abad^c,
M. Enguita^c, M. Pallàs^{a,d}, A. Camins^{a,d,*}

^a Unitat de Farmacologia, Facultat de Farmàcia Universitat de Barcelona, Nucli Universitari de Pedralbes, E-08028 Barcelona, Spain

^b Unitat de Bioquímica, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgil, C./St. Llorenç 21, 43201 Reus (Tarragona), Spain

^c Neurobiology Unit, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Rossello 161, 08036 Barcelona, Spain

^d Institut de Biomedicina, Facultat de Farmàcia Universitat de Barcelona, Nucli Universitari de Pedralbes E-08028 Barcelona, Spain

Received 12 June 2006; received in revised form 2 April 2007; accepted 16 May 2007

Abstract

Recent studies have demonstrated that neuronal reentry in the cell cycle and specifically the expression of the transcription factor E2F-1, constitutes a pathway that may be involved in neuronal apoptosis after serum and potassium withdrawal. Other enzymes such as glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) are also involved in this apoptotic stimulus, and thus in the process of neuronal cell death. Primary cerebellar granule cells (CGNs) were used in this study to determine whether pharmacological inhibition of GSK-3 β is involved in neuronal modulation of the cell cycle, and specifically in the regulation of E2F-1 and retinoblastoma protein (Rb). CGNs showed a dramatic increase in GSK-3 β activity after 2 h of serum and potassium deprivation. Immunoblot and activity assays revealed that lithium and SB415286 inhibit fully the activation of GSK-3 β and attenuate the expression of cyclin D, cyclin E, pRb phosphorylation and the transcription factor E2F-1. These data were confirmed using AR-014418, a selective GSK-3 β inhibitor that prevents the expression of cell-cycle proteins. Our data indicate that GSK-3 β inhibition regulates, in part, the cell cycle in CGNs by inhibiting Rb phosphorylation and thus inhibiting E2F-1 activity. However, the selective inhibition of GSK-3 β with AR-A014418 had not effect on cell viability or apoptosis mediated by S/K withdrawal. Furthermore, our results suggest that selective GSK-3 β inhibition is not sufficient to protect against apoptosis in this S/K withdrawal model, indicating that Li⁺ and SB415286 neuroprotective effects are mediated by the inhibition of additional targets to GSK3 β . Therefore, there is a connection between cell cycle and GSK-3 β activation and that these, along with other mechanisms, are involved in the molecular paths leading to the apoptotic process of rat CGNs triggered by S/K withdrawal.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Apoptosis; Cell cycle; Serum and potassium withdrawal; Lithium; SB415286; GSK3 β ; Cerebellar granule cells

1. Introduction

Understanding the mechanisms involved in neuronal apoptosis is essential for an effective treatment of neurodegenerative

diseases (Cavallaro et al., 2004). The enzyme GSK-3 β is one of the main apoptotic pathways involved in central nervous system diseases such as Alzheimer's disease (AD) (Crowder and Freeman, 2000; Alvarez et al., 2002; Mora et al., 2001; Facci et al., 2003; Enguita et al., 2005), Prion diseases (Wada et al., 2005), bipolar disorders and others (Kanai et al., 2002). Therefore, GSK3 β in CNS alterations is an important area of research aimed at the development of new drugs, e.g. for treating AD (Alvarez et al., 1999, 2002; Jope and Johnson, 2004; Jope et al., 2007). Furthermore, studies performed on the brains of

* Corresponding author at: Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Nucli Universitari de Pedralbes, Avinguda Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain.

E-mail address: camins@ub.edu (A. Camins).

¹ The first two authors contributed equally to this research.

patients with AD confirm the importance of GSK3 β , as a relationship between increased GSK3 β activity and tau hyperphosphorylation has been found (Alvarez et al., 2002). In addition, studies performed in neuronal cell preparations, provide evidence of the importance of GSK-3 β in the mechanisms of neuronal cell death, as GSK3 β is involved in a common pathway that is activated in the neuronal apoptotic process (Tseng and Lin-Shiau, 2002; Heidenreich, 2003; Linseman et al., 2003; Pardo et al., 2003; Chen et al., 2004; Shao et al., 2005; Jin et al., 2005; Enguita et al., 2005; Jordà et al., 2005; Jope and Roh, 2006). Likewise, serum and potassium (S/K) withdrawal in CGNs is a model that is widely used to study the mechanisms of apoptotic routes in neurons (Desagher et al., 2005). However, evidence indicates that multiple pathways are activated in this apoptotic model, such as reentry in the cell cycle, activation of the intrinsic apoptotic pathway with the release of cytochrome C and caspase activation, activation of calpains, activation of the c-Jun kinase signaling pathway (c-JNK), and GSK-3 β (Gerhardt et al., 2001; Hongisto et al., 2003; Chien et al., 2004; Benedito et al., 2005; Desagher et al., 2005; Canu et al., 1998; Verdaguer et al., 2005). The importance of GSK3 β in the regulation of neuronal apoptosis is corroborated by the fact that lithium, an inhibitor of this enzyme, and SB415286, a most specific inhibitor of GSK-3 β , had neuroprotective effects in neurons (Cross et al., 2001; Shi et al., 2005). In fact, lithium showed widely neuroprotective properties against β -amyloid neurotoxicity (Alvarez et al., 2002; Wei et al., 2000), glutamate neurotoxicity (Chen et al., 2004), colchicine-induced apoptosis in CGNs (Jordà et al., 2005), and kainic acid excitotoxicity (Facci et al., 2003). Furthermore, the maleimide derivatives SB415286 and SB-216763 exert neuroprotective effects in two models of neuronal apoptosis: S/K deprivation and excitotoxicity in CGNs (Cross et al., 2001).

Thus, a plausible explanation of the widely neuroprotective properties of lithium and GSK-3 β inhibitors, could be due to the ability of GSK-3 β to inhibit or modulate other pro-apoptotic signals such as the c-Jun kinase pathway and cell cycle (Alvarez et al., 2002; Hongisto et al., 2003; Hashimoto et al., 2003; Welcker et al., 2003; Bhat et al., 2004; Litovchick et al., 2004; Erdal et al., 2005; Wada et al., 2005).

Previous studies, has been demonstrated that the expression of cell cycle proteins is a common event in the brains of AD patients (Jordan-Sciutto et al., 1999, 2002). Furthermore, experiments performed in neuronal cell preparations and in laboratory animals indicate the importance of E2F-1 as a transcription factor that is involved in the regulation of the neuronal apoptotic process (Smith et al., 2000; Hou et al., 2001a,b; Gendron et al., 2001; Liu and Greene, 2001a,b; Smits et al., 2001; Hoglinger et al., 2007). CGNs cultures that lack the transcription factor E2F-1 are partially protected from S/K deprivation-induced apoptosis. In addition, cyclin-dependent kinase inhibitors show neuroprotective properties in neurons against this and other neurotoxic stimuli (O'Hare et al., 2000; Verdaguer et al., 2005). Therefore, it seems that E2F-1 and GSK-3 β are prominent modulators of S/K-induced apoptosis in CGNs. Thus, the aims of the present work were to evaluate the potential modulation of cell-cycle protein

expression by GSK-3 β , and to put forward a possible explanation for the neuroprotective properties of GSK-3 β inhibitors through the inhibition of E2F-1 and Rb phosphorylation.

2. Methods

2.1. Cell culture

Primary cultures of cerebellar granule neurons were prepared from postnatal day 7 Sprague–Dawley rat pups, as described previously (Verdaguer et al., 2002). Cells were dissociated in the presence of trypsin and DNase I. They were then plated in poly-L-lysine (100 μ g/ml)-coated dishes at a density of 8×10^5 cells/cm² in basal Eagle's medium supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum, 0.1 mg/ml gentamicin, 2 mM L-glutamine and 25 mM KCl. Cytosine-D-arabifuranoside (10 μ M) was added to the culture medium 16–18 h after plating to prevent the replication of non-neuronal cells. The cultures were maintained at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO₂, 95% air. They left undisturbed until experiments performed 9 days after plating (9 days in vitro). All procedures involving animals and their care were approved by the University of Barcelona's ethics committee. Procedures were conducted in accordance with guidelines that comply with national (Generalitat de Catalunya) and international laws and policies (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Academy Press, Washington, DC, 1996).

2.2. Induction of neuronal death by serum and potassium depletion and neuroprotective treatments

After 8 days in culture, the cerebellar granule cells medium (conditioned medium, +S/+K) was replaced with fresh unconditioned serum-free medium containing 5 mM potassium (serum and potassium withdrawal: –S/–K). The drug treatments were performed at 7–8 days in vitro. GSK3 β inhibitors lithium and SB415286 were from Sigma (St. Louis, MO, USA) and AR-A014418 was from Calbiochem. SB415286 stock solutions (44 mM) of this inhibitor were prepared in DMSO and stored at –20 °C. AR-A014418 stock solutions (16 mM) were prepared in DMSO and stored at –20 °C.

2.3. GSK3 β immunoprecipitation and activity assay

The activity of GSK3 β was essentially measured as described in Bijur and Jope (2003). Cells were lysed in immunoprecipitation lysis buffer (20 mM Tris, pH 7.5, 0.2% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 1 mM sodium orthovanadate, 100 μ M phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml aprotinin, 5 μ g/ml pepstatin, 1 nM okadaic acid, 100 mM sodium fluoride and 1 mg/ml glycogen). The cell lysates were passed through a 23-gauge syringe, incubated for 10 min on ice, and centrifuged at 20,800 \times g for 15 min. The protein concentration was determined using a protein assay kit (Pierce Chemical, Rockford, IL). Each sample (100 μ g of protein) was cleared with 40 μ l of protein G-Sepharose beads for 90 min at 4 °C. It was then incubated with 1.2 μ g of mouse anti-GSK3 β antibody overnight at 4 °C. This procedure led to the complete immunoprecipitation of GSK3 β in all samples. The immune complexes were washed three times with immunoprecipitation lysis buffer and once with 20 mM Tris, pH 7.5, 5 mM MgCl₂ and 1 mM dithiothreitol. Kinase activity was assayed in a total volume of 15 μ l of kinase buffer containing 20 mM Tris, pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, 250 μ M ATP 1.4 μ Ci of [γ -³²P]ATP, and 100 μ M phosphoglycogen synthase peptide-2 (YRRAAVPPSPSLSRHSSP HQSEDEEE; Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA). Kinase buffer without peptide was used as a control. The samples were incubated for 30 min at 30 °C and placed on ice for 2 min before centrifuging for 3 min at 1800 \times g. The reaction supernatants were spotted onto 1 \times 2 cm P81 filter paper (three spots of 5 μ l each; Upstate Biotechnology). The filters were then washed four times in 0.5% phosphoric acid for a total of 1 h. Then, the filters were washed with 95% ethanol for 2 min, air-dried and counted in a liquid scintillation counter. The efficiency of GSK3 β immunoprecipitation was examined by immunoblotting for GSK3 β . The value of GSK3 β activity from

each sample was standardized with the corresponding optical density value of the GSK3 β assayed.

2.4. Detection of apoptotic nuclei by propidium iodide

PI staining was used to detect morphological evidence of apoptosis. CGNs were grown on glass coverslips following S/K withdrawal treatment alone, or in the presence of GSK3 β inhibitors. Subsequently, cells were fixed in 4% paraformaldehyde/phosphate buffered saline solution (PBS) pH 7.4 for 1 h at room temperature. After washing with PBS, cells were incubated for 3 min with a solution of PI in PBS (10 μ g/ml). Coverslips were mounted in Mowiol[®] 4–88. Stained cells were viewed under UV illumination with the 20 \times lens and their digitized images were then taken. Treatment of apoptotic cells resulted in shrunken, brightly fluorescent, apoptotic nuclei showing high fluorescence and condensed chromatin that non-apoptotic cell. The number of apoptotic cells was calculated by counting at least 500 cells in each sample over three separate experiments.

2.5. Cytotoxicity assays with AR-A014418

2.5.1. Viability assays

AR-A014418 was added at the same time as –S/–K medium (serum and potassium withdrawal). To assess the loss of cell viability, we used the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium] method. MTT was added to the cells at a final concentration of 250 μ M and incubated for 1 h, allowing the reduction in MTT to produce a dark blue formazan product. Media were then removed, and cells were dissolved in dimethylsulfoxide. Formazan production was measured by the absorbency change at 595 nm using

a microplate reader (BioRad Laboratories, CA, USA). Viability results were expressed as percentages. The absorbency measured from non-treated cells was taken to be 100%.

2.5.2. Analysis of apoptosis by flow cytometry

Apoptosis was measured at 12 h of –S/–K (serum and potassium withdrawal) by flow cytometry. Briefly, culture medium was removed and cells were collected from culture plates by pipetting and washed with PBS. Flow cytometer experiments were carried out using an Epics XL flow cytometer with propidium iodide (PI, 10 μ g/ml) added 30 min before. The instrument was set up in the standard configuration: the sample was excited by a 488 nm air-cooled argon-ion laser at 15 mW power as a standard. Forward scatter (FSC), side scatter (SSC), and PI red (620 nm) fluorescence values were then acquired. Optical alignment was based on the optimized signal from 10 nm fluorescent beads (Immunocheck, Epics Division). Time was used as a control to stabilize the instrument while red fluorescence was projected onto a 1024 monoparametrical histogram. Aggregates were excluded while single cells were gated by individual area vs. peak signal fluorescence.

2.6. Western blot analysis

Aliquots of cell homogenate, containing 25 μ g per sample, were analyzed by Western blot. In brief, samples were placed in sample buffer (0.5 M Tris–HCl pH 6.8, 10% glycerol, 2% w/v SDS, 5% v/v 2- β -mercaptoethanol, 0.05% bromophenol blue) and denatured by boiling at 95–100 $^{\circ}$ C for 90 s. Samples were separated by electrophoresis on 10% acrylamide gels. Thereafter, proteins were transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) sheets (ImmobilonTM-P, Millipore Corp., Bedford, MA, USA) using a transblot apparatus

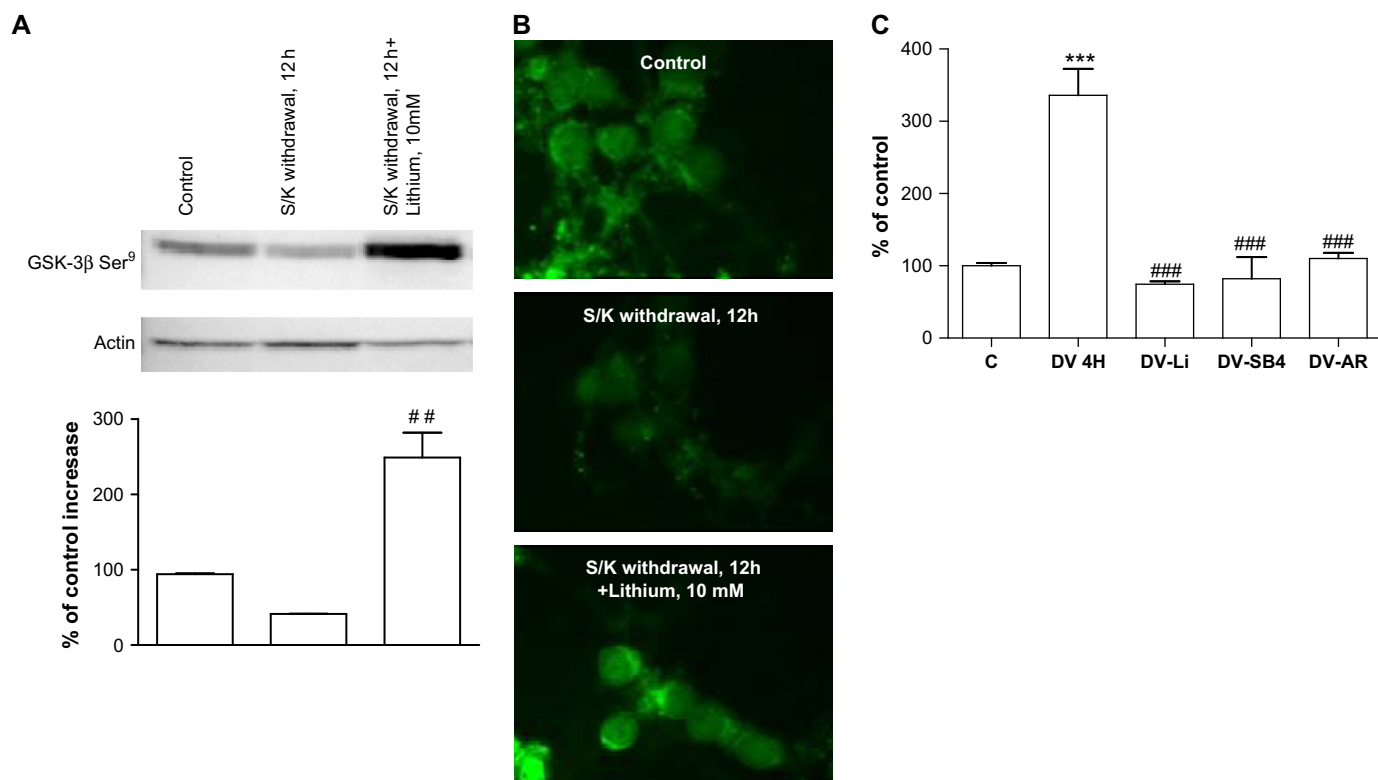


Fig. 1. (A) Serum and potassium withdrawal depletion increases GSK3 β dephosphorylation on Ser-9. Quantitative analysis of dephosphorylation of GSK3 β on Ser-9 induced by S/K withdrawal. 10 mM lithium 10 mM prevents GSK-3 β dephosphorylation. Protein extracts were obtained at 12 h after S/K withdrawal indicated in Section 2. Membranes were incubated with mouse anti-GSK3 β (pSer-9) phosphospecific antibody (1:500). The intensity of the bands was determined by densitometric analysis of at least three independent experiments. * p < 0.05 vs. Control; ### p < 0.01 vs. S/K withdrawal. (B) Immunocytochemistry showing dephosphorylation on Ser-9 GSK3 β and Li⁺ 10 mM. Calibration Bar 25 μ m. (C) Bar chart showing the effects the prevention of GSK3 β activation by Li⁺ and SB415286. GSK3 β was immunoprecipitated, and its activity was assayed from protein extracts obtained at the indicated experimental condition. Values are dpm of [γ -³²P] incorporated to phosphoglycogen synthase peptide-1 standardized with the densitometric value of the corresponding immunoprecipitated GSK3 β . The ratio over GSK3 β immunoreactivity was expressed as a percentage of control. Values are mean \pm SEM of at least 3 independent experiments. * p < 0.05 vs. Control.

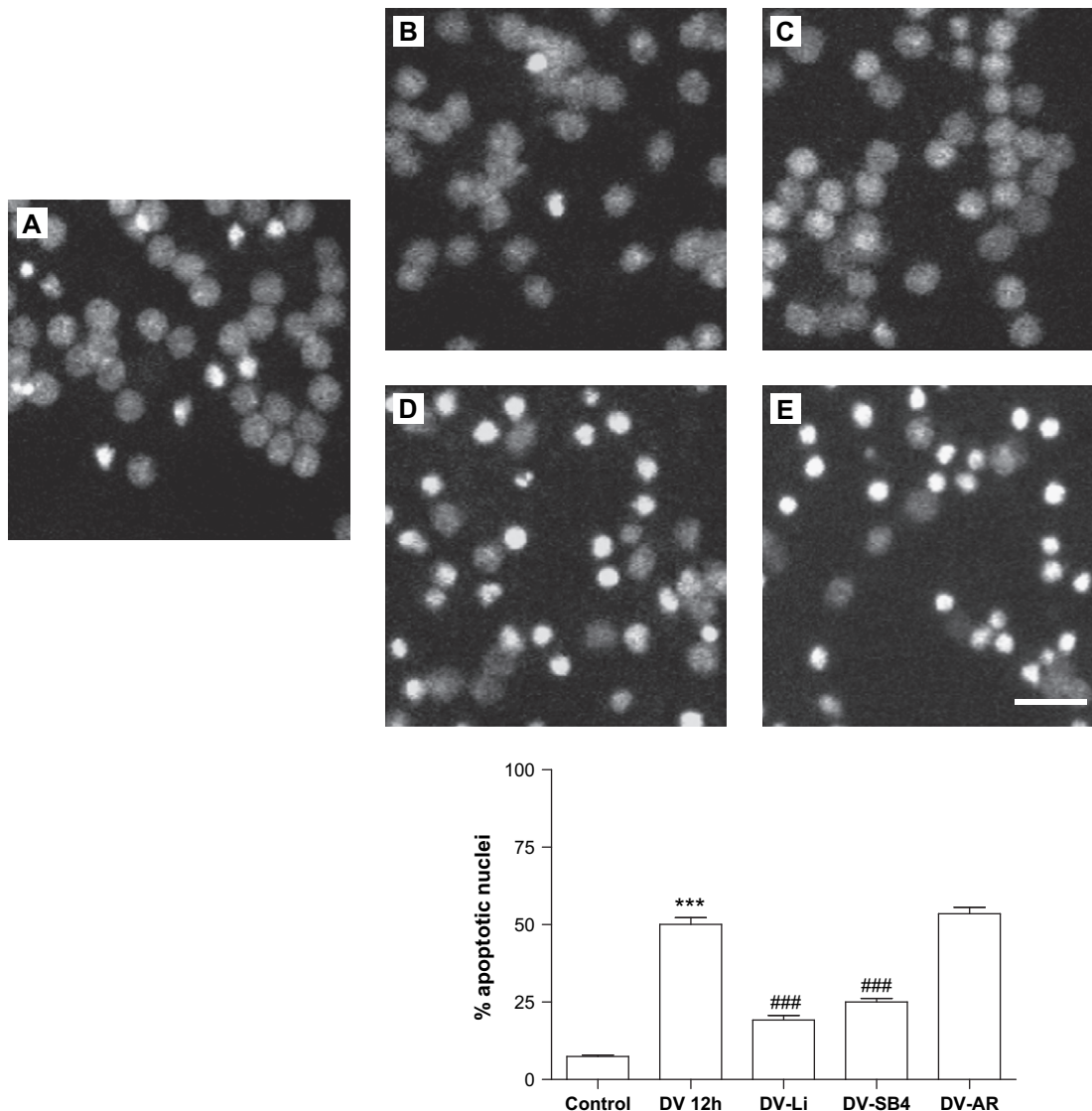


Fig. 2. Representative images of nuclei control sample (A); lithium 10 mM (B); SB415286 20 μ M (C); S/K withdrawal (D); and AR-A014418 20 μ M (E), respectively (calibration bar, 10 μ M). Bar chart showing the percentage effects of lithium 10 mM, SB415286 20 μ M and AR-A014418 20 μ M on S/K withdrawal-induced nuclear condensation in CGNs exposed for 12 h. The nuclei were counted on a fluorescence microscope, distinguishing normal nuclei from the condensed ones following the criteria stated in the material and methods. Each point is the mean \pm SEM of four wells of four to six different cultures. When necessary, statistical analyses were carried out using the one-way ANOVAs followed by Tukey's tests: *** p < 0.001 vs. control; ### p < 0.001 vs. S/K withdrawal.

(BioRad). Membranes were blocked for one hour at room temperature with 5% non-fat milk dissolved in TBS-T buffer (Tris 50 mM; NaCl 1.5%; Tween 20, 0.05%; pH 7.5). They were then incubated with primary monoclonal antibodies against phospho-GSK-3 β -Ser9 (from Affinity BioReagents) that were used at a 1:500 dilution; E2F-1 at 1:200 and cyclin E at 1:500 (from Santa Cruz); cyclin D1 at 1:500, pRb at 1:500 and p-Akt-Ser473 at 1:1000 (from Cell Signaling), Rb (1:500) and β -actin (1:3000) from Neomarkers; and After 4 h, blots were washed thoroughly in TBS-T buffer and incubated for 1 h with a peroxidase-conjugated IgG antibody (Amersham Corp., Arlington Heights, IL, USA). Immunoreactive protein was viewed with a chemiluminescence-based detection kit, following the manufacturer's protocol (ECL kit; Amersham Corp.). The protein load was routinely monitored by phenol red staining of the blot membrane or immunodetection of β -actin.

2.7. Immunocytochemistry assays

CGNs were grown on sterile glass slides. After the stimuli, cells were washed twice in PBS and fixed in 4% paraformaldehyde/PBS, pH 7.4 for 1 h at room

temperature. Cells were pre-incubated for 30 min with PBS containing 0.3% Triton X-100 and 30% normal horse serum at room temperature. After blocking, cells were incubated overnight at 4 $^{\circ}$ C with: an antibody against phospho-GSK3 β -Ser9 (from Affinity BioReagents) that was used at 1:100 dilution; E2F-1 and cyclin E at a 1:100 (from Santa Cruz); pRb at 1:100 (from Cell Signaling) at 1:100; cyclin D1 (from Cell Signaling) at a 1:100 in PBS containing 0.3% Triton X-100 and 3% normal horse serum. Cells were then washed extensively and incubated with fluorescent secondary antibody, for 1 h at room temperature. Coverslips were thoroughly washed and mounted in Mowiol[®] 4–88. An immunosignal analysis was performed using Nikon Eclipse fluorescence microscopy at 100 \times magnification.

2.8. Reverse transcriptase-PCR

Total RNA was extracted from CGCs using Trizol reagent from the Invitrogen Corporation (Carlsbad, USA). Isolated RNA was treated with amplification grade DNase I in order to remove contaminant genomic DNA (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA). First-strand cDNA was reverse transcribed from 2 μ g of total RNA using a First-strand Synthesis System kit from Invitrogen Corporation

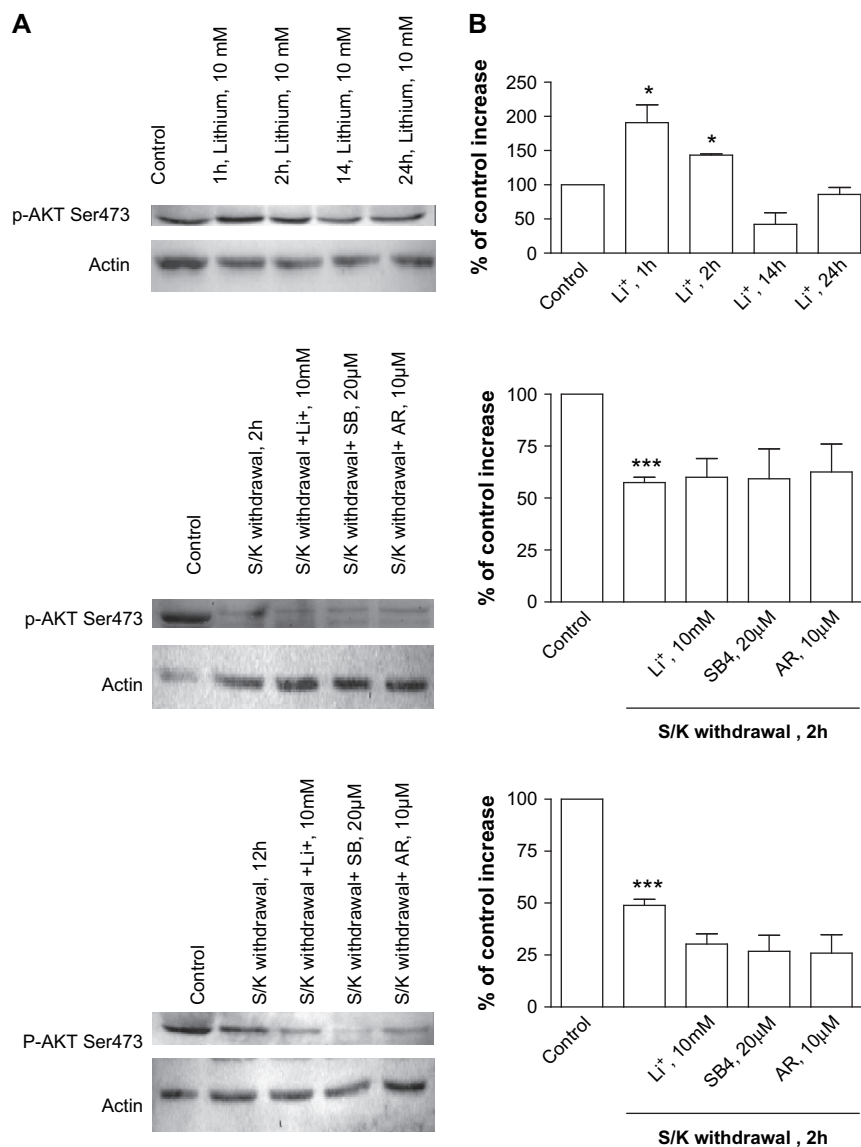


Fig. 3. (A) 10 mM lithium phosphorylate Akt at Ser473 in a time-dependent manner. (B) Akt phosphorylation in Ser473 decreases when cerebellar granule cells switched to S/K withdrawal for 2 h or 12 h. GSK3 β inhibitors (lithium, SB415286 and AR-A014418) did not prevent the phosphorylation of Akt.

(Carlsbad, USA). The same amounts of cDNA were subsequently used for the PCR amplification (39 cycles; 95 °C for 1 min, 60 °C for 1 min and 72 °C for 2 min each cycle) using a RedTaq SuperPak DNA polymerase kit from Sigma (Saint Louis, USA). The rat-specific E2F-1 PCR primers (forward: 5'-ACT CAG CTG ATG GTG TTG TTG A-3'; reverse: 5'-GGA CAT TGG TGA TGT CAT AGA TGC-3') were used to generate a fragment of 86 bp. The expression of β -actin mRNA was used as a standard. β -actin primers (forward: 5'-ATG GAT GAC GAT ATC GCT GCG-3'; reverse: 5'-CAG GGT CAG GAT GCC TCT CTT-3') were used to generate a PCR product of 200 bp. β -actin primers were designed to cross a large expanse of intronic sequence between exons 2 and 3 of the rat gene. Non-reactivity of the primers with contaminating genomic DNA was tested by the inclusion of controls that omitted the reverse-transcriptase enzyme from the cDNA synthesis reaction (RT-negative controls). The PCR products were separated on a 2% agarose gel. The lack of primer dimerization or non-specific PCR product bands was also tested.

2.9. Real-time PCR quantification using SYBR green

Relative gene expression was quantified by real-time PCR, using the ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City,

CA, USA). Real-time PCR was carried out with a SYBR Green PCR kit (QuantiTect SYBR Green PCR Kit, QIAGEN). Thus, primer concentration and PCR melting temperature were adjusted to avoid non-specific PCR products, as SYBR Green binds non-specifically to each double-strand DNA product formed during the amplification. The optimum temperature was that which gave the maximum reading for the specific product when the non-specific product could no longer be detected.

Once the optimum temperature had been determined, quantitative PCR was carried out using the following thermal cycling programme. Stage 1 was undertaken at 95 °C for 15 min. Stage 2 consisted of three steps: 95 °C for 15 s, 60 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s. Stage 2 was repeated for 40 cycles. The relative mRNA expression was calculated by the standard curve method. In brief, both β -actin and E2F-1 gene amplifications were run in separate tubes. Standard curves were obtained for all genes by using decreasing concentrations of cDNA template. PCR reactions were performed in duplicate for standard curves, whereas samples were tested in triplicate, at a final volume of 25 μ l in all cases. For each cDNA template, the cycle threshold (Ct) necessary to detect the amplified product was determined and semilogarithmic standard plots were drawn (Ct vs. cDNA amount). The cDNA concentration values in samples were interpolated from the

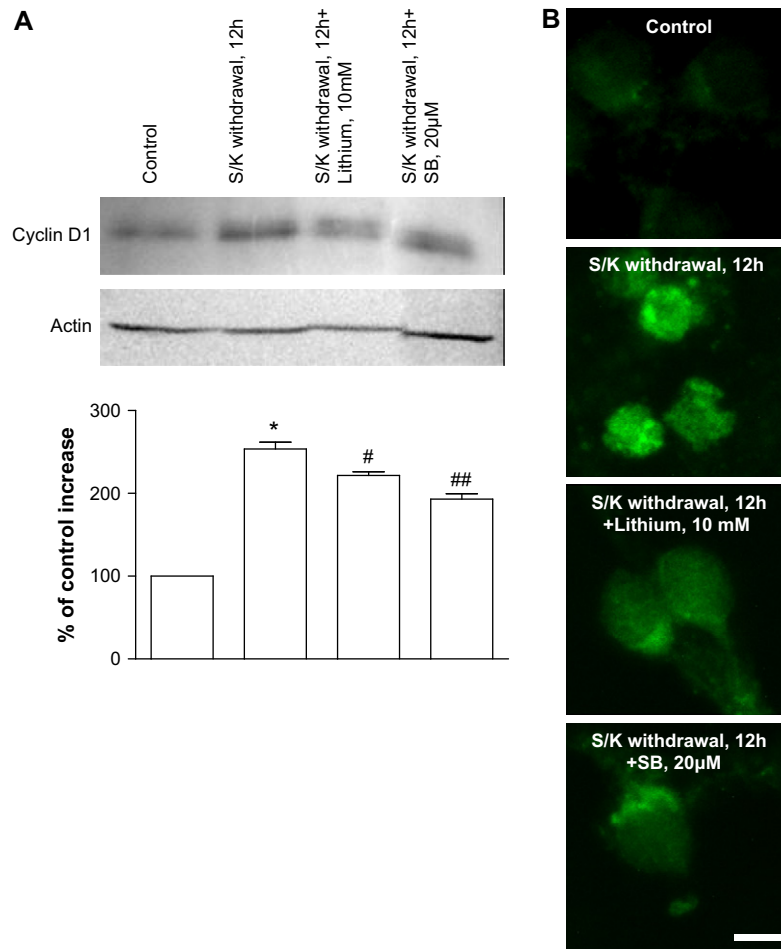


Fig. 4. Lithium and SB415286 inhibit cyclin D expression mediated by S/K withdrawal. (A) Cerebellar granule neuron cultures were maintained in complete medium (containing serum and 25 mM KCl). S/K withdrawal (without serum and 5 mM KCl), in the absence or in the presence of LiCl (10 mM) or SB415286 (20 μM) was carried out for 12 h. At the end of the treatments, cells were lysed and the cell lysates were subjected to immunoblot analysis with an antibody directed against cyclin D. The bar graph shows cyclin D band intensities that were determined by densitometry and standardized to the corresponding total β-actin band intensities. Changes in the standardized cyclin D band intensities were calculated as percentages of the control. Columns represent means ± SEM of four separate experiments with four different culture preparations ($n = 4$). Statistical significance was determined by ANOVA followed by post-hoc Tukey–Kramer multiple-comparison tests. *** $p < 0.001$ vs. control. # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ vs. treated cells. (B) Immunocytochemistry of cyclin D expression: while S/K withdrawal increases cyclin D expression lithium (10 mM) and SB415286 (20 μM) inhibit it. Calibration Bar 25 μm.

semilogarithmic standard plots and standardized to the cDNA concentration of the control gene, β-actin.

Non-reactivity of the primers was tested by the inclusion of controls that omitted the cDNA template (which was replaced by buffer). Genomic DNA contamination was tested by the inclusion of total RNA samples from RT-PCR reactions lacking reverse-transcriptase enzyme. The absence of non-specific PCR product was tested in all samples by analysis of a melting temperature profile by the Model 7700 Sequence detector. The program consisted of Stage 1, 95 °C for 1 min, Stage 2, 60 °C for 1 min and then an increase in temperature up to a final temperature of 95 °C at stage 3 with a 19 min ramp time. Fluorescence data were collected for each PCR reaction and melting graphs were drawn to confirm the presence of a single specific product.

2.10. Statistical analysis

Data are given as the mean ± SEM of at least three experiments for protein determination and at least two experiments for gene expression analysis. In all experiments, data were analyzed by ANOVA followed by post-hoc Tukey–Kramer multiple-comparison tests. P -values lower than 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. S/K withdrawal activates GSK-3β

In previous studies we and others demonstrated the neuroprotective and antiapoptotic properties of GSK3β inhibitors (Heidenreich, 2003; Jorda et al., 2004,2005; Jin et al., 2005). In the present study, the result of switching cultures of CGNs from normal medium to S/K withdrawal medium was GSK3β activation as early as 2 h. As shown in Fig. 1, lithium 10 mM, SB415286 20 μM and AR-A014418 20 μM inhibit the activation of this enzyme. Indeed, 2 h of S/K withdrawal treatment leads to dephosphorylation at Ser9 and thus activation of GSK3β. In agreement with previous studies (Verdaguer et al., 2005), Li⁺ prevents dephosphorylation. All these data suggest that Li⁺, SB-415286 and AR-A014418 inhibit the activation of GSK3β. We also evaluated if at these concentrations all these drugs were able to inhibit apoptosis mediated by S/K

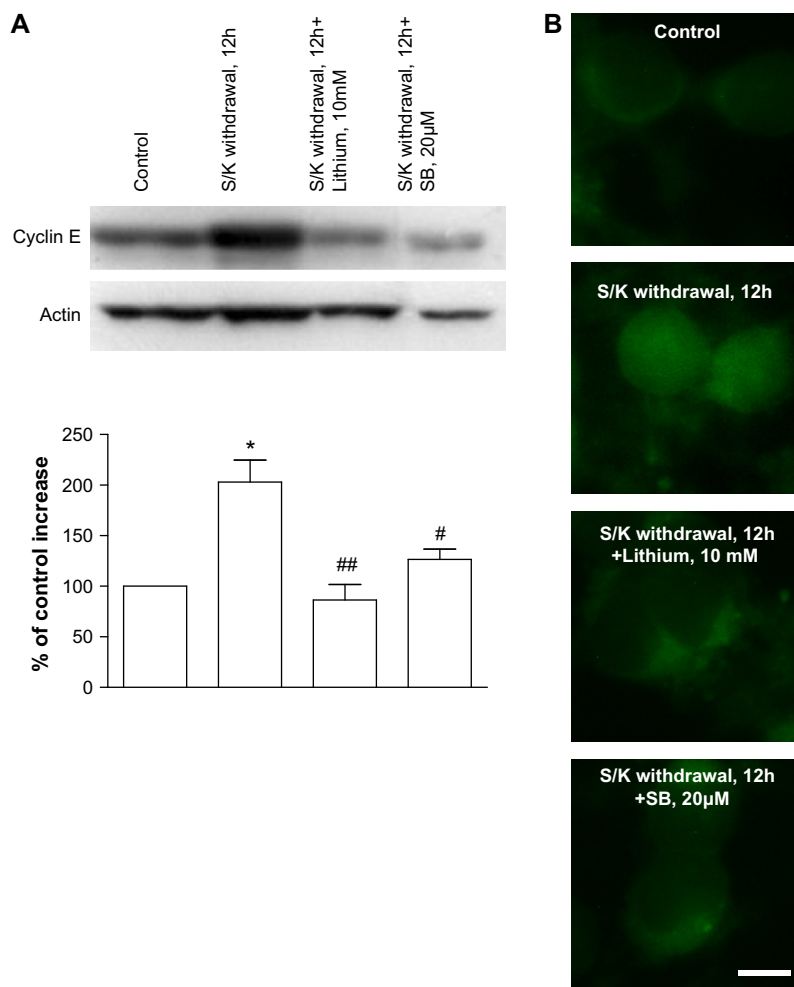


Fig. 5. Lithium and SB415286 (20 μ M) prevent cyclin E expression mediated by 12 h S/K withdrawal in cultures of CGNs. S/K withdrawal in the absence or in the presence of LiCl (10 mM) and SB415286 (20 μ M), was carried out on DIV 8 for the indicated time periods. At the end of the treatments, cells were lysed and the cell lysates were subjected to immunoblot analysis with an antibody directed cyclin E. (A) Upper panel, representative immunoblots are shown. The bar graph shows cyclin E band intensities that were determined by densitometry and standardized to the corresponding total β -actin band intensities. Changes in the standardized cyclin E band intensities were calculated as percentages of the control. Columns represent means \pm SEM of four separate experiments with four different culture preparations ($n = 4$). Statistical significance was determined by ANOVA followed by post-hoc Tukey–Kramer multiple-comparison tests. * $p < 0.05$ vs. control; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. to 12 h S/K withdrawal. (B) Immunocytochemistry of cyclin E expression, while S/K withdrawal increases cyclin E expression, LiCl (10 mM) and SB415286 (20 μ M) inhibit it. Calibration Bar 25 μ m.

withdrawal. In Fig. 2, we showed the images of nuclear condensed cell nuclei after the treatment with S/K withdrawal and in presence of GSK3 β inhibitors. Li⁺ and SB-415286 showed antiapoptotic effects calculated by the percentage of nuclear apoptotic nuclei according material and methods. However, AR-A014418 was not able to attenuated nuclear condensation after S/K withdrawal.

3.2. GSK3 β inhibitors did not prevent Akt inhibition mediated by S/K withdrawal

Previous studies showed that lithium's neuroprotective effects could be mediated through Akt activation. Therefore, we examined the time course effects of 10 mM lithium on p-Akt-Ser473 (the active form of Akt). After 1 and 2 h of Li⁺ treatment, a significant increase in Akt phosphorylation levels was detected (Fig. 3). Thus, these data corroborate previous

studies performed in CGNs of Li⁺-increased Akt activity. On the other hand, Akt phosphorylation significantly decreased at 2 h of S/K withdrawal and GSK3 β inhibitors had not significant effects on the levels of phosphorylated Akt activation at short exposure times. Accordingly, these data indicate that Akt, under our experimental conditions, is probably not the main target involved in the effects of GSK3 β inhibitors on CGNs.

3.3. GSK3 β inhibitors, lithium and SB-415286 attenuate the expression of cell cycle regulators

Re-entry into the cell cycle is a pathway that may be involved in S/K withdrawal-induced apoptosis (O'Hare et al., 2000; Verdaguer et al., 2005). The retinoblastoma protein (Rb) forms a complex with E2F-1 and thus maintains the cells in a Go/G1 phase. The phosphorylation of Rb by CDKs is a prerequisite for reentry into the cell cycle. Rb phosphorylation

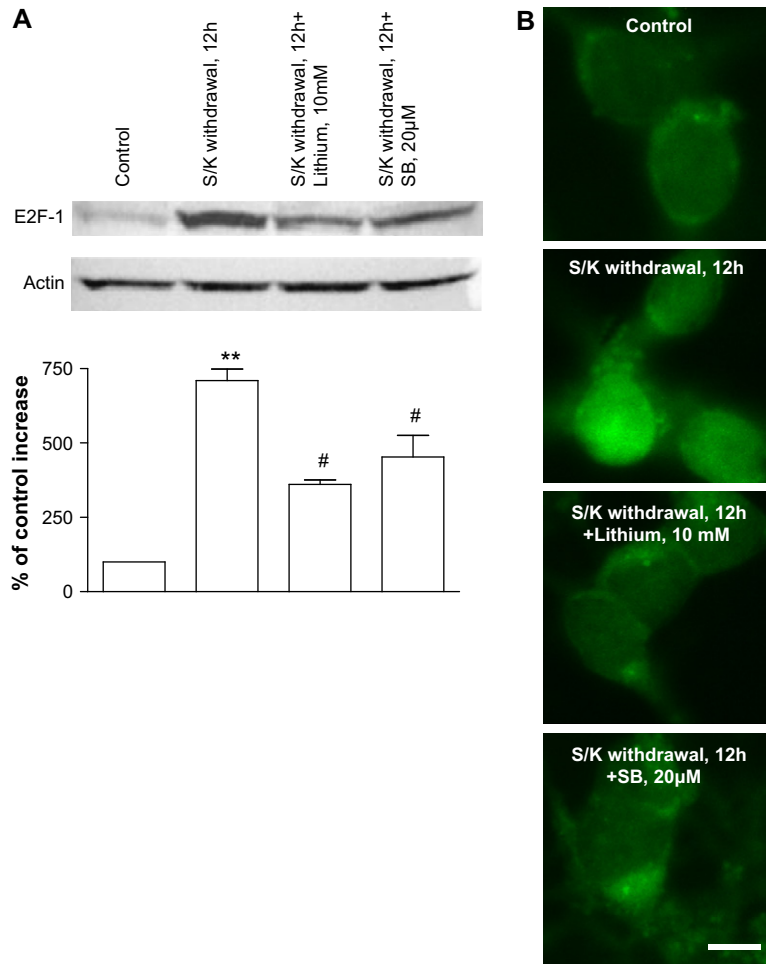


Fig. 6. Lithium and SB415286 (20 μ M) prevent E2F-1 expression mediated by S/K withdrawal in cultures of CGNs. S/K withdrawal, in the absence or in the presence of LiCl (10 mM) and SB415286 (20 μ M) was carried out on DIV 8 for the indicated time periods. At the end of the treatments, cells were lysed and the cell lysates were subjected to immunoblot analysis with an antibody directed E2F-1. (A) The upper panel shows representative immunoblots are shown. The bar graph shows E2F-1 band intensities that were determined by densitometry and standardized to the corresponding total β -actin band intensities. Changes in the standardized E2F-1 band intensities were calculated as percentages of the control. Columns represent means \pm SEM of four separate experiments with four different culture preparations ($n = 4$). Statistical significance was determined by ANOVA followed by post-hoc Tukey–Kramer multiple-comparison. $**p < 0.01$ vs. control; $\#p < 0.05$ vs. 12 h S/K withdrawal. (B) Immunocytochemistry of E2F-1 expression while S/K withdrawal increases E2F-1 expression, LiCl (10 mM) and SB415286 (20 μ M) inhibit it. Calibration Bar 25 μ m.

leads to release of the transcription factor E2F-1. Therefore, we tested the hypothesis that the protective effects of Li^+ and SB-415286 could involve modulation of the cell cycle. Western blot analysis of cultures after 12 h of S/K deprivation revealed a significant increase in the expression of cyclin D, cyclin E and the proapoptotic E2F-1. Treatment of CGNs with lithium (10 mM) and SB415286 (20 μ M) significantly decreased the expression of all these cell cycle proteins. We further examined by immunocytochemistry studies the effect of GSK3 β inhibitors and confirmed that there was inhibition in the expression of cell cycle proteins (Figs. 4–6).

Rb phosphorylation is restrictive. Therefore, we studied in depth the effect of GSK3 β inhibitors; Li^+ and SB-415286 on Rb phosphorylation. In our experiments Rb phosphorylation status was examined during a time-course experiment (30 min, 1 h, 2 h, 4 h and 6 h after S/K withdrawal). We demonstrated that pRb phosphorylation increased 2 h after S/K withdrawal. Furthermore, Rb phosphorylation was analyzed

in the presence of the GSK3 β inhibitors Li^+ and SB415286. These compounds prevented the phosphorylation of pRb protein by S/K withdrawal. This suggests that GSK-3 β is involved in the regulation of Rb phosphorylation (Fig. 7).

3.4. AR-A014418, a selective GSK3 β inhibitor, did not attenuate apoptosis mediated by S/K withdrawal, however inhibits the expression of cell cycle proteins

Li^+ and SB415286 are not selective against GSK3 β , and previous studies suggest that they could also affect cdk2 and cdk5 kinases because these were homologous with GSK3 β (Chin et al., 2005). Therefore, to avoid this non-specificity, AR-A014418, a more selective and specific GSK3 β blocker, was used. First, we tested in depth the ability of AR-A014418 to prevent S/K withdrawal-induced apoptosis in CGNs. For these experiments, cultures were maintained in S/K withdrawal or S/K withdrawal supplemented with AR-A014418 at concentrations

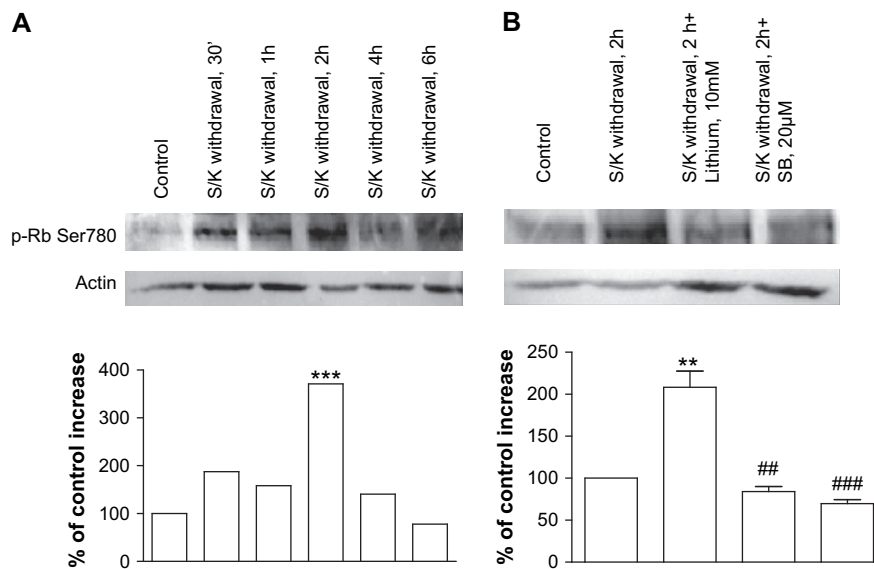


Fig. 7. Lithium and SB415286 (20 μ M) prevent pRb phosphorylation mediated by S/K withdrawal in cultures of CGNs. S/K withdrawal, in the absence or in the presence of LiCl (10 mM) and SB415286 (20 μ M), was carried out on DIV 8 for the indicated time periods. At the end of the treatments, cells were lysed and the cell lysates were subjected to immunoblot analysis with an antibody directed against pRb. (A) Left panel: representative immunoblots are shown from 30 min to 6 h. (B) Right panel: representative immunoblots are shown at 2 h of treatment in the absence or in the presence of LiCl or SB415286. Band intensities were determined by densitometry and standardized to the corresponding total β -actin band intensities. Changes in the standardized pRb band intensities were calculated as percentages of the control. Bars represent means \pm SEM of four separate experiments with four different culture preparations ($n = 4$). Statistical significance was determined by ANOVA followed by post-hoc Tukey–Kramer multiple-comparison tests. $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ vs. control; $\#p < 0.05$; $###p < 0.05$ vs. 12 h S/K withdrawal. (C) Immunocytochemistry of pRb expression, meanwhile S/K withdrawal increase pRb expression and nuclear localization, LiCl (10 mM) and SB415286 (20 μ M) inhibit the expression.

ranging from 1 μ M to 50 μ M. As we suggest above, this selective inhibitor was not able to protect cell viability from apoptosis measured by nuclear cell counting or DNA fragmentation measured by flow cytometry (Fig. 8). However, although this compound was not able to rescue CGNs from S/K withdrawal-induced apoptosis, acute treatment of CGNs with AR-A014418 attenuated the activation of cell cycle proteins, including E2F1 (Fig. 9).

3.5. Effects of GSK-3 β on E2F-1 mRNA expression

We and others demonstrated that S/K withdrawal induced the protein expression of E2F-1 (Verdaguer et al., 2005). In the present study we also found a significant decrease in the expression of E2F-1 by GSK-3 β inhibitors. Therefore we evaluated the role of these compounds in ARNm expression. We performed a real-time PCR analysis of the E2F-1 transcripts and also analyzed the effects of Li⁺ and GSK3 β inhibitors (data not shown). As shown in Fig. 10 E2F-1 mRNA increased after S/K withdrawal. Treatment with the GSK3 β inhibitor Li⁺ did not attenuate this increase.

4. Discussion

In the present study, we demonstrated that GSK3 β inhibitors blocked the expression of cell cycle proteins mediated by S/K withdrawal in CGNs. Likewise, we proved that Li⁺ and SB415286 showed an antiapoptotic effect in this model. However, the selective GSK3 β inhibitor AR-A014418 failed to protect CGNs. Finally, our results suggest a connection between GSK3 β activation and cell cycle re-entry.

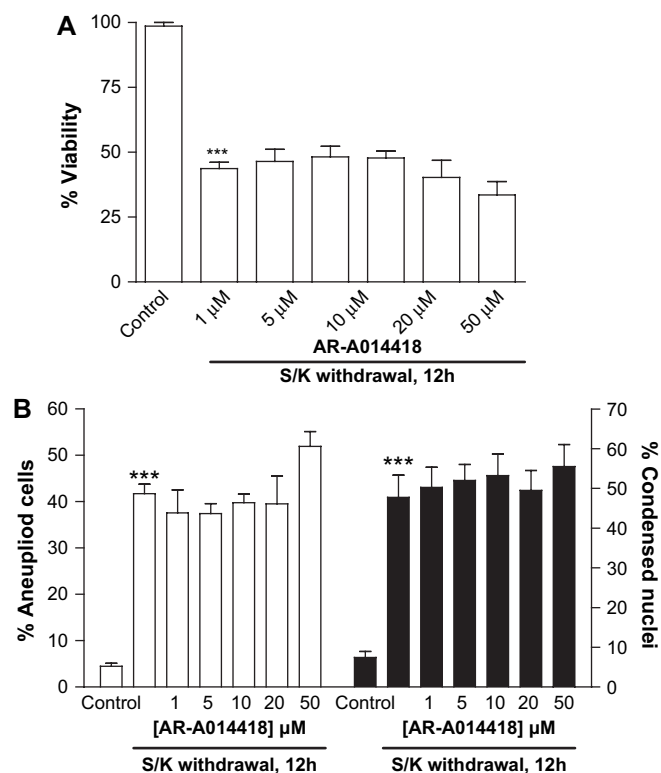


Fig. 8. AR-A014418 effects on S/K withdrawal-induced toxicity. (A) Viability quantification by MTT. (B) Changes in the percentage of cells rated as apoptotic (upper panel) by means of flow cytometry (aneuploid cells, open bars) or morphological analysis (black bars). Results are show as mean \pm SEM of 4–6 independent cultures. Statistical analysis was carried out by one-way ANOVA followed by Tukey’s test. $***p < 0.001$ vs. control.

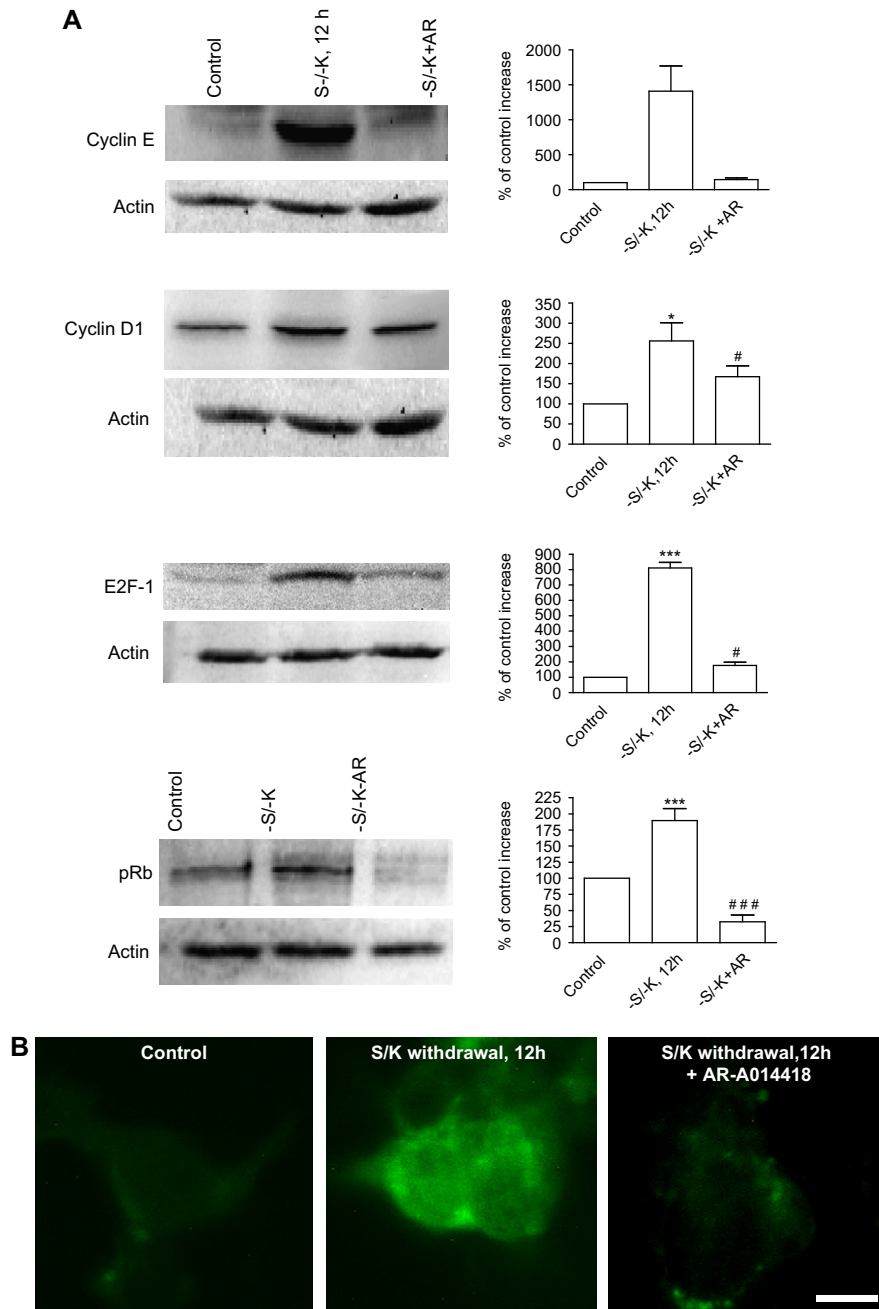


Fig. 9. AR-A014418 (10 μ M) prevents expression of cell cycle-related proteins (cyclin D1, Cyclin E, E2F-1 and pRb) mediated by S/K withdrawal in cultures of CGNs. 12 h or 2 h S/K withdrawal in the absence or in the presence of AR-A014418 was carried out on DIV 8 for the indicated time periods. At the end of the treatments, cells were lysed and the cell lysates were subjected to immunoblot analysis with specific antibodies. (A) Upper panel, representative immunoblots are shown. Band intensities were determined by densitometry and standardized to the corresponding total β -actin band intensities. Changes in the standardized band intensities were calculated as percentages of control. Bars represent means \pm SEM of four separate experiments with four different culture preparations ($n = 4$). Statistical significance was determined by ANOVA followed by post-hoc Tukey–Kramer multiple-comparisons tests. $**p < 0.01$ vs. control; $\#p < 0.05$ vs. 12 h S/K withdrawal. (B) Immunocytochemistry of E2F-1 expression, while S/K withdrawal increase E2F-1 expression, AR-A014418 (10 μ M) inhibits it. Calibration Bar 25 μ m.

In previous studies, we and others demonstrated the involvement of numerous signaling pathways such as: the activation of cell cycle proteins (O'Hare et al., 2000; Verdaguer et al., 2005), GSK-3 β (Mora et al., 2002; Enguita et al., 2005; Jordà et al., 2005), caspase-3 (D'Mello et al., 2000; Verdaguer et al., 2005), and c-Jun N-terminal kinase (Hongisto et al., 2003; Jin et al., 2005). Interestingly, apoptosis mediated

by potassium deprivation is attenuated in CGNs that lack the transcription factor of E2F-1. This could indicate that the activation of the cell cycle is a key event in the apoptotic process mediated by this stimulus (O'Hare et al., 2000).

The possible involvement of cell cycle activation in neuronal apoptosis has been extensively investigated in recent years (Nguyen et al., 2002; Verdaguer et al., 2002; Jordan-Sciutto

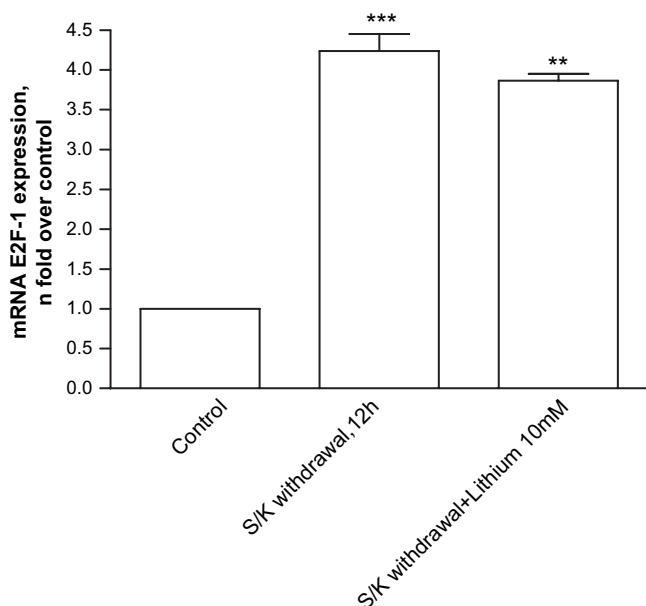


Fig. 10. Lithium did not prevent E2F-1 gene expression in CGNs after S/K withdrawal.

et al., 2003; Strachan et al., 2005). Studies carried out on brains of AD patients demonstrated that the expression of cell cycle proteins and DNA synthesis increase in this pathology (Jordan-Sciutto et al., 2002). Further, the phosphorylation of the retinoblastoma protein increases in the brains of Parkinson's disease patients (Jordan-Sciutto et al., 2003; Hoglinger, 2007). Thus, in vivo data and in vitro data from neuronal cell cultures suggest that re-entry into the cell cycle is a potential step in the neuronal apoptotic cascade. It is widely known that cell division in mammalian cells is regulated by cyclin-dependent kinases (CDKs) (Smits et al., 2001; Nguyen et al., 2002; Verdaguer et al., 2005). In this process of cell cycle re-entry, the phosphorylation of Rb by CDKs is a key step, as unphosphorylated Rb can block cell cycle progression by binding to the transcription factor E2F-1 (Smith et al., 2000). However, recent studies suggest that Rb could be phosphorylated by other kinases such as CDK5 in neuronal cells and GSK3 β in non-neuronal cells (Litovchick et al., 2004; Hamdane et al., 2005). In the present study we provide new evidence that Rb is phosphorylated very quickly in CGNs under S/K withdrawal conditions. Interestingly, our data demonstrated that pRb phosphorylation was prevented in presence of GSK-3 β inhibitors.

The process of neuronal cell death is probable mediated by the balance of survival signals (AKT) and proapoptotic signals (GSK3 β and cell cycle activation) (Chin and D'Mello, 2004). The implications of PI3K-Akt activation in response to different anti-apoptotic agents have been well documented by many groups (Chin et al., 2005; Chin and D'Mello, 2004). The process of Akt activation is mediated by phosphorylation of two sites, T308 and S473. In cerebellar granule neurons where Akt is phosphorylated by lithium at S473 site, this kinase is activated. Under our experimental conditions, Li⁺ enhances the phosphorylation of Akt and S/K withdrawal decreases S473 Akt phosphorylation. However, in our study, GSK3 β

inhibitors did not prevent the phosphorylation decrease of S473 Akt, and thus the activation of this survival pathway. Therefore, we concluded that AKT activation is not the main target involved in cell cycle inhibition.

The observation that Li⁺ and SB-415286 succeeded, while GSK3 inhibitor AR-A014418 failed to rescue CGNs from S/K withdrawal-induced apoptosis, supports the hypothesis that the neuroprotective effects of Li⁺ and SB-415286 are not exclusively due to the inhibition of GSK-3 β . Whilst AR-A014418 did not show, in vitro, inhibition in other CDKs (Bhat et al., 2003) our results indicate that GSK-3 β is involved in the regulation of the cell cycle in CGNs. This affirmation is based on evidence that inhibition of GSK3 β blocks pRb phosphorylation and E2F-1 expression. However, the lack of neuroprotective effects caused by AR-A014418 could be interpreted as showing the existence of multiple pathways involved in S/K withdrawal-induced apoptosis, one of which is the intrinsic mitochondrial programme cell death pathway (Verdaguer et al., 2005). Thus, apoptosis mediated by S/K withdrawal is recruited probably as a consequence of the activation of the c-Jun N-terminal kinase, GSK-3 β , CDK5 and perhaps other mechanisms (Enguita et al., 2005; Jorda et al., 2005; Verdaguer et al., 2005; Xie et al., 2004). Accordingly, the change of death routes in response to the insult is a probable scenario in cellular models of apoptosis when a selective path is blocked.

As we discussed above, evidence is accumulating that E2F-1 is an important factor in modulating postmitotic neuronal apoptosis in response to a variety of pathological insults (O'Hare et al., 2000; Hou et al., 2001a,b). The fact that GSK-3 β inhibition by Li⁺ and SB415286 attenuates the expression of cyclin D and E and decreases the expression of the proapoptotic E2F-1 is compatible with previous studies. Such studies found that lithium inhibits cell proliferation in tumour cell preparations (Pardo et al., 2003; Erdal et al., 2005). Our data suggest that inhibition of the expression of E2F-1 could partly explain the neuroprotective effects of GSK3 β inhibitors. Whilst E2F-1 protein levels were down-regulated by GSK-3 β inhibitors, the mRNA levels of E2F-1 did not decrease. These data could indicate that E2F-1 is regulated by a post-transcriptional mechanism, the phosphorylation of Rb. Accordingly; our results indicate that GSK3 β could be involved in the phosphorylation of RB.

In conclusion, our data reveal a relationship between GSK-3 β and cell cycle regulation in CGNs after S/K withdrawal. Although, specific and selective GSK-3 β inhibitors are being developed, our data indicate that the question is whether to synthesize non-specific drugs that inhibit more than one pathway in order to confer the very best neuroprotection. Further, this model of drugs could be suitable for the treatment of AD by the prevention of tau phosphorylation and cell cycle blockade.

Acknowledgements

The excellent secretarial support of Ms Mar Morales is greatly appreciated. We thank the Language Assessment Service of the University of Barcelona for revising the manuscript. This study was supported by grants SAF2005-01604,

SAF-2005-05179 and SAF-2006-13092 from Ministerio de Educación y Ciencia, PI 041300, PI040376 (RT) and Centros de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED) from Instituto de Salud Carlos III. We also thanks to Generalitat de Catalunya 2005/SGR00893.

References

- Alvarez, G., Munoz-Montano, J.R., Satrustegui, J., Avila, J., Bogonez, E., Diaz-Nido, J., 1999. Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neurodegeneration. *FEBS Letters* 453, 260–264.
- Alvarez, G., Munoz-Montano, J.R., Satrustegui, J., Avila, J., Bogonez, E., Diaz-Nido, J., 2002. Regulation of tau phosphorylation and protection against beta-amyloid-induced neurodegeneration by lithium. Possible implications for Alzheimer's disease. *Bipolar Disorders* 4, 153–165.
- Benedito, A.B., Lehtinen, M., Massol, R., Lopes, U.G., Kirchhausen, T., Rao, A., Bonni, A., 2005. The transcription factor NFAT3 mediates neuronal survival. *Journal of Biological Chemistry* 280, 2818–2825.
- Bhat, R., Xue, Y., Berg, S., Hellberg, S., Ormo, M., Nilsson, Y., Radesater, A.C., Jerning, E., Markgren, P.O., Borgegard, T., Nylof, M., Gimenez-Cassina, A., Hernandez, F., Lucas, J.J., Diaz-Nido, J., Avila, J., 2003. Structural insights and biological effects of glycogen synthase kinase 3-specific inhibitor AR-A014418. *Journal of Biological Chemistry* 278, 45937–45945.
- Bhat, R.V., Budd Haeberlein, S.L., Avila, J., 2004. Glycogen synthase kinase 3: a drug target for CNS therapies. *Journal of Neurochemistry* 89, 1313–1317.
- Bijur, G.N., Jope, R.S., 2003. Glycogen synthase kinase-3 beta is highly activated in nuclei and mitochondria. *Neuroreport* 14, 2415–2419.
- Canu, N., Dus, L., Barbato, C., Ciotti, M.T., Brancolini, C., Rinaldi, A.M., Novak, M., Cattaneo, A., Bradbury, A., Calissano, P., 1998. Tau cleavage and dephosphorylation in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis. *Journal of Neuroscience* 18, 7061–7074.
- Cavallaro, S., D'Agata, V., Alessi, E., Coffa, S., Halcón, D.L., Manickam, P., Ciotti, M.T., Possenti, R., Bonini, P., Marlier, L., Calissano, P., 2004. Gene expression profiles of apoptotic neurons. *Genomics* 84, 485–496.
- Chen, G., Bower, K.A., Ma, C., Fang, S., Thiele, C.J., Luo, J., 2004. Glycogen synthase kinase 3beta (GSK3 β) mediates 6-hydroxydopamine-induced neuronal death. *FASEB Journal* 18, 1162–1164.
- Chin, P.C., D'Mello, S.R., 2004. Survival of cultured cerebellar granule cells can be maintained by Akt-dependent and Akt-independent signalling pathways. *Molecular Brain Research* 127, 140–145.
- Chin, P.C., Majdzadeh, N., D'Mello, S.R., 2005. Inhibition of GSK3 β is a common event in neuroprotection by different survival factors. *Molecular Brain Research* 137, 193–201.
- Cross, D.A., Culbert, A.A., Chalmers, K.A., Facci, L., Skaper, S.D., Reith, A.D., 2001. Selective small-molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity protect primary neurones from death. *Journal of Neurochemistry* 77, 94–102.
- Crowder, R.J., Freeman, R.S., 2000. Glycogen synthase kinase-3 beta activity is critical for neuronal death caused by inhibiting phosphatidylinositol 3-kinase or Akt but not for death caused by nerve growth factor withdrawal. *Journal of Biological Chemistry* 275, 34266–34271.
- Desagher, S., Severac, D., Lipkin, A., Bernis, C., Ritchie, W., Le Digarcher, A., Journot, L., 2005. Genes regulated in neurons undergoing transcription-dependent apoptosis belong to signaling pathways rather than the apoptotic machinery. *Journal of Biological Chemistry* 280, 5693–5702.
- D'Mello, S.R., Kuan, C.Y., Flavell, R.A., Rakic, P., 2000. Caspase-3 is required for apoptosis-associated DNA fragmentation but not for cell death in neurons deprived of potassium. *Journal of Neuroscience Research* 59, 24–31.
- Enguita, M., DeGregorio-Rocasolano, N., Abad, A., Trullas, R., 2005. Glycogen synthase kinase 3 activity mediates neuronal pentraxin 1 expression and cell death induced by potassium deprivation in cerebellar granule cells. *Molecular Pharmacology* 67, 1237–1246.
- Erdal, E., Ozturk, N., Cagatay, T., Eksioglu-Demiralp, E., Ozturk, M., 2005. Lithium-mediated downregulation of PKB/Akt and cyclin E with growth inhibition in hepatocellular carcinoma cells. *International Journal of Cancer* 115, 903–910.
- Facci, L., Stevens, D.A., Skaper, S.D., 2003. Glycogen synthase kinase-3 inhibitors protect central neurons against excitotoxicity. *Neuroreport* 14, 1467–1470.
- Gendron, T.F., Mealing, G.A., Paris, J., Lou, A., Edwards, A., Hou, S.T., MacManus, J.P., Hakim, A.M., Morley, P., 2001. Attenuation of neurotoxicity in cortical cultures and hippocampal slices from E2F1 knockout mice. *Journal of Neurochemistry* 78, 316–324.
- Gerhardt, E., Kugler, S., Leist, M., Beier, C., Berliocchi, L., Volbracht, C., Sèller, M., Bahr, M., Nicotera, P., Schulz, J.B., 2001. Cascade of caspase activation in potassium-deprived cerebellar granule neurons: targets for treatment with peptide and protein inhibitors of apoptosis. *Molecular and Cellular Neuroscience* 17, 717–731.
- Hamdane, M., Bretteville, A., Sambo, A.V., Schindowski, K., Begard, S., Delacourte, A., Bertrand, P., Buee, L., 2005. p25/Cdk5 mediated retinoblastoma phosphorylation is an early event in neuronal cell death. *Journal of Cell Science* 118, 1291–1298.
- Hashimoto, R., Senatorov, V., Kanai, H., Leeds, P., Chuang, D.M., 2003. Lithium stimulates progenitor proliferation in cultured brain neurons. *Neuroscience* 117, 55–61.
- Heidenreich, K.A., 2003. A myocyte enhancer factor 2D (MEF2D) kinase activated during neuronal apoptosis is a novel target inhibited by lithium. *Journal of Neurochemistry* 85, 1488–1499.
- Hoglinger, G.U., Breunig, J.J., Depboylu, C., Rouaux, C., Michel, P.P., Alvarez-Fischer, D., Boutillier, A.L., Degregori, J., Oertel, W.H., Rakic, P., Hirsch, E.C., Hunot, S., 2007. The pRb/E2F cell-cycle pathway mediates cell death in Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy Science USA* 104, 3585–3590.
- Hongisto, V., Smeds, N., Brecht, S., Herdegen, T., Courtney, M.J., Coffey, E.T., 2003. Lithium blocks the c-Jun stress response and protects neurons via its action on glycogen synthase kinase 3. *Molecular and Cellular Biology* 23, 6027–6036.
- Hou, S.T., Cowan, E., Walker, T., Ohan, N., Dove, M., Rasqinha, I., MacManus, J.P., 2001a. The transcription factor E2F1 promotes dopamine-evoked neuronal apoptosis by a mechanism independent of transcriptional activation. *Journal of Neurochemistry* 78, 287–297.
- Hou, S.T., Cowan, E., Dostanic, S., Rasqinha, I., Comas, T., Morley, P., MacManus, J.P., 2001b. Increased expression of the transcription factor E2F1 during dopamine-evoked, caspase-3-mediated apoptosis in rat cortical neurons. *Neuroscience Letters* 306, 153–156.
- Jin, N., Kovacs, A.D., Sui, Z., Dewhurst, S., Maggirwar, S.B., 2005. Opposite effects of lithium and valproic acid on trophic factor deprivation-induced glycogen synthase kinase-3 activation, c-Jun expression and neuronal cell death. *Neuropharmacology* 48, 576–583.
- Jope, R.S., Johnson, G.V., 2004. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochemical Science* 29, 95–102.
- Jope, R.S., Roh, M.S., 2006. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in psychiatric diseases and therapeutic interventions. *Current Drug Targets* 7, 1421–1434.
- Jope, R.S., Yuskaitis, C.J., Beurel, E., 2007. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics. *Neurochemical Research* 32, 577–595.
- Jorda, E.G., Verdager, E., Morano, A., Jiménez, A., Canudas, A.M., Camins, A., Pallas, M., 2004. Lithium prevents colchicine-induced apoptosis in rat cerebellar granule neurons. *Bipolar Disorders* 6, 144–149.
- Jorda, E.G., Verdager, E., Canudas, A.M., Jiménez, A., Garcia de Arriba, S., Allgaier, C., Pallas, M., Camins, A., 2005. Implication of cyclin-dependent kinase 5 in the neuroprotective properties of lithium. *Neuroscience* 134, 1001–10011.
- Jordan-Sciutto, K.L., Morgan, K., Bowser, R., 1999. Increased cyclin G1 immunoreactivity during Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimers Disease* 1, 409–417.
- Jordan-Sciutto, K.L., Malaiyandi, L.M., Bowser, R., 2002. Altered distribution of cell cycle transcriptional regulators during Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology Experimental Neurology* 61, 358–367.

- Jordan-Sciutto, K.L., Dorsey, R., Chalovich, E.M., Hammond, R.R., Achim, C.L., 2003. Expression patterns of retinoblastoma protein in Parkinson disease. *Journal Neuropathology and Experimental Neurology* 62, 68–74.
- Kanai, H., Hough, C., Hirió, T., Leeds, P., 2002. Neuroprotective effects of lithium in cultured cells and animal models of diseases. *Bipolar Disorders* 4, 129–136.
- Linseman, D.A., Cornejo, B.J., Le, S.S., Meintzer, M.K., Laessig, T.A., Bouchard, R.J., Heidenreich, K.A., 2003. A myocyte enhancer factor 2D (MEF2D) kinase activated during neuronal apoptosis is a novel target inhibited by lithium. *Journal of Neurochemistry* 85, 1488–1499.
- Litovchick, L., Chestukhin, A., DeCaprio, J.A., 2004. Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates RBL2/p130 during quiescence. *Molecular and Cellular Biology* 24, 8970–8980.
- Liu, D.X., Greene, L.A., 2001a. Regulation of neuronal survival and death by E2F-1 dependent gene repression and derepression. *Neuron* 32, 425–438.
- Liu, D.X., Greene, L.A., 2001b. Neuronal apoptosis at the G1/S cell cycle checkpoint. *Cell Tissue Research* 305, 217–228.
- Mora, A., Sabio, G., Gonzalez-Polo, R.A., Cuenda, A., Alessi, D.R., Alonso, J.C., Fuentes, J.M., Soler, G., Centeno, F., 2001. Lithium inhibits caspase 3 activation and dephosphorylation of PKB and GSK3 induced by K⁺ deprivation in cerebellar granule cells. *Journal of Neurochemistry* 78, 199–206.
- Mora, A., Sabio, G., Alonso, J.C., Soler, G., Centeno, F., 2002. Different dependence of lithium and valproate on PI3K/PKB pathway. *Bipolar Disorders* 4, 195–200.
- Nguyen, M.D., Mushynski, W.E., Julián, J.P., 2002. Cycling at the interface between neurodevelopment and neurodegeneration. *Cell Death Differentiation* 9, 1294–1306.
- O'Hare, M.J., Hou, S.T., Morris, E.J., Cregan, S.P., Xu, Q., Snack, R.S., Park, D.S., 2000. Induction and modulation of cerebellar granule neuron death by E2F-1. *Journal of Biological Chemistry* 275, 25358–25364.
- Pardo, R., Andreolotti, A.G., Ramos, B., Picatoste, F., Claro, E., 2003. Opposed effects of lithium on the MEK-ERK pathway in neural cells: inhibition in astrocytes and stimulation in neurons by GSK3 independent mechanisms. *Journal of Neurochemistry* 87, 417–426.
- Shao, L., Young, L.T., Wang, J.F., 2005. Chronic treatment with mood stabilizers lithium and valproate prevents excitotoxicity by inhibiting oxidative stress in rat cerebral cortical cells. *Biological Psychiatry* 58, 879–884.
- Shi, L., Gong, S., Yuan, Z., Ma, C., Liu, Y., Wang, C., Li, W., Pi, R., Huang, S., Chen, R., Han, Y., Mao, Z., Li, M., 2005. Activity deprivation-dependent induction of the proapoptotic BH3-only protein Bim is independent of JNK/c-Jun activation during apoptosis in cerebellar granule neurons. *Neuroscience Letters* 375, 7–12.
- Smith, D.S., Leone, G., DeGregori, J., Ahmed, M.N., Qumsiyeh, M.B., Nevins, J.R., 2000. Induction of DNA replication in adult rat neurons by deregulation of the retinoblastoma/E2F G1 cell cycle pathway. *Cell Growth Differentiation* 11, 625–633.
- Smits, V.A., Essers, M.A., Loomans, D.S., Klompaker, R., Rijksen, G., Medema, R.H., Trinh, E., Boutillier, A.L., Loeffler, J.P., 2001. Regulation of the retinoblastoma-dependent Mdm2 and E2F-1 signaling pathways during neuronal apoptosis. *Molecular and Cellular Neuroscience* 17, 342–353.
- Strachan, G.D., Koike, M.A., Siman, R., Hall, D.J., Jordan-Sciutto, K.L., 2005. E2F1 induces cell death, calpain activation, and MDMX degradation in a transcription independent manner implicating a novel role for E2F1 in neuronal loss in SIV encephalitis. *Journal of Cellular Biochemistry* 96, 728–740.
- Tseng, W.P., Lin-Shiau, S.Y., 2002. Long-term lithium treatment prevents neurotoxic effects of beta-bungarotoxin in primary cultured neurons. *Journal of Neuroscience Research* 69, 633–641.
- Verdaguer, E., Garcia-Jorda, E., Canudas, A.M., Dominguez, E., Jimenez, A., Pubill, D., Escubedo, E., Camarasa, J., Pallas, M., Camins, A., 2002. Kainic acid-induced apoptosis in cerebellar granule neurons: an attempt at cell cycle re-entry. *Neuroreport* 13, 413–416.
- Verdaguer, E., Jorda, E.G., Alvira, D., Jiménez, A., Canudas, A.M., Folch, J., Rimbau, V., Pallas, M., Camins, A., 2005. Inhibition of multiple pathways accounts for the antiapoptotic effects of flavopiridol on potassium withdrawal-induced apoptosis in neurons. *Journal of Molecular Neuroscience* 26, 71–84.
- Wada, A., Yokoo, H., Yanagita, T., Kobayashi, H., 2005. Lithium: potential therapeutics against acute brain injuries and chronic neurodegenerative diseases. *Journal of Pharmacological Sciences* 99, 307–321.
- Wei, H., Leeds, P.R., Qian, Y., Wei, W., Chen, R., Chiang, D., 2000. Beta-amyloid peptide-induced death of PC 12 cells and cerebellar granule cell neurons is inhibited by long-term lithium treatment. *European Journal of Pharmacology* 392, 117–123.
- Welcker, M., Singer, J., Loeb, K.R., Grim, J., Bloecher, A., Gurién-West, M., Clurman, B.E., Roberts, J.M., 2003. Multisite phosphorylation by Cdk2 and GSK3 controls cyclin E degradation. *Molecular Cell* 12, 381–392.
- Xie, Y., Liu, Y., Ma, C., Yuan, Z., Wang, W., Zhu, Z., Gao, G., Liu, X., Yuan, H., Chen, R., Huang, S., Wang, X., Zhu, X., Wang, X., Mao, Z., Li, M., 2004. Indirubin-3'-oxime inhibits c-Jun NH2-terminal kinase: anti-apoptotic effect in cerebellar granule neurons. *Neuroscience Letters* 367, 355–359.

Publicació 3

**GSK-3 β INHIBITION AND PREVENTION OF
MITOCHONDRIAL APOPTOSIS INDUCING FACTOR
RELEASE ARE NOT INVOLVED IN THE ANTIOXIDANT
PROPERTIES OF SB-415286**

Marc Yeste-Velasco, Jaume Folch, Andrés Jiménez, Víctor Rimbau, Mercè
Pallàs, Antoni Camins

European Journal of Pharmacology (Acceptat)



Short communication

GSK-3 β inhibition and prevention of mitochondrial apoptosis inducing factor release are not involved in the antioxidant properties of SB-415286

Marc Yeste-Velasco^{a,c}, Jaume Folch^{b,c}, Andres Jiménez^{a,c}, Víctor Rimbau^{a,c},
Mercè Pallàs^{a,c}, Antoni Camins^{a,c,*}

^a Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia and Institut de Biomedicina (IBUB), Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Nucli Universitari de Pedralbes, 08028 Barcelona, Spain

^b Unitat de Bioquímica, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, C/ St. Llorenç 21 43201 Reus (Tarragona), Spain

^c Centros de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Instituto de Salud Carlos III, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 November 2007

Received in revised form 20 March 2008

Accepted 2 April 2008

Available online xxxx

Keywords:

Oxidative stress

GSK-3 β

AIF

Apoptosis

Lithium

SB-415286

ABSTRACT

The antioxidant effects of lithium and SB-415286, two glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) inhibitors, were studied in cerebellar granule neurons by measuring changes in 2, 7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA) fluorescence. GSK-3 β inhibitors inhibit apoptosis mediated by serum and potassium withdrawal (S/K withdrawal) and GSK-3 β activation, as measured by β -catenin degradation. Furthermore, as both drugs prevent mitochondrial apoptosis inducing factor (AIF) release, these data indicate that GSK-3 β inhibitors prevent caspase-independent apoptosis in cerebellar granule neurons induced by S/K withdrawal. While the most specific GSK-3 β inhibitor, SB-415286, demonstrated antioxidant effects, Li⁺ 10 mM did not. These results indicate that lithium 10 mM and SB-415286 20 μ M exert anti-apoptotic effects in cases of S/K withdrawal mediated by GSK-3 β inhibition. However, these antioxidant properties are independent of GSK-3 β inhibition and prevention of mitochondrial AIF release.

© 2008 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

In the search for drugs to treat neurodegenerative disorders, inhibitors of the enzyme glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) have been proposed as candidates (Manji et al., 2000; Chuang and Manji, 2007). This hypothesis is supported by the role GSK-3 β plays in regulating apoptosis (Gould et al., 2006). Furthermore, increasing evidence implicates GSK-3 β in tau hyperphosphorylation and, thus, in the pathogenesis of Alzheimer's disease (Bhat et al., 2004). Indeed, recent clinical trials involving Alzheimer's disease patients indicate that lithium has beneficial effects (Terao et al., 2006). Experimental studies with neuronal cell cultures and animal neurodegenerative disease models indicate that the inhibition of GSK-3 β protects against excitotoxicity (Facci et al., 2003), *N*-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) mediated neurotoxicity (Youdim and Arraf, 2004) and other toxic stimuli (Lai et al., 2006). Furthermore, recent studies have demonstrated that the inhibition of GSK-3 β is attributable to the antioxidant properties of lithium (Schafer et al., 2004; Lee et al., 2007). This finding is important since it suggests that this drug possesses an additional mechanism of action. Previous reports have indicated that lithium reduces GSK-3 β activity in at least two ways, either directly

by acting as a competitive inhibitor of Mg²⁺, or indirectly via the inhibition of protein phosphatase activity, which thereby inactivates GSK-3 β (Gould et al., 2006). The latter mechanism is mediated by the activation of AKT. Through the inhibition of GSK-3 β , lithium's neuroprotective effects are associated with the up-regulation of Bcl-2, the down-regulation of p53, and inhibition of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway (Beurel and Jope, 2006). However, there are conflicting data regarding the possible mechanisms underlying the antioxidant properties of lithium. Some studies suggest that the latter may result from the inhibition of GSK-3 β . This hypothesis is based on experimental data involving the compound AR-014418, a selective drug that inhibits GSK-3 β (Lee et al., 2007). In contrast, others studies indicate that the antioxidant properties of lithium are independent of GSK-3 β inhibition, since this effect is achieved following chronic treatment with mood stabilizing drugs (Shao et al., 2005; Frey et al., 2005). Moreover, in cortical neurons, the mood stabilizing drugs lithium and valproate inhibit glutamate-induced oxidative stress production via the inhibition of intracellular calcium increase (Shao et al., 2005).

Recent studies suggest that another physiological protein involved in oxidative stress prevention is apoptosis inducing factor (AIF) (Porter and Urbano, 2006; Apostolova et al., 2006). Previous reports have shown that AIF plays an important physiological role in mitochondria (Krantic et al., 2007). AIF was shown to localize in close proximity to mitochondrial complex I, maintaining the latter's function and exerts an reactive oxygen species scavenging effect. Furthermore, when AIF

* Corresponding author. Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia i Institut de Biomedicina, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Nucli Universitari de Pedralbes, 08028 Barcelona, Spain.

E-mail address: camins@ub.edu (A. Camins).

is released by the mitochondria following a pro-apoptotic stimulus and translocates to the nucleus, it regulates neuronal cell death (Porter and Urbano, 2006). This protein induces apoptosis by a mechanism independent of caspase stimulation.

We designed the present study to investigate the effects of lithium and SB-415286 on mitochondrial AIF release in order to evaluate whether this mitochondrial protein is involved in the antioxidant properties of GSK-3 β inhibitors.

2. Materials and methods

2.1. Neuronal cell cultures

Primary cultures of cerebellar granule neurons were prepared from post-natal day 7 Sprague–Dawley rat pups as described previously (Verdaguer et al., 2002). Cells were dissociated in the presence of trypsin and DNase I, and then plated in poly-L-lysine (100 μ g/ml)-coated dishes at a density of 8×10^5 cells/cm² in basal Eagle's medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 0.1 mg/ml gentamicin, 2 mM L-glutamine, and 25 mM KCl. Cytosine-D-arabino-furanoside (10 μ M) was added to the culture medium 16–18 h after plating to prevent the replication of non-neuronal cells. The cultures were maintained at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO₂, 95% air and were left undisturbed until experiments were performed 8 days after plating (8 days *in vitro*). All procedures involving animals and their care were approved by the ethics committee of the University of Barcelona, and were conducted in accordance with governmental guidelines (Generalitat de Catalunya).

After 8 days in culture, the medium in which cerebellar granule cells were grown (conditioned medium, serum and potassium) was replaced with serum-free medium containing 5 mM potassium in the absence of serum. The GSK-3 β inhibitor SB415286 (3-[3-Chloro-4-hydroxyphenol] amino]-4-(2-nitrophenyl)-1H-pyrrol-2,5-dione) and lithium were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA).

2.2. Detection of condensed nuclei by propidium iodide staining

Propidium iodide (PI) staining was used to detect morphological evidence of cell viability. Cerebellar granule cells were grown on glass coverslips following S/K withdrawal treatment alone, or in the presence of SB415286 or Li⁺. Subsequently, cells were fixed in 4% paraformaldehyde/phosphate-buffered saline solution (PBS) pH 7.4 for 1 h at room temperature. After washing with PBS, the cells were incubated for 3 min with a solution of PI in PBS (10 μ g/ml). Stained cells were visualized under UV illumination using a 20 \times objective and their digitized images were captured.

The treatment of apoptotic cells resulted in shrunken, brightly fluorescent, apoptotic nuclei exhibiting high fluorescence and condensed chromatin compared with non-apoptotic cells. Apoptotic cells were awarded a score based on a minimum 500-cell count of each sample over three separate experiments.

2.3. Western-blot analysis

Aliquots of cell homogenate, total extracts and mitochondrial containing 25 μ g per sample, were analyzed by Western-blot. Briefly, samples were placed in sample buffer (0.5 M Tris–HCl pH 6.8, 10% glycerol, 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) 2- β -mercaptoethanol, 0.05% bromophenol blue) and denatured by boiling at 95–100 °C for 2 min. Samples were separated by electrophoresis on 15% acrylamide for AIF and 7.5% for β -catenin gels. Thereafter, proteins were transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) sheets (ImmobilonTM-P, Millipore Corp., Bedford, MA) using a transblot apparatus (BioRad). Membranes were blocked for 1 h at room temperature with 5% non-fat milk dissolved in TBS-T buffer (Tris 50 mM; NaCl 1.5%; Tween 20, 0.05%, pH 7.5). They were then incubated with primary monoclonal antibodies against

dilutions of AIF Ab-3 rabbit polyclonal antibody (from Neomarkers) at 1:500, goat polyclonal anti-catenin β (C-18) (from Santa Cruz) at 1:1000, and β -Actin (from Neomarkers) at 1:3000.

After 4 h, blots were washed thoroughly in TBS-T buffer and incubated for 1 h with a peroxidase-conjugated IgG antibody (Amersham Corp., Arlington Heights, IL). Immunoreactive protein was visualized using a chemiluminescence-based detection kit following the manufacturer's protocol (ECL kit; Amersham Corp.). The protein load was routinely monitored using phenol red staining of the blot membrane or immunodetection of β -Actin.

2.4. Measurements of reactive oxygen species

Levels of intracellular reactive oxygen species were measured using the fluorescent probe 2, 7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA). Briefly, cells were incubated for 30 min at 37 °C in the presence of 10 μ M of H₂DCFDA (added from a 20 mM stock solution in dimethyl sulfoxide). H₂DCFDA diffused across neuronal membranes, where acetates migrated by intracellular esterases. Oxidation of H₂DCFDA occurred almost exclusively in the cytosol, and generated a fluorescent response that was proportional to reactive oxygen species generation. After loading with the dye, the neurons were washed in a Locke's buffer and fluorescence was measured at a 488 nm excitation wavelength and an emission wavelength of 510 nm, using a Perkin-Elmer Victor 3 fluorometer.

2.5. Statistical analysis

Data are expressed as the mean \pm S.E.M. of at least four experiments involving four to six independent cultures. In all experiments, data were analyzed using ANOVA followed by post-hoc Tukey–Kramer multiple comparison tests. *P*-values less than 0.05 were considered significant.

3. Results

In previous reports others and we have demonstrated that lithium and SB-415286 exert neuroprotective effects in the well-known apoptotic model of serum and potassium withdrawal (S/K withdrawal) (Wang et al., 2004; Yeste-Velasco et al., 2007). In the present study, we also evaluated their anti-apoptotic effects, specifically at the concentrations of 10 mM (lithium) and 20 μ M (SB-415286), by counting the number of condensed cell nuclei following S/K withdrawal and in the presence of GSK3 β inhibitors (Fig. 1A). At these concentrations, these compounds significantly inhibited apoptosis mediated by S/K withdrawal. Li⁺ and SB-415286 exerts anti-apoptotic effects, as calculated by the percentage of condensed nuclei (see Materials and methods) (Fig. 1A). To evaluate the extent of GSK-3 β activation after S/K withdrawal, we measured β -catenin degradation by Western-blot. It is well-known that GSK-3 β is involved in β -catenin phosphorylation and degradation. Previous studies demonstrated that lithium increased the β -catenin levels and enhanced transcription of prosurvival genes and inhibit the expression of apoptotic genes (Jope et al., 2007). Thus, after 4 h of S/K withdrawal, we noted a decrease in β -catenin expression, which was reversed by treatment with Li⁺ 10 mM and SB-415286 20 μ M (Fig. 1B).

It has been demonstrated that the protective effects of lithium in settings of S/K deprivation are mediated through the inhibition of an intrinsic apoptotic caspase-dependent pathway (Enguita et al., 2005). However, the effects of GSK-3 β inhibitors on AIF release, to our knowledge, have not yet been characterized. To this end, western blot experiments were carried out to evaluate the role of GSK-3 β inhibitors on AIF release from mitochondria. Our data demonstrated that Li⁺Li⁺ and SB-415286 prevent AIF release from mitochondria (Fig. 2).

Subsequent experiments were then carried out to evaluate not only intracellular oxidative stress production after 12 h of S/K withdrawal,

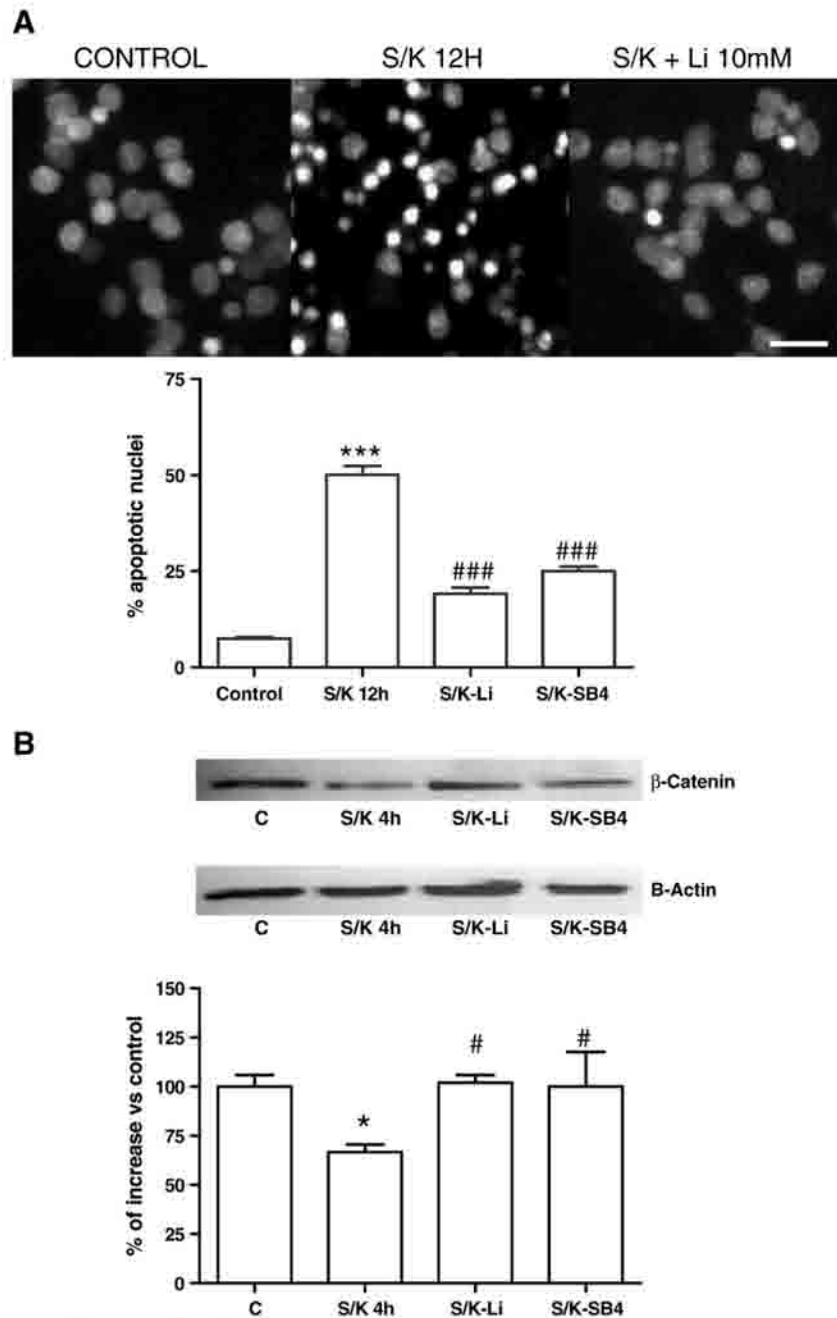


Fig. 1. (A) Representative images of nuclei control sample; S/K withdrawal and S/K withdrawal with lithium 10 mM respectively (calibration bar, 10 μ M). Bar chart showing the percentage effects of lithium 10 mM, SB415286 20 μ M on S/K withdrawal-induced nuclear condensation in cerebellar granule neurons exposed for 12 h. The nuclei were counted on a fluorescence microscope, distinguishing normal nuclei from the condensed ones following the criteria stated in the material and methods. Each point is the mean \pm SEM of four wells of four to six different cultures. Statistical analyses were carried out using the one-way ANOVAs followed by Tukey's tests: ### P <0.001 vs. S/K withdrawal. (B) Western-blot of serum and potassium withdrawal decrease β -catenin expression and quantitative analysis of β -catenin expression induced by S/K withdrawal. Protein extracts were obtained at 4 h after S/K withdrawal as indicated in material and methods. Membranes were incubated with goat polyclonal anti-catenin β (C-18) (1:1000). The intensity of the bands was determined by densitometric analysis of at least three independent experiments. * P <0.05 vs. Control; # P <0.05 vs. S/K withdrawal.

but also the effects of Li⁺ and SB-415286. Thus, S/K withdrawal significantly increased DCF fluorescence, which was completely abrogated by resveratrol 100 μ M, a well-known antioxidant. Interestingly, SB-415286 (20 μ M) exhibited antioxidant effects similar to those of resveratrol (100 μ M), while Li⁺ (10 μ M) failed to decrease DCF fluorescence. Thus, Li⁺ 10 mM did not exert any antioxidant effects in this model.

4. Discussion

An increase in oxidative stress is a common characteristic and a key initiator in the process of neuronal loss in all neurological disorders

(Terao et al., 2006; Machado-Vieira et al., 2007). Recent data suggest that GSK-3 β , apart from its previously described physiological functions (e.g., regulation of glucose metabolism), plays a role in regulating reactive oxygen species (Wang et al., 2004; Dal-Pizzol et al., 2006). This hypothesis is supported by previous studies demonstrating that GSK-3 β inhibition plays a prominent role in protecting against oxidative stress (Lee et al., 2007). To study this process, different neurotoxic stimuli, such as complex I inhibitors (MPTP), glutamate, and H₂O₂, have been used (Lai et al., 2006). These reports have demonstrated that Li⁺ exerts neuroprotective effects against neurotoxins by inhibiting reactive oxygen species production. A recent study in-

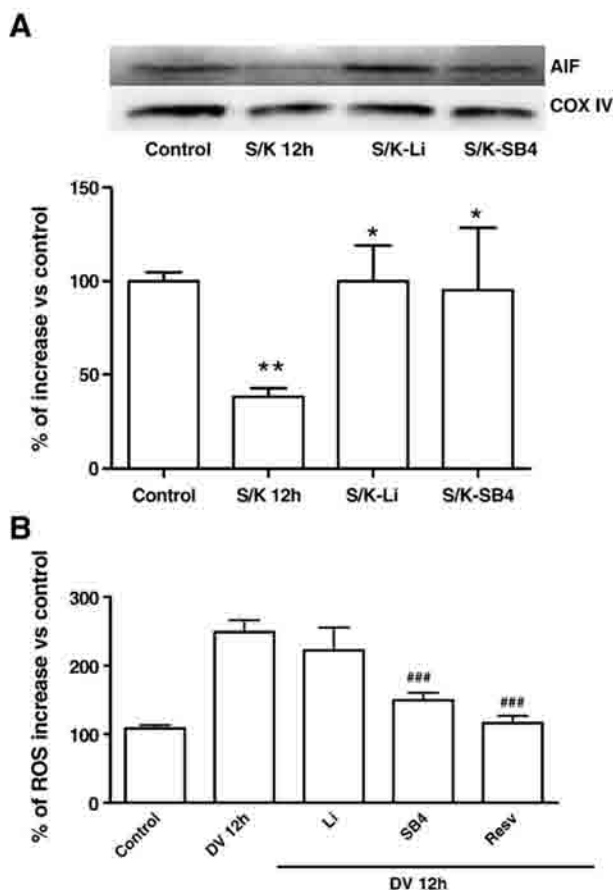


Fig. 2. (A) Western-blot of serum and potassium withdrawal decrease mitochondrial AIF expression and quantitative analysis of AIF expression induced by S/K withdrawal. Protein extracts were obtained at 12 h after S/K withdrawal as indicated in material and methods. Membranes were incubated with monoclonal antibody against AIF Ab-3 rabbit polyclonal antibody (1:500). The intensity of the bands was determined by densitometric analysis of at least three independent experiments. ** $P < 0.01$ vs. Control; * $P < 0.05$ vs. S/K withdrawal. (B) Measurement of free radical production. Data are presented as means \pm S.E.M. After 12 h of S/K withdrawal cerebellar granule neurons were incubated with DCFH-DA (see Section 2). ### $P < 0.001$ (when compared with the S/K withdrawal group).

volving primary rat cortical cultures demonstrated that chronic treatment with lithium increased levels of the antioxidant enzyme glutathione S-transferase (Wang et al., 2004; Cui et al., 2007; Shao et al., 2008). Moreover, selective inhibition of GSK-3 β protected PC12 cells from oxidative stress mediated by H₂O₂ (Schafer et al., 2004). However, the antioxidant effects of Li⁺ in SH-SY5Y cells were independent of GSK-3 β inhibition (King and Jope, 2005). Therefore, the discrepancy between our results and others could be explained by the acute treatment of cerebellar granule cells (24 h) performed in the present study.

Furthermore, chronic treatment with lithium has also been shown to increase expression of the molecular chaperone GRP78 and the anti-apoptotic factor bcl-2 in rat brains. This data is of great interest since both proteins not only stabilize mitochondrial function, but also suppress oxyradical accumulation (Frey et al., 2005). Increased expression of GRP78 and bcl-2 implies that these two proteins may inhibit reactive oxygen species overproduction by stabilizing mitochondrial function.

Although lithium and SB-415286 are known to inhibit GSK-3 β activity (Bhat et al., 2004), our observations regarding a differential reactive oxygen species production effect caused by two GSK-3 β inhibitors, argue against the idea that inhibition of GSK-3 β activity is involved in the inhibition of reactive oxygen species, at least in the cellular paradigms used here. Our data is supported by the fact that Li⁺

did not exhibit any antioxidant effects. Furthermore, we demonstrated that AIF is not involved in these antioxidant effects. Our hypothesis is based on evidence that both compounds prevent AIF release from mitochondria. Thus, mitochondrial AIF localization may be related to its anti-apoptotic properties more than to its role as an antioxidant. These findings support the possibility that prevention of mitochondrial AIF release may constitute one of the mechanisms of GSK-3 β pharmacological action.

Our results suggest that the previously described neuroprotective effects of SB-415286 in a model of excitotoxicity and S/K withdrawal could also reflect its antioxidant effects (Facci et al., 2004). This antioxidant property of SB-415286 could be important in the quest to synthesize new drugs possessing dual inhibitory effects against GSK-3 β and reactive oxygen species, both of which are highly relevant to the treatment of Alzheimer's disease.

Acknowledgements

This study was supported by grants from Spain's Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2005-01604, SAF2006-13092), the Instituto de Salud Carlos III (PI 041300) and the Centros de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED). We are grateful to the Autonomous Government of Catalonia for supporting research groups (2005/SGR00893) and to the TV3 Marathon. We thank the Language Assessment Service of the University of Barcelona for revising the manuscript.

References

- Aghdam, S.Y., Barger, S.W., 2007. Glycogen synthase kinase-3 in neurodegeneration and neuroprotection: lessons from lithium. *Curr. Alzheimer Res.* 4, 21–31.
- Apostolova, N., Cervera, A.M., Victor, V.M., Cadenas, S., Sanjuan-Pla, A., Alvarez-Barrientos, A., Esplugues, J.V., McCreath, K.J., 2006. Loss of apoptosis-inducing factor leads to an increase in reactive oxygen species, and an impairment of respiration that can be reversed by antioxidants. *Cell Death Differ.* 13, 354–357.
- Beurel, E., Jope, R.S., 2006. The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. *Prog. Neurobiol.* 79, 173–189.
- Bhat, R.V., Budd, M., Haerberlein, S.L., Avila, J., 2004. Glycogen synthase kinase 3: a drug target for CNS therapies. *J. Neurochem.* 89, 1313–1337.
- Chuang, D.M., Manji, H.K., 2007. In search of the Holy Grail for the treatment of neurodegenerative disorders: has a simple cation been overlooked? *Biol Psychiatry* 62, 4–6.
- Cui, J., Shao, L., Young, L.T., Wang, J.F., 2007. Role of glutathione in neuroprotective effects of mood stabilizing drugs lithium and valproate. *Neuroscience* 144, 1447–1453.
- Dal-Pizzol, F., Kapczinski, F., Quevedo, J., 2006. Effects of lithium and valproate on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. *J. Psychiatry Neurosci.* 31, 326–332.
- de Vasconcellos, A.P., Nieto, F.B., Crema, L.M., Diehl, L.A., de Almeida, L.M., Prediger, M.E., da Rocha, E.R., Dalmaz, C., 2006. Chronic lithium treatment has antioxidant properties but does not prevent oxidative damage induced by chronic variate stress. *Neurochem. Res.* 31, 1141–1151.
- Enguita, M., DeGregorio-Rocasolano, N., Abad, A., Trullas, R., 2005. Glycogen synthase kinase 3 activity mediates neuronal pentraxin 1 expression and cell death induced by potassium deprivation in cerebellar granule cells. *Mol. Pharmacol.* 67, 1237–1246.
- Facci, L., Stevens, D.A., Skaper, S.D., 2004. Glycogen synthase kinase-3 inhibitors protect central neurons against excitotoxicity. *Neuroreport* 14, 1467–1470.
- Frey, B.N., Valvassori, S.S., Reus, G.Z., Martins, M.R., Petronilho, F.C., Bardini, K., Hiroi, T., Wei, H., Hough, C., Leeds, P., Chuang, D.M., 2005. Prolonged lithium treatment protects against the ER stress elicited by thapsigargin in rat PC12 cells: roles of intracellular calcium, GRP78 and Bcl-2. *J. Pharmacogenomics* 5, 102–111.
- Frey, B.N., Andreatza, A.C., Kunz, M., Gomes, F.A., Quevedo, J., Salvador, M., Gonçalves, C.A., Kapczinski, F., 2007. Increased oxidative stress and DNA damage in bipolar disorder: a twin-case report. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 31, 283–285.
- Gould, T.D., Picchini, A.M., Einat, H., Manji, H.K., 2006. Targeting glycogen synthase kinase-3 in the CNS: implications for the development of new treatments for mood disorders. *Curr. Drug Targets* 7, 1399–1409.

- Jope, R.S., Roh, M.S., 2006. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in psychiatric diseases and therapeutic interventions. *Curr. Drug Targets* 7, 1421–1434.
- Jope, R.S., Yuskaitis, C.J., Beurel, E., 2007. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics. *Neurochem. Res.* 32, 577–595.
- King, T.D., Jope, R.S., 2005. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 protects cells from intrinsic but not extrinsic oxidative stress. *Neuroreport* 16, 597–601.
- Krantic, S., Mechawar, N., Reix, S., Quirion, R., 2007. Apoptosis-inducing factor: a matter of neuron life and death. *Prog. Neurobiol.* 81, 179–196.
- Lai, J.S., Zhao, C., Warsh, J.J., Li, P.P., 2006. Cytoprotection by lithium and valproate varies between cell types and cellular stresses. *Eur. J. Pharmacol.* 539, 18–26.
- Lee, K.Y., Koh, S.H., Noh, M.Y., Park, K.W., Lee, Y.J., Kim, S.H., 2007. Glycogen synthase kinase-3 β activity plays very important roles in determining the fate of oxidative stress-inflicted neuronal cells. *Brain Res.* 1129, 89–99.
- Machado-Vieira, R., Andreazza, A.C., Viale, C.I., Zanatto, V., Cereser Jr., V., da Silva Vargas, R., Kapczinski, F., Portela, L.V., Souza, D.O., Salvador, M., Gentil, V., 2007. Oxidative stress parameters in unmedicated and treated bipolar subjects during initial manic episode: a possible role for lithium antioxidant effects. *Neurosci. Lett.* 421, 33–36.
- Manji, H.K., Moore, G.J., Chen, G., 2000. Lithium up-regulates the cytoprotective protein Bcl-2 in the CNS in vivo: a role for neurotrophic and neuroprotective effects in manic depressive illness. *J. Clin. Psychiatry* 9, 82–96.
- Porter, A.G., Urbano, A.G., 2006. Does apoptosis-inducing factor (AIF) have both life and death functions in cells? *Bioessays* 28, 834–843.
- Schafer, M., Goodenough, S., Moosmann, B., Behl, C., 2004. Inhibition of glycogen synthase kinase 3 β is involved in the resistance to oxidative stress in neuronal HT22 cells. *Brain Res.* 1005, 84–89.
- Shao, L., Young, L.T., Wang, J.F., 2005. Chronic treatment with mood stabilizers lithium and valproate prevents excitotoxicity by inhibiting oxidative stress in rat cerebral cortical cells. *Biol. Psychiatry* 58, 879–884.
- Shao, L., Cui, J., Young, L.T., Wang, J.F., 2008. The effect of mood stabilizer lithium on expression and activity of glutathione s-transferase isoenzymes. *Neuroscience* 151, 518–524.
- Terao, T., Nakano, H., Inoue, Y., Okamoto, T., Nakamura, J., Iwata, N., 2006. Lithium and dementia: a preliminary study. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 30, 1125–1128.
- Verdaguer, E., Garcia-Jorda, E., Canudas, A.M., Dominguez, E., Jimenez, A., Pubill, D., Escubedo, E., Camarasa, J., Pallas, M., Camins, A., 2002. Kainic acid-induced apoptosis in cerebellar granule neurons: an attempt at cell cycle re-entry. *Neuroreport* 13, 413–416.
- Wang, J.F., Shao, L., Sun, X., Young, L.T., 2004. Glutathione S-transferase is a novel target for mood stabilizing drugs in primary cultured neurons. *J. Neurochem.* 88, 1477–1484.
- Yeste-Velasco, M., Folch, J., Trullas, R., Abad, M.A., Enguita, M., Pallas, M., Camins, A., 2007. Glycogen synthase kinase-3 is involved in the regulation of the cell cycle in cerebellar granule cells. *Neuropharmacology* 53, 295–307.
- Youdim, M.B., Arraf, Z., 2004. Prevention of MPTP (N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) dopaminergic neurotoxicity in mice by chronic lithium: involvements of Bcl-2 and Bax. *Neuropharmacology* 46, 1130–1140.
- Zhong, J., Lee, W.H., 2007. Lithium: a novel treatment for Alzheimer's disease? *Expert Opin. Drug Saf.* 6, 375–383.

Publicació 4

**NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF SB-415286 ON
HYDROGEN PEROXIDE-INDUCED CELL DEATH IN B65 RAT
NEUROBLASTOMA CELLS AND NEURONS**

Javier G. Pizarro, **Marc Yeste-Velasco (Coautor)**, Víctor Rimbau, Gemma Casadesús, Mark A. Smith, Mercè Pallàs, Jaume Folch, Antoni Camins

Internacional Journal of Developmental Neuroscience (2008) 26: 269-276

Neuroprotective effects of SB-415286 on hydrogen peroxide-induced cell death in B65 rat neuroblastoma cells and neurons

Javier G. Pizarro^{a,c,1}, Marc Yeste-Velasco^{a,c,1}, Victor Rimbau^{a,c}, Gemma Casadesús^d,
Mark A. Smith^e, Mercè Pallàs^{a,c}, Jaume Folch^{b,c}, Antoni Camins^{a,c,*}

^aUnitat de Farmacologia i Farmacognòsia i Institut de Biomedicina (IBUB), Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Nucli Universitari de Pedralbes, 08028 Barcelona, Spain

^bUnitat de Bioquímica, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, C./St. Llorenç 21 43201 Reus (Tarragona), Spain

^cCentros de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

^dDepartment of Neurosciences, Case Western Reserve University School of Medicine, Cleveland, OH 44106, USA

^eDepartment of Pathology, Case Western Reserve University School of Medicine, Cleveland, OH 44106, USA

Received 10 January 2008; received in revised form 1 February 2008; accepted 1 February 2008

Abstract

Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) is involved in the pathogenesis of several neurodegenerative diseases. In addition, as oxidative stress has been implicated in all neurodegenerative disorders, the inhibition of both pathways offers a potential strategy for preventing or delaying neurodegeneration. We examined the cytoprotective effects of lithium and SB-415286, two inhibitors of GSK-3, using a rat B65 cell line and also in cerebellar granule cells (CGN). H₂O₂ decreased the inactive form of GSK-3 (phospho-GSK-3 at Ser9), as measured by immunoblot experiments involving an antibody against the inactive form of the enzyme. Moreover, lithium inhibited this effect. While SB-415286 exerted a protective effect, lithium did not attenuate the toxic effects of H₂O₂ (1 mM). We then examined those mechanisms implicated in the protective effects of SB-415286. When we analyzed reactive oxygen species (ROS) production using the fluorescent probe 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate in B65 cells, as well as in CGN, we found that SB-415286 strongly reduced DCF fluorescence. Lithium, however, did not exhibit any antioxidant properties. We conclude that the GSK-3 inhibitor SB-415286 has antioxidant properties, which may explain the cytoprotective effects against H₂O₂ damage. Furthermore, inhibition of GSK-3 activity was not involved in this protective effect.

© 2008 ISDN. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: SB-415286; Lithium; B65 Neuroblastoma cells; Cerebellar granule cells; H₂O₂; Oxidative stress

1. Introduction

Oxidative injury has been linked to a variety of neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD) and amyotrophic lateral sclerosis, as well as conditions such as ischemia, bipolar disorders and excitotoxicity (Zhu et al., 2006, 2007; Moreira et al., 2005; Pallas and Camins, 2006; Machado-Vieira et al., 2007). Oxidative damage is mediated by ROS, which can be generated by an oxidative burst, or by the presence of excess free transition metals. H₂O₂ is widely used as a toxicant to

establish in vitro models of oxidative stress-induced injury (Lee et al., 2007). Since ROS production is a component of neuronal cell demise via necrosis and apoptosis, antioxidant drug research remains an area of interest in neuroscience. Thus, although several clinical studies involving antioxidant drugs (e.g., vitamin E) have been carried out, these proved unsuccessful (Liu et al., 2007). One plausible explanation for the loss of efficacy in these antioxidant drugs is that blocking only a single path is insufficient for achieving effective neuroprotection.

An interesting factor involved in AD pathogenesis is the enzyme GSK-3 (Aghdam and Barger, 2007). Although, originally identified as a regulator of glycogen metabolism, GSK-3 is now known to play a role in the regulation of glucose secretion, tau phosphorylation, gene expression and apoptosis (Linseman et al., 2003; Jope and Johnson, 2004; Xie et al., 2004; Zhong et al., 2006; Jope et al., 2007; Yeste-Velasco et al.,

* Corresponding author at: Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Institut de Biomedicina, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Nucli Universitari de Pedralbes, 08028 Barcelona, Spain.

E-mail address: camins@ub.edu (A. Camins).

¹ Both authors contributed equally to this work.

2007). Moreover, recent data suggest that this enzyme plays a role in the regulation of oxidative stress-induced neuronal cell death (Hongisto et al., 2003; Ghribi et al., 2003; Facci et al., 2003; Goodenough et al., 2004; Schafer et al., 2004; de Vasconcellos et al., 2006). Regarding the latter, several studies have been performed using different neurotoxins and stimuli, including rotenone (an inhibitor of mitochondria complex I) and glutamate (an excitatory amino acid); in both cases, GSK-3 was determined to play a part in cell loss (King and Jope, 2005; Lai et al., 2006). Likewise, GSK-3 has been implicated in the hyperphosphorylation of tau related to AD (Jin et al., 2005; Pallas and Camins, 2006). Consequently, GSK-3 was postulated to play a key role in a Parkinson's disease model involving endoplasmic reticulum stress (Youdim and Arraf, 2004; Yeste et al., 2007). Moreover, studies performed in GSK-3 transgenic mice confirmed the importance of this enzyme in AD pathology (Engel et al., 2006). Furthermore, a recent clinical study proposed the use of lithium for the treatment of AD, since a slight improvement in patient symptomatology was observed (Zhong and Lee, 2007). Although lithium currently remains the only GSK-3 inhibitor clinically administered to humans, this drug has shown undesirable effects. Thus, more specific and newer GSK-3 inhibitors have been synthesised. Those that have shown the most promise include molecules such as maleimide derivatives, namely SB-216763 and SB-415286, which are potent inhibitors of GSK-3. Moreover, recent studies suggest that these compounds could inhibit additional protein kinases (Bain et al., 2007). Indeed, these have exhibited neuroprotective properties *in vitro* against excitotoxicity and other apoptotic stimuli (Cross et al., 2001; Yeste-Velasco et al., 2007).

Therefore, numerous therapeutic agents regulating GSK-3 have been investigated for the treatment of neurodegenerative diseases (Coghlan et al., 2000; Cross et al., 2001; Facci et al., 2003).

In the present study, we examined the protective effects of lithium and SB-415286 on a rat neuroblastoma B65 cell line and also in CGN. We conclude that SB-415286 protects from H₂O₂ toxicity via a new mechanism: its antioxidant properties. This is the first study to describe these properties and to demonstrate that they constitute a protective path independent of GSK-3 inhibition. Finally, we propose that the dual effects afforded by this drug (i.e., its antioxidant and GSK-3 inhibitory properties) may make it suitable for the treatment of neurological disorders.

2. Methods

2.1. B65 neuroblastoma and neuronal cell cultures

Neuroblastoma B65 cell line was purchased from the European Collection of Cell Cultures (ECACC, Alisbury, UK). Cells were placed at 200 cells/mm² and cultured in DMEM media containing 10% FCS.

Primary cultures of cerebellar granule neurons were prepared from postnatal day 7 Sprague–Dawley rat pups as described previously (Verdaguer et al., 2004). Cells were dissociated in the presence of trypsin and DNase I and placed in poly-L-lysine (100 µg/ml)-coated dishes at a density of 8×10^5 cells/cm² in basal Eagle's medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 0.1 mg/ml gentamicin, 2 mM L-glutamine and 25 mM KCl. Cytosine-D-

arabino-furanoside (10 µM) was added to the culture medium 24 h after plating to prevent the replication of non-neuronal cells. The cultures were maintained at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO₂/95% air and left undisturbed until the experiments were performed. All procedures involving animals and their care were approved by the ethics committee of the University of Barcelona, and were conducted in accordance with national (Spanish) laws.

2.2. Assessment of cell viability

B65 cells were used after 24 h of *in vitro* culture. CGN were used after 7–8 days *in vitro* (Verdaguer et al., 2004). Lithium and SB-415286 were dissolved in culture media and DMSO, respectively, and added to the neuronal preparation at the precise concentrations, 1 h before addition H₂O₂ (50 µM to 1 mM). To assess the loss in cell viability, we used the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium] method. MTT was added to the cells at a final concentration of 250 µM and incubated for 1 h, allowing the reduction in MTT to produce a dark blue formazan product. Media were then removed, and cells were dissolved in dimethylsulfoxide. Formazan production was measured by the absorbency change at 595 nm using a microplate reader (BioRad Laboratories, CA, USA). Viability results were expressed as percentages. The absorbency measured from non-treated cells was taken to be 100%.

Cell death by LDH method, was determined 24 h after the addition of H₂O₂ using an LDH-cytotoxicity assay kit (Roche diagnostics following manufacturer's protocol).

2.3. Measurements of reactive oxygen species

Levels of intracellular ROS were measured using the fluorescent probe 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA). Briefly, cells were incubated for 30 min at 37 °C in the presence of 10 µM of H₂DCFDA (added from a 20 mM stock solution in dimethyl sulfoxide). H₂DCFDA diffuses across neuronal membranes, where acetates migrate via intracellular esterases. Oxidation of H₂DCFDA occurs almost exclusively in the cytosol, generating a fluorescent response proportional to ROS generation. After loading the dye, neurons were washed in a Locke's buffer and fluorescence was measured at a 488 nm excitation wavelength and an emission wavelength of 510 nm, using a PerkinElmer Victor 3 fluorometer.

2.4. Western-blot analysis

Aliquots of cell homogenate containing 15 µg of protein per sample were analyzed by Western blot. Briefly, samples were placed in sample buffer (0.5 M Tris–HCl pH 6.8, 10% glycerol, 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) 2-β-mercaptoethanol, 0.05% bromophenol blue) and denatured by boiling at 95–100 °C for 5 min. Samples were then separated by electrophoresis on 10% acrylamide gels, with proteins subsequently transferred to polyvinylidene fluoride sheets (ImmobilonTM-P, Millipore Corp., Bedford, MA, USA) using a transblot apparatus (BioRad). The membranes were blocked overnight with 5% non-fat milk dissolved in TBS-T buffer (Tris 50 mM; NaCl 1.5%; Tween 20, 0.05%, pH 7.5). They were then incubated with primary monoclonal antibodies against ser-9 GSK-3β (from Affinity BioReagents), pAkt (from Cell Signalling) and actin (1:1000, Santa Cruz Biotechnology). After 4 h or overnight, blots were washed thoroughly in TBS-T buffer and incubated for 1 h with a peroxidase-conjugated IgG antibody (Amersham Corp., Arlington Heights, IL, USA). Immunoreactive protein was visualized using a chemiluminescence-based detection kit and following the manufacturer's instructions (ECL kit; Amersham Corp.). Digital images were taken with a Chemidoc XRS (Biorad), which permits semi-quantitation of band intensity. The protein load was periodically monitored via immunodetection of actin.

2.5. Statistical analysis

Data are given as the mean ± S.E.M. of at least four experiments involving four to six independent cultures. In all experiments, data were analyzed by ANOVA followed by post hoc Tukey–Kramer multiple comparisons tests. *P*-values lower than 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. Comparative effects of Li⁺ and SB-415286 against H₂O₂-induced cytotoxicity

Light microscopic examination revealed that, compared to the untreated control (Fig. 1A), H₂O₂ caused progressive loss of cell morphology of B65 neuroblastoma cells. B65 cells were exposed to H₂O₂ (100–1000 μM) for 30 min and cell survival was assessed after 24 h, using the MTT method, which

measures the integrity of the cell membrane. Thus, decreased MTT reduction served as an indicator of cell injury resulting from mitochondrial damage. Specifically, the addition of H₂O₂ to B65 cells induced a significant decrease in cell survival in a dose-dependent manner, as measured by this method. For example, in the presence of H₂O₂ (for 24 h), the cell MTT viability values were as follows: 97.51% at 100 μM; 88.01% for 250 μM; 69.83% for 500 μM; 42.75% for 750 μM; 36.33% for 1 mM (Fig. 1B). When B65 cells were treated with H₂O₂ 1 mM in the presence (applied 30 min prior H₂O₂) of

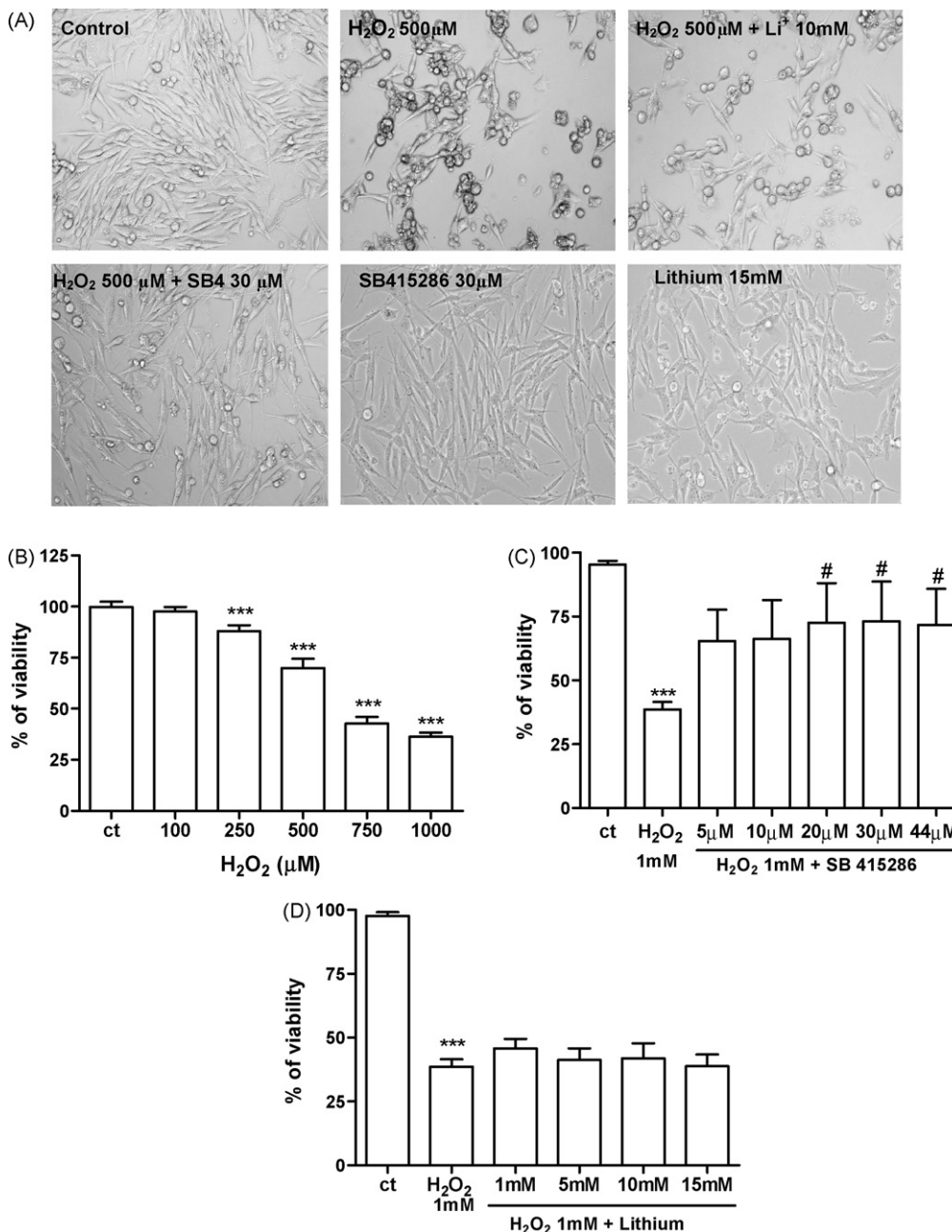


Fig. 1. (A) Morphological changes of B65 cells exposed to H₂O₂. Phase contrast microscopic analysis of B65 cells after 24 h treatment with 1 mM of H₂O₂ in the presence of Li⁺ and SB-415286. Calibration bar, 10 μm. (B) Viability of B65 cells (% respect to the control cells) after treatment with different concentrations of H₂O₂. B65 cells were treated with H₂O₂ (100–1000 μM). Viability was assessed after 24 h by an MTT assay. (C) SB-415286 (5–44 μM) attenuated B65 cell loss mediated by 1 mM H₂O₂. (D) Effects of Li⁺ (1–15 mM) on 1 mM H₂O₂-induced cell loss. Data are expressed as the mean ± S.D. from five independent experiments. *P < 0.05 compared with H₂O₂-treated cells.

SB-415286 (5–44 μM), our results revealed that SB-415286 exerted a protective effect in a concentration-dependent manner (Fig. 1C). On the other hand, treatment of B65 cells with different concentrations of lithium (1–15 mM) did not protect against H_2O_2 toxicity (Fig. 1D). Furthermore, when we evaluated the protective effects of SB-415286 (5–44 μM) on B65 cells treated with 1 mM H_2O_2 using the LDH leakage method, we did indeed find such an effect (Fig. 2A), with a maximal rescue occurring at a concentration of 44 μM (Fig. 2B). However, Li^+ did not prevent the cytotoxic effects of H_2O_2 , in agreement with the results obtained using the MTT method (data not shown).

CGN were treated with H_2O_2 concentrations ranging from 10 to 400 μM for 30 min at the end of which the agent was removed. We examined the cell viability at 24 h. H_2O_2 reduced CGN viability significantly in a concentration dependent manner, compared to the controls ($P < 0.01$) (Fig. 3A). The neuroprotective role of GSK-3 inhibitors against oxidative damage was investigated. Drugs were applied 30 min prior to the subsequent 1 h treatment with H_2O_2 in the continuing presence of the drugs. In the presence of SB-415286 (5–44 μM), the effect of 100 μM H_2O_2 was significantly attenuated ($P < 0.01$) (Fig. 3B). On the other hand, the significant reduction in viability with 100 μM H_2O_2 was unaltered in the presence of Li^+ (5–10 mM) (Fig. 3C).

3.2. Effects of Li^+ and SB-415286 in B65 cells on H_2O_2 -induced increase in intracellular reactive oxygen species levels

In $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ -loaded B65 neuroblastoma cells treated with H_2O_2 (100–1000 μM), fluorescence intensity increased in a dose-dependent manner, suggesting an increase in the generation of ROS (Fig. 4A). Exposure of B65 cells to the selective GSK-3 inhibitor SB-415286 (5–44 μM) caused a significant ($P < 0.01$) dose-dependent decrease in the fluorescence intensity of DCF (Fig. 4B). This result would indicate that the protective effects of SB-415286 against H_2O_2 toxicity are mediated by their antioxidant ability. On the other hand, treatment of B65 cells with lithium (1–15 mM) failed to prevent H_2O_2 -mediated ROS production. These data would suggest that only SB-415286 possesses antioxidant properties (Fig. 4C).

3.3. Effects of Li^+ and SB-415286 in cerebellar granule neurons on H_2O_2 -induced increase in intracellular reactive oxygen species

To evaluate whether the antioxidant effects of SB-415286 are cell dependent or stimuli dependent, we studied the effects of H_2O_2 in CGN (Fig. 5A). Thus, in Fig. 5B we show that SB-415286 exerts antioxidant effects in response to this stimulus in a dose-dependent manner. These data confirm the antioxidant properties of this drug obtained in B65 cells. On the other hand, cells treated with lithium (1–10 mM) failed to prevent H_2O_2 -mediated ROS production (Fig. 5C).

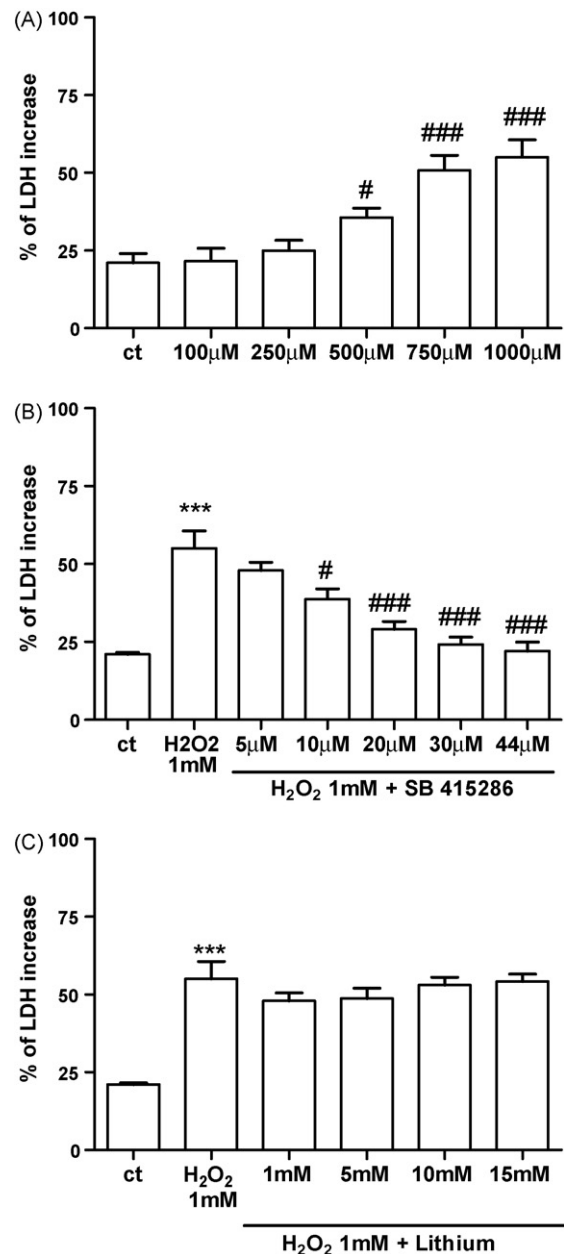


Fig. 2. (A) Viability of B65 cells after treatment with different concentrations of H_2O_2 . B65 cells were treated with H_2O_2 (100–1000 μM). Viability was assessed after 24 h by an LDH assay. (B) SB-415286 (5–44 μM) attenuated B65 cell loss mediated by 1 mM H_2O_2 . (C) Lithium did not prevent H_2O_2 -induced cell loss. Data are expressed as the mean \pm S.D. from five independent experiments. Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Tukey's tests: # $P < 0.05$; ### $P < 0.001$ compared with H_2O_2 -treated cells.

3.4. Role of GSK-3 in H_2O_2 -mediated ROS production

To determine whether lithium might inhibit GSK-3 activation in H_2O_2 -treated cells, immunoblot experiments were performed using an antibody directed against phospho-GSK-3 (Ser9). This allowed us to detect levels of inactive (phosphorylated) GSK-3 β . Following treatment with H_2O_2 , phospho-GSK-3 β levels decreased significantly within 24 h, which is consistent with rapid and prolonged GSK-3 activation (Fig. 6A). Lithium

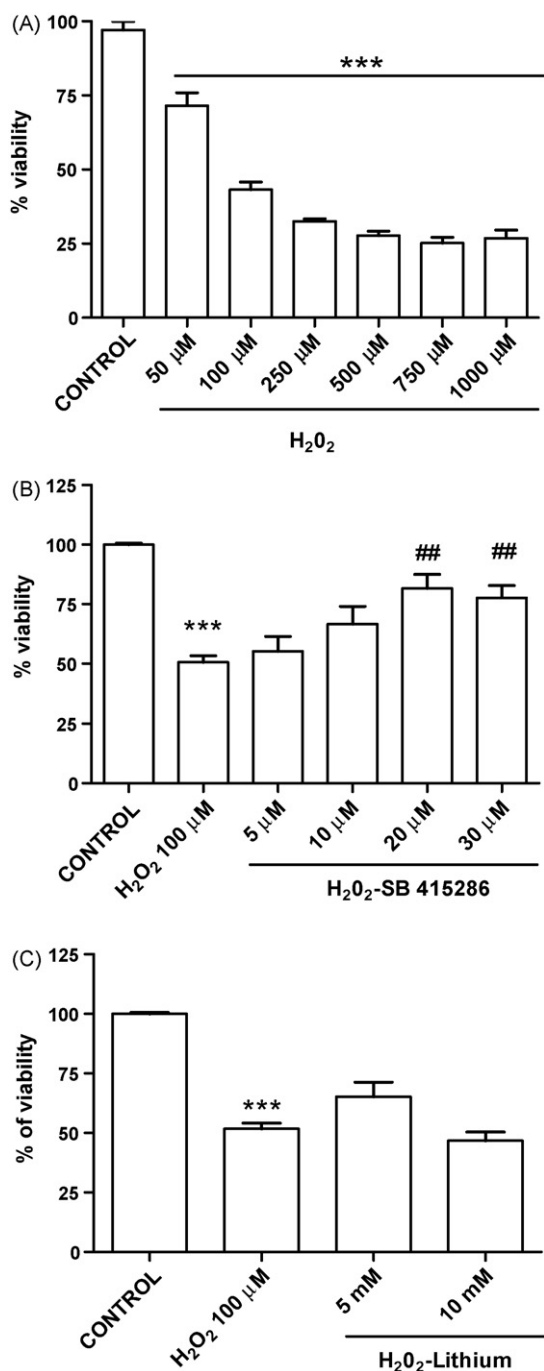


Fig. 3. (A) Viability of CGN after treatment with different concentrations of H₂O₂. CGN were treated with H₂O₂ (100–1000 μM). Viability was assessed after 24 h by an MTT assay. (B) SB-415286 (5–44 μM) attenuated cell loss mediated by 1 mM H₂O₂. (C) Effects of Li⁺ (5–10 mM) on 1 mM H₂O₂-induced cell loss. Data are expressed as the mean ± S.D. from five independent experiments. Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Tukey's tests. ****P* < 0.001 compared control cells. ###*P* < 0.001 compared with H₂O₂-treated cells.

treatment completely prevented GSK-3 dephosphorylation. When lithium was added to B65 cultures, it was able to induce inhibitory phosphorylation of GSK-3 (Fig. 6B). As expected, SB-415286 failed to attenuate phospho-GSK-3 levels, since GSK-3 inhibition occurs via the ATP inhibition. These data are in agreement with previous studies performed with Li⁺ in CGN

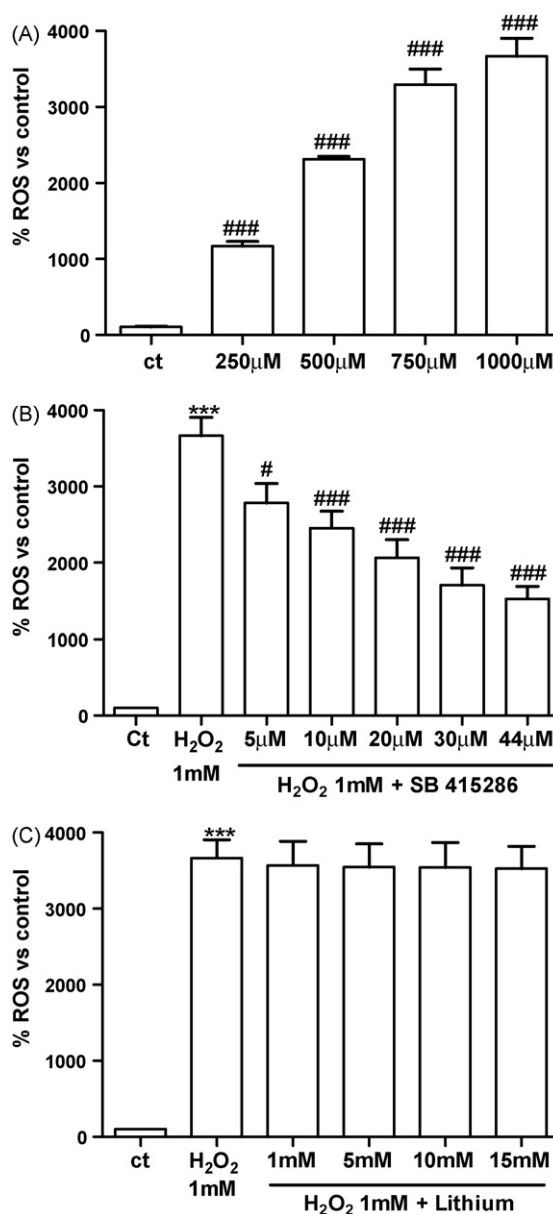


Fig. 4. (A) ROS production in H₂O₂-treated B65 cells. ROS accumulation was detected after B65 cells were treated with 1 mM H₂O₂ for 1 h. ROS production was expressed as the percentage increase of control group. (B) SB-415286 (5–44 μM) attenuated B65 ROS production as mediated by 1 mM H₂O₂. (C) However, Li⁺ (1–15 mM) did not attenuate ROS production mediated by 1 mM of H₂O₂. Data are expressed as the means ± S.E.M. of four independent experiments. Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Tukey's tests: ###*P* < 0.001 compared with H₂O₂-treated cells. ****P* < 0.001 compared with control cells.

(Yeste-Velasco et al., 2007) Likewise, we also demonstrated that lithium was able to activate the Akt pathway. Therefore, we suggest that this pathway plays no role in the protective properties of SB-415286 (Fig. 7A and B).

4. Discussion

It is widely accepted that oxidative stress is one of the main factors involved in neuronal loss (Zhu et al., 2006, 2007;

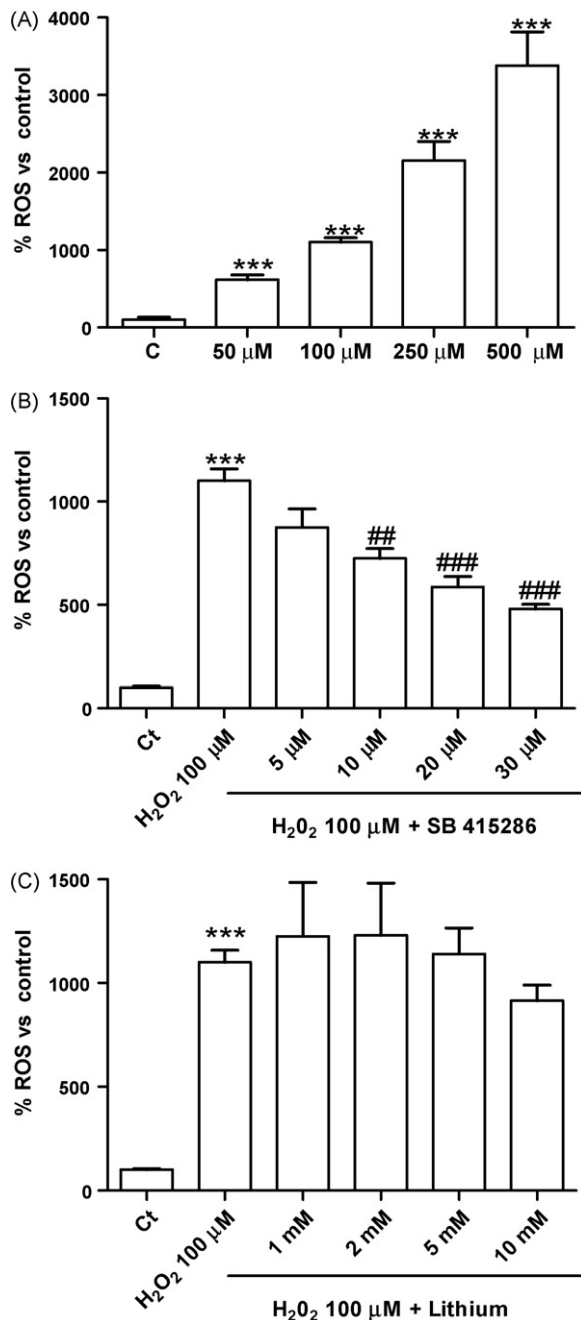


Fig. 5. (A) ROS production in H₂O₂-treated CGN. ROS accumulation was detected after CGN were treated with 1 mM H₂O₂ for 1 h. ROS production is expressed as the percentage increase of control group. Data are expressed as the mean \pm S.D. from four independent experiments. *** P < 0.001 compared control cells. (B) SB-415286 (5–44 μ M) attenuated ROS production in CGN mediated by 1 mM H₂O₂. Data are expressed as the means \pm S.E.M. of four independent experiments. ## P < 0.05; ### P < 0.001 compared with H₂O₂-treated cells. (C) However, Li⁺ (1–15 mM) did not attenuate ROS production mediated by 1 mM of H₂O₂.

Petersen et al., 2007). Thus, an effective neuroprotective drug must have antioxidant properties (Liu et al., 2007). In the current study, we present a new finding for the selective GSK-3 inhibitor SB-415286. Specifically, we demonstrate its antioxidant properties, which explain the protective effects afforded B65 cells and CGN against H₂O₂.

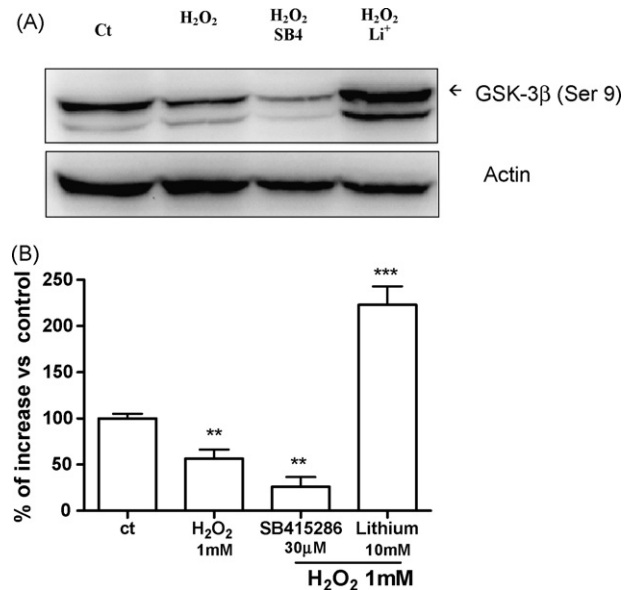


Fig. 6. (A) Treatment of B65 cells with 1 mM H₂O₂-induced GSK-3 β activation, which was prevented by 10 mM Li⁺. Changes in the band intensities were calculated as percentages of the control band intensity. (B) Columns and bars represent means \pm S.E.M. of three or four separate experiments with four different culture preparations. Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Tukey's tests: *** P < 0.05 vs. control and H₂O₂ treatment.

These data are of particular relevance since previous studies have widely implicated the activation of GSK-3 in AD pathology (Aghdam and Barger, 2007). Furthermore, research area of high interest in the treatment of neurodegenerative diseases is the synthesis and development of GSK-3 inhibitors.

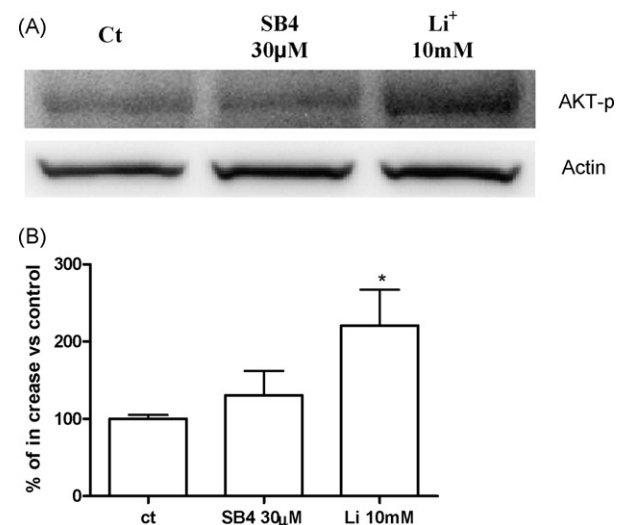


Fig. 7. (A) Western-blot analysis of the levels of loss of Akt phosphorylation, after treatment of B65 with H₂O₂, which was prevented by treatment cells with 10 mM Li⁺. Cultures were treated with H₂O₂ alone for 24 h. At the end of the treatments, cells were lysed and the cell lysates were subjected to immunoblot analysis with an antibody directed against Akt-p (see Section 2). (B) Changes in the band intensities were calculated as percentages of the control band intensity. Columns and bars represent means \pm S.E.M. of three or four separate experiments with four different culture preparations (n = 4). Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Tukey's tests: * P < 0.05 vs. control.

In this context, GlaxoSmithKline synthesized small selective maleimide derivatives, including SB-415286, which inhibits GSK-3 by preventing ATP binding (Facci et al., 2003). This drug may thus possess two potential mechanisms of action underlying its neuroprotective properties; namely, the inhibition of GSK-3, which not only prevents tau phosphorylation and apoptosis, but which has also shown antioxidant properties.

Under our experimental conditions, however, Li⁺ failed to exert any antioxidant effects. Likewise, the antioxidant properties of Li⁺, as well as the implication of GSK-3 in the regulation of antioxidant cell levels, remains an area of intensive research (Frey et al., 2006). Previous studies have demonstrated that, following chronic treatment of neuronal and neuronal-like cultures with Li⁺, this ion exhibits significant antioxidant effects (Wang et al., 2004; Shao et al., 2005; Lai et al., 2006). Furthermore, this effect stems from the increased expression and activity of antioxidant enzymes and/or proteins. It is widely known that glutathione is the major antioxidant molecule in the brain and plays a key role in defending against oxidative damage. Thus, Li⁺ increases glutathione levels in neurons, which may explain the antioxidant properties of this compound (Cui et al., 2007). However, in another study involving SH-SY5Y cells, Li⁺ and other inhibitors of GSK-3 exhibited protective properties against complex I inhibitors (intrinsic oxidative stress), although only Li⁺ protected against extrinsic oxidative stress (Schafer et al., 2004; King and Jope, 2005). Thus, these data suggest that GSK-3 inhibition is not involved in the antioxidant effects of Li⁺ as mediated by H₂O₂.

Other studies involving HT22N neurons demonstrated that Li⁺ exerts a protective, albeit slight, property against glutamate and H₂O₂ via the inhibition of GSK-3. In these experiments, acute treatment with Li⁺ was carried out, revealing this neuroprotective effect to be independent of antioxidant enzyme modulation. Likewise, in PC 12 cells GSK-3 inhibition was associated with a neuroprotective effect mediated by the GSK-3 inhibitor II (Lee et al., 2007). Moreover, in glial cell lines chronic Li⁺ or valproate treatment failed to ameliorate cytotoxicity induced by rotenone and H₂O₂ (Lai et al., 2006). Thus, it appears that the antioxidant properties of Li⁺ are both cell- and stimuli-dependent.

In our cellular models, we demonstrated that the antioxidant properties of SB-415286 are independent of cell type and stimuli, since this drug exhibited antioxidant properties in B65 and CGN treated with H₂O₂. Moreover, our study suggests that the antioxidant effects of SB-415286 are probably independent of GSK-3 inhibition. Our hypothesis is based in the fact that while H₂O₂ activates GSK-3, Li⁺ – in agreement with previous studies – inhibited the activation of this enzyme, thereby increasing the presence of the inactive form of GSK-3 (ser 9), although this did not prevent B65 cell loss. Another interesting point raised by our study is the evidence that lithium-induced Akt activation was unable to protect B65 cells from H₂O₂ toxicity. It is well known that the protein kinase Akt (also called protein kinase B) not only is activated by inositol lipids, but also is involved in cell survival via its capacity to phosphorylate several substrates, including GSK-3, BAD, CREB and others (Jope et al., 2007).

In summary, our findings have demonstrated a new pharmacological aspect of the protective effects provided by the GSK-3 inhibitor SB-415386: its antioxidant properties.

Acknowledgements

This study was supported by grants from Spain's Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2005-01604, SAF2006-13092), the Instituto de Salud Carlos III (PI 041300) and the Centros de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED). We are grateful to the Autonomous Government of Catalonia for supporting research groups (2005/SGR00893) and to the TV3 Marathon. We thank the Language Assessment Service of the University of Barcelona for revising the manuscript.

References

- Aghdam, S.Y., Barger, S.W., 2007. Glycogen synthase kinase-3 in neurodegeneration and neuroprotection Lessons from lithium. *Current Alzheimer Res.* 3, 21–31.
- Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C.J., McLauchlan, H., Klevernic, I., Arthur, J.S., Alessi, D.R., Cohen, P., 2007. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem. J.* 408, 297–315.
- Coghlan, M.P., Culbert, A.A., Cross, D.A., Corcoran, S.L., Yates, J.W., Pearce, N.J., Rausch, O.L., Murphy, G.J., Carter, P.S., Roxbee, C.L., Mills, D., Brown, M.J., Haigh, D., Ward, R.W., Smith, D.G., Murray, K.J., Reith, A.D., Holder, J.C., 2000. Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription. *Chem. Biol.* 7, 793–803.
- Cross, D.A., Culbert, A.A., Chalmers, K.A., Facci, L., Skaper, S.D., Reith, A.D., 2001. Selective small-molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity protect primary neurones from death. *J. Neurochem.* 77, 94–102.
- Cui, J., Shao, L., Young, L.T., Wang, J.F., 2007. Role of glutathione in neuroprotective effects of mood stabilizing drugs lithium and valproate. *Neuroscience* 144, 1447–1453.
- de Vasconcellos, A.P., Nieto, F.B., Crema, L.M., Diehl, L.A., de Almeida, L.M., Prediger, M.E., da Rocha, E.R., Dalmaz, C., 2006. Chronic lithium treatment has antioxidant properties but does not prevent oxidative damage induced by chronic variate stress. *Neurochem. Res.* 31, 1141–1151.
- Engel, T., Goni-Oliver, P., Lucas, J.J., Avila, J., Hernandez, F., 2006. Chronic lithium administration to FTDP-17 tau and GSK-3beta overexpressing mice prevents tau hyperphosphorylation and neurofibrillary tangle formation, but pre-formed neurofibrillary tangles do not revert. *J. Neurochem.* 99, 1445–1455.
- Facci, L., Stevens, D.A., Skaper, S.D., 2003. Glycogen synthase kinase-3 inhibitors protect central neurons against excitotoxicity. *Neuroreport* 14, 1467–1470.
- Frey, B.N., Valvassori, S.S., Reus, G.Z., Martins, M.R., Petronilho, F.C., Bordini, K., Dal-Pizzol, F., Kapczinski, F., Quevedo, J., 2006. Effects of lithium and valproate on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. *J. Psychiat. Neurosci.* 31, 326–332.
- Ghribi, O., Herman, M.M., Savory, J., 2003. Lithium inhibits Abeta-induced stress in endoplasmic reticulum of rabbit hippocampus but does not prevent oxidative damage and tau phosphorylation. *J. Neurosci. Res.* 71, 853–862.
- Goodenough, S., Conrad, S., Skutella, T., Behl, C., 2004. Inactivation of glycogen synthase kinase-3β protects against kainic acid-induced neurotoxicity in vivo. *Brain Res.* 1026, 116–125.
- Hongisto, V., Smeds, N., Brecht, S., Herdegen, T., Courtney, M.J., Coffey, E.T., 2003. Lithium blocks the c-Jun stress response and protects neurons via its action on glycogen synthase kinase 3. *Mol. Cell. Biol.* 23, 6027–6036.
- Jin, N., Kovacs, A.D., Sui, Z., Dewhurst, S., Maggirwar, S.B., 2005. Opposite effects of lithium and valproic acid on trophic factor deprivation-induced

- glycogen synthase kinase-3 activation, c-Jun expression and neuronal cell death. *Neuropharmacology* 48, 576–583.
- Jope, R.S., Johson, G.V.W., 2004. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem. Sci.* 29, 95–102.
- Jope, R.S., Yuskaitis, C.J., Beurel, E., 2007. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics. *Neurochem. Res.* 32, 577–595.
- King, T.D., Jope, R.S., 2005. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 protects cells from intrinsic but not extrinsic oxidative stress. *Neuroreport* 16, 597–601.
- Lai, J.S., Zhao, C., Warsh, J.J., Li, P.P., 2006. Cytoprotection by lithium and valproate varies between cell types and cellular stresses. *Eur. J. Pharmacol.* 539, 18–26.
- Lee, K.Y., Koh, S.H., Noh, M.Y., Park, K.W., Lee, Y.J., Kim, S.H., 2007. Glycogen synthase kinase-3 β activity plays very important roles in determining the fate of oxidative stress-inflicted neuronal cells. *Brain Res.* 1129, 89–99.
- Linseman, D.A., Cornejo, B.J., Le, S.S., Meintzer, M.K., Laessig, T.A., Bouchard, R.J., Heidenreich, K.A., 2003. A myocyte enhancer factor 2D (MEF2D) kinase activated during neuronal apoptosis is a novel target inhibited by lithium. *J. Neurochem.* 85, 1488–1499.
- Liu, Q., Xie, F., Rolston, R., Moreira, P.I., Nunomura, A., Zhu, X., Smith, M.A., Perry, G., 2007. Prevention and treatment of Alzheimer disease and aging: antioxidants. *Mini Rev. Med. Chem.* 7, 171–180.
- Machado-Vieira, R., Andreazza, A.C., Viale, C.I., Zanatto, V., Cereser, V., Vargas, R.S., Kapczinski, F., Portela, L.V., Souza, D.O., Salvador, M., Gentil, V., 2007. Oxidative stress parameters in unmedicated and treated bipolar subjects during initial manic episode: a possible role for lithium antioxidant effects. *Neurosci. Lett.* 421, 33–36.
- Moreira, P.I., Siedlak, S.L., Aliev, G., Zhu, X., Cash, A.D., Smith, M.A., Perry, G., 2005. Oxidative stress mechanisms and potential therapeutics in Alzheimer disease. *J. Neural Trans.* 112, 921–932.
- Pallas, M., Camins, A., 2006. Molecular and biochemical features in Alzheimer's disease. *Curr. Pharm. Des.* 12, 4389–4408.
- Petersen, R.B., Nunomura, A., Lee, H.G., Casadesus, G., Perry, G., Smith, M.A., Zhu, X., 2007. Signal transduction cascades associated with oxidative stress in Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* 11, 143–152.
- Schafer, M., Goodenough, S., Moosmann, B., Behl, C., 2004. Inhibition of glycogen synthase kinase 3 β is involved in the resistance to oxidative stress in neuronal HT22 cells. *Brain Res.* 1005, 84–89.
- Shao, L., Young, L.T., Wang, J.F., 2005. Chronic treatment with mood stabilizers lithium and valproate prevents excitotoxicity by inhibiting oxidative stress in rat cerebral cortical cells. *Biol. Psychiatry* 58, 879–884.
- Verdaguer, E., Jiménez, A., Canudas, A.M., Jorda, E.G., Sureda, F.X., Pallas, M., Camins, A., 2004. Inhibition of cell cycle pathway by flavopiridol promotes survival of cerebellar granule cells after an excitotoxic treatment. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308, 609–616.
- Wang, J.F., Shao, L., Sun, X., Young, L.T., 2004. Glutathione S-transferase is a novel target for mood stabilizing drugs in primary cultured neurons. *J. Neurochem.* 88, 1477–1484.
- Xie, Y., Liu, Y., Ma, C., Yuan, Z., Wang, W., Zhu, Z., Gao, G., Liu, X., Yuan, H., Chen, R., Huang, S., Wang, X., Zhu, X., Wang, X., Mao, Z., Li, M., 2004. Indirubin-3'-oxime inhibits c-Jun NH₂-terminal kinase: anti-apoptotic effect in cerebellar granule neurons. *Neurosci. Lett.* 367, 355–359.
- Yeste, M., Alvira, D., Verdager, E., Tajés, M., Folch, J., Rimbau, V., Pallas, M., Camins, A., 2007. Evaluation of acute antiapoptotic effects of Li(+) in neuronal cell cultures. *J. Neural Trans.* 114, 405–416.
- Yeste-Velasco, M., Folch, J., Trullas, R., Abad, M.A., Enguita, M., Pallas, M., Camins, A., 2007. Glycogen synthase kinase-3 is involved in the regulation of the cell cycle in cerebellar granule cells. *Neuropharmacology* 53, 295–307.
- Youdim, M.B., Arraf, Z., 2004. Prevention of MPTP (*N*-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) dopaminergic neurotoxicity in mice by chronic lithium: involvements of Bcl-2 and Bax. *Neuropharmacology* 46, 1130–1140.
- Zhong, J., Yang, X., Yao, W., Lee, W., 2006. Lithium protects ethanol-induced neuronal apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 350, 905–910.
- Zhong, J., Lee, W.H., 2007. Lithium: a novel treatment for Alzheimer's disease? *Expert Opin. Drug Saf.* 6, 375–383.
- Zhu, X., Perry, G., Moreira, P.I., Aliev, G., Cash, A.D., Hirai, K., Smith, M.A., 2006. Mitochondrial abnormalities and oxidative imbalance in Alzheimer disease. *J. Alzheimer's Dis.* 9, 147–153.
- Zhu, X., Su, B., Wang, X., Smith, M.A., Perry, G., 2007. Causes of oxidative stress in Alzheimer disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 2202–2210.

Publicació 5

**NEUROPROTECTION BY SP600125 AGAINST POTASSIUM
DEPRIVATION-INDUCED APOPTOSIS INVOLVES THE AKT
PATHWAY**

Marc Yeste-Velasco, Jaume Folch, Gemma Casadesús, Mark A. Smith, Mercè
Pallàs, Antoni Camins

Enviat a *Journal of Neurochemistry*

Neuroprotection by SP600125 against potassium deprivation-induced apoptosis involves the Akt pathway

Marc Yeste-Velasco¹, Jaume Folch², Gemma Casadesús³, Mark A. Smith⁴, Mercè Pallàs¹ and Antoni Camins¹.

¹Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia Facultat de Farmàcia, Institut de Biomedicina (IBUB), Centros de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED). Universitat de Barcelona. Nucli Universitari de Pedralbes. 08028 Barcelona, Spain.

²Unitat de Bioquímica, Centros de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili. C./ St. Llorenç 21 43201 Reus (Tarragona), Spain

³Department of Neurosciences. Case Western Reserve University School of Medicine, Cleveland OH 44106, USA.

⁴ Department of Pathology. Case Western Reserve University School of Medicine, Cleveland OH 44106, USA.

Correspondence to: Antoni Camins, Ph.D.
Institut de Biomedicina (IBUB), Centros de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia .

Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona,
Nucli Universitari de Pedralbes,
08028 Barcelona, Spain
camins@ub.edu

Abbreviations: c-Jun NH2-terminal kinase (JNK), cerebellar granule cells (CGNs), deprived of serum and potassium (S/K withdrawal), cyclin-dependent kinase 5 (cdk5/p35), glycogen synthase kinase-3 beta (GSK-3 β), reactive oxygen species (ROS)

Abstract

Increasing evidence implicates the c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) pathway in the regulation of apoptosis in neurodegenerative diseases. Here we examine the neuroprotective effect of SP600125, a selective JNK inhibitor, in cerebellar granule cells (CGNs) deprived of serum and potassium (S/K withdrawal). S/K withdrawal-induced apoptosis occurs via activation of multiple pro-apoptotic pathways, including re-entry into the cell cycle, activation of GSK-3 β , cdk5/p35 breakdown, formation of cdk5/p25 and JNK activation. Here we demonstrate that SP600125 could inhibit all these pro-apoptotic pathways via the inhibition of JNK, which also allow the maintenance of Akt activated. We detected that JNK inhibition maintains the phosphorylation/activation of Akt after S/K withdrawal. In order to confirm this result, we also studied several Akt downstream targets like GSK-3 β , p-FOXO1, p-CREB and cdk5/p35. Moreover, we detected that the specific PI3K/Akt inhibitor LY294002 attenuated the antiapoptotic effects of SP600125 on S/K withdrawal, confirming that Akt is involved in the neuroprotection achieved by SP600125. Furthermore, we propose that JNK could regulate the cell cycle re-entry by a novel mechanism that involves Akt, GSK-3 β and Rb phosphorylation. These results suggest that the maintenance of the PI3-kinase/Akt pathway activated by SP600125 treatment contributes to the prevention of apoptosis in cerebellar granule neurons mediated by S/K withdrawal.

Key words: SP600125, c-Jun NH₂-terminal kinase, Akt, GSK-3 β , cell cycle, E2F-1, cerebellar granule cells.

Introduction

Cell death is a prominent feature of the central nervous system both during development and in the adult, specifically in neurodegenerative disorders (Kuan and Burke, 2005; Camins et al. 2008). However, although cell death was believed to be the result of either apoptosis or necrosis, it is now widely accepted that a dynamic boundary exist between apoptosis and necrosis depending of mitochondrial ATP levels (Nicotera et al., 1999). During development a large number of neuronal cells die through apoptosis. Furthermore, apoptosis may be mimicked *in vitro* by depriving cultured cerebellar granule neurons (CGNs) of potassium and serum (S/K withdrawal), which induces chromatin condensation and cell shrinkage (D'Mello et al., 1993; Miller and Johnson, 1996). S/K withdrawal thus provides an excellent *in vitro* model of neuronal programmed cell death induced by trophic-factor deprivation (Verdaguer et al. 2005). Induction of apoptosis has been implicated in many neurodegenerative disorders, including Alzheimer's, Huntington's and Parkinson's disease (Nagy 2005; Zhu et al. 2004; Zhu et al. 2007). Therefore, elucidating and understanding the apoptotic signalling pathways underlying neurodegeneration may enhance future therapies for these disorders.

Many studies using S/K withdrawal have demonstrated the activation of multiple apoptotic pathways, for instance: a) re-entry into the cell cycle and induction of the transcription factor E2F-1 (O'Hare et al. 2000; Verdaguer et al. 2004; b) activation of GSK-3 β (Enguita et al. 2005; Yeste-Velasco et al. 2007); c) activation of cyclin-dependent kinase 5 (cdk5/p35) and its breakdown by calpain with formation of the apoptotic cdk5/p25 (Verdaguer et al. 2005); and finally, d) activation of the c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) pathway (Harris and Jonhson, 2001; Harris and Jonhson, 2002;

Harris et al. 2002; Hongisto et al.2003). Furthermore, mitochondrial alteration with the release of cytochrome c and the activation of caspases has also been demonstrated (Padmanabhan et al. 1999).

In this process of neuronal loss, and apart from the activation of apoptotic pathways, neurons also activate pro-survival pathways, specifically the PI3K/Akt signal transduction pathway (Luo et al. 2003; Song et al. 2005). Akt, a serine/threonine kinase, plays a prominent role in regulating neuronal cell survival. Akt activation is mediated through the stimulation of growth factor receptors on the surface of the cell membrane (Wang et al. 2005; Song et al. 2005). Once Akt is activated it inhibits apoptosis through multiple mechanisms, for example, by negatively regulating the phosphorylation and activation of the JNK/c-Jun pathway (Luo et al. 2003). Therefore, targeting the Akt signalling pathway could be a potential therapeutic strategy for the treatment of neurodegenerative diseases.

Moreover, several studies have demonstrated the efficacy of drugs that inhibit a number of apoptotic pathways; these drugs include roscovitine and flavopridol inhibitors of cdk5 and the cell cycle (Verdaguer et al. 2004; Verdaguer et al. 2005), SB415286, a specific GSK-3 β inhibitor (Enguita et al. 2005; Yeste-Velasco et al. 2007), and CEP-1347, an ATP-competitive inhibitor of mixed-lineage kinases (MLKs, which function as an MAPKKK of the JNK pathway) (Harris and Johson, 2002; Harris et al. 2002). Most pro-death pathways mainly occur inside the cytoplasm, activated upstream of mitochondria. They are also highly complex: for example, under physiological conditions cdk5 and its coactivator p35 show a pro-survival effect, whereas stimulation of cdk5/p35 and its breakdown to cdk5/p25 induces apoptosis (Bogush et al. 2007).

Targeting the JNK pathway with specific drugs may improve neuronal viability and constitute a potential target for the treatment of neurodegenerative diseases (Wang et al. 2004; Kuan and Burke, 2004; Walmeier et al. 2006). In this respect, both *in vitro* and animal studies point to the application of CEP-1347 as a potential drug for the treatment of Parkinson's disease (Wang et al. 2004; Silva et al 2005). However, recent data indicate that CEP-1347 is ineffective in the treatment of Parkinson's disease. The inefficacy of this drug in clinical trials could be due to many reasons (see Waldmeier et al., 2006; Parkinson Study Group Precept, 2007). Further research is needed to identify the mechanisms underlying JNK signalling inhibition that induce neuroprotection. To this end, more selective JNK inhibitors such as SP600125 have been developed. This compound is a reversible inhibitor of the JNK pathway that competes for ATP binding sites (Kuan et al. 2005; Xifrò et al. 2006). The neuroprotective effects of this drug are due to the down-regulation of genes related to apoptosis, for example, Bax, Bim and Dp5 (Shi et al. 2005; Ma et al. 2007). However, neuronal apoptosis is highly complex and multiple signals are activated upstream the mitochondria, and therefore the mechanism of neuronal protection based on JNK inhibitors remains unclear.

Recent data suggest a potential cross-talk between JNK and Akt (Shimoke et al. 1999; Hongisto et al., 2003; Wang et al. 2005; Song et al. 2005). Since Akt activation has an important role in regulating neuronal survival, we examined whether the inhibition of JNK in CGNs with SP600125 results in an interaction with this pro-survival pathway. We demonstrated that SP600126 maintains Akt activated, which in turn has an effect in Akt downstream targets, like glycogen synthase kinase-3 beta (GSK-3 β) which is inhibited, and also that it inhibits Rb phosphorylation that prevents the expression of proteins involved in the process of re-entry into the cell cycle. Moreover, other Akt

substrates such as p-FOXO1 (Ser256), p-CREB (Ser133) and p35 were also affected after the specific inhibition of JNK by SP600125.

Materials and Methods

Drugs used in this study include: SP600125, LY294002, MK-801, resveratrol, propidium iodide (PI) from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, U.S.A.), 4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl) pyrazolo [3,4-d] pyrimidine (PP2) and 4-amino-7-phenylpyrazolo[3,4-d]-pyrimidine (PP3) from Calbiochem. K252a was from Fluka, while cell culture media and fetal calf serum were from GIBCO (Life Technologies, Paisley, UK). Cell culture salts, enzymes and Triton X-100 were purchased from Sigma. Other chemical reagents of analytical quality were purchased from Scharlab (Barcelona, Spain).

Cell cultures

Primary cultures of cerebellar granule neurons were prepared from postnatal day 7 Sprague-Dawley rat pups, as described previously (Alvira et al. 2007). Cells were dissociated in the presence of trypsin and DNase I and plated in poly-L-lysine (100 µg/ml)-coated dishes at a density of 8×10^5 cells/cm² in Eagle's basal medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 0.1 mg/ml gentamicin, 2 mM L-glutamine, and 25 mM KCl. Cytosine-D-arabino-furanoside (10 µM) was added to the culture medium 16-18 h after plating to prevent the replication of non-neuronal cells. The cultures were maintained at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂, 95% air and left undisturbed until the experiments were performed. All procedures involving animals and their care were approved by the Ethics Committee of the

University of Barcelona, and were conducted in accordance with national (Spanish) and international laws.

Treatment of CGNs

After 7-8 days in culture the medium in which cerebellar granule cells were grown (serum and potassium) was replaced with either fresh unconditioned serum-free medium containing 5 mM potassium (S/K withdrawal) or one of the following: the c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) inhibitor SP600125, from which stock solutions (20 mM) were prepared in DMSO and stored at -20°C; LY294002, from which stock solutions (14.5 mM) were prepared in DMSO and stored at -20°C; K252a, from which stock solutions (1.07 mM) were prepared in DMSO and stored at -20°C; MK-801, from which stock solutions (2.96 mM) were prepared in ethanol and stored at -20°C; PP2 and PP3, from which stock solutions (3.31 mM) were prepared in DMSO and stored at -20°C; or resveratrol, from which stock solutions (5 mM) were prepared in ethanol and stored at -20°C.

Propidium Iodide staining

PI staining was used to detect morphological evidence of apoptosis. CGNs were grown on culture plates and subjected to S/K withdrawal treatment, either alone or in the presence of drugs. Subsequently, cells were fixed in 4% paraformaldehyde/phosphate buffered saline solution (PBS) pH 7.4 for 1 h at room temperature. After washing with PBS, the cells were incubated for 3 min with a solution of PI in PBS (10 µg/ml). Stained cells were visualized under UV illumination using the 20x objective and their digitized images were captured.

Treatment of apoptotic cells resulted in shrunken, brightly fluorescent, apoptotic nuclei exhibiting high fluorescence and condensed chromatin compared with non-apoptotic cells. Apoptotic cells were awarded a score by counting at least 500 cells in each sample over three separate experiments.

Analysis of DNA fragmentation by flow cytometry

Apoptosis was measured 12 h after S/K withdrawal. Flow cytometry experiments were carried out using an Epics XL flow cytometer with propidium iodide (PI, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) added 1 h beforehand. The instrument was set up in the standard configuration: excitation of the sample was conducted using a 488 nm air-cooled argon-ion laser at 15 mW as a standard. Forward scatter, side scatter and PI red (620 nm) fluorescence values were then acquired. Optical alignment was based on the optimized signal from 10 nm fluorescent beads (Immunocheck, Epics Division). Time was used as a control to stabilize the instrument, while red fluorescence was projected onto a 1024 monoparametric histogram. Aggregates were excluded and single cells were gated by individual area vs. peak signal fluorescence.

Production of reactive oxygen species (ROS)

Levels of intracellular ROS were measured using the fluorescent probe 2, 7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H_2DCFDA). Briefly, cells were incubated for 1h at 37 $^\circ\text{C}$ in the presence of 10 μM of H_2DCFDA (added from a 10 mM stock solution in DMSO). H_2DCFDA diffuses across neuronal membranes, where acetates migrate by intracellular esterases. Oxidation of H_2DCFDA occurs almost exclusively in the cytosol and generates a fluorescent response that is proportional to ROS generation. After loading with the dye, fluorescence was measured in a Perkin-Elmer Victor 3 fluorimeter at an excitation wavelength of 488 nm and an emission wavelength of 510 nm.

Protein expression

Aliquots of cell homogenate (containing 25 µg of protein per sample) were analyzed by Western blot. Briefly, samples were placed in sample buffer (0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 10% glycerol, 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) 2-β-mercaptoethanol, 0.05% bromophenol blue) and denatured by boiling at 95-100 °C for 90 s. Samples were then separated by electrophoresis on 10% acrylamide gels, with proteins subsequently transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) sheets (Immobilon™-P, Millipore Corp., Bedford, MA, U.S.A.) using a transblot apparatus (BioRad). The membranes were blocked for 1 h at RT with 5% non-fat milk dissolved in TBS-T buffer (Tris 50 mM; NaCl 1.5%; Tween 20, 0.05%, pH 7.5). They were then incubated with primary monoclonal antibodies against E2F-1, which were used at a 1:200 dilution, and cyclin E at 1:500 (from Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A.), P-c-Jun (Ser73) at 1:1000, cyclin D1 at 1:500, P-pRb (Ser780) at 1:500, p-Akt (Ser473) at 1:1000, total Akt at 1:1000, p-GSK-3β (Ser9) a 1:1000, total GSK-3β at 1:1000, P-FOXO1 (Ser256) at 1:1000, p-CREB (Ser133) at 1:1000 and p35 at 1:1000 (all from Cell Signaling) and β-actin at 1:20000 (from Sigma). After 3 h at room temperature or overnight at 4°C (Cell Signaling antibodies), blots were washed thoroughly in TBS-T buffer and incubated for 1 h with a peroxidase-conjugated IgG antibody (Amersham Corp., Arlington Heights, IL, U.S.A.). Immunoreactive protein was visualized using a chemiluminescence-based detection kit according to the manufacturer's instructions (ECL kit; Amersham Corp.). Digital images were taken with a Chemidoc XRS (Biorad), which enables semi-quantitation of band intensity. The protein load was periodically monitored by staining the blot membrane with Ponceau S or via immunodetection of β-actin.

Reverse transcriptase PCR

Total RNA was extracted from CGNs using Trizol reagent from the Invitrogen Corporation (Carlsbad, USA). The isolated RNA was then treated with amplification grade DNase I in order to remove contaminant genomic DNA (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA). First-strand cDNA was reverse transcribed from 2 µg of total RNA using a First-Strand Synthesis System kit from the Invitrogen Corporation (Carlsbad, USA). The same amounts of cDNA were subsequently used for the PCR amplification (39 cycles; 95°C for 1 min, 60°C for 1 min and 72 °C for 2 min each cycle) using a RedTaq SuperPak DNA polymerase kit from Sigma (Saint Louis, USA). The rat-specific E2F-1 PCR primers (forward: 5'-ACT CAG CTG ATG GTG TTG TTG A-3'; reverse: 5'-GGA CAT TGG TGA TGT CAT AGA TGC-3') were used to generate a fragment of 86 bp, Bax PCR primers (forward: 5'-AAG AAG CTG AGC GAG TGT CTC-3'; reverse: 5'-CCA GTT GAA GTT GCC ATC AGC-3') were used to generate a fragment of 150 bp, and DP5 PCR primers (forward: 5'-TTC CGT ATC TGT GCA TGC CTG-3'; reverse: 5'-CAA AGT CTC AGA GTT CAC ATC G -3') were used to generate a fragment of 80 bp. The expression of β-actin mRNA was used as a standard. β-actin primers (forward: 5'-ATG GAT GAC GAT ATC GCT GCG -3'; reverse: 5'-CAG GGT CAG GAT GCC TCT CTT-3') were used to generate a PCR product of 200 bp; these primers were designed to cross a large expanse of intronic sequence between exons 2 and 3 of the rat gene. The non-reactivity of the primers with contaminating genomic DNA was tested by the inclusion of controls that omitted the reverse transcriptase enzyme from the cDNA synthesis reaction (RT-negative controls). The PCR products were separated on a 2% agarose gel. The lack of primer dimerization or non-specific PCR product bands was also tested.

Real-time PCR quantification using SYBR Green

Relative gene expression was quantized by real-time quantitative PCR using the ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.). Real-time PCR was carried out using a SYBR Green PCR kit (QuantiTect SYBR Green PCR Kit, QIAGEN). Thus, primer concentration and PCR melting temperature were adjusted to avoid unspecific PCR products, as SYBR Green binds unspecifically to each double-strand DNA product formed during amplification. The optimum temperature is that which gives the maximum reading for the specific product when the non-specific product can no longer be detected.

Once the optimum temperature had been determined, quantitative PCR was carried out using the following thermal cycling programme. Stage 1 was undertaken at 95°C for 15 min. Stage 2 consisted of three steps: 95°C for 15 s; 60°C for 30 s; and 72°C for 30 s. Stage 2 was repeated 40 times. The relative mRNA expression was calculated by the standard curve method. In brief, β -actin and E2F-1, Bax or Dp5 gene amplifications were run in separate tubes. Standard curves were obtained for all genes by using decreasing amounts of cDNA template. PCR reactions were performed in duplicate for standard curves, whereas samples were tested in triplicate, at a final volume of 25 μ l in all cases. For each cDNA template, the cycle threshold (Ct) necessary to detect the amplified product was determined and semi-logarithmic standard plots were drawn (Ct vs. amount of cDNA). The cDNA concentrations in the samples were interpolated from the semi-logarithmic standard plots and normalized to the cDNA concentration of the control gene, β -actin.

Non-reactivity of the primers was tested by the inclusion of controls that omitted the cDNA template (which was replaced by buffer). Genomic DNA contamination was tested by the inclusion of total RNA samples from RT-PCR reactions lacking the

reverse transcriptase enzyme. All the samples were tested for the absence of unspecific PCR products by analyzing a melting temperature profile using the Model 7700 sequence detector. The program consisted of stage 1, 95°C for 1 min; stage 2, 60°C for 1 min, followed by an increase in temperature up to a final temperature of 95°C at stage 3 with a 19 min ramp time. Fluorescence data were collected for each PCR reaction and melting graphs were drawn to confirm the presence of a single specific product.

Statistical analysis

Data are given as the mean \pm S.E.M. of at least three or four experiments. In all the experiments, the data were analyzed using ANOVA followed by Tukey-Kramer multiple comparisons test. P-values lower than 0.05 were considered significant.

Results

SP600125 prevents S/K withdrawal-mediated apoptosis in cerebellar granule cells and c-jun phosphorylation

CGNs require high levels of potassium and serum for continued survival in culture (D'Mello et al. 1993). When cell culture medium is replaced by a low potassium (5 mM) and serum-free medium, CGNs die by apoptosis (Verdaguer et al. 2005). First, we determined the effective concentrations of SP600125 in order to obtain an optimal inhibition of apoptosis, measured by counting condensed nuclei after staining the nuclei with PI. Following S/K withdrawal, approximately 55-60% of CGNs show condensed chromatin (Fig 1A). In the presence of increasing concentrations of SP600125, the nuclear condensation of CGNs was prevented. Photomicrographs of phase contrast of CGNs after S/K withdrawal showed loss of cell viability and treatment with SP600125

10 μ M suppressed neuronal death, and that neuronal integrity was comparable to that of control neurons (Fig 1A). Furthermore, DNA fragmentation evaluated by flow cytometry was also attenuated by SP600125 (Fig 1B).

Previous studies suggest that transactivation of c-Jun through JNK-dependent phosphorylation is essential for S/K withdrawal-induced apoptosis in CGNs (Harri et al. 2001; Wang et al 2004; Becker et al. 2004). Therefore, we confirmed the effects of SP600125 on c-Jun phosphorylation using a specific antibody against (ser73). Western blot data showed that the level of c-Jun phosphorylation increased significantly 4 h after S/K withdrawal and that the JNK inhibitor at a concentration of 10 μ M blocked c-Jun phosphorylation (Fig 2A).

Furthermore, and in agreement with previous studies, SP600125 at a concentration of 10 μ M inhibited the expression of pro-apoptotic genes such as Bax (a pro-apoptotic protein belonging to the family of Bcl-2 proteins) which promotes apoptosis through mitochondrial alteration and release of cytochrome c, and Dp5 (a c-Jun target gene that promotes apoptosis in CGNs induced by S/K withdrawal) (Harris et al. 2001; Ma et al. 2007) (Fig 2B and C).

SP600125 maintains Akt activated

Previously was reported that S/K withdrawal induced apoptosis is in part mediated by the inhibition of the PI3-K/Akt survival pathway (D'Mello 1997). Therefore we decided to study if the SP600125 antiapoptotic effect also affects the activation of Akt. To verify this hypothesis, we determined the phosphorylation of Akt Ser473. Treatment of CGNs with S/K withdrawal induced a decrease of p-Akt levels that was abolished by treatment of CGNs with SP600125 10 μ M (Fig 3).

In order to confirm that Akt is maintained activated by SP600125, we decided to study several Akt downstream targets. First we studied GSK-3 β , which is known to be phosphorylated at serine 9 by Akt. This phosphorylation inhibits GSK-3 β . Treatment of CGNs with S/K withdrawal induced a decrease of p-GSK-3 β levels that was abolished by treatment of CGNs with SP600125 10 μ M (Fig 3). Therefore, this result confirms that Akt remains activated after JNK inhibition.

The regulation of programmed cell death by Akt could be mediated mainly by two processes: one directly by a mechanism of phosphorylation or interactions with cell death proteins and another indirectly through the regulation of transcriptional factors responsible for the expression of pro- or anti-apoptotic proteins (Luo et al. 2003; Song et al. 2005). Therefore, we investigated whether the protective effects of SP600125 may target or inhibit indirect signalling of Akt. We studied the expression of Forkhead protein (FoxO), specifically p-FOXO1 (Ser256), a transcription factor that promotes apoptosis but which, when it is phosphorylated by Akt, translocates to the cytoplasm and does not exert its function. We also studied the cyclic AMP response element-binding protein (CREB), specifically p-CREB (Ser133), which promotes neuronal survival when is phosphorylated. Our results suggest that 12 h of S/K withdrawal treatment inhibits p-FOXO1-Ser256 and p-CREB-Ser133 phosphorylation, while treatment with 10 μ M of SP600125 prevents this dephosphorylation inhibition (Fig 3). The phosphorylation of both proteins when CGNs were treated with SP600125 could also explain, in part, the neuroprotective properties of this drug in this apoptotic model, and again confirms that Akt remains activated by SP600125.

As regards CDK5, another cyclin-dependent kinase that is involved in the process of neuronal apoptosis (Camins et al., 2008), it has recently been demonstrated that Akt is

involved in the direct regulation of CDK5 activity through the increase of p35 protein expression, which activates CDK5 (Bogush et al., 2007). Thus, the next experiments we carried out sought to investigate further whether SP600125 could prevent cdk5/p35 breakdown and the formation of pro-apoptotic cdk5/p25. Here Western blot analysis showed that SP606125 increased the p35/p25 ratio and prevented the breakdown of CDK5/p35 (Fig 3).

Finally, to determine whether Akt is involved in SP600125 neuroprotection, we subjected CGNs to a neuroprotective treatment in the presence of LY294002 after S/K withdrawal. The PI3K/AKT inhibitor in part counteracted the antiapoptotic effects of SP600125 against S/K withdrawal, this being demonstrated by the significant increase ($P < 0.05$) in DNA fragmentation and the number of condensed nuclei (Fig 4).

Evaluation of potential pathways involved in maintaining Akt activated by SP600125 treatment

In order to elucidate the mechanism by which SP600125 maintains Akt activated, we studied previously-recognized pathways that activate Akt. For example, it is known that the PI3K pathway can be activated by several ligands such as NMDA, neurotrophic factors, insulin and others (Wang et al. 2005).

To determine whether the antiapoptotic effects of SP600125 are due to interaction with neurotrophin receptors, we used K252a, a potent TrkB inhibitor (Wang et al. 2005). Treatment of CGNs with S/K withdrawal in the presence of SP600125 was, however, not altered by this compound (Fig 5A).

Activation by N-methyl-D-aspartate leads to the activation of PI3K and the phosphorylation of Akt in CGNs. To investigate the involvement of NMDA receptor

activation in the neuroprotective effects of SP600125 we used MK-801, an antagonist of this receptor. Nonetheless, the antiapoptotic effect of SP600125 against S/K withdrawal was not influenced by this treatment (Fig 5A).

The Akt protein can also be activated by Src family tyrosine kinases (Crossthwaite et al., 2004). We assessed the role of Src family signalling pathways using PP2, a known Src family inhibitor. As shown in Figure 5A, PP2 and PP3 (the negative control) were not effective at repressing the neuroprotective effects of SP606125 on S/K withdrawal.

It is well known that PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10) is a negative regulator of (PI3K)/Akt pathway. Therefore, we examined if SP600125 blocked Akt inhibition through PTEN regulation. Treatment of CGNs with SP600125 was observed not significantly alter the expression of PTEN protein (Kyrylenko et al. 1999) (Fig 5B).

Taken together, these data rule out the activation of NMDA receptors, TrkB receptors, the Src pathway and PTEN in the mechanism of maintaining Akt activated by SP600125.

SP600125 inhibits the expression of cell cycle proteins mediated by S/K withdrawal

It has been shown that the over-expression of transcription factor E2F-1 induces apoptosis in CGNs, as well as in other cells, and neuronal cultures from mice lacking this transcription factor are protected from neurotoxic stimuli (Hou et al. 2001; O'Hare et al., 2000; Konoshi et al. 2003). Likewise, the hypothesis regarding the role of cell cycle re-entry in neuronal apoptosis is supported by the fact that cyclin-dependent kinase inhibitors (such as flavopiridol and roscovitine) protect CGNs from S/K withdrawal treatment (Padmanbhan et al. 1999). It is known that JNK could regulate

cell cycle through the phosphorylation and activation of c-Jun (Wisdom 1999). Therefore, it is possible that part of the neuroprotective properties of SP600125 is due to the inhibition of the cell cycle. Our Western blot data showed an increase in the expression of pRb phosphorylation at 2 h of S/K withdrawal, which was prevented by SP600125 (Fig 6A). The next experiments we performed sought to determine whether the SP600125 also affect the expression of other cell cycle proteins. Western blot analysis of cyclin D, cyclin E and E2F-1 showed a significant increase in the expression levels of both cyclins after 12 h of treatment with S/K withdrawal, and this was significantly prevented by the addition of 10 μ M of SP600125 to cell cultures (Fig 6A).

When E2F-1 is released from Rb, it can activate several genes that are necessary for transcription and protein synthesis during the S phase; moreover, E2F-1 is also an apoptotic factor. Since the transcription factor E2F-1 is, by itself, sufficient to induce neuronal apoptosis we also evaluated the effect of SP600125 on mRNA levels of the E2F-1 gene in CGNs after S/K withdrawal. We found that the mRNA level was up-regulated 4.7-fold after potassium/serum deprivation, but only 2.5-fold when CGNs were deprived in the presence of SP600125 at a concentration of 10 μ M (Fig 6B). Therefore, our results suggest that the expression of the proapoptotic E2F-1 gene is down-regulated by SP600125, and that this drug may interfere with the apoptotic function of E2F-1 by inhibiting its expression.

Effects of SP600125 on intracellular oxidative stress production

Oxidative stress is a common intracellular target in all neurodegenerative diseases (Camins et al. 2008). Furthermore, it has been hypothesised that oxidative stress constitutes a key component of the process of re-entry into the cell cycle. Therefore, we studied whether the antiapoptotic effects of SP600125 on CGNs may be due, in part, to

an antioxidant effect of this drug. To this end, we evaluated ROS production after 12 h of S/K withdrawal in the presence of 100 μ M of resveratrol, a known antioxidant that we used as a positive control, and SP600125 (Fig 7). Our results demonstrated a significant increase in oxidative stress production that was prevented by resveratrol; however, SP600125 did not show any antioxidant effect. Thus, the neuroprotective effects of SP600125 are not related to the inhibition of oxidative stress.

Discussion

This study provides evidence for a link between JNK inhibition and the maintenance of Akt activated that may explain, in part, the antiapoptotic effects of SP600125 against S/K withdrawal toxicity in CGNs. Furthermore, we examined the role of JNK signalling in S/K withdrawal, which induces cell death in CGNs *in vitro*. Both *in vivo* and *in vitro* reports have indicated that JNK plays an important role in stress-induced apoptosis, since the activation of JNK has been implicated in experimental models of neuronal cell death. For example, several studies have shown that JNK is required for NGF withdrawal-induced apoptosis of PC12 cells (Harris and Johnson 2002; Harris et al. 2003), while JNK inhibitors protect CGNs from potassium deprivation-induced apoptosis (Harris and Johnson 2001; Harris and Johnson 2001), from ischemia-induced apoptosis (Borsello and Forloni, 2007) and from MPTP neurotoxicity (Wang et al. 2004). Therefore, the c-Jun N-terminal kinases may represent a potential target in the treatment of neurodegenerative diseases (Kuan and Burke; 2005). Moreover, CEP-1347 has been administered to humans in clinical trials with Parkinson's disease (Silva et al. 2005). New synthetic drugs are both ATP-competitive and non-competitive JNK inhibitors that have shown neuroprotective efficacy in neuronal cell preparations, as well as in laboratory animals (Harris and Johnson, 2002; Wang et al. 2004; Xifró et al.

2006). In addition, it appears that the role of JNK activation may be vital to our understanding of the mechanisms underlying S/K withdrawal-induced cell death.

c-jun promotes neuronal cell death by regulating the expression of proteins involved in the mitochondrial process of apoptosis, for example, the BH3-only protein members BIM and Dp5 (Harris and Johnson, 2001). Furthermore, the proapoptotic protein Bax is also implicated in the apoptotic route orchestrated by JNK activation. Bax induces apoptosis through the mitochondrial release of proteins such as cytochrome c into the cytosol. In this context, and in agreement with previous studies, we observed that S/K withdrawal increases the levels of mRNA Bax and the BH3-only protein Dp5 that were blocked by SP606125, thus preventing the mitochondrial alteration (Harris and Johnson, 2001; Harris and Johnson 2002).

As we coment above, JNK activation mediated neuronal apoptosis by activation of the mitochondrial pathway. However, in the apoptotic process prosurvival pathways are inactivated such as Akt. Thus we decided to study if JNK inhibition could activate prosurvival pathways and also inhibit additional pro-death pathways. Our experiments showed that SP600125 mantained Akt activated (phosphorylated at Ser- 473). This result is supported by the evidence that several Akt targets such as Ser9 P-GSK-3 β (inactivated form) are increased, confirming that Akt is maintained activated. The PI3K/Akt pathway also could regulate the apoptotic process by an indirect modulation of the transcription factors responsible for the expression of pro- or anti-apoptotic molecules. To confirm our hypothesis, we studied in depth the effects of Akt activation by SP600125 in terms of promoting neuronal survival through the inhibition pro-death pathways (specifically, FOXO, CREB). The present data suggest that SP606125 increases the phosphorylation of the Forkhead protein (FoxO) isoform p-FOXO1 at

Ser256 (a direct target of Akt), and once phosphorylated it remains in the cytoplasm, thus preventing the expression of pro-apoptotic proteins induced by FOXO such as Bim (Bcl-2 interacting member of cell death). Furthermore, we also found that SP600125 via Akt activation phosphorylates CREB in Ser133, which is another signal implicated in neuronal survival through multiple pathways (Song et al. 2005). Taken together, these data strongly suggest that activation of the PI3K/Akt pathway might contribute to the neuroprotective effects of this compound.

Recently, Li et al. (2003) propose that cdk5 was responsible for Akt activation, which would explain its neuroprotective properties (Song et al. 2005; Wang et al. 2005). Here, we suggest that SP600125 prevents cdk5/p35 breakdown via Akt activation. Thus, our data are consistent with the recent hypothesis that Akt is involved in the regulation of cdk5/p35 (Bogush et al., 2007).

To confirm our hypothesis regarding the role of Akt in the neuroprotective properties of JNK inhibition we evaluated the effects of SP600125 against S/K withdrawal in the presence of PI3K/Akt inhibitor LY294002. Thus, in the presence of the pharmacological inhibitor LY294002 the neuroprotection was partially lost, demonstrating SP600125 neuroprotective effects are in part due to the maintenance of Akt activated. However, it should be noted that LY294002 did not completely abrogate the antiapoptotic effects of the JNK inhibitor, thus suggesting that Akt activation contributes to these neuroprotective effects but that it is not the only pathway involved in the neuroprotective properties of the JNK inhibitor.

We also sought to elucidate the potential mechanisms by which SP600125 could maintain Akt activated. In this regard, previous studies have reported that calcium signalling activates Akt through NMDA receptors. However, our results using MK-801,

an NMDA receptor antagonist, suggest that the NMDA receptor is not involved in SP600125 neuroprotective effects. On the other hand, there is growing evidence that neurotrophins act on CGNs throughout binding to tyrosine-kinase receptors and that phosphorylation of Akt by BDNF is mediated by TrkB receptors (Wang et al. 2005). Here we showed that the TrkB receptors did not play a prominent role in Akt activation mediated by SP600125, because K252a, an antagonist of these receptors, did not exert any effect in terms of counteracting the protective effects of SP600125.

PTEN is a lipid phosphatase that plays a role in cell survival and apoptosis by negatively regulating phosphoproteins in the PI3K/Akt pathway (Kyrylenko et al. 1999; Zhang et al. 2007). Indeed, PTEN is known to be a major negative regulator of the PI3K/Akt signalling pathway that acts by catalyzing the degradation of phosphatidylinositol (PI)-3,4,5-triphosphate (PIP3) to PI-4,5-diphosphate. Here since SP600125 did not induce changes in PTEN expression, we clearly to show that enhancing Akt-Ser473 phosphorylation are not mediated by changes in PTEN expression.

Another regulator of the Akt pathway is the Src family tyrosine kinases. Our results show that the neuroprotective effects of SP600125 are not mediated through the activation of Src. Our hypothesis is based on the fact that the selective Src family tyrosine kinase inhibitor PP2 and its control PP3 were not able to attenuate the neuroprotective effects of SP600125. The results presented here differ from those reported in previous studies, which suggested that CEP1347 in PC12 cells modulates Akt activation via Src (Roux et al. 2002). However, this difference could be due to the different neuronal models used.

Another finding of this study is that JNK inhibition inhibits the process of re-entry into the cell cycle in CGNs by a novel mechanism that involves the inhibition of GSK-3 β and p-Rb. Studying the mechanism by which JNK inhibition prevents re-entry into the cell cycle is important because a common characteristic in all neurodegenerative disorders is the increased expression of cell cycle proteins, which subsequently has detrimental effects on neuronal survival (Smith et al. 2003; Nagy et al. 2005; Webber et al. 2005; Woods et al. 2007). Likewise, in response to apoptotic insults, post-mitotic neurons may attempt to re-enter the cell cycle and failure to complete the cell cycle leads to the demise of neurons. Although much of the theory remains to be verified, examples of up-regulation of cell cycle genes and elevated levels of proteins in damaged neurons have been widely reported (O'Hare et al. 2000; Smith et al. 2003; Zhu et al. 2004; Konishi and Bonni 2005; Zhu et al. 2007). Although the process underlying neuronal cell cycle re-entry is poorly understood it has been proposed that DNA damage may be the main cause. Furthermore, a recent study suggests that the increase in cell cycle proteins constitutes a mechanism of DNA repair (Kruman and Schwartz, 2008). In this context, previous studies suggest that the JNK/c-jun pathway is an important route involved in cell cycle regulation. Once activated, JNK phosphorylated the downstream target effectors c-jun Ser63 and Ser73, and it was demonstrated that c-jun is an essential gene that regulates the transition from the G1 to S phase (Thakur et al. 2007), inducing cyclin D1 transcription (Wisdom et al. 1999). Thus, the effects of SP606125 on cell cycle inhibition in neurons could be mediated by the inhibition of the JNK/c-jun pathway.

We have previously shown under an apoptotic stimuli GSK-3 β is a key enzyme involved in the process of cell cycle re-entry by regulating p-Rb, while recent studies

have also demonstrated that GSK-3 β was able to activate E2F-1 (Garcia-Alvarez et al. 2007; Yeste-Velasco et al. 2007).

Moreover, we demonstrate that SP600125 inhibits the phosphorylation of the retinoblastoma protein, and we suggest that this effect is probably mediated by GSK-3 β inhibition. It is also well known that c-jun is implicated in cell cycle regulation through cyclin D1 activation that mediated Rb phosphorylation. But we ruled out this explanation because of the timing, p-Rb is detected after 2 hours of S/K withdrawal, whereas c-Jun phosphorylation is not detected until 4 hours of S/K withdrawal. Therefore, we think that prevention of Rb phosphorylation mediated by SP600125 is due to the inhibition of GSK-3 β . Thus, we want to propose a novel mechanism by which JNK could regulate cell cycle, at least in neurons through maintaining Akt activation and which in turns inhibits GSK-3 β and p-Rb phosphorylation. An additional new finding is that SP600125 significantly inhibits the expression of E2F-1 mRNA and protein expression levels. Therefore, given that treatment of CGNs with SP600125 was able to inhibit the expression of proteins involved in the cell cycle (cyclin D1, cyclin E and E2F-1) we propose that blockade of this pathway could explain, in part, the antiapoptotic properties of this compound.

JNK activation may be caused by the generation of reactive oxygen species (ROS), which are rapidly formed in CGNs exposed to S/K withdrawal. However, JNK inhibition was not able to prevent ROS generation, and thus the neuroprotective effects of SP600125 are downstream of oxidative stress. Our data in CGNs suggest that S/K withdrawal-induced cell death occurs via a mechanism that probably begins with the formation of ROS, resulting in inactivation of Akt and finally JNK activation. Taking into account all the data presented here the main question is: how does JNK regulate

AKT activation? Previous studies have demonstrated that Akt inhibition activates the JNK/c-Jun pathway and thus one can speculate that there is cross-linking between JNK and other apoptotic routes. In this cross-talk, it would seem that Akt also acts as a pivotal mediator upstream of JNK, while inhibition of JNK also modulates Akt activation.

In conclusion, we have demonstrated that JNK inhibition leads to the prevention of Akt dephosphorylation, thus enhancing neuronal cell survival and, subsequently, the inhibition of downstream proapoptotic targets regulated by Akt. These data shed further light on the molecular signalling pathways underlying JNK inhibition, and thus improve our chances of developing therapies to prevent neuronal cell death.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by grants from Spain's Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2005-01604, SAF2006-13092). We are grateful to the Autonomous Government of Catalonia for supporting research groups (2005/SGR00893) and to the Fundació la Marató 063230 Marathon. We thank the Language Assessment Service of the University of Barcelona for revising the manuscript.

References

Alvira D., Tajés M., Verdaguer E., de Arriba S.G., Allgaier C., Matute C., Trullas R., Jimenez A., Pallas M. and Camins A. (2007) Inhibition of cyclin-dependent kinases is neuroprotective in 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced apoptosis in neurons. *Neuroscience*. 146, 350-65.

- Becker E.B., Howell J., Kodama Y., Barker P.A. and Bonni A. (2004) Characterization of the c-Jun N-terminal kinase-BimEL signaling pathway in neuronal apoptosis. *J. Neurosci.* 24 , 8762-8770.
- Bogush A., Pedrini S., Pelta-Heller J., Chan T., Yang Q., Mao Z., Sluzas E., Gieringer T. and Ehrlich M-E. (2007) AKT and CDK5/p35 mediated brain/derived neurotrophic factor induction of DARPP-32 in medium size spiny neurons in vitro. *J. Biol. Chem.* 282, 7352-7359.
- Borsello T. and Forloni G. (2007) JNK signalling: a possible target to prevent neurodegeneration. *Curr. Pharm. Des.*13, 1875-1886.
- Bowser R. and Smith M.A. (2002) Cell cycle proteins in Alzheimer's disease: plenty of wheels but no cycle. *J. Alzheimers Dis.* 4, 249-254.
- Camins A., Pallas M., Silvestre J.S. (2008) Apoptotic mechanisms involved in neurodegenerative diseases: experimental and therapeutic approaches. *Methods. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 30, 43-65.
- Crossthwaite A.J., Valli H. and Williams RJ. (2004) Inhibiting Src family tyrosine kinase activity blocks glutamate signalling to ERK1/2 and Akt/PKB but not JNK in cultured striatal neurones. *J Neurochem.* 88, 1127-1139.
- Kuan C. Y. and Burke R.E. (2005) Targeting the JNK signalling pathway for stroke and Parkinson's Diseases therapy. *Current Drug Target CNS Neurol. Dis.* 4, 63-67.
- D'Mello S.R., Galli C., Ciotti T. and 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.
- Enguita M., DeGregorio-Rocasolano N., Abad A. and Trullas R. (2005) Glycogen synthase kinase 3 activity mediates neuronal pentraxin 1 expression and cell

- death induced by potassium deprivation in cerebellar granule cells. *Mol. Pharmacol.* 67, 1237-1246.
- García-Alvarez G., Ventura V., Ros O., Aligué R., Gil J, Tauler A. (2007) Glycogen synthase kinase-3beta binds to E2F1 and regulates its transcriptional activity. *Biochim. Biophys Acta.* 1773, 375-382.
- Harris C.A. and Johnson E.M. Jr. (2001) BH3-only Bcl-2 family members are coordinately regulated by the JNK pathway and require Bax to induce apoptosis in neurons. *J. Biol. Chem.* 276, 37754-37760.
- Harris C.A. and Jonson E.M. Jr. (2002). Identification of JNK-dependent and – independent components of cerebellar granule neuron apoptosis. *J. Neurochem.* 83, 992-1001.
- Harris C.A., Deshmukh M., Tsui-Pierchala B., Maroney A.C. and Johnson E.M. Jr. (2002) Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase signaling pathway by the mixed lineage kinase inhibitor CEP-1347 (KT7515) preserves metabolism and growth of trophic factor-deprived neurons. *J Neurosci.* 22, 103-113.
- Hongisto V., Smeds N., Brecht S., Herdegen T., Courtney M.J. and Coffey ET. (2003) Lithium blocks the c-Jun stress response and protects neurons via its action on glycogen synthase kinase 3. *Mol Cell Biol.* 23, 6027-6036.
- Hou S.T., Cowan E., Walker T., Ohan N., Dove M., Rasqinha I. and MacManus J.P. (2001) The transcription factor E2F1 promotes dopamine-evoked neuronal apoptosis by a mechanism independent of transcriptional activation. *J. Neurochem.* 78, 287-297.
- Konishi Y. and Bonni A. (2003) The E2F-Cdc2 cell-cycle pathway specifically mediates activity deprivation-induced apoptosis of postmitotic neurons. *J. Neurosci.* 23, 1649-1658.

- Kuan C.Y. and Burke R.E. (2005) Targeting the JNK signaling pathway for stroke and Parkinson's diseases therapy. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* **4**, 63-67.
- Kruman I.I. and Schwartz E.I. (2008) DNA damage response and neuroprotection. *Front Biosci.* **13**, 2504-2515.
- Kyrylenko S., Roschier M., Korhonen P. and Salminen A. (1999) Regulation of PTEN expression in neuronal apoptosis. *Brain Res. Mol. Brain. Res.* **73**, 198-202.
- Li B.S., Ma W., Jaffe H., Zheng Y., Takahashi S., Zhang L., Kulkarni A.B., Pant H.C. (2003) Cyclin-dependent kinase-5 is involved in neuregulin-dependent activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Akt activity mediating neuronal survival. *J. Biol. Chem.* **278**, 35702-35709.
- Lotharius J., Falsig J., van Beek J., Payne S., Dringen R., Brundin P. and Leist M. (2005) Progressive degeneration of human mesencephalic neuron-derived cells triggered by dopamine-dependent oxidative stress is dependent on the mixed-lineage kinase pathway. *J Neurosci.* **25**, 6329-6342.
- Luo H.R., Hattori H., Hossain M.A., Hester L., Huang Y., Lee-Kwon W., Donowitz M., Nagata E. and Snyder S.H. (2003) Akt as a mediator of cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 11712-11717.
- Ma C., Ying C., Yuan Z., Song B., Li D., Liu Y., Lai B., Li W., Chen R., Ching Y.P. and Li M. (2007) dp5/HRK is a c-Jun target gene and required for apoptosis induced by potassium deprivation in cerebellar granule neurons. *J Biol Chem.* **282**, 30901-30909.
- Miller T.M., Tansey M.G., Johnson E.M. Jr. and Creedon DJ. (1997) Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity blocks depolarization- and insulin-like growth factor I-mediated survival of cerebellar granule cells. *J. Biol Chem.* **272**, 9847-9853.

- Nagy Z. (2005) The last neuronal division: a unifying hypothesis for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Cell. Mol. Med.* **9**, 531-541.
- Nicotera P, Leist M, Manzo L. (1999) Neuronal cell death: a demise with different shapes. *Trends Pharmacol. Sci.* **20**, 46-51.
- O'Hare M.J., Hou S.T., Morris E.J., Cregan S.P., Xu Q., Slack R.S. and Park D.S. (2000) Induction and modulation of cerebellar granule neuron death by E2F-1. *J Biol. Chem.* **275**, 25358-25364.
- Padmanabhan J., Park D.S., Greene L.A. and Shelanski M.L. (1999) Role of cell cycle regulatory proteins in cerebellar granule neuron apoptosis. *J. Neurosci.* **19**, 8747-8756.
- Parkinson Study Group PRECEPT Investigators. (2007) Mixed lineage kinase inhibitor CEP-1347 fails to delay disability in early Parkinson disease. *Neurology.* **69**, 1480-1490.
- Putcha G.V., Le S., Frank S., Besirli C.G., Clark K., Chu B., Alix S., Youle R.J., LaMarche A., Maroney A.C. and Johnson E.M. Jr. (2003) JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis. *Neuron.* **38**, 899-914.
- Roux P.P., Dorval G., Boudreau M., Angers-Loustau A., Morris S.J., Makkerh J., Barker P.A. (2002) K252a and CEP1347 are neuroprotective compounds that inhibit mixed-lineage kinase-3 and induce activation of Akt and ERK. *J Biol Chem.* **277**, 49473-49480.
- Shi L., Gong S., Yuan Z., Ma C., Liu Y., Wang C., Li W., Pi R., Huang S., Chen R., Han Y., Mao Z. and Li M. (2005) Activity deprivation-dependent induction of the proapoptotic BH3-only protein Bim is independent of JNK/c-Jun activation during apoptosis in cerebellar granule neurons. *Neurosci. Lett.* **375**, 7-12.

- Shimoke K., Yamagishi S., Yamada M., Ikeuchi T., Hatanaka H. (1999) Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity elevates c-Jun N-terminal kinase activity in apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **112**, 245-253.
- Silva R.M., Kuan C.Y., Rakic P., Burke R.E. (2005) Mixed lineage kinase-c-jun N-terminal kinase signaling pathway: a new therapeutic target in Parkinson's disease. *Mov Disord.* **20**, 653-664.
- Smith R.A., Walker T., Xie X. and Hou S.T. (2003) Involvement of the transcription factor E2F1/Rb in kainic acid-induced death of murine cerebellar granule cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **116**, 70-79.
- Song G., Ouyang G. and Bao S. (2005) The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J. Cell. Mol. Med.* **9**, 59-71.
- Thakur A., Wang X., Siedlak S.L., Perry G., Smith M.A. and Zhu X. (2007) c-Jun phosphorylation in Alzheimer disease. *J Neurosci. Res.* **85**, 1668-1673.
- Verdaguer E., Jordà E.G., Alvira D., Jiménez A., Canudas A.M., Folch J., Rimbau V., Pallàs M and Camins A. (2005) Inhibition of multiple pathways accounts for the antiapoptotic effects of flavopiridol on potassium withdrawal-induced apoptosis in neurons. *J. Mol. Neurosci.* **26**,71-84.
- Verdaguer E., Jordà E.G., Canudas A.M., Jiménez A., Pubill D., Escubedo E., Camarasa J., Pallàs M. and Camins A. (2004) Antiapoptotic effects of roscovitine in cerebellar granule cells deprived of serum and potassium: a cell cycle-related mechanism. *Neurochem Int.* **44**, 251-61.
- Waldmeier P., Bozyczko-Coyne D., Williams M., Vaught J.L. (2006). Recent clinical failures in Parkinson's disease with apoptosis inhibitors underline the need for a

- paradigm shift in drug discovery for neurodegenerative diseases. *Biochem Pharmacol.* **72**, 1197-206.
- Wang L.H., Paden A.J. and Johnson EM Jr. Mixed-lineage kinase inhibitors require the activation of Trk receptors to maintain long-term neuronal trophism and survival. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **312**, 1007-1019.
- Wang L.H., Besirli C.G. and Johnson EM Jr. (2004) Mixed-lineage kinases: a target for the prevention of neurodegeneration. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **44**, 451-474.
- Wang W., Shi L., Xie Y., Ma C., Li W., Su X., Huang S., Chen R., Zhu Y and Li M. (2004) SP606125 a new JNK inhibitor, protects dopaminergic neurons in the MPTP model of Parkinson's Disease. *Neurosci. Res.* **48**, 195-202.
- Webber K.M., Raina A.K., Marlatt M.W., Zhu X., Prat M.I., Morelli L., Casadesus G., Perry G. And Smith MA. (2005) The cell cycle in Alzheimer disease: a unique target for neuropharmacology. *Mech Ageing Dev.* **126**, 1019-1025.
- Wisdom R, Johnson RS, Moore C. (1999) c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. *EMBO J.* **18**, 188-97.
- Woods J., Snape M., Smith M.A. (2007) The cell cycle hypothesis of Alzheimer's disease: suggestions for drug development. *Biochim Biophys Acta.* **1772**, 503-508.
- Xifró 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**, 6801-6812.

- Yeste-Velasco M., Folch J., Trullas R., Abad M.A., Enguita M., Pallas M. and Camins A. (2007) Glycogen synthase kinase-3 is involved in the regulation of the cell cycle in cerebellar granule cells. *Neuropharmacology* **53**, 295-307.
- Zhang Q.G., Wu D.N., Han D., Zhang G.Y. (2007) Critical role of PTEN in the coupling between PI3K/Akt and JNK1/2 signaling in ischemic brain injury. *FEBS Lett.* **581**, 495-505.
- Zhu X., Lee H.G., Perry G. and Smith M.A. (2007) Alzheimer disease, the two-hit hypothesis: an update. *Biochim Biophys Acta.* **1772**, 494-502.
- Zhu X., Raina A.K., Perry G. and Smith M.A. (2004) Alzheimer's disease: the two-hit hypothesis. *Lancet Neurol.* **3**, 219-226.

Legend for figures

Fig. 1. SP600125 prevents neuronal apoptosis induced by S/K in CGNs. (A) At 8 DIV, CGNs were exposed to S/K withdrawal (DV) for 12 h alone or in presence of different concentrations of SP600125 (1-25 μ M). Photomicrographs of phase contrast of CGNs. B) Photomicrographs of nuclei staining with PI. C) S/K withdrawal Quantification of SP600125 prevented S/K withdrawal-induced condensed nuclei staining with propidium iodide followed by fluorescence microscopy in CGNs. The co-treatment with SP600125 (1-25 μ M) prevented the chromatin condensation. The values represent the average from counts of at least 500 nuclei in four or more random microscope fields per condition. All data are expressed as the mean \pm SEM of four separate experiments. Calibration bar, 10 μ m. Phase contrast photomicrographs showing the neuroprotective effects of SP600125 10 μ M against S/K withdrawal-induced cell loss (B) Flow cytometry analysis of PI: Bar chart showing the effects of SP600125 (1-25 μ M) on S/K

withdrawal-induced DNA fragmentation in CGNs. The values represent the average of three to four independent experiments, and error bars represent the SEM. The statistical analysis used was one-way ANOVA followed by Tukey's test *** $p < 0.001$ vs. controls. # $p < 0.05$. ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs. S/K withdrawal.

Fig 2. A) S/K withdrawal increased p-c-Jun phosphorylation on Ser-73. Quantitative analysis of phosphorylation of p-c-Jun phosphorylation on Ser-73 induced by S/K withdrawal. SP600125 (10 μ M) prevented p-c-Jun phosphorylation. Protein extracts were obtained at 4h after S/K withdrawal indicated in material and methods. Membranes were incubated with anti-c-JUN (pSer-73) phosphospecific antibody. The intensity of the bands was determined by densitometric analysis of at least three independent experiments. $p^{###} < 0.001$, significantly different from S/K withdrawal.

B and C) Bar chart showing the effects of SP600125 (10 μ M) on inhibition of Bax and Dp5 gene expression respectively in CGNs after S/K withdrawal (DV). The values represent the average of three to four independent experiments, and error bars represent the SEM. The statistical analysis used was ANOVA followed by Tukey's test ** $p < 0.001$ vs. controls. # $p < 0.01$ vs. S/K withdrawal.

Fig. 3. The effect of SP600125 (10 μ M) on the protein levels of p-Akt, p-GSK-3 β , p-FOXO1, p-CREB and p35/p25 expression mediated by S/K withdrawal (DV). Bar graph, showing p-Akt, p-GSK-3 β , p-FOXO1, p-CREB and p35/p25 bands intensities that were determined by densitometry and normalized to the corresponding total β -actin or total GSK-3 β and total Akt intensities. Changes in the normalized antibodies bands intensities were calculated as percentages of the control, normalized (K25 + S = 100%). Columns and bars represent means \pm SEM of four or five separate experiments with

four different culture preparations (n = 4-5). Statistical significance was determined by analyzed by ANOVA followed by post-hoc Tukey's multiple comparisons tests.

*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 vs. control; #p<0.05; ##p<0.01; ###P < 0.001 as compared vs. S/K withdrawal.

Fig 4. LY 294002 (30 μ M) attenuated the antiapoptotic effects of SP600125 (10 μ M) induced by S/K withdrawal (DV) in CGNs. (A) Phase contrast photomicrographs showing the neuroprotective effects of SP600125 10 μ M againsts S/K withdrawal-induced cell loss that were attenuated in presence of LY 294002 (30 μ M). B) Quantification of attenuation of SP600125 prevents S/K withdrawal-induced condensed nuclei staining and DNA fragmentation measured by flow cytometry by LY 294002 (30 μ M). The values represent the average from counts of at least 500 nuclei in four or more random microscope fields per condition. All data are expressed as the mean \pm SEM of four separate experiments. Calibration bar, 10 μ m.

Fig 5. A Bar chart showing the percentage of effects of K252a, MK-801, PP2 and PP3 on DNA fragmentation and condensed nuclei after S/K withdrawal exposed for 12 h. The nuclei were counted on a fluorescence microscope, distinguishing normal nuclei from the condensed ones following the criteria stated in the material and methods. Bar graph, PTEN bands intensities that were determined by densitometry and normalized to the corresponding total β -actin intensities. Each point is the mean \pm S.E.M. of four wells of five to six different cultures (calibration bar, 10 μ m). When necessary, statistical analyses were carried out using the one-way ANOVAs followed by Tukey's tests: ***p < 0.001 vs. control.

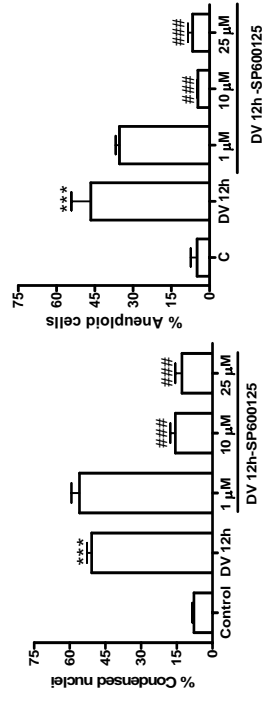
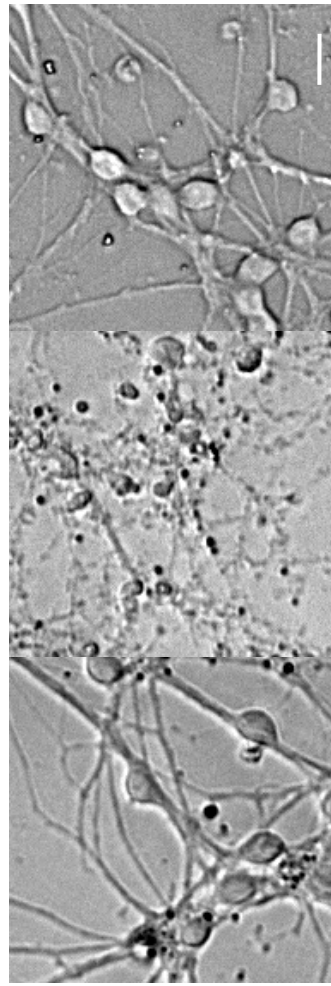
Fig 6. A) SP600125 (10 μ M), inhibits cyclin D, cyclin E, p-Rb and E2F-1 expression mediated by S/K withdrawal. A) Cerebellar granule neuron cultures were maintained in medium containing serum and 25 mM KCl. S/K withdrawal, in the absence or in the presence of SP600125 (10 μ M), was carried out on DIV 7-8 for 12 h (2 h for p-Rb). At the end of the treatments, cells were lysed and the cell lysates were subjected to immunoblot analysis with an antibody directed against cyclin D, cyclin E, p-Rb and E2F-1. Bar graph, showing cyclin D, cyclin E, p-Rb and E2F-1 bands intensities that were determined by densitometry and normalized to the corresponding total β -actin band intensities. Changes in the normalized antibodies bands intensities were calculated as percentages of the control, normalized (K25 + S = 100%). Columns and bars represent means \pm SEM of four separate experiments with four different culture preparations (n = 4). Statistical significance was determined by analyzed by ANOVA followed by post-hoc Tukey's multiple comparisons tests. $p < 0.05$. ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ vs. controls. * vs.control; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $P < 0.001$ as compared versus S/K withdrawal. B) Bar chart showing the effects of SP600125 (10 μ M) on inhibition of E2F-1 gene expression in CGNs after S/K withdrawal. The values represent the average of three to four independent experiments, and error bars represent the SEM. The statistical analysis used was ANOVA followed by Tukey's test *** $p < 0.001$ vs. control, ## $p < 0.01$ vs. S/K withdrawal.

Fig 7. Resveratrol (RESV) prevents oxidative stress production mediated by S/K withdrawal. However, SP600125 (10 μ M) did not prevents ROS production. Results are the mean \pm S.E.M. of three or four separate experiments with four different culture

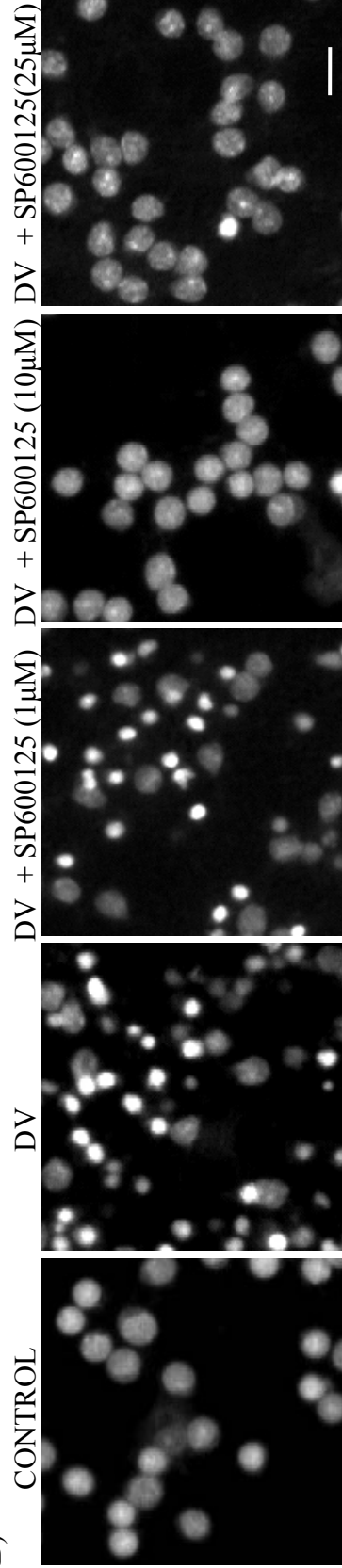
preparations. Statistical analyses were carried out using one-way ANOVA followed by Tukey's tests *** $p < 0.001$ vs. control; ### $p < 0.001$ vs. S/K withdrawal.

Yeste-Velasco et al. Fig 1

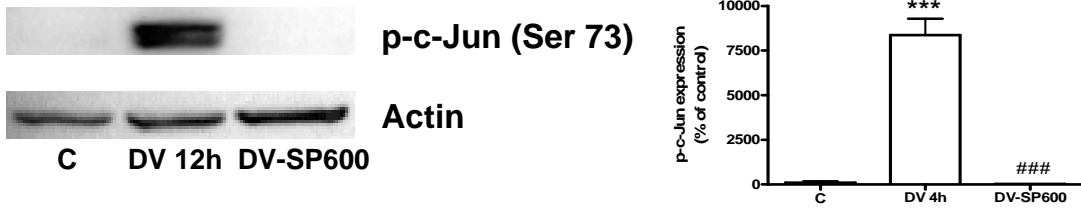
A) CONTROL DV DV + SP600125 (10 μ M) DV + SP600125 (10 μ M) C)



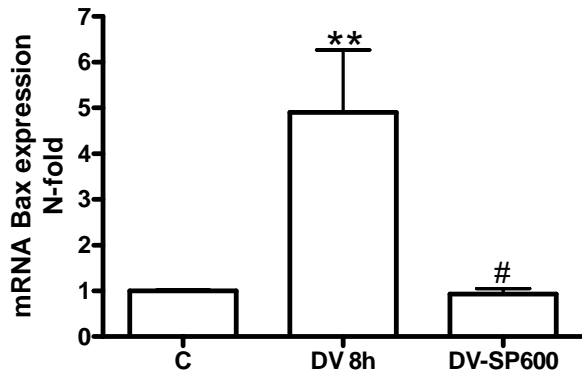
B)



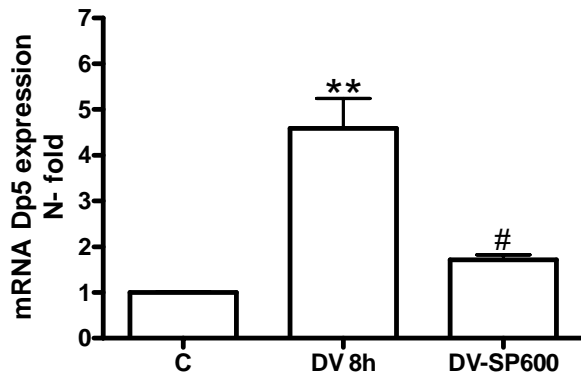
A)



B)

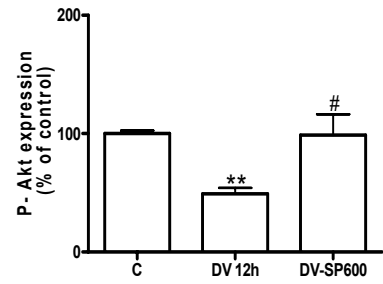


C)

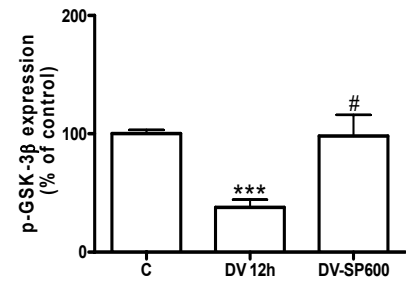
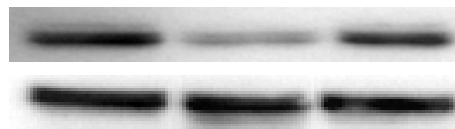


Yeste-Velasco et al Fig 3

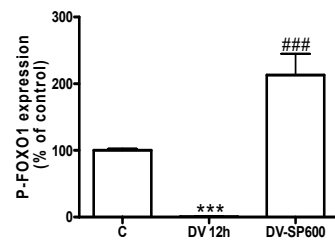
CONTROL DV 12h DV 12h
+ SP606125



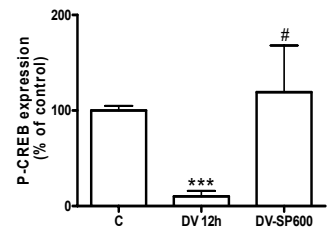
CONTROL DV 12h DV 12h
+SP606125



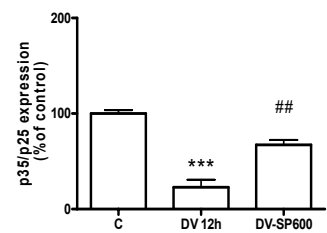
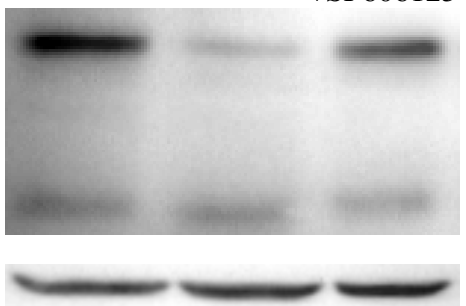
CONTROL DV 12h DV 12h
+ SP606125



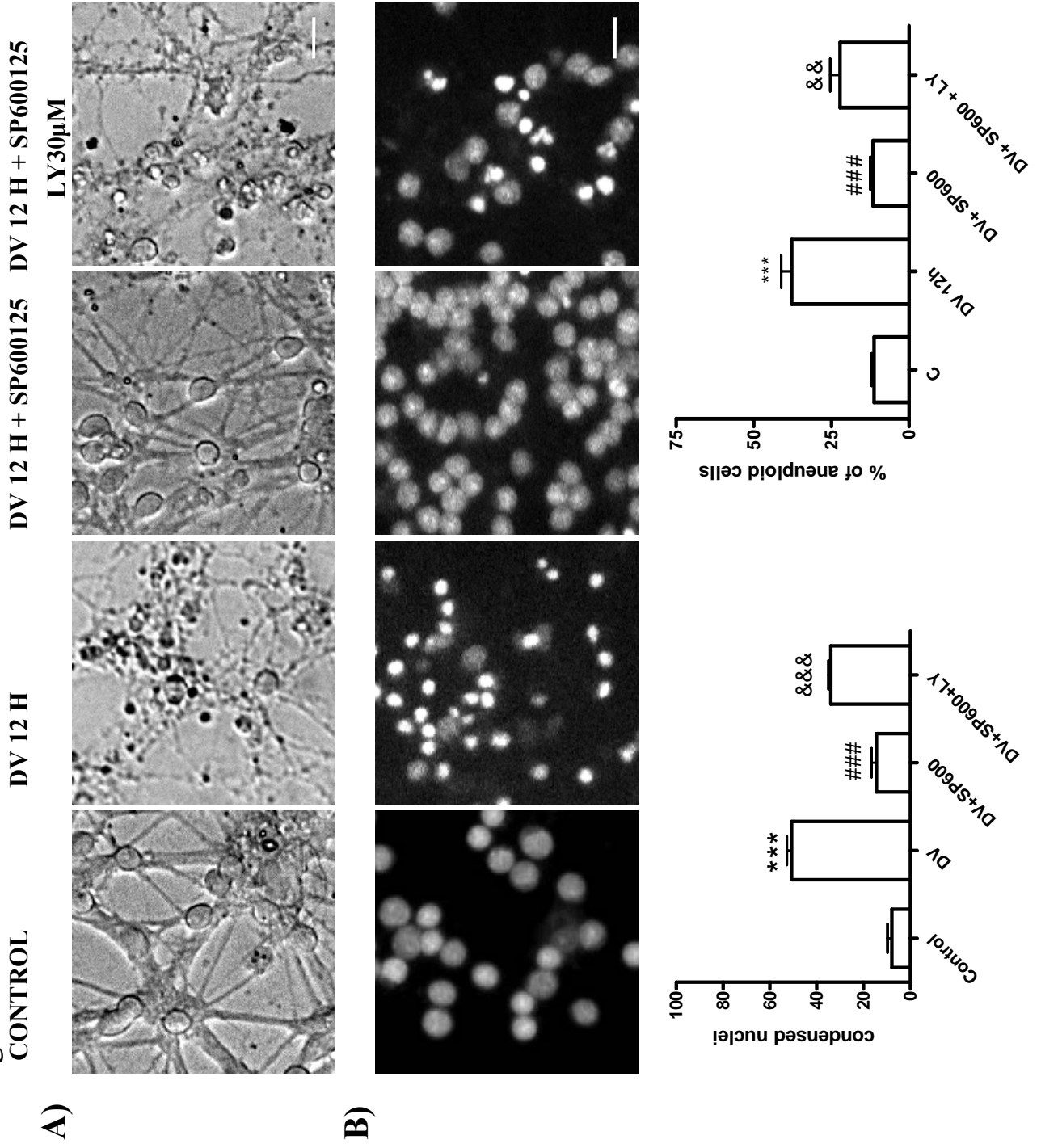
CONTROL DV 12h DV 12h
+SP606125



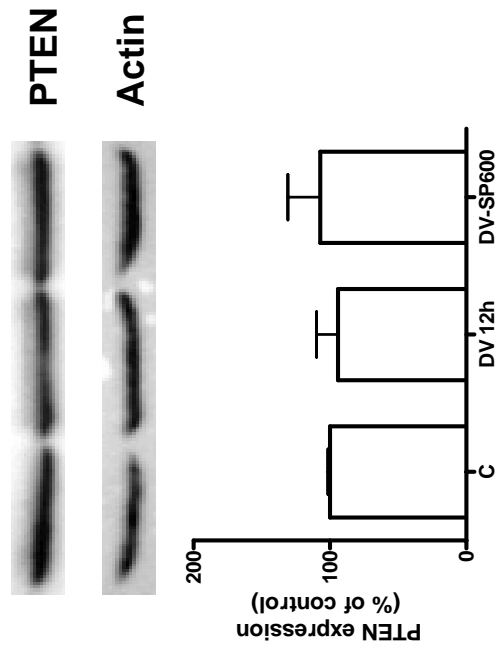
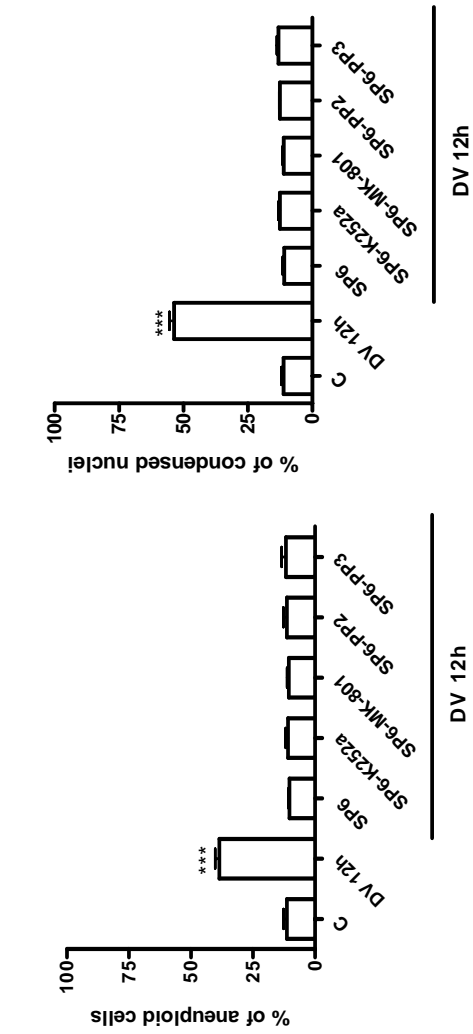
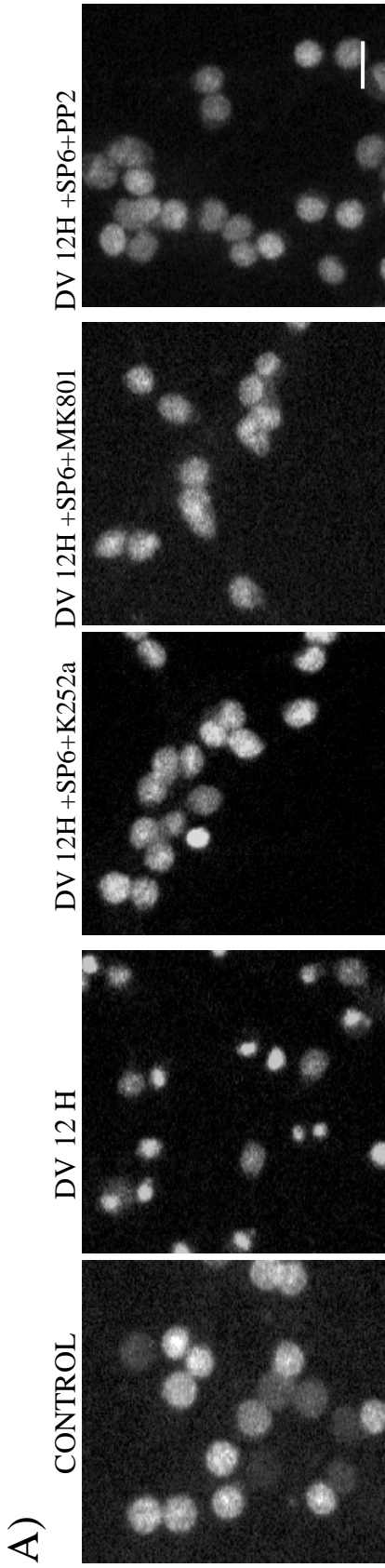
CONTROL DV 12h DV 12h
+SP606125



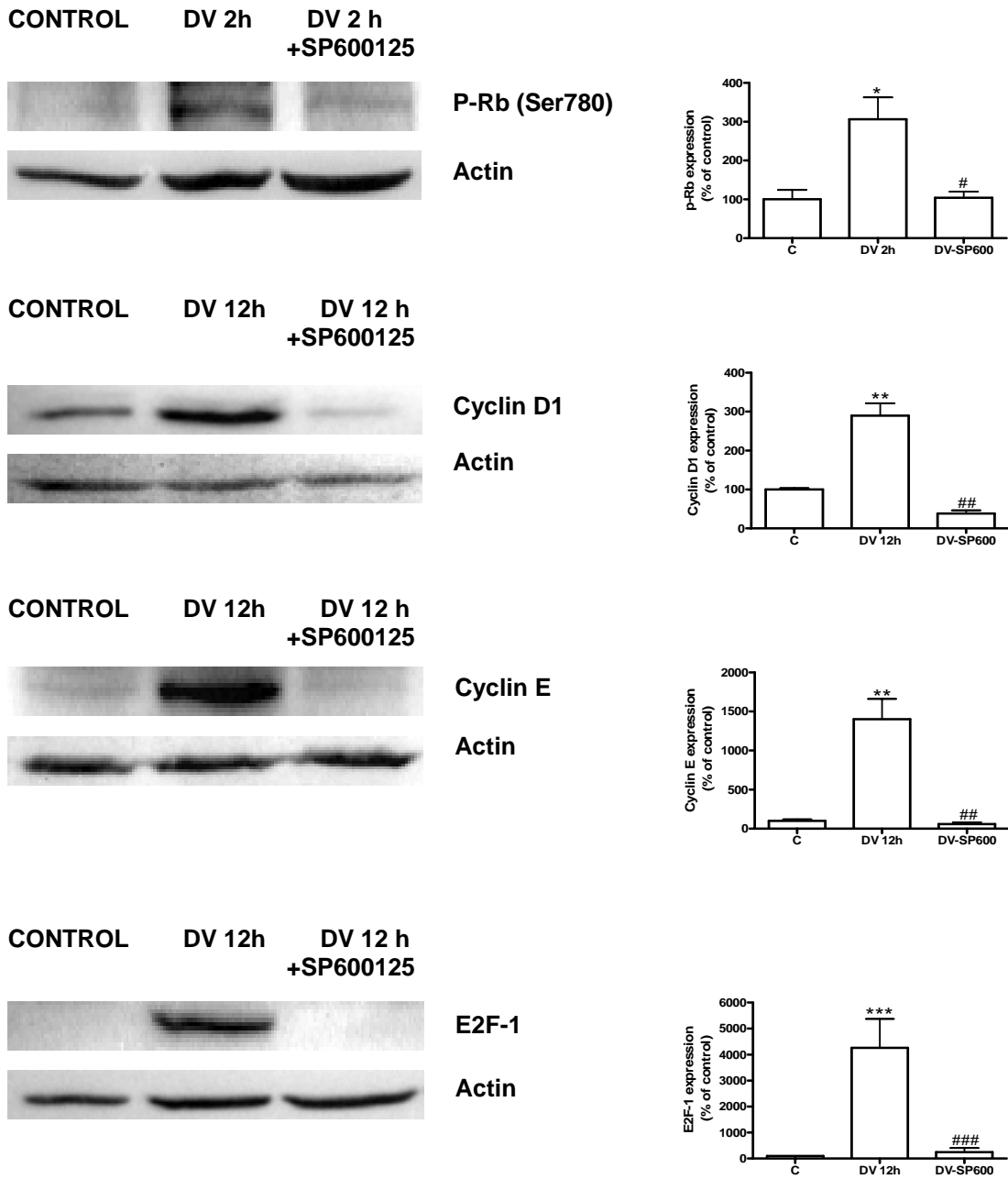
Yeste-Velasco et al. Fig 4



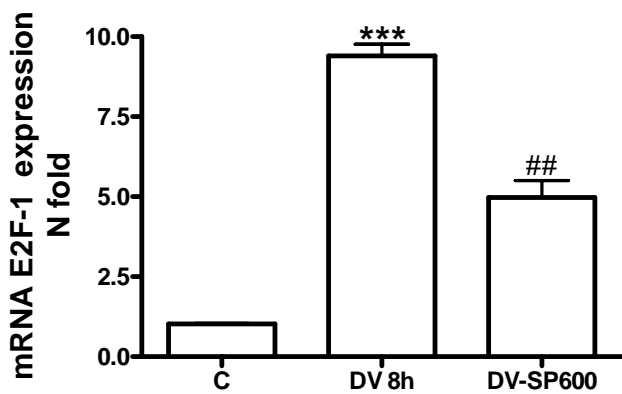
Yeste-Velasco et al Fig 5

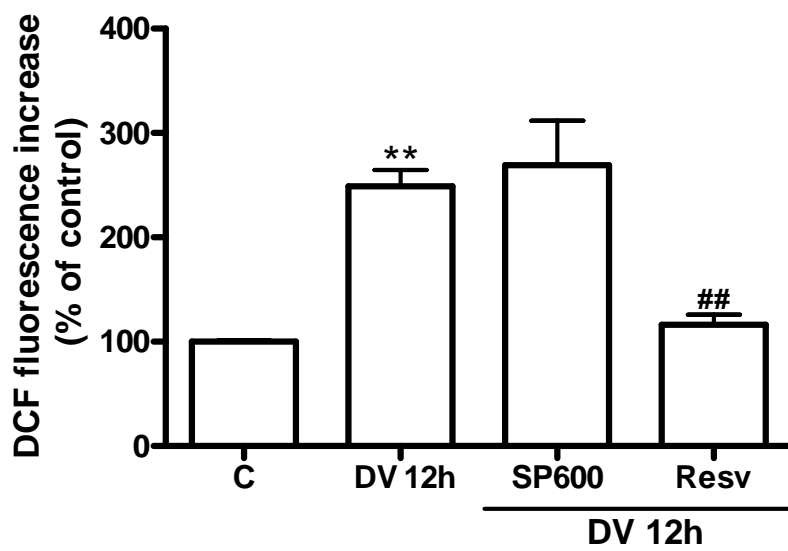


A)



B)





Publicació 6

**NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF CAFFEINE AGAINST
COMPLEX I INHIBITION-INDUCED APOPTOSIS ARE
MEDIATED BY INHIBITION OF THE ATM/P53/E2F-1 PATH
IN CEREBELLAR GRANULE NEURONS**

Daniel Alvira, **Marc Yeste-Velasco**, Jaume Folch, Gemma Casadesús, Mark A.
Smith, Mercè Pallàs, Antoni Camins

Journal of Neuroscience Research (2007) 85: 3079-3088

Neuroprotective Effects of Caffeine Against Complex I Inhibition–Induced Apoptosis Are Mediated by Inhibition of the Atm/P53/E2F-1 Path in Cerebellar Granule Neurons

Daniel Alvira,^{1,2,3} Marc Yeste-Velasco,^{1,2,3} Jaume Folch,^{3,4} Gemma Casadesús,⁵ Mark A. Smith,⁶ Mercè Pallàs,^{2,3} and Antoni Camins^{1,2,3*}

¹Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Nucli Universitari de Pedralbes, Barcelona, Spain

²Institut de Biomedicina (IBUB), Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Nucli Universitari de Pedralbes, Barcelona, Spain

³Centros de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

⁴Unitat de Bioquímica, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, C, Reus (Tarragona), Spain

⁵Department of Neurosciences, Case Western Reserve University School of Medicine, Cleveland, Ohio

⁶Department of Pathology, Case Western Reserve University School of Medicine, Cleveland, Ohio

The aim of the present study was to evaluate the neuroprotective effects of caffeine, an inhibitor of ataxia telangiectasia mutated (ATM) enzyme and an antagonist of adenosine receptors, in two models of apoptosis in cerebellar granule neurons (CGNs): the inhibition of mitochondrial complex I by the neurotoxin MPP⁺ and serum and potassium deprivation. We used cerebellar granule neurons because of low glial contamination. Cell viability was measured by the MTT method, and apoptosis was evaluated by assessing DNA fragmentation with flow cytometry or quantification of nuclear condensation. Our data indicate that the neuroprotective effects of caffeine in the MPP⁺ model of apoptosis are mediated through activation of the ATM/p53 pathway. In addition, caffeine decreased the expression of cyclin D and the transcription factor E2F-1, a regulator of apoptosis in neurons. Caffeine-mediated neuroprotection was not mediated through blockade of adenosine receptors because DPCPX and CGS-15943, two antagonists of these receptors, failed to attenuate apoptosis produced by MPP⁺ treatment. In addition, caffeine did not exert neuroprotective effects after serum and potassium withdrawal, a p53-independent model of apoptosis. Taken together, our findings indicate that DNA damage/ATM activation is a key component of MPP⁺-induced apoptosis in CGNs through activation of p53 and reentry into the cell cycle, specifically expression of the transcription factor E2F-1. © 2007 Wiley-Liss, Inc.

Key words: MPP⁺; complex I inhibition; ataxia telangiectasia mutated; caffeine; E2F-1; cerebellar granule cells

Currently, the mechanisms involved in neuronal cell death by apoptosis, which is associated with neurodegenerative disease states, is unknown (Pallàs and Camins, 2006). However, research efforts in this area during the last few years are enabling better understanding of this pathophysiological process of neuronal demise (Kanazawa, 2001; Klein et al., 2002; Andersen, 2004; Beal et al., 2004; Kruman, 2004; Krancic et al., 2005; Mattson and Magnus, 2006). Indeed, it is widely accepted that the mitochondria play a prominent role in this complex mechanism by releasing key proteins such as cytochrome C, which activates the classical caspase-3 intrinsic apoptotic pathway (Orth and Schapira, 2002; Becker and Bonni, 2004; Przedborski et al., 2004). Like-

Contract grant sponsor: Ministerio de Educación y Ciencia of Spain; Contract grant numbers: SAF2005-01604, SAF2005-05179, and SAF2006-13092 (FEDER funds); Contract grant sponsor: Instituto de Salud Carlos III; Contract grant number: PI 041300; Contract grant sponsor: Centros de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED); Contract grant sponsor: Generalitat (Autonomous Government) of Catalunya; Contract grant number: 2005/SGR00893; Contract grant sponsor: TV3 Marathon.

*Correspondence to: Antoni Camins, Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Nucli Universitari de Pedralbes, E-08028 Barcelona, Spain. E-mail: camins@ub.edu

Received 16 February 2007; Revised 3 April and 2 May 2007; Accepted 9 May 2007

Published online 17 July 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jnr.21427

wise, mitochondria release other proteins such as apoptosis-inducing factor (AIF) that mediate neuronal apoptosis independent of caspase activation (Chu et al., 2005; Liou et al., 2005; Lin and Beal, 2006). Elucidating the mechanisms behind apoptotic cell death is further complicated by caspase inhibitors being rather inefficient at conferring neuroprotective effects during apoptotic insults (Chee et al., 2005). Therefore, although mitochondria alterations are likely to be a key event in all neurodegenerative diseases, other intracellular components must also be involved in this process, for example, DNA damage (Khanna et al., 2001; Kurz et al., 2004; Culmsee and Mattson, 2005).

A common hallmark of all neurodegenerative diseases is oxidative stress (Kanazawa, 2001; Perry et al., 2002; Moreira et al., 2005). Reactive oxygen species (ROS) are extremely harmful to neurons (Kanazawa, 2001; Andersen, 2004; Langley and Ratan, 2004) and have been demonstrated to target DNA. A consequence of DNA damage is activation of a family of phosphatidylinositol 3-kinases (family of serine/threonine protein kinases) that include ataxia telangiectasia mutated (ATM) protein, which is involved in the regulation of cellular response by phosphorylation of many downstream substrates, among them p53 (McKinnon, 2001; Kurz and Less-Miller, 2004; Ljungman, 2005). Therefore, one possibility is that in addition to or together with mitochondria activation, ATM could constitute a common pathway activated in neuronal apoptosis after DNA damage.

A common characteristic of the brains of patients with neurodegenerative diseases like Alzheimer's and Parkinson's diseases is expression of cell-cycle proteins (Zhu et al., 2000, 2004; Raina et al., 2001, 2004; Copani et al., 2001; Arendt, 2002; Bowser and Smith, 2002; Cash et al., 2002; Smith et al., 2003, 2004; Casadesus et al., 2005; Pallàs et al., 2005; Neve et al., 2006). Because neurons do not proliferate as they are postmitotic cells, several hypotheses have been proposed to explain the abnormal expression of these proteins. Among these, one attractive explanation is that cell-cycle protein expression in neurons is a consequence of DNA damage (Keramaris et al., 2003; Kruman, 2004; Krantic et al., 2005; Schwartz et al., 2007), and previous studies working with DNA neurotoxins found an association between neuronal apoptosis and the process of cell-cycle reentry (Kruman, 2004; Hoglinger et al., 2007). The importance of cell-cycle activation in neuronal apoptosis lies in expression of the transcription factor E2F-1. It has been demonstrated that E2F-1, apart from its role in cell-cycle proliferation, may mediate apoptosis through p53, p73, caspase activation, regulation of ATM, and NF- κ B disruption signaling, which can then lead to activation of several genes implicated in neuronal protection (Stevens and Thangue, 2003, 2004; McMurray, 2005). Furthermore, E2F-1 could also modulate the apoptotic process through a caspase-independent mechanism. In this way, it has been demonstrated that E2F-1 induces up-regulation of AIF (Hou et al., 2000; Hou et al.,

2001; Phillips and Vousden, 2001). Therefore, one possibility is that p53 and E2F-1 are key components in the process of neuronal apoptosis. Neurotoxins are often used to study the mechanism implicated in the process of neuronal demise in neuronal cell cultures. To this end, MPP⁺ is a toxin that inhibits mitochondrial complex I and generates ROS. Previous studies demonstrated that p53 is involved in the apoptotic pathway mediated by MPP⁺, and that synthetic p53 inhibitors exert neuroprotective effects in experimental models of Parkinson's disease (Duan et al., 2002). However the mechanism involved in p53 induction after complex I inhibition remains unclear (Culmsee and Mattson, 2005). Thus, we hypothesize that if there is ROS production after inhibition of complex I, as has been previously demonstrated by us and others (Gonzalez-Polo et al., 2003, 2004; Alvira et al., 2006), then there should also be DNA damage.

The aim of the present study was to explore DNA damage, specifically the role of ATM in neuronal apoptosis after complex I inhibition. Activation of ATM would explain activation of p53. For this purpose, primary cultures of cerebellar granule neurons (CGNs) were used. Although the main target of MPP⁺ in Parkinson's disease is the striatum, previous studies have been demonstrated that CGNs constitute a suitable *in vitro* methodology to study the process of apoptosis mediated by mitochondrial complex I inhibition (Leist et al., 1998; Gonzalez-Polo et al., 2001, 2003, 2004b; Shang et al., 2003, 2004). Furthermore, another advantage of this experimental paradigm is the feasibility of the neuronal cell culture and the purity of the neuronal cell preparation (Jordà et al., 2003; Verdager et al., 2004). The caspase pathway and ROS generation in the apoptotic process of CGNs have previously been demonstrated (Shang et al., 2003; Gonzalez-Polo et al., 2004). However, the role of a DNA-associated pathway in the apoptotic process after modulation of mitochondria with ATM inhibitors, such as caffeine, a readily available substance that could lead to additional therapeutic strategies for the treatment of neurodegenerative disorders, remains unclear.

MATERIAL AND METHODS

Drugs and Reagents

Caffeine, 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine DP CPX, CGS-15943, and propidium iodide came from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Cell culture media and fetal calf serum (FCS) were purchased from GIBCO (Life Technologies, Paisley, UK). Cell culture salts, enzymes, Mowiol[®] 4-88, and Triton X-100 were purchased from Sigma. Other chemical reagents were of analytical quality and purchased from Sharlab (Barcelona, Spain).

Cell Cultures

Primary cultures of cerebellar granule cells were prepared from 7-day-old Sprague-Dawley rat pups according to the method of Verdager et al. (2002). Cerebella freed of

meninges were trypsinized and treated with DNAase. Cells were adjusted at 8×10^5 cells/mL and were plated on poly-L-lysine-coated 24-well plates (FALCON) at a density 320,000 cells/cm². Cultures were grown in Eagle's medium (Eagle's basal medium, BME, GIBCO, Life Technologies, Paisley, UK) containing 10% FCS (GIBCO, Life Technologies, Paisley, UK), 2 mM L-glutamine, 0.1 mg/mL gentamicin, and 25 mM KCl. Cytosine arabinoside (10 μ M) was added 16–18 hr after plating in order to inhibit growth of nonneuronal cells. Cultures prepared by this method were more than 95% enriched in granule neurons.

Treatment of CGNs and Evaluation of Neuronal Survival

CGNs were used after 7–8 days in vitro. Caffeine (1–20 mM) was dissolved in culture medium and added to the neuronal preparation at the precise concentrations 30 min before the addition of MPP⁺. In other experiments, caffeine (1–20 mM) was added 24 hr before and 12 hr during serum and potassium (S/K) withdrawal. Cell death was determined 48 hr after MPP⁺ or 12 hr after S/K treatment using the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium] assay. MTT was added to the cells at a final concentration of 250 μ M and incubated for 1 hr, allowing the reduction in MTT to produce a dark blue formazan product. Media were then removed, and cells were dissolved in dimethylsulfoxide. Formazan production was measured by the absorbency change at 595 nm using a microplate reader (BioRad Laboratories, CA). Viability results are expressed as percentages. The measured absorbency of non-treated cells was considered 100%.

Analysis of Apoptosis Rate by Flow Cytometry

Apoptosis was measured after 48 hr of MPP⁺ and 12 hr after S/K withdrawal treatment as described previously (Alvira et al., 2005). In brief, the culture medium was removed; cells were collected from culture plates by pipetting and washing with PBS. Flow cytometer experiments were carried out using an Epics XL flow cytometer adding propidium iodide (10 μ g/mL) 30 min before. The instrument was set up with the standard configuration: excitation of the sample was done using as a standard 488-nm air-cooled argon-ion laser at 15 mW power. Forward-scatter (FSC), side-scatter (SSC), and red (620 nm) fluorescence for PI were acquired. Optical alignment was based on an optimized signal from 10-nm fluorescent beads (Immunocheck, Epics Division). Time was used as a control of the stability of the instrument. Red fluorescence was projected on a 1024 monoparametrical histogram. Aggregates were excluded, gating single cells by their area versus peak fluorescence signal.

Detection of Apoptotic Nuclei by Propidium Iodide Staining

PI staining was used to detect morphological evidence of apoptosis. CGNs were grown on glass coverslips after treatment with MPP⁺ (200 μ M) and S/K withdrawal, alone or in the presence of caffeine (1–10 mM). After treatments, cells were fixed in 4% paraformaldehyde/phosphate-buffered saline (PBS) solution (pH 7.4) for 1 hr at room temperature. After washing with PBS, cells were incubated for 3 min with a solution of PI

in PBS (10 μ g/mL) and then coverslipped by mounting in Mowiol[®] 4-88. Stained cells were visualized under UV illumination using a 20 \times objective (Leica DMRB fluorescence microscope, Leica Microsystems AG, Germany), and digitized images were captured.

Compared with nonapoptotic cells, apoptotic cells showed shrunken, brightly fluorescent, apoptotic nuclei showing high fluorescence and condensed chromatin. Apoptotic cells were scored by counting at least 500 cells for each sample in three experiments.

Immunoblotting Analysis

Aliquots of tissue homogenate, containing 30 μ g of protein per sample, were placed in sample buffer [0.5 M tris-HCl (pH 6.8), 10% glycerol, 2% SDS (w/v), 5% 2- β -mercaptoethanol (v/v), 0.05% bromophenol blue] and denatured by boiling at 95°C–100°C for 5 min. Samples were separated by electrophoresis on 10% acrylamide gels. Subsequently, proteins were transferred to poly(vinylidene fluoride) sheets (ImmobilonTM-P, Millipore Corp., Bedford, MA) using a transblot apparatus (BioRad). Membranes were blocked overnight with 5% nonfat milk dissolved in TBS-T buffer [50 mM Tris; 1.5% NaCl; 0.05% Tween 20 (pH 7.5)]. Membranes were then incubated with primary rabbit polyclonal antibodies against p-ATM, PUMA, p53, E2F-1, and cyclin D (1:1,000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). After 90 min, blots were washed thoroughly in TBS-T buffer and incubated for 1 hr with a peroxidase-conjugated antirabbit IgG antibody (Amersham Corp., Arlington Heights, IL). Immunoreactive protein was visualized using a chemoluminescence-based detection kit according to the manufacturer's protocol (ECL kit; Amersham Corp.).

Statistical Analysis

Data are given as the mean \pm SEM of at least four experiments involving 4–6 independent cultures. In all the experiments, data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) followed by post hoc Turkey–Kramer multiple comparison tests. *P* values less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Activation of ATM and p53 Pathways after Treatment of CGNs with MPP⁺

We previously showed that MPP⁺-induced apoptosis involves ROS production (Alvira et al., 2006). Furthermore, caspase inhibitors such as ZVAD-fmk did not attenuate apoptosis. However, the potential role of kinases involved in DNA damage in this apoptotic pathway remains unclear. To resolve this question, we first examined if the ATM enzyme was activated after treatment of CGNs with 200 μ M MPP⁺, a concentration previously found to induce apoptosis in CGNs (Alvira et al., 2006). Using a specific antibody of ATM at Ser1981 as an indicator of ATM activation, we found a rapid increase in the activation of ATM 30 min and 2 hr after MPP⁺ treatment (Fig. 1). Because previous studies indicated that p53 is involved in MPP⁺-induced apopto-

sis, we examined the stabilization of p53 by ATM through its phosphorylation at serine 15. We detected an increase of about 35% in the signal after 30 min of treatment with 200 μM MPP^+ . Once p53 is activated, it can induce apoptosis through activation of the BH3-only family of proteins, a subfamily of the Bcl-2 protein family, which is essential in apoptosis. Therefore, we examined the role of PUMA (p53 up-regulated modulator of apoptosis) after MPP^+ treatment and found that PUMA is significantly up-regulated after treatment with MPP^+ (Fig. 1).

Caffeine, an Inhibitor of ATM, Shows Neuroprotective Effects against Complex I Inhibition

Previous reports indicated that caffeine is an inhibitor of ATM in the millimolar range (Blasina et al., 1999; Sarkaria et al., 1999). Therefore, we examined whether caffeine could inhibit MPP^+ -induced apoptosis in CGNs. The percentage of neuronal survival dramatically decreased—approximately $40\% \pm 2\%$ —48 hr after exposure to MPP^+ at concentration of 200 μM . As expected, neurons exposed to 200 μM MPP^+ had shrunken cell bodies with condensed nuclei, whereas untreated cells exhibited soma and abundant arborization of dendrites. Thus, treatment of CGNs with different concentrations of caffeine (from 1 to 20 mM) attenuated up to 70% of such loss of cell viability (Fig. 2). However, the highest dose of caffeine evaluated in the present study (20 mM) had a toxic effect on CGNs (data not shown).

To evaluate if caffeine attenuates DNA fragmentation and nuclear cell condensation, we examined two well-established markers of neuronal apoptosis after MPP^+ treatment. We found a significant increase in the percentage of apoptotic cells (hypodiploid DNA content) after 48 hr of 200 μM MPP^+ treatment: $37\% \pm 3\%$ (mean \pm SEM, $n = 6$). When treated with caffeine, the percentage of apoptotic cells decreased at 48 hr (Fig. 2). We also determined condensed nuclei after 48 hr of 200 μM treatment, and we found a significant increase after neurotoxin treatment and a significant antiapoptotic effect by caffeine (Fig. 2D).

Adenosine Receptors Are Not Involved in Neuroprotective Properties of Caffeine

It is well accepted that the neuroprotective effects of caffeine in the MPTP model are mediated by its interaction with adenosine receptors (Jenner, 2003). We therefore evaluated whether the antiapoptotic effects of caffeine on MPP^+ are also a result of the interaction with these A_1 and A_2 adenosine receptors. For this purpose, we used pharmacological antagonists to these receptors: DPCPX, an antagonist of the A_1 receptor, and CGS-15943, a nonselective antagonist of the A_1 and A_2 receptors. MPP^+ (200 μM) was added to CGNs alone or in combination with increasing concentrations of DPCPX (0.1–1 μM) and CGS-15943 (0.025–0.2 μM). Neither DPCPX nor CGS-15943 was able to attenuate either

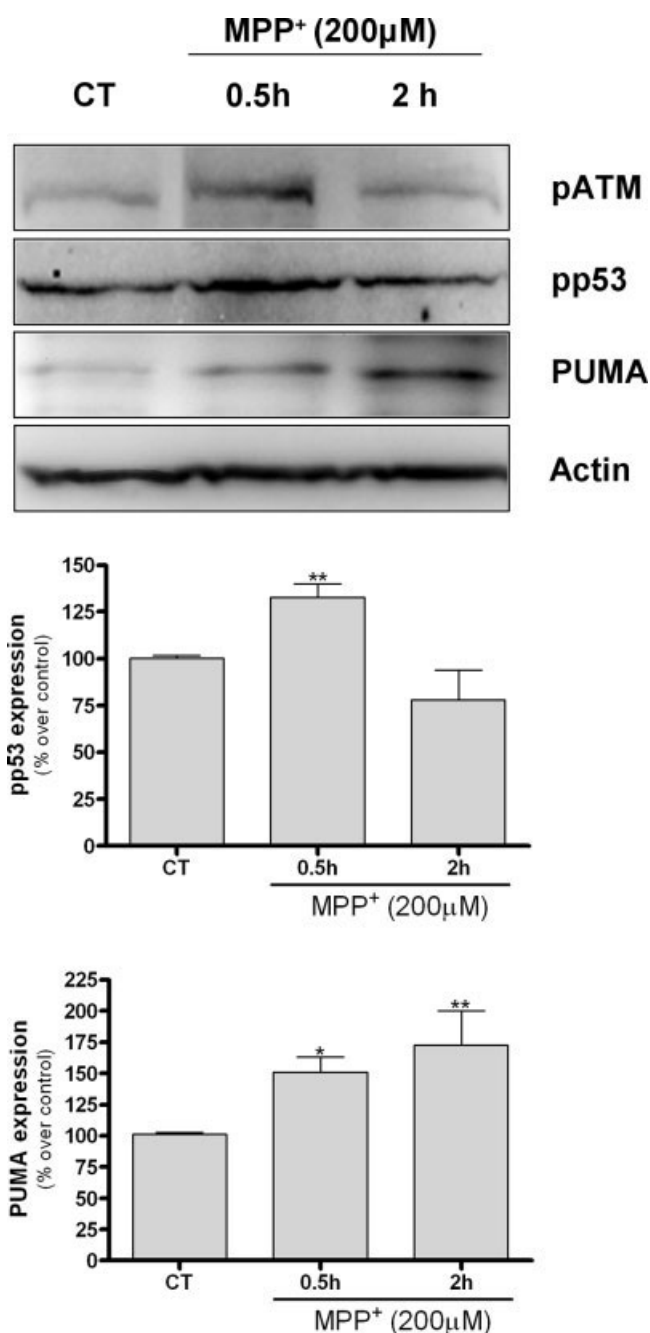


Fig. 1. Western blot analysis of p-ATM, pp53, p53, and PUMA levels in CGNs after MPP^+ treatment. Cultures were treated with 200 μM MPP^+ alone for 0.5 and 2 hr. At the end of the treatments, cells were lysed, and the cell lysates were subjected to immunoblot analysis (see Material and Methods section). Changes in band intensity were calculated as percentages of control band intensity. Columns and bars represent means \pm SEMs of three or four experiments with four culture preparations ($n = 4$). Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Tukey's tests: * $P < 0.05$ versus control; ** $P < 0.01$ versus control.

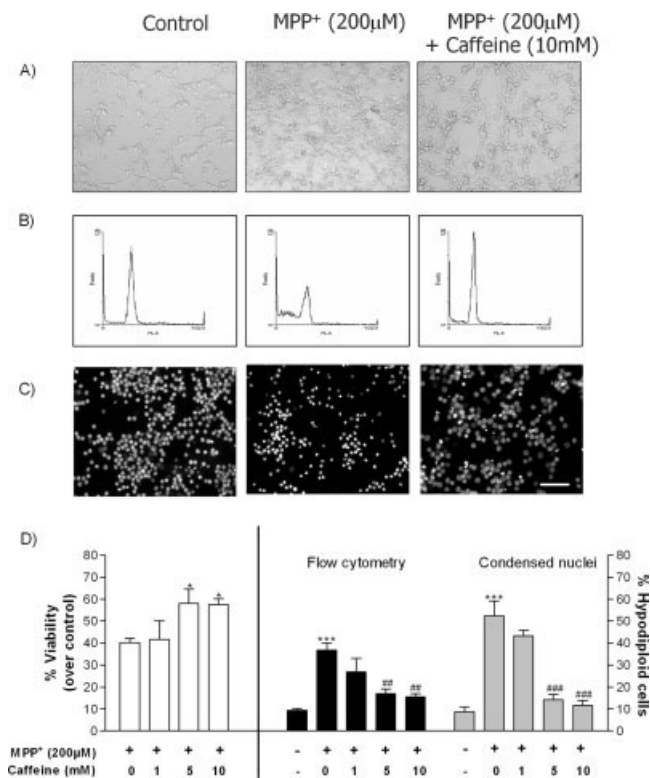


Fig. 2. **A:** Representative phase-contrast photomicrographs of CGNs under different experimental conditions: control, MPP⁺ treatment, and MPP⁺ in the presence of caffeine. **B:** Typical profile of flow-cytometry analysis of CGNs under different experimental conditions. **C:** PI staining of DNA from the nuclei of CGNs under different experimental conditions, observed under a fluorescence microscope. **D:** Concentration-response (MTT, flow cytometry, and condensed nuclei) bar chart showing the effect of exposure to caffeine for 48 hr on CGNs treated with MPP⁺. Each bar is the mean ± SEM of 5–6 cultures, carried out in quadruplicate. Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Tukey’s test: **P* < 0.05 versus control; ****P* < 0.001 versus control; ###*P* < 0.01 versus MPP⁺ ####*P* < 0.001 versus MPP⁺.

MPP⁺-induced neurotoxicity or apoptosis in CGNs (Fig. 3). This data demonstrates that blockade of adenosine receptors is not likely to be involved in the neuroprotective effects of caffeine in CGNs.

Evaluation of Neuroprotective Effects of Caffeine in S/K-Induced Apoptosis in CGNs

After DNA damage, the p53 signaling pathway is usually activated. S/K withdrawal is a well-studied model of apoptosis in CGNs, in which the intrinsic apoptotic pathway is activated together with cell cycle. However, p53 activation is not implicated in apoptosis associated with S/K withdrawal treatment. Therefore, we studied whether caffeine would show neuroprotective effects in the S/K withdrawal apoptotic model. Caffeine was added 24 hr before and 12 hr after S/K withdrawal, and we evaluated the neuroprotective and antiapoptotic effects of this drug. In this paradigm, caf-

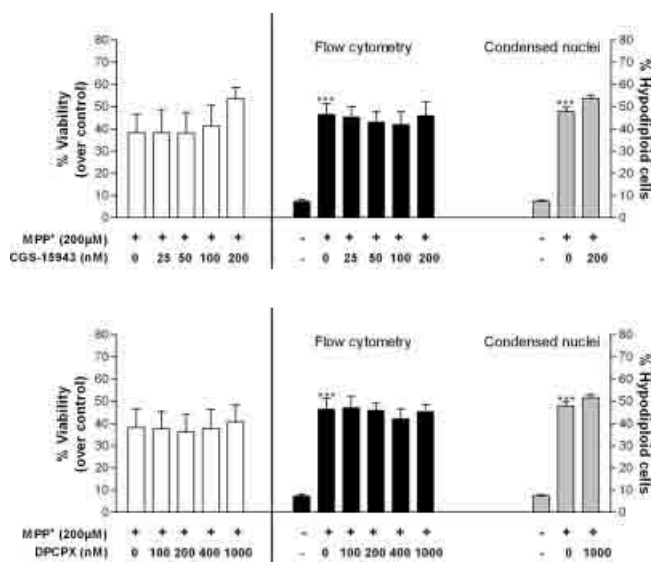


Fig. 3. Concentration-response (MTT, flow cytometry, and condensed nuclei) bar chart showing the effect of 48 hr of exposure to DPCPX and CGS-15943 on CGNs treated with MPP⁺. Each bar is the mean ± SEM of 5–6 cultures, carried out in quadruplicate. Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Tukey’s test: ****P* < 0.001 versus control.

fine was not able to attenuate apoptosis as measured by nuclear cell counting and flow cytometry (Fig. 4).

Caffeine Inhibits p53 Pathway Activation and Cell-Cycle Reentry

The next series of experiments were performed to evaluate whether the neuroprotective effects of caffeine on complex I inhibition-induced apoptosis are mediated by the inhibition of the ATM/p53 pathway, as well as whether there is a relationship with cell-cycle activation. Thus, when CGNs were treated with MPP⁺ in the presence of caffeine (10 mM), inhibition of p-ser15-p53 expression was found. This data strongly suggest that caffeine acts on ATM. Because previous studies have shown that PUMA is necessary for DNA damage-induced neuronal apoptosis, we also evaluated whether caffeine (10 mM) would decrease the expression of PUMA after MPP⁺ treatment. In this regard, we found a significant decrease in the expression of this protein modulator of apoptosis mediated by p53 (Fig. 5).

It has been widely demonstrated that there is expression of proteins involved in cell-cycle regulation after exposure to different neurotoxin stimuli. As a result, it has been suggested that the cell-cycle response is a consequence of DNA damage (Kruman et al., 2004). Moreover, two proteins, cyclin D and the transcription factor E2F-1, play a prominent role in the process of neuronal apoptosis. Therefore, we evaluated if caffeine prevented the expression of these two proteins after MPP⁺ treatment. We observed that treatment of CGNs with MPP⁺ induced increased expression of cyclin D

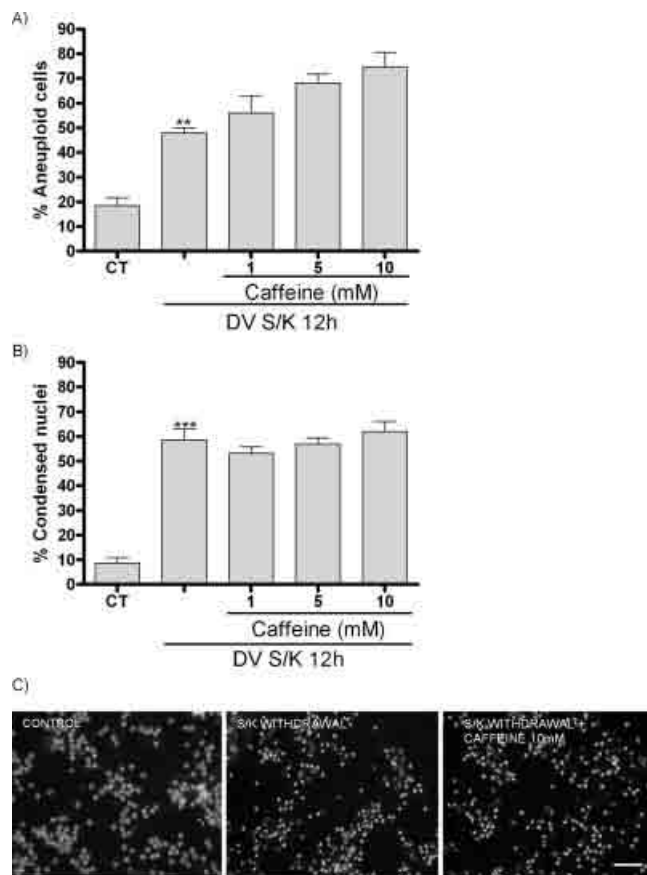


Fig. 4. **A:** Concentration–response of flow cytometry bar chart showing the effect of 12 hr of exposure to caffeine on CGNs treated with S/K withdrawal. **B:** Concentration–response of condensed nuclei bar chart showing the effect of 12 hr of exposure to caffeine on CGNs treated with S/K withdrawal. Each bar is the mean \pm SEM of 5–6 cultures, carried out in quadruplicate. Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Tukey's test: *** $P < 0.001$ versus control. **C:** PI staining of DNA from nuclei of CGNs under different experimental conditions, observed under a fluorescence microscope.

and E2F-1, which was completely prevented by 10 mM caffeine (Fig. 6). These results suggest that DNA damage associated with ATM activation is involved in cell-cycle regulation.

DISCUSSION

In the present study, we examined the neuroprotective effects of caffeine on a model of inhibition of mitochondrial complex I and the treatment of CGNs with the neurotoxin MPP⁺ (Gonzalez-Polo et al., 2004). Using specific antibodies for activated ATM and p53, we demonstrated that MPP⁺-induced apoptosis was associated with activation of the ATM/p53 pathway. Moreover, our results indicate that the addition of caffeine in CGNs attenuated the loss of cell viability induced by complex I inhibitor, as measured by the MTT method, and prevented apoptosis mediated by

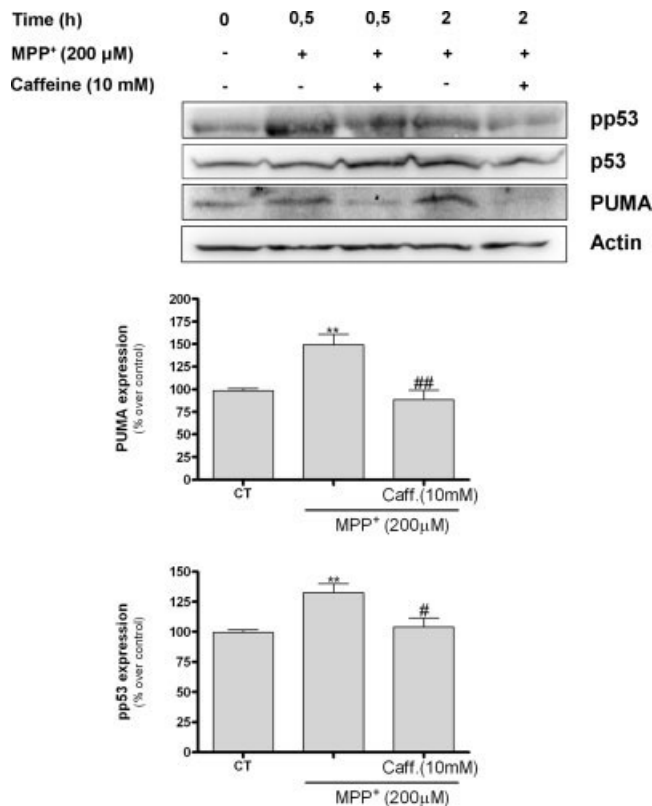


Fig. 5. Western blot analysis of pp53, p53, and PUMA levels in CGNs after MPP⁺ treatment. Cultures were treated with 200 μM MPP⁺ alone for 0.5 and 2 hr or in the presence of 10 mM caffeine. At the end of the treatments, cells were lysed, and the cell lysates were subjected to immunoblot analysis (see Material and Methods section). Changes in band intensity were calculated as percentages of control band intensity. Columns and bars represent means \pm SEM of 3–4 experiments with four culture preparations ($n = 4$). Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Tukey's tests: ** $P < 0.01$ versus control; ## $P < 0.01$ versus MPP⁺.

MPP⁺, as quantified by DNA fragmentation and nuclear cell counting. These results are in agreement with previous data showing that caffeine exerts neuroprotective effects in the MPTP mouse model and after amyloid- β toxicity in CGNs (Dall'Igna et al., 2003; Schwarzschild et al., 2003). In previous studies (Dall'Igna et al., 2003; Schwarzschild et al., 2003), the neuroprotective effects of caffeine were attributed to the interaction with adenosine receptors; however, in the present work, we have demonstrated that the blockade of A₁ and A₂ receptors was not implicated in the neuroprotective effect of caffeine. This conclusion is supported by the lack of neuroprotective effects and attenuation of MPP⁺-induced apoptosis using two antagonists of adenosine receptors (DPCPX and CGS-159438) at doses that successfully block these receptors.

On the other hand, previous studies have also shown that p53 is involved in MPTP-induced apoptosis. As such, synthetic p53 offers neuroprotection to mice

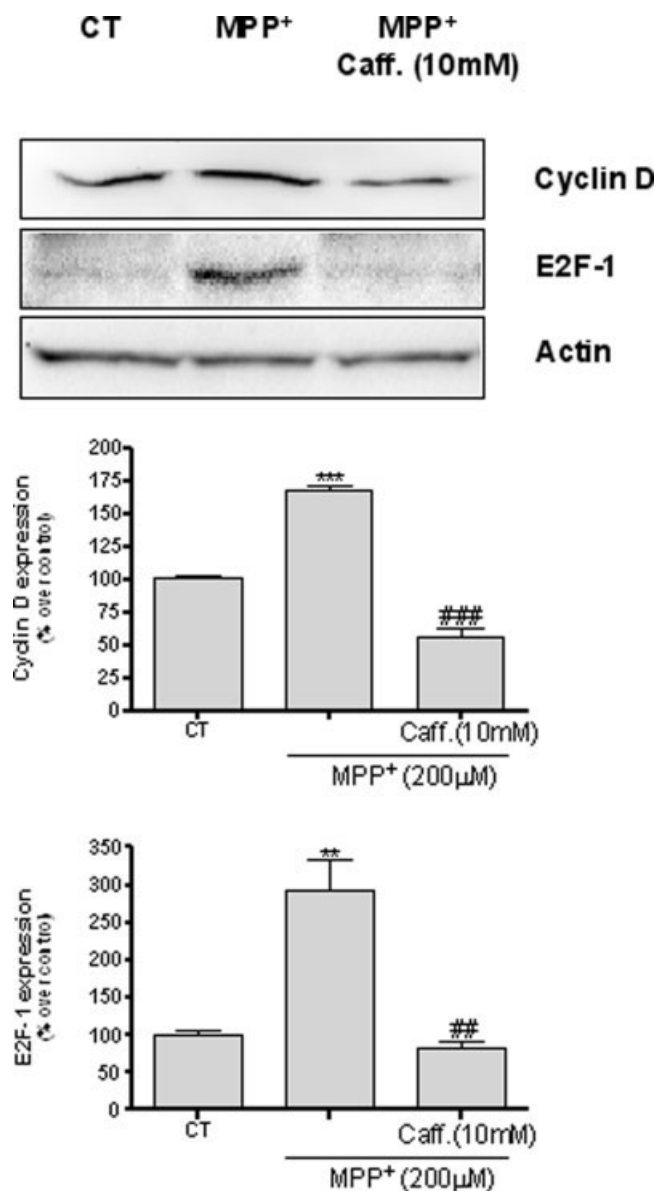


Fig. 6. Western blot analysis of cyclin D and E2F-1 levels in CGNs after MPP⁺ treatment. Cultures were treated with 200 μ M MPP⁺ alone for 0.5 and 2 hr or in the presence of 10 mM caffeine. At the end of the treatments, cells were lysed, and the cell lysates were subjected to immunoblot analysis (see Material and Methods section). Changes in band intensity were calculated as percentages of control band intensity. Columns and bars represent means \pm SEMs of 3–4 experiments ($n = 4$). Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Tukey's tests: ** $P < 0.01$ versus control; *** $P < 0.001$ versus control; ### $P < 0.01$ versus MPP⁺; #### $P < 0.01$ versus MPP⁺.

treated with the neurotoxin MPTP (Duan et al., 2002). In addition, p53 activates the mitochondrial apoptotic pathway and constitutes a potential link between DNA damage and mitochondrial alteration by increasing transcription of the proapoptotic BH3-only proteins such as PUMA (Culmsee and Mattson 2005). In the present

study we have demonstrated that after a treatment with MPP⁺, there is rapid activation of Ser15-p53 that can be inhibited by caffeine. Furthermore, our data also have demonstrated that caffeine prevents expression of the downstream target of p53, the protein PUMA. Therefore, our results suggest that ATM is a key component of the process of apoptosis mediated by MPP⁺. Such an interpretation is consistent with studies performed with DNA damage agents such as camptothecin and cytosine arabinoside and also 6-hydroxydopamine, an experimental model of Parkinson's disease (Geller et al., 2001; Keramis et al., 2003; Nair, 2006). Likewise, ATM activation has been previously demonstrated in others models of neurotoxicity such as during treatment of neuronal cell cultures with the neurotoxin amyloid- β and excitotoxic treatment with NMDA (Macleod et al., 2003; Kruman et al., 2004). In this regard, neuroprotection was achieved using neuronal mice cell cultures lacking ATM (-/-). These previous findings, together with our results, strongly suggest that in addition to mitochondria, DNA damage, specifically activation of PI3kinases such as ATM, contributes to the neuronal apoptotic process. It seems that ATM is activated as a transducer pathway, which in turn by phosphorylation activates a large number of proteins that convey the message activating several intracellular processes (McKinnon, 2001; McMurray, 2005; Ljungman, 2005). In addition to ATM, activation of cell-cycle proteins, specifically the transcription factor E2F-1, is also key in the neuronal apoptotic route (Hou et al., 2000, 2001; Phillips and Vousden, 2001; Smith et al., 2003; Verdager et al., 2004; Pallàs et al., 2005) consistent with reports suggesting that the expression of cell-cycle proteins could constitute a convergent point in all neurodegenerative diseases (Becker and Bonni, 2004; Langley and Ratan, 2004). In support of this concept, we demonstrated for the first time that caffeine inhibits the expression of two key proapoptotic factors, E2F-1 and p53. The inhibition of cyclin D and E2F-1 is in agreement with the hypothesis that neuronal reentry into the cell cycle is associated with DNA damage (Zhu et al., 2004). Several studies have shown the importance of E2F-1 in neuronal apoptosis, including death induced by potassium deprivation, excitotoxicity; ischemia, and DNA damage (O'Hare et al., 2000; Wang et al., 2002; Verdager et al., 2002; Wu et al., 2004). However, caffeine did not attenuate apoptosis mediated by S/K potassium deprivation. The lack of neuroprotective effects in this model using caffeine could be explained by the apoptosis in this model being independent of p53 activation. Nonetheless, the implication of the cell cycle in S/K deprivation was demonstrated by the partial protection of CGNs from mice lacking E2F-1 (O'Hare et al., 2000).

Previously Kruman et al. demonstrated a link between DNA damage and reentry into the cell cycle after camptothecin and amyloid- β treatment. However, the novel finding in our study stems from using a neurotoxin that specifically targets the mitochondria rather

than the nucleus. Furthermore, the results of our study suggest that targeting nuclear enzymes is adequate to attenuate neuronal apoptosis mediated by mitochondrial alteration. Previously, it has been hypothesized that neuronal loss is a consequence of two stimuli, oxidative stress and reentry into the cell cycle; this is known as the two-hit hypothesis (Zhu et al., 2004). The present study has provided strong support for this hypothesis and has provided potential additional mechanisms. As such, we suggest that because E2F-1 (or cell-cycle activation) is placed downstream of ATM activation in the MPP⁺ stimuli (and probably others) and because ATM could directly activate E2F-1, the most suitable hypothesis is that oxidative stress (mitochondrial activation) together with PI3kinase activation (ATM) regulates neuronal apoptosis. We also propose that although mitochondrial alterations are the first target implicated in MPP⁺-induced apoptosis, in a second step, ROS generation could probably activate ATM (antioxidants attenuate apoptosis mediated by MPP⁺). Likewise, ATM, through reentry into the cell cycle, could also overstimulate mitochondria and favor the process of apoptosis. Furthermore, the multiple substrates that are phosphorylated by ATM could explain the caspase-independent pathway mediated by, for example, E2F-1.

Our data are also consistent with those of previous studies wherever activation of another nuclear enzyme involved in DNA repair PARP is involved in regulating release of mitochondrial proteins, specifically apoptosis-inducing factor (Moore et al., 2005). Thus, our data confirm the importance of the nucleus in mitochondrial regulation through p53 activation.

In summary, our observations are consistent with the evidence that enzymes activated by DNA damage, in this case mediated by complex I inhibition, are an important feature in the process of neuronal apoptosis. Specifically, we have demonstrated that activation of ATM upstream of p53 and the transcription factor E2F-1 constitutes a key target for caffeine prevention of neuronal apoptosis. Moreover, our findings also implicate the inhibition of the cell cycle in the neuroprotective route of caffeine in the presence of DNA damage and p53 activation. This is supported by caffeine not showing neuroprotective effects in another model of apoptosis in which, although the cell cycle is activated, apoptosis is p53 independent. Furthermore, our study suggests that the enzyme ATM could constitute a target for the prevention of neuronal apoptosis in neurodegeneration where p53 is implicated and constitutes a common pathway.

REFERENCES

- Andersen JK. 2004. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence. *Nat Rev Neurosci* 5:S18–S25.
- Alvira D, Tajés M, Verdaguer E, Acuna-Castroviejo D, Folch J, Camins A, Pallas M. 2006. Inhibition of the cdk5/p25 fragment formation may explain the antiapoptotic effects of melatonin in an experimental model of Parkinson's disease. *J Pineal Res* 40:251–258.
- Arendt T. 2002. Dysregulation of neuronal differentiation and cell cycle control in Alzheimer's disease. *J Neural Trans Suppl* 62:77–85.
- Barzilai A, Yamamoto KI. 2004. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst)* 3:1109–1115.
- Beal MF. 2004. Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in Alzheimer's and Parkinson's diseases and coenzyme Q10 as a potential treatment. *J Bioenerg Biomem* 36:381–386.
- Becker EB, Bonni A. 2004. Cell cycle regulation of neuronal apoptosis in development and disease. *Progress Neurobiol* 72:1–25.
- Biswas SC, Liu DX, Greene LA. 2005. Bim is a direct target of a neuronal E2F-1 dependent apoptotic pathway. *J Neurosci* 25:8349–8358.
- Bowser R, Smith MA. 2002. Cell cycle proteins in Alzheimer's disease: plenty of wheels but no cycle. *J Alzheimer Dis* 4:249–254.
- Busser J, Geldmacher DS, Herrup K. 1998. Ectopic cell cycle proteins predict the sites of neuronal cell death in Alzheimer's disease brain. *J Neurosci* 18:2801–2807.
- Casadesus G, Atwood CS, Zhu X, Hartzler AW, Webber KM, Perry G, Bowen RL, Smith MA. 2005. Evidence for the role of gonadotropin hormones in the development of Alzheimer disease. *Cell Mol Life Sci* 62:293–298.
- Cernak I, Stoica B, Byrnes KR, Di Giovanni S, Faden AI. 2005. Role of the cell cycle in the pathobiology of central nervous system trauma. *Cell Cycle* 4:1286–1293.
- Chee JL, Guan XL, Lee JY, Dong B, Leong SM, Ong EH, Liou AK, Lim TM. 2005. Compensatory caspase activation in MPP⁺-induced cell death in dopaminergic neurons. *Cell Mol Life Sci* 62:227–238.
- Choi WS, Lee EH, Chung CW, Jung YK, Jin BK, Kim SU, Oh TH, Saïdo TC, Oh YJ. 2001. Cleavage of Bax is mediated by caspase-dependent or -independent calpain activation in dopaminergic neuronal cells: protective role of Bcl-2. *J Neurochem* 77:1531–1541.
- Chu CT, Zhu JH, Cao G, Signore A, Wang S, Chen J. 2005. Apoptosis inducing factor mediates caspase-independent 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity in dopaminergic cells. *J Neurochem* 94:1685–1695.
- Cookson MR. 2005. The biochemistry of Parkinson's disease. *Ann Review Biochem* 74:29–52.
- Copani A, Uberti D, Sortino MA, Bruno V, Nicoletti F, Memo M. 2001. Activation of cell-cycle-associated proteins in neuronal death: a mandatory or dispensable path? *Trends Neurosci* 24:25–31.
- Copani A, Sortino MA, Caricasole A, Chiechio S, Chisari M, Battaglia G, Giuffrida-Stella AM., Vancheri C., Nicoletti F. 2002. Erratic expression of DNA polymerases by beta-amyloid causes neuronal death. *FASEB J* 16:2006–2008.
- Crocker SJ, Smith PD, Jackson-Lewis V, Lamba WR, Hayley SP, Grimm E, Callaghan S.M, Slack RS, Melloni E, Przedborski S, Robertson GS, Anisman H, Merali Z, Park DS. 2003. Inhibition of calpains prevents neuronal and behavioral deficits in an MPTP mouse model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 23:4081–4091.
- Culmsee C, Mattson MP. 2005. p53 in neuronal apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 331:761–777.
- Dall'Igna OP, Porciuncula LO, Souza DO, Cunha RA, Lara DR. 2003. Neuroprotection by caffeine and adenosine A_{2A} receptor blockade of β -amyloid neurotoxicity. *Br J Pharmacol* 138:1207–1209.
- Du Y, Dodel RC, Bales KR, Jemmerson R, Hamilton-Byrd E, Paul SM. 1997. Involvement of a caspase-3-like cysteine protease in 1-methyl-4-phenylpyridinium-mediated apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *J Neurochem* 69:1382–1388.
- Duan W, Zhu X, Ladenheim B, Yu QS, Guo Z, Oyler J, Cutler RG, Cadet JL, Greig NH, Mattson MP. 2002. P53 inhibitors preserve dopamine neurons and motor function in experimental Parkinsonism. *Ann Neurol* 52:597–606.
- Geller HM, Cheng KY, Goldsmith NK, Romero AA, Zhang AL, Morris EJ, Grandison L. 2001. Oxidative stress mediates DNA damage and apoptosis in response to cytosine arabinoside. *J Neurochem* 78:265–275.

- Giovanni A, Wirtz-Brugger F, Keramaris E, Slack R, Park DS. 1999. Involvement of cell cycle elements, cyclin-dependent kinases, pRb, and E2F x DP, in B-amyloid-induced neuronal death. *J Biol Chem* 274:19011–19016.
- Gonzalez-Polo RA, Mora A, Clemente N, Sabio G, Centeno F, Soler G, Fuentes JM. 2001. Mechanisms of MPP⁺ incorporation into cerebellar granule cells. *Brain Res Bull* 56:119–123.
- Gonzalez-Polo RA, Soler G, Alvarez A, Fabregat I, Fuentes JM. 2003. Vitamin E blocks early events induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) in cerebellar granule cells. *J Neurochem* 84:305–315.
- Gonzalez-Polo RA, Soler G, Fuentes JM. 2004. MPP⁺: mechanism for its toxicity in cerebellar granule cells. *Mol Neurobiol* 30:253–264.
- Herrup K, Arendt T. 2002. Re-expression of cell cycle proteins induces neuronal cell death during Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 4:243–247.
- Herrup K, Neve R, Ackerman SL, Copani A. 2004. Divide and die: cell cycle events as triggers of nerve cell death. *J Neurosci* 24:9232–9239.
- Hoglinger GU, Breunig JJ, Depboylu C, Rouaux C, Michel PP, Alvarez-Fischer D, Boutillier AL, Degregori J, Oertel WH, Rakic P, Hirsch EC, Hunot S. 2007. The pRb/E2F cell-cycle pathway mediates cell death in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:3585–3590.
- Hou ST, Callaghan D, Fournier MC, Hill I, Kang L, Massie B. 2000. The transcription factor E2F1 modulates apoptosis of neurons. *J Neurochem* 75:91–100.
- Hou ST, Cowan E, Walker T, Ohan N, Dove M, Rasqinha I, MacManus JP. 2001. The transcription factor E2F1 promotes dopamine-evoked neuronal apoptosis by a mechanism independent of transcriptional activation. *J Neurochem* 78:287–297.
- Jenner P. 2003. A2A antagonists as novel non-dopaminergic therapy for motor dysfunction in PD. *Neurology* 61:S32–S328.
- Jorda EG, Verdager E, Canudas AM, Jimenez A, Bruna A, Caelles C, Bravo R, Escubedo E, Pubill D, Camarasa J, Pallas M, Camins A. 2003. Neuroprotective action of flavopiridol, a cyclin-dependent kinase inhibitor, in colchicine-induced apoptosis. *Neuropharmacology* 45:672–683.
- Jordan-Sciutto KL, Malaiyandi LM, Bowser R. 2002. Altered distribution of cell cycle transcriptional regulators during Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 61:358–367.
- Jordan-Sciutto KL, Dorsey R, Chalovic EM, Hammond RR, Achim CL. 2003. Expression patterns of retinoblastoma protein in Parkinson disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 62:68–74.
- Kanazawa I. 2001. How do neurons die in neurodegenerative diseases? *Trends Mol Med* 7:339–344.
- Keramaris E, Hirao A, Slack RS, Mak TW, Park DS. 2003. Ataxia Telangiectasia-mutated can regulate p53 and neuronal death independent of Chk2 in response to DNA damage. *J Biol Chem* 278:37782–37789.
- Khanna KK, Lavin MF, Jackson SP, Mulherm TD. 2001. ATM, a central controller of cellular responses to DNA damage. *Cell Death Diff* 8:1052–1065.
- Klein JA, Longo-Guess CM, Rossmann MP, Seburn KL, Hurd RE, Frankel WN. 2002. The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature* 419:367–374.
- Krantic S, Mechawar N, Reix S, Quirion R. 2005. Molecular basis of programmed cell death involved in neurodegeneration. *Trends Neurosci* 28:670–676.
- Kruman II. 2004. Why do neurons enter the cell cycle? *Cell Cycle* 3:e56–e60.
- Kruman II, Wersto RP, Cardozo-Pelaez F, Smilenov L, Chan SL, Chrest FJ, Emokpae R Jr, Gorospe M, Mattson MP. 2004. Cell cycle activation linked to neuronal cell death initiated by DNA damage. *Neuron* 41:549–561.
- Schwartz EI, Smilenov LB, Price MA, Osredkar T, Baker RA, Ghosh S, Shi FD, Vollmer TL, Lencinas A, Stearns DM, Gorospe M, Kruman II. 2007. Cell cycle activation in postmitotic neurons is essential for DNA repair. *Cell Cycle* 6:318–329.
- Kurz E, Less-Miller SP. 2004. DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signalling pathways. *DNA Repair* 3:889–900.
- Langley B, Ratan RR. 2004. Oxidative stress-induced death in the nervous system: cell cycle dependent or independent? *J Neurosci Res* 77:621–629.
- Leist M, Volbracht C, Fava E, Nicotera P. 1998. 1-Methyl-4-phenylpyridinium induces autocrine excitotoxicity, protease activation, and neuronal apoptosis. *Mol Pharmacol* 54:789–801.
- Lin MT, Beal MF. 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443:787–795.
- Liou AK, Zhou Z, Pei W, Lim, T.M., Yin, X.M., Chen, J. 2005. BimEL up-regulation potentiates AIF translocation and cell death in response to MPTP. *FASEB J* 19:1350–1352.
- Ljungman M. 2005. Activation of DNA damage signalling. *Mut Res* 577:203–216.
- Macleod MR, Ramage L, McGregor A, Seckl JR. 2003. Reduced NMDA-induced apoptosis in neurons lacking ataxia telangiectasia mutated protein. *Neuroreport* 14:215–217.
- Mattson MP, Magnus T. 2006. Ageing and neuronal vulnerability. *Nat Rev Neurosci* 7:278–294.
- McKinnon PJ. 2001. Ataxia telangiectasia: new neurons and ATM. *Trends Mol Med* 7:233–234.
- McMurray CT. 2005. To die or not to die: DNA repair in neurons. *Mut Res* 577:260–274.
- Mirjany, M, Ho L, Pasinetti GM. 2002. Role of cyclooxygenase-2 in neuronal cell cycle activity and glutamate-mediated excitotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 301:494–500.
- Moreira PI, Smith MA, Zhu X, Nunomura A, Castellani RJ, Perry G. 2005. Oxidative stress and neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci* 1043:545–552.
- Moore DJ, West AB, Dawson VL, Dawson TM. 2005. Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci* 28:57–87.
- Nair VD. 2006. Activation of p53 signaling initiates apoptotic death in a cellular model of Parkinson's disease. *Apoptosis* 11:955–966.
- Nagy Z, Esiri MM, Smith AD. 1997. Expression of cell division markers in the hippocampus in Alzheimer's disease and other neurodegenerative conditions. *Acta Neuropathol (Berl)* 93:294–300.
- Neve RL, McPhie DL. 2006. The cell cycle as a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Pharmacol Ther* 111:99–113.
- O'Hare MJ, Hou ST, Morris EJ, Cregan SP, Xu Q, Slack RS, Park DS. 2000. Induction and modulation of cerebellar granule neuron death by E2F-1. *J Biol Chem* 275:25358–25264.
- Orth M, Schapira AHV. 2002. Mitochondrial involvement in Parkinson's disease. *Neurochem Int* 40:533–541.
- Pallas M, Verdager E, Jorda EG, Jiménez A, Canudas AM, Camins A. 2005. Flavopiridol: an antitumor drug with potential application in the treatment of neurodegenerative diseases. *Med Hypotheses* 64:120–123.
- Pallas M, Camins A. 2006. Molecular and biochemical features in Alzheimer's disease. *Curr Pharm* 12:4389–4408.
- Perry G, Nunomura A, Hirai K, Zhu X, Perez M, Avila J, Castellani RJ, Atwood CS, Aliev G, Sayre LM, Takeda A, Smith MA. 2002. Is oxidative damage the fundamental pathogenic mechanism of Alzheimer's and other neurodegenerative diseases? *Free Radic Biol Med* 33:1475–1479.
- Przedborski S, Tieu K, Perier C, Vila M. 2004. MPTP as a mitochondrial neurotoxic model of Parkinson's Disease. *J Bioener Biomem* 36:375–379.
- Phillips AC, Vousden KH. 2001. E2F-1 induced apoptosis. *Apoptosis* 6:173–183.
- Raina AK, Pardo P, Rottkamp CA, Zhu X, Pereira-Smith OM, Smith MA. 2001. Neurons in Alzheimer disease emerge from senescence. *Mech Ageing Dev* 123:3–9.

- Raina AK, Zhu X, Smith MA. 2004. Alzheimer's disease and the cell cycle. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 64:107–112.
- Ranganathan S, Bowser R. 2003. Alterations in G (1) to S phase cell-cycle regulators during amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol* 162:823–835.
- Rolig RL, McKinnon PJ. 2000. Linking DNA damage and neurodegeneration. *Trends Pharmacol Sci* 23:417–424.
- Schwarzschild MA, Xu K, Oztas E, Petzer JP, Castagnoli K, Castagnoli N Jr, Chen JF. 2003. Neuroprotection by caffeine and more specific A_{2A} receptor antagonists in animal models of Parkinson's disease. *Neurology* 61:S55–S61.
- Segura-Aguilar J, Kostrzewa RM. 2004. Neurotoxins and Neurotoxic species implicated in neurodegeneration. *Neurotoxicity Res* 6:615–630.
- Shang T, Kotamraju S, Kalivendi SV, Hillard CJ, Kalyanaraman B. 2004. 1-Methyl-4-phenylpyridinium-induced apoptosis in cerebellar granule neurons is mediated by transferrin receptor iron-dependent depletion of tetrahydrobiopterin and neuronal nitric-oxide synthase-derived superoxide. *J Biol Chem* 279:19099–19112.
- Shang T, Uihlein AV, Van Asten J, Kalyanaraman B, Hillard CJ. 2003. 1-Methyl-4-phenylpyridinium accumulates in cerebellar granule neurons via organic cation transporter 3. *J Neurochem* 85:358–367.
- Smith PD, Crocker SJ, Jackson-Lewis V, Jordan-Sciutto KL, Hayley S, Mount MP, O'Hare MJ, Callaghan S, Slack RS, Przedborski S, Anisman H, Park DS. 2003. Cyclin-dependent kinase 5 is a mediator of dopaminergic neuron loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Science U S A* 100:13650–13655.
- Smith PD, O'Hare MJ, Park DS. 2004. CDKs: taking on a role as mediators of dopaminergic loss in Parkinson's disease. *Trends Mol Med* 10:445–451.
- Smith RA, Walker T, Xie X, Hou ST. 2003. Involvement of the transcription factor E2F1/Rb in kainic acid-induced death of murine cerebellar granule cells. *Mol Brain Res* 116:70–79.
- Stevens C, La Thangue NB. 2003. E2F and cell cycle control: a double-edged sword. *Arch Biochem Biophys* 412:157–169.
- Stevens, C, La Thangue NB. 2004. The emerging role of E2F-1 in the DNA damage response and checkpoint control. *DNA Repair* 3:1071–1079.
- Tretter L, Sipos I, Adam-Vizzi V. 2004. Initiation of neuronal damage by complex I deficiency and oxidative stress in Parkinson's disease. *Neurochem Res* 29:569–577.
- Verdaguer E, Garcia-Jorda E, Canudas AM, Dominguez E, Jimenez A, Pubill D, Escubedo E, Camarasa J, Pallas M, Camins A. 2002. Kainic acid-induced apoptosis in cerebellar granule neurons: an attempt at cell cycle re-entry. *Neuroreport* 13:413–416.
- Verdaguer E, Jimenez A, Canudas AM, Jorda EG, Sureda FX, Pallas M, Camins A. 2004. Inhibition of cell cycle pathway by flavopiridol promotes survival of cerebellar granule cells after an excitotoxic treatment. *J Pharmacol Exp Ther* 308:609–616.
- Wang F, Corbett D, Osuga H, Osuga S, Ikeda JE, Slack RS, Hogan MJ, Hakim AM, Park DS. 2002. Inhibition of cyclin-dependent kinases improves CA1 neuronal survival and behavioral performance after global ischemia in the rat. *J Cerebral Blood Flow Metab* 22:171–182.
- Webber KM, Raina AK, Marlatt MW, Zhu X, Prat MI, Morelli L, Casadesus G, Perry G, Smith MA. 2005. The cell cycle in Alzheimer disease: A unique target for neuropharmacology. *Mech Ageing Dev* 126:1019–1025.
- Wu CR, Zhang Y, Rose ME, Graham SH. 2004. Cyclooxygenase-2 activity contributes to neuronal expression of cyclin D1 after anoxia/ischemia in vitro and in vivo. *Mol Brain Res* 132:31–37.
- Zhu X, Raina AK, Boux H, Simmons ZL, Takeda A, Smith MA. 2000. Activation of oncogenic pathways in degenerating neurons in Alzheimer disease. *Int J Dev Neurosci* 18:433–437.
- Zhu X, Raina AK, Perry G, Smith MA. 2004. Alzheimer's disease: the two-hit hypothesis. *Lancet* 3:219–226.

Publicació 7

**COMPARATIVE ANALYSIS OF THE EFFECTS OF
RESVERATROL IN TWO APOPTOTIC MODELS: INHIBITION
OF COMPLEX I AND POTASSIUM DEPRIVATION IN
CEREBELLAR NEURONS**

Daniel Alvira, **Marc Yeste-Velasco**, Jaume Folch, Ester Verdaguer, Anna Maria
Canudas, Mercè Pallàs, Antoni Camins

Neuroscience (2007) 147: 746-756

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE EFFECTS OF RESVERATROL IN TWO APOPTOTIC MODELS: INHIBITION OF COMPLEX I AND POTASSIUM DEPRIVATION IN CEREBELLAR NEURONS

D. ALVIRA^{a,c,d} M. YESTE-VELASCO^{a,c,d} J. FOLCH^{b,c,d}
E. VERDAGUER^e A. M. CANUDAS^{a,c,d} M. PALLÀS^{a,c,d}
AND A. CAMINS^{a,c,d*}

^aUnitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Nucli Universitari de Pedralbes, 08028 Barcelona, Spain

^bUnitat de Bioquímica, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, C.ISt. Llorenç 21 43201 Reus (Tarragona), Spain

^cInstitut de Biomedicina, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Nucli Universitari de Pedralbes, 08028 Barcelona, Spain

^dCentros de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas, Instituto de Salud Carlos III, Spain

^eDepartament de Farmacologia i Toxicologia, IIBB-CSIC, IDIBAPS, Rossello 161, Planta 6, 08036 Barcelona, Spain

Abstract—The mechanism involved in neuronal apoptosis is largely unknown. Studies performed on neuronal cell cultures provide information about the pathways which orchestrate the process of neuronal loss and potential drugs for the treatment of neurological disorders. In the present study we select resveratrol, a natural antioxidant, as a potential drug for the treatment of neurodegenerative diseases. We evaluate the neuroprotective effects of resveratrol in two apoptotic models in rat cerebellar granule neurons (CGNs): the inhibition of mitochondrial complex I using 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) (an *in vitro* model of Parkinson's disease) and serum potassium withdrawal. We study the role of the mammalian silent information regulator 2 (SIRT1) in the process of neuroprotection mediated by resveratrol.

Because recent studies have demonstrated that SIRT1 is involved in cell survival and has antiaging properties, we also measured changes in the expression of this protein after the addition of these two apoptotic stimuli. MPP⁺-induced loss of cell viability and apoptosis in CGNs was prevented by the addition of RESV (1 μ M to 100 μ M). However, the neuroprotective effects were not mediated by the activation of SIRT1, since sirtinol—an inhibitor of this enzyme—did not attenuate them. Furthermore MPP⁺ decreases the protein expression of SIRT1. RESV did not prevent serum potassium withdrawal-induced apoptosis although it did completely attenuate oxidative stress production by these apoptotic stimuli. Furthermore, serum potassium withdrawal increases the expression of SIRT1.

*Correspondence to: A. Camins, Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Nucli Universitari de Pedralbes, 08028 Barcelona, Spain.
E-mail address: camins@ub.edu (A. Camins).

Abbreviations: CGN, cerebellar granule neuron; Ct, cycle threshold; H₂DCFDA, 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate; MPP⁺, 1-methyl-4-phenylpyridinium; PBS, phosphate buffered saline; PD, Parkinson's disease; PI, propidium iodide; ROS, reactive oxygen species; SIRT1, mammalian silent information regulator 2; Sir2, silent information regulator 2.

0306-4522/07\$30.00+0.00 © 2007 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.neuroscience.2007.04.029

Our results indicate that the antiapoptotic effects of RESV in MPP⁺ are independent of the stimulation of SIRT1 and depend on its antioxidant properties. Furthermore, because SIRT1 is involved in neuronal survival depending on the apoptotic stimuli, changes in the expression of SIRT1 could be involved in the regulation of the apoptotic route. © 2007 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: cerebellar granule cells, resveratrol, sirtinol, SIRT1, MPP⁺, serum and potassium withdrawal.

One essential task in neuropharmacology is the search for and development of new drugs for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders (Krantic et al., 2005; Anekonda and Reddy, 2006). Natural compounds could be suitable candidates in this respect (Baur and Sinclair, 2006; Mattson and Cheng, 2006). Moreover, in recent years it has been shown that resveratrol offers protection against different neurotoxins and delayed axonal degeneration (Anekonda, 2006; Araki et al., 2004). Resveratrol (trans-3,4',5-tryhydroxystilbene) is a natural phytochemical present in high concentrations in red grapes and wine and the health benefits of red wine have been attributed to this compound (Bastianetto and Quirion, 2002; Lu et al., 2006; Baur and Sinclair, 2006). It exhibits potent antioxidant activity and it was originally believed that this action was responsible for its beneficial properties (De Ruvo et al., 2000). All this is related to the evidence that people who consume a moderate amount of red wine face a reduced risk of cardiovascular disease, this is termed the French paradox (Tredici et al., 1999; Sovak, 2001; Sun et al., 2002; Zhuang et al., 2003; Mattson and Cheng, 2006).

Previous studies have demonstrated that resveratrol is an interesting candidate for potential pharmacological applications; for example in cancer treatment and cardiovascular treatment, and recently it has been suggested that resveratrol has a beneficial effect in the treatment of neurodegenerative diseases (Bastianetto and Quirion, 2002; Wang et al., 2002, 2004; Anekonda, 2006; Baur and Sinclair, 2006; Anekonda and Reddy, 2006; Shimizu et al., 2006). Although the mechanisms of the neuroprotective effects of resveratrol are not fully understood, studies performed on many different cell lines and primary neuronal cell cultures suggest that several signal transduction components are activated or inhibited by RESV. These include AKT in a model of oxygen and glucose deprivation, GSK-3 β inhibition, protein kinase C attenuation and inhibition of several ion channels (Miloso et al., 1999; Gao and

Hu, 2005; Kim et al., 2005; Gao et al., 2006; Zamin et al., 2006). The beneficial effects of resveratrol were believed to be due to its antioxidant properties (Bastianetto and Quirion, 2002; Kasdallah-Grissa et al., 2006). However, the evidence that resveratrol was able to activate the silent information regulator 2 (Sir2) families of proteins (sirtuins) SIRT1 (the mammalian homolog) opened a new area of interest associated with its antiaging properties (Grubisha et al., 2005).

Sir2 is a NAD-dependent deacetylase that shows the characteristic that is widely conserved from bacteria to humans and is involved in longevity (Kruszewski and Szumiel, 2005; Grubisha et al., 2005). There are also several recent reports on the potential neuroprotective effects of RESV in the treatment of Alzheimer's disease and probably other neurological disorders (Jang et al., 2003; Savaskan et al., 2003; Han et al., 2004). These studies are based in the activation of SIRT1 in the process of axonal neuroprotection, in the regulation of stress responses such as cell proliferation (Parker et al., 2005). These beneficial effects of RESV are explained by the regulation of several transcription factors such as p53, the forkhead transcription factor (FOXO) family of proteins, and others (Kobayashi et al., 2005). SIRT1 exerts its effects through control by NAD⁺ of deacetylation and acetylation of lysine groups of transcription factors and other proteins. Recent findings suggest an additional action of resveratrol extends lifespan in yeast, worms, *Drosophila* and in a fish *Nothobranchius furzeri* by activating Sir2 (Valenzano and Cellerino, 2006). Because a correlation exists between aging and neurodegenerative disorders, potential drugs which attenuate the aging process may be a suitable and additional strategy in the prevention or delay the neurodegenerative process. These observations raise the possibility that the potential pharmacological therapeutic effects of RESV could be exclusively mediated by the activation of SIRT1 and therefore involved in cell survival and they could increase longevity (Anekonda, 2006).

A useful method for studying the mechanisms involved in neurodegenerative diseases is the use of neurotoxins which reproduce a specific disease or well-known apoptotic models. At present, the most useful neurotoxin used to reproduce Parkinson's disease (PD) is 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) (Przedborski et al., 2004; Gonzalez-Polo et al., 2004a; Moore et al., 2005). This compound is an inhibitor of the mitochondrial complex I and is widely used as an experimental model of PD. To date, several routes have been proposed to explain the mechanisms involved in neuronal cell death in PD. Among these, reactive oxygen species (ROS) production is the main event in the process of neuronal cell death, probably by apoptosis (Gonzalez-Polo et al., 2004b). As we comment above, because effective treatments for neurodegenerative diseases are lacking, it is important to study and understand the mechanisms of potential drugs with a potential application in PD and other neurodegenerative diseases.

Therefore, a large number of studies use the neurotoxin MPP⁺ to demonstrate the neuroprotective effects of antioxidant drugs against this neurotoxin. For instance, it

has been shown that a number of natural compounds such as melatonin, vitamin E and also polyphenol compounds have neuroprotective effects in this experimental model of PD (Gonzalez-Polo et al., 2004b; Przedborski et al., 2004). Resveratrol could be an interesting candidate for potential application in the treatment of neurodegenerative disorders. Although a previous study demonstrated that resveratrol exerts a neuroprotective effect against MPP⁺ in cultures of mesencephalon neurons, the potential involvement of SIRT1 in this neuroprotective effect has not yet been evaluated. It is therefore of considerable interest to identify any potential molecular targets of resveratrol that transduce its beneficial effects on neurons.

The present study aimed to establish the effects of resveratrol on two well-known *in vitro* apoptotic models in cerebellar granule neurons (CGNs): exposure to the neurotoxin MPP⁺ and serum and potassium deprivation. We also investigated whether the potential neuroprotective effects of resveratrol could be related to the activation of SIRT1.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials

Pharmacological agents used in this study include: MPP⁺, resveratrol, sirtinol, and propidium iodide (PI) from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Cell culture media and fetal calf serum (FCS) from GIBCO (Life Technologies, Paisley, UK). Cell cultures salts, enzymes, Mowiol® 4–88 and Triton X-100 were purchased from Sigma. Other chemical reagents were of analytical quality and purchased from Sharlab (Barcelona, Spain).

Cell cultures

Primary cultures of CGNs were prepared from postnatal day 7 Sprague–Dawley rat pups as described previously (Verdaguer et al., 2002, 2004). Cells were dissociated in the presence of trypsin and DNase I and plated in poly-L-lysine (100 µg/ml)-coated dishes at a density of 8×10⁵ cells/cm² in basal Eagle's medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 0.1 mg/ml gentamicin, 2 mM L-glutamine, and 25 mM KCl. Cytosine-D-arabino-furanoside (10 µM) was added to the culture medium 24 h after plating to prevent the replication of non-neuronal cells. The cultures were maintained at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO₂, 95% air and left undisturbed until the experiments were performed. All procedures involving animals and their care were approved by the ethics committee of the University of Barcelona, and were conducted in accordance with national (Spanish) and international laws and policies (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Academy Press, Washington, DC, 1996). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Treatment of CGNs

CGNs were used after 7–8 days of *in vitro* culture. Drugs (resveratrol and sirtinol) were added 2 h before the addition of MPP⁺ (200 µM). With respect to S/K withdrawal, RESV was added 24 h before S/K withdrawal and then at the same time as S/K deprivation.

Detection of condensed nuclei by PI staining

PI staining was used to detect morphological evidence of cell viability. CGNs were grown on glass coverslips following MPP⁺

treatment alone, or in the presence of RESV. Subsequently, cells were fixed in 4% paraformaldehyde/phosphate buffered saline solution (PBS) pH 7.4 for 1 h at room temperature. After washing with PBS, the cells were incubated for 3 min with a solution of PI in PBS (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Stained cells were visualized under UV illumination using the 20 \times objective and their digitized images were captured.

Treatment of apoptotic cells resulted in shrunken, brightly fluorescent, apoptotic nuclei exhibiting high fluorescence and condensed chromatin compared with non-apoptotic cells. Apoptotic cells were awarded a score by counting at least 500 cells in each sample over three separate experiments.

Analysis of DNA fragmentation by flow cytometry

Apoptosis was measured 48 h after MPP⁺ treatment and 12 h after S/K withdrawal. Briefly, the culture medium was removed, the cells were then collected from culture plates by pipetting and washed with PBS. Flow cytometer experiments were carried out using an Epics XL flow cytometer with PI (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) added 30 min beforehand. The instrument was set up in the standard configuration: excitation of the sample was conducted using a 488 nm air-cooled argon-ion laser at 15 mW as a standard. Forward scatter (FSC), side scatter (SSC), and PI red (620 nm) fluorescence values were then acquired. Optical alignment was based on the optimized signal from 10 nm fluorescent beads (Immunocheck, Epics Division, Coulter Corporation, Hialeah, FL, USA). Time was used as a control to stabilize the instrument while red

fluorescence was projected onto a 1024 monoparametrical histogram. Aggregates were excluded while single cells were gated by individual area vs. peak signal fluorescence.

Measurements of ROS

Levels of intracellular ROS were measured using the fluorescent probe 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA). Briefly, cells were incubated for 30 min at 37 °C in the presence of 10 μM of H₂DCFDA (added from a 20 mM stock solution in dimethyl sulfoxide). H₂DCFDA diffuses across the neuronal membranes, where acetates migrate by intracellular esterases. Oxidation of H₂DCFDA occurs almost exclusively in the cytosol, and generates a fluorescent response that is proportional to ROS generation. After loading with the dye, the neurons were washed in a Locke's buffer and fluorescence was measured at a 488 nm excitation wavelength and an emission wavelength of 510 nm, in a Perkin-Elmer Victor 3 fluorimeter.

Western-blot analysis

Aliquots of cell homogenate, containing 30 μg of protein per sample (SIRT1, α -tubulin), were analyzed by Western blot. Briefly, samples were placed in sample buffer (0.5 M Tris–HCl pH 6.8, 10% glycerol, 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) 2- β -mercaptoethanol, 0.05% Bromophenol Blue) and denatured by boiling at 95–100 °C for 5 min. Samples were then separated by electrophoresis on 10% acrylamide gels, with proteins subsequently transferred to

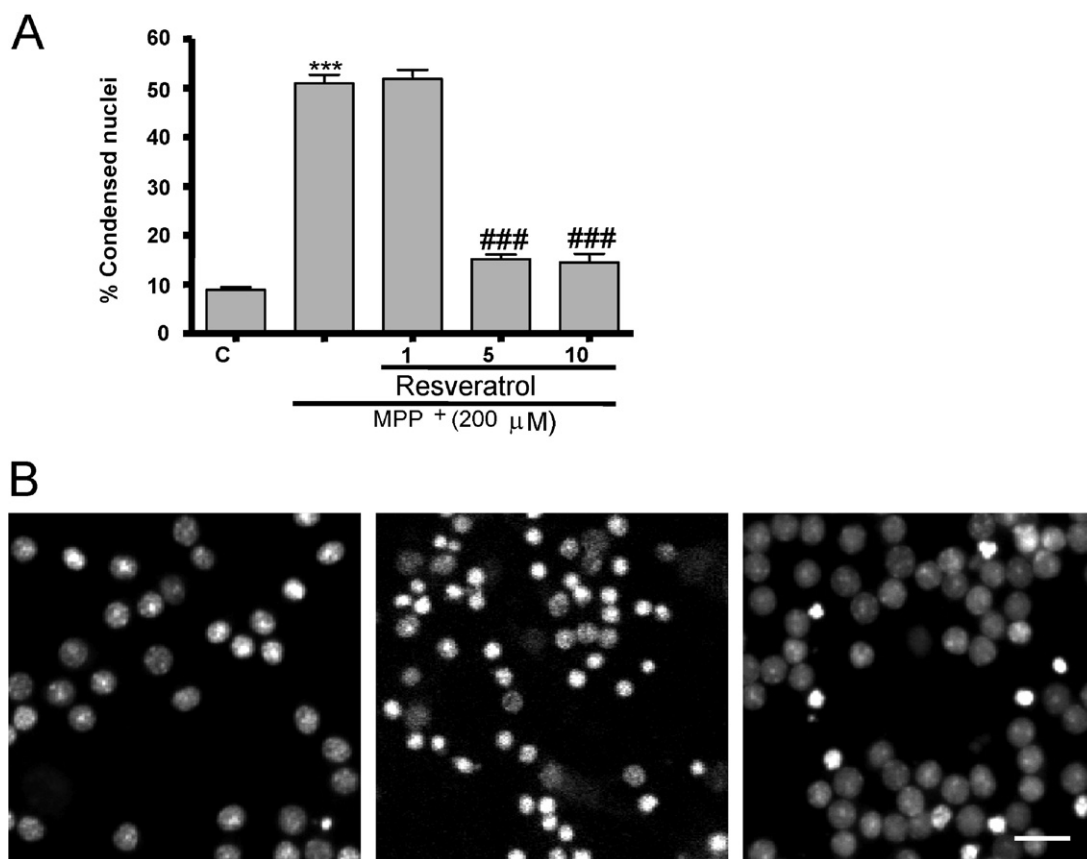


Fig. 1. (A) Bar chart showing the percentage effects of different concentrations of resveratrol on MPP⁺-induced nuclear condensation in CGNs exposed for 48 h. The nuclei were counted on a fluorescence microscope, distinguishing normal nuclei from the condensed ones following the criteria stated in the Experimental Procedures. Each point is the mean \pm S.E.M. of four wells of five to six different cultures. (B) Representative images of nuclei control sample, MPP⁺ 200 μM treated and MPP⁺ RESV 100 μM respectively (scale bar = 10 μM). When necessary, statistical analyses was carried out using the one-way ANOVAs followed by Tukey's tests: *** $P < 0.001$ vs. control; ### $P < 0.001$ vs. MPP⁺ 200 μM .

polyvinylidene fluoride (PVDF) sheets (Immobilon™-P, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) using a transblot apparatus (Bio-Rad, Richmond, CA, USA). The membranes were blocked overnight with 5% non-fat milk dissolved in TBS-T buffer (Tris 50 mM; NaCl 1.5%; Tween 20, 0.05%, pH 7.5). They were then incubated with primary monoclonal antibodies against SIRT1 and α -tubulin (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), rabbit anti-acetylated p53 (1:1000, Upstate). After 90 min, blots were washed thoroughly in TBS-T buffer and incubated for 1 h with a peroxidase-conjugated IgG antibody (Amersham Corporation, Arlington Heights, IL, USA). Immunoreactive protein was visualized using a chemiluminescence-based detection kit and following the manufacturer's instructions (ECL kit; Amersham Corporation). Digital images were taken with a Chemidoc XRS (Bio-Rad), which permits semi-quantitation of band intensity. The protein load was periodically monitored by staining the blot membrane with Phenol Red or via immunodetection of α -tubulin.

Reverse transcriptase-PCR

Total RNA was extracted from CGNs using Trizol reagent from the Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA). The isolated RNA was then treated with amplification grade DNase I in order to remove contaminant genomic DNA (Invitrogen Corporation). First strand cDNA was reverse transcribed from 2 μ g of total RNA using a First-Strand Synthesis System kit from Invitrogen Corporation. The same amounts of cDNA were subsequently used for the PCR

amplification (39 cycles; 95 °C for 1 min, 60 °C for 1 min and 72 °C for 2 min each cycle) using a RedTaq SuperPak DNA polymerase kit from Sigma. The rat-specific E2F-1 PCR primers (forward: 5'-ACT CAG CTG ATG GTG TTG TTG A-3'; reverse: 5'-GGA CAT TGG TGA TGT CAT AGA TGC-3') were used to generate a fragment of 86 bp. The expression of β -actin mRNA was used as a standard. β -Actin primers (forward: 5'-ATG GAT GAC GAT ATC GCT GCG-3'; reverse: 5'-CAG GGT CAG GAT GCC TCT CTT-3') were used to generate a PCR product of 200 bp. β -Actin primers were designed to cross a large expanse of intronic sequence between exons 2 and 3 of the rat gene. The non-reactivity of the primers with contaminating genomic DNA was tested by the inclusion of controls that omitted the reverse transcriptase enzyme from the cDNA synthesis reaction (RT-negative controls). The PCR products were separated on a 2% agarose gel. The lack of primer dimerization or non-specific PCR product bands was also tested.

Real-time PCR quantification using SYBR Green

Relative gene expression was quantized by real-time quantitative PCR, using the ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Real-time PCR was carried out using a SYBR Green PCR kit (QuantiTect SYBR Green PCR Kit, Qiagen, Valencia, CA, USA). Thus, primer concentration and PCR melting temperature were adjusted to avoid unspecific PCR products, as SYBR Green binds unspecifically to

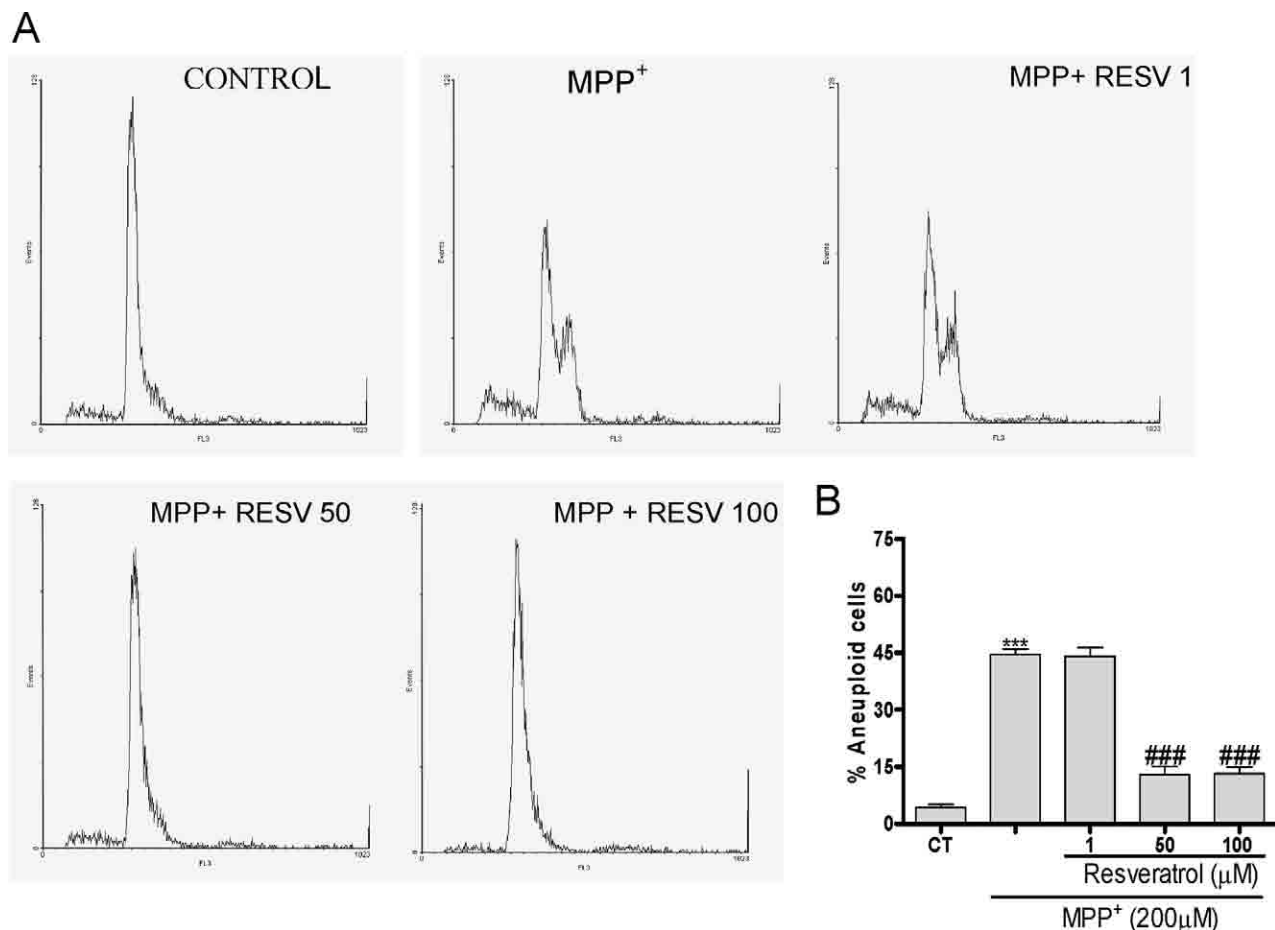


Fig. 2. (A) Typical flow cytometry histograms of PI-stained nuclei. (B) Bar chart showing the antiapoptotic effects of RESV on DNA fragmentation induced by MPP⁺ 200 μ M on CGNs. When necessary, statistical analyses were carried out using the one-way ANOVAs followed by Tukey's tests: *** $P < 0.001$ vs. control; ### $P < 0.001$ vs. MPP⁺ 200 μ M.

each double-strand DNA product formed during amplification. The optimum temperature is that which gives the maximum reading for the specific product when the non-specific product can no longer be detected.

Once the optimum temperature had been determined, quantitative PCR was carried out using the following thermal cycling program. Stage 1 was undertaken at 95 °C for 15 min. Stage 2 consisted of three steps: 95 °C for 15 s; 60 °C for 30 s; and 72 °C for 30 s. Stage 2 was repeated 40 times. The relative mRNA expression was calculated by the standard curve method. In brief, β -actin and E2F-1 gene amplifications were run in separate tubes. Standard curves were obtained for all genes by using decreasing amounts of cDNA template. PCR reactions were performed in duplicate for standard curves, whereas samples were tested in triplicate, at a final volume of 25 μ l in all cases. For each cDNA template, the cycle threshold (Ct) necessary to detect the amplified product was determined and semilogarithmic standard plots were drawn (Ct vs. amount of cDNA). The cDNA concentrations in the samples were interpolated from the semilogarithmic standard plots and normalized to the cDNA concentration of the control gene, β -actin.

Non-reactivity of the primers was tested by the inclusion of controls that omitted the cDNA template (which was replaced by buffer). Genomic DNA contamination was tested by the inclusion of total RNA samples from RT-PCR reactions lacking the reverse transcriptase enzyme. All the samples were tested for the absence of unspecific PCR products by analyzing a melting temperature profile using the Model 7700 Sequence detector. The program consisted of stage 1, 95 °C for 1 min; stage 2, 60 °C for 1 min then an increase in temperature up to a final temperature of 95 °C at stage 3 with a 19 min ramp time. Fluorescence data were collected for each PCR reaction and melting graphs were drawn to confirm the presence of a single specific product.

Statistical analysis

Data are given as the mean \pm S.E.M. of at least four experiments involving four to six independent cultures. In all the experiments, the data were analyzed using ANOVA followed by post hoc Tukey-Kramer multiple comparison tests. *P*-values lower than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Neuroprotective effects of resveratrol on MPP⁺ neurotoxicity in CGNs

In the present study, the neuroprotective effects of RESV on MPP⁺-induced CGNs cell viability loss was assessed by counting the condensed nuclei. As shown in Fig. 1, when neurons were treated with MPP⁺ for 48 h, the number of condensed nuclei increased by up to 50.9 ± 1.7 (mean \pm S.E.M., *n*=6) (control value 8.8 ± 0.5 ; mean \pm S.E.M., *n*=6). The effect of MPP⁺ on the loss of cell viability was attenuated by RESV in a concentration dependent manner. Treatment with different concentrations: 1 μ M, 50 μ M and 100 μ M of RESV, reversed the MPP⁺-induced increase in condensed nuclei by $51.8 \pm 1.8\%$, $15.1 \pm 0.8\%$ and $14.5 \pm 1.7\%$, respectively. To further investigate whether the addition of RESV affected MPP⁺-induced DNA fragmentation, a flow cytometry analysis of DNA fragmentation was performed using PI (see Experimental Procedures, above). RESV 1 μ M, 50 μ M and 100 μ M, decreased MPP⁺-induced increase in DNA frag-

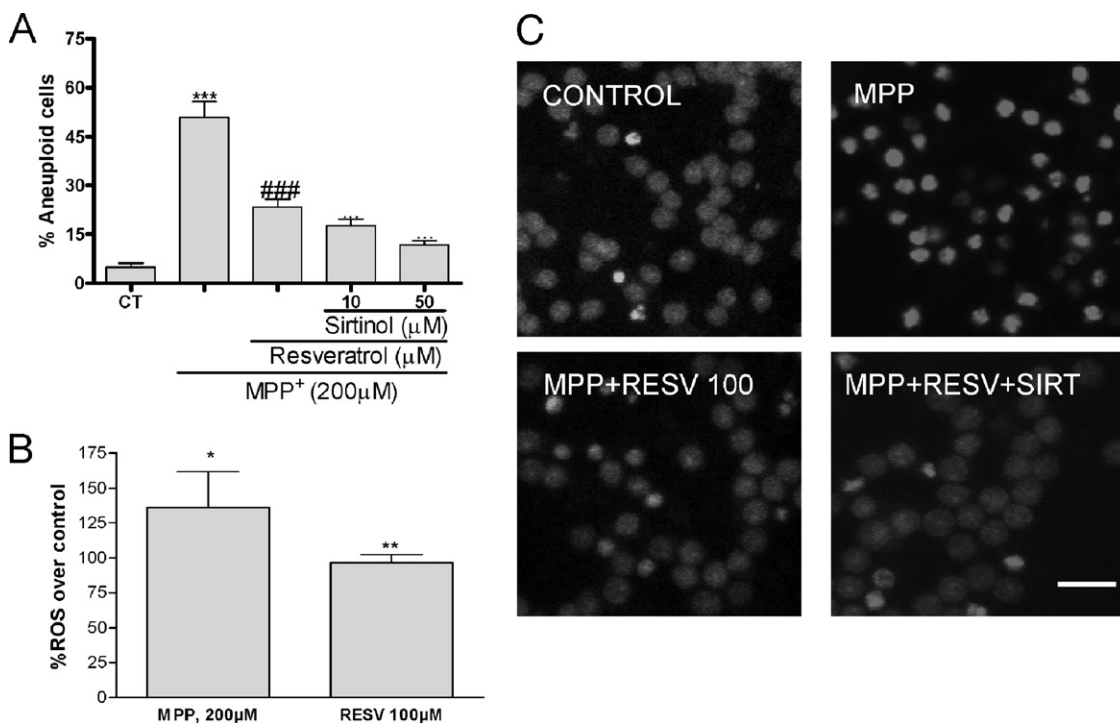


Fig. 3. (A) Bar chart showing the effects of sirtinol (10 μ M and 50 μ M) together with RESV 100 μ M on 200 μ M MPP⁺-induced neurotoxicity in CGNs exposed for 48 h. Statistical analyses were carried out using one-way ANOVAs followed by Tukey's tests *** *P*<0.001 vs. control; ### *P*<0.05 vs. MPP⁺. (B) RESV prevents oxidative stress production mediated by MPP⁺. Statistical analyses were carried out using one-way ANOVA followed by Tukey's tests * *P*<0.05, vs. control; ** *P*<0.05 vs. MPP⁺ 200 μ M. (C) Representative fluorescence photomicrographs showing effects of sirtinol (50 μ M) together with RESV 100 μ M on 200 μ M MPP⁺-induced neurotoxicity in CGNs exposed for 48 h.

mentation with the a values of $43.58 \pm 1.9\%$, $15 \pm 0.8\%$ and $11 \pm 1.1\%$ (mean \pm S.E.M., $n=4$), respectively (control value 3.5 ± 0.3 ; mean \pm S.E.M., $n=6$) (Fig. 2A).

Sirtinol did not prevent the neuroprotective effects of resveratrol

A proposed mechanism by which resveratrol could protect neurons is via activation of the SIRT1 pathway (Howitz et al., 2003). We therefore carried out further experiments to establish whether the neuroprotective effects of RESV against MPP⁺ on CGNs are mediated through SIRT1 activation. We added sirtinol, an inhibitor of SIRT1, to neuronal cell cultures. The effects of RESV 100 μ M and SIRT1 10 μ M and 50 μ M on CGNs were also evaluated and none of these compounds by itself showed any toxic effect (data not shown). Likewise, in the presence of sirtinol, our flow cytometric and condensed nuclear cell counting data demonstrated that sirtinol did not attenuate the antiapoptotic effects of resveratrol (Fig. 3). Furthermore, we evaluated the effects of sirtinol at 10 μ M and 50 μ M on MPP⁺-induced DNA fragmentation and at these concentrations it did not prevent apoptosis (Fig. 4).

On the other hand, we demonstrated that RESV (100 μ M) decreases ROS production mediated by MPP⁺ 200 μ M (Fig. 3B).

Effects of MPP⁺ on the expression of SIRT1

In the next series of experiments we examined how the protein expression of SIRT1 is regulated in response to

treatment with MPP⁺ using Western blot analysis. As shown in Fig. 5, SIRT1 expression significantly decreased over time and at 8 h the protein expression was completely lost. However, REV treatment, alone and in presence of MPP⁺, increased the SIRT1 expression level over control values. These data suggest that although SIRT1 activation is not involved in the neuroprotective properties of resveratrol, the loss of SIRT1 expression could favor the apoptotic process and the restoration of SIRT1 levels could offer protection from MPP⁺ neurotoxicity. By a process of deacetylation of p53, SIRT-1 acts as a negative regulator of p53 function. Thus, we study in depth changes in acetylated p53 after MPP⁺ treatment. Western blot analysis demonstrated that the levels of acetylated p53 increased in response to MPP⁺ treatment in CGNs (Fig. 6).

We also evaluated the SIRT1 mRNA expression after treatment with MPP⁺ and we found a decrease in SIRT1 mRNA levels, although it was not significant. However, when CGNs were treated with MPP⁺ and RESV 100 μ M we found a significant increase in SIRT1 mRNA levels (fold increase 3.12 ± 0.11 , mean \pm S.E.M. $n=3$ with respect to the control). Interestingly, treatment of CGNs with RESV 100 μ M alone also increased SIRT mRNA levels up to (6.18 ± 0.12 , mean \pm S.E.M. $n=3$) (Fig. 9).

Evaluation of resveratrol effects in serum/potassium withdrawal-induced apoptosis

Our next sets of experiments were carried out to evaluate the effects of RESV on another well-known model of apo-

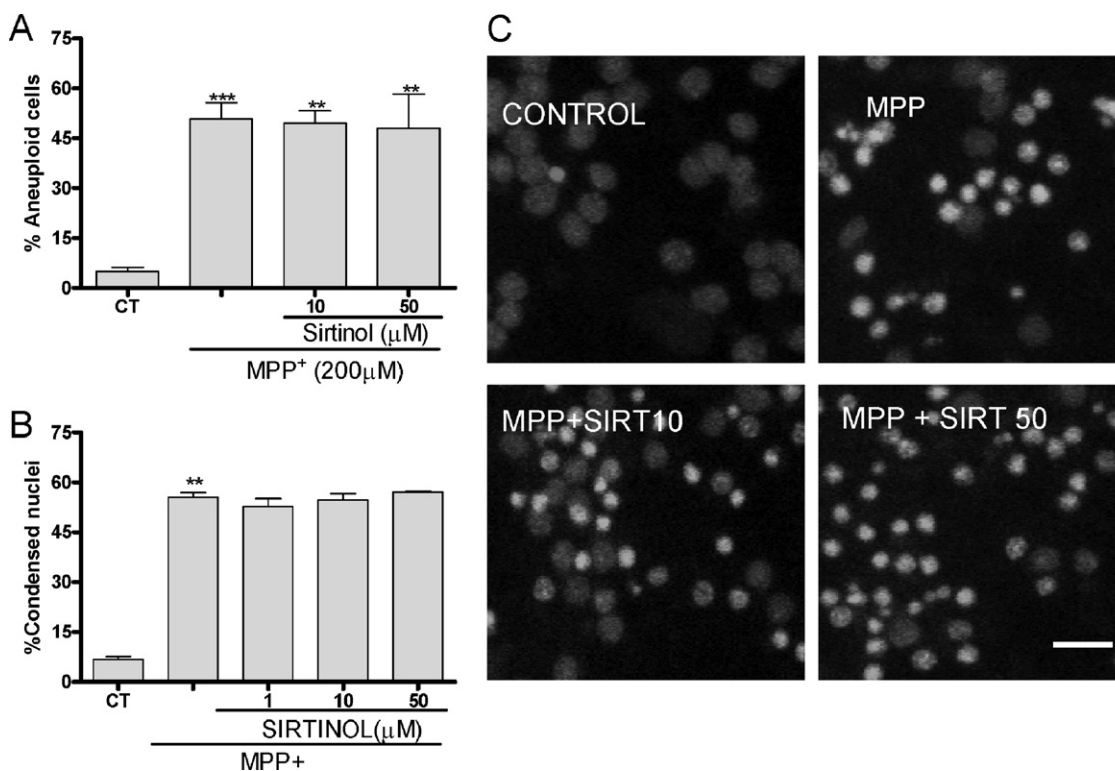


Fig. 4. Bar chart showing the effects of sirtinol 200 μ M on MPP⁺-induced toxicity in CGNs exposed for 48 h. (A) Flow cytometry analysis (B) and nuclei condensation. (C) Representative fluorescence photomicrographs showing the effects of sirtinol (10 μ M and 50 μ M) on chromatin condensation in permeabilized CGNs exposed to 200 μ M MPP⁺ for 48 h. Scale bar=10 μ M.

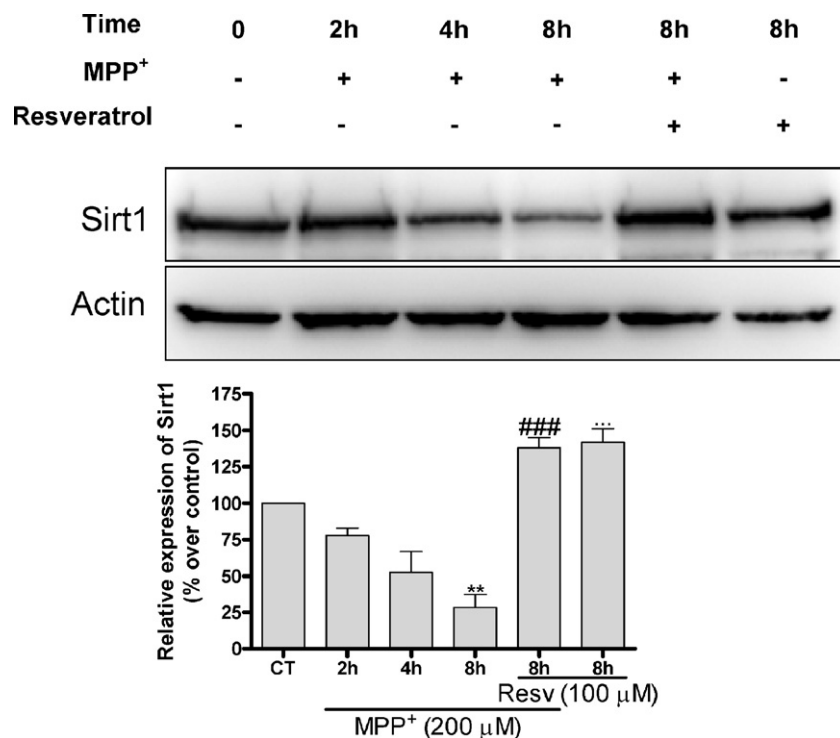


Fig. 5. Western-blot analysis of the levels of SIRT1 in CGNs. Cultures were treated with MPP⁺ 200 μM alone or in the presence of RESV (100 μM) for 48 h. At the end of the treatments, cells were lysed and the cell lysates were subjected to immunoblot analysis with an antibody directed against SIRT1 (see Experimental Procedures). Changes in the band intensities were calculated as percentages of the control band intensity. Columns and bars represent means±S.E.M. of three or four separate experiments with four different culture preparations ($n=4$). Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Tukey's tests: ** $P<0.01$ vs. control; ### $P<0.01$, *** $P<0.01$ vs. MPP⁺ 200 μM.

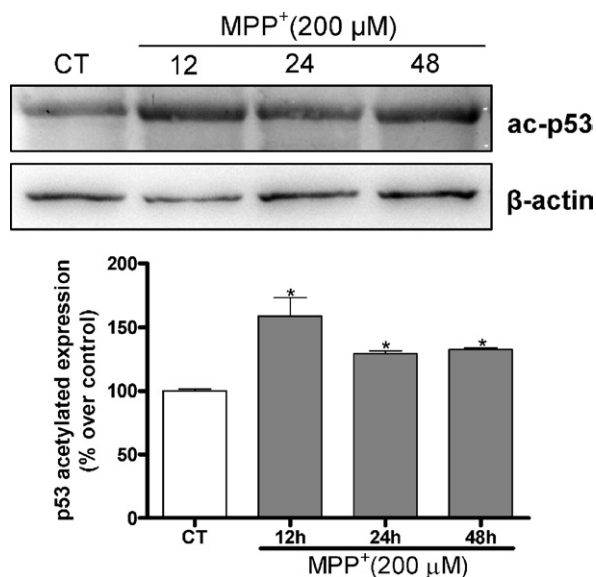


Fig. 6. Western-blot analysis of the levels of Acetylated p53 in CGNs. Cultures were treated with MPP⁺ 200 μM alone for 12, 24 and 48 h. At the end of the treatments, cells were lysed and the cell lysates were subjected to immunoblot analysis with an antibody directed against acetylated p53 (see Experimental Procedures). Changes in the band intensities were calculated as percentages of the control band intensity. Columns and bars represent means±S.E.M. of three or four separate experiments with four different culture preparations ($n=4$). Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Tukey's tests: * $P<0.05$ vs. control.

ptosis: S/K withdrawal. We found here that RESV (concentrations ranging from 1 μM to 100 μM) did not protect from S/K withdrawal-induced apoptosis in CGNs (Fig. 7). We also determined the role of ROS in S/K after RESV treatment. After S/K withdrawal, we found a 160% increase in ROS production measured by DCF fluorescence. Pretreatment with RESV 100 μM significantly decreased the levels of ROS to the control levels (Fig. 8). Therefore, our data demonstrate that ROS does not play a major role in S/K deprivation-induced apoptosis in CGNs neurons. To rule out the possibility that the loss of neuroprotective effects of RESV is due to changes in SIRT1 expression, Western blot analysis was performed after S/K withdrawal. After 12 h of S/K withdrawal, a significant upregulation in this protein expression was found (Fig. 9). Likewise, the increase in SIRT-1 expression was associated with a decreased in acetylated p53. We also performed a real-time PCR analysis of SIRT1 transcripts and, in agreement with the protein expression, SIRT1 mRNA increased after S/K withdrawal (Fig. 10). Therefore, we conclude that neither SIRT1 activation nor the antioxidant effects of RESV can protect CGNs from S/K-induced apoptosis.

DISCUSSION

This study shows: a) RESV exerts a neuroprotective effect on MPP⁺-induced apoptosis in CGNs and this neuroprotective effect is not mediated by stimulation of SIRT1, it is probably due to its antioxidant properties; b) MPP⁺ de-

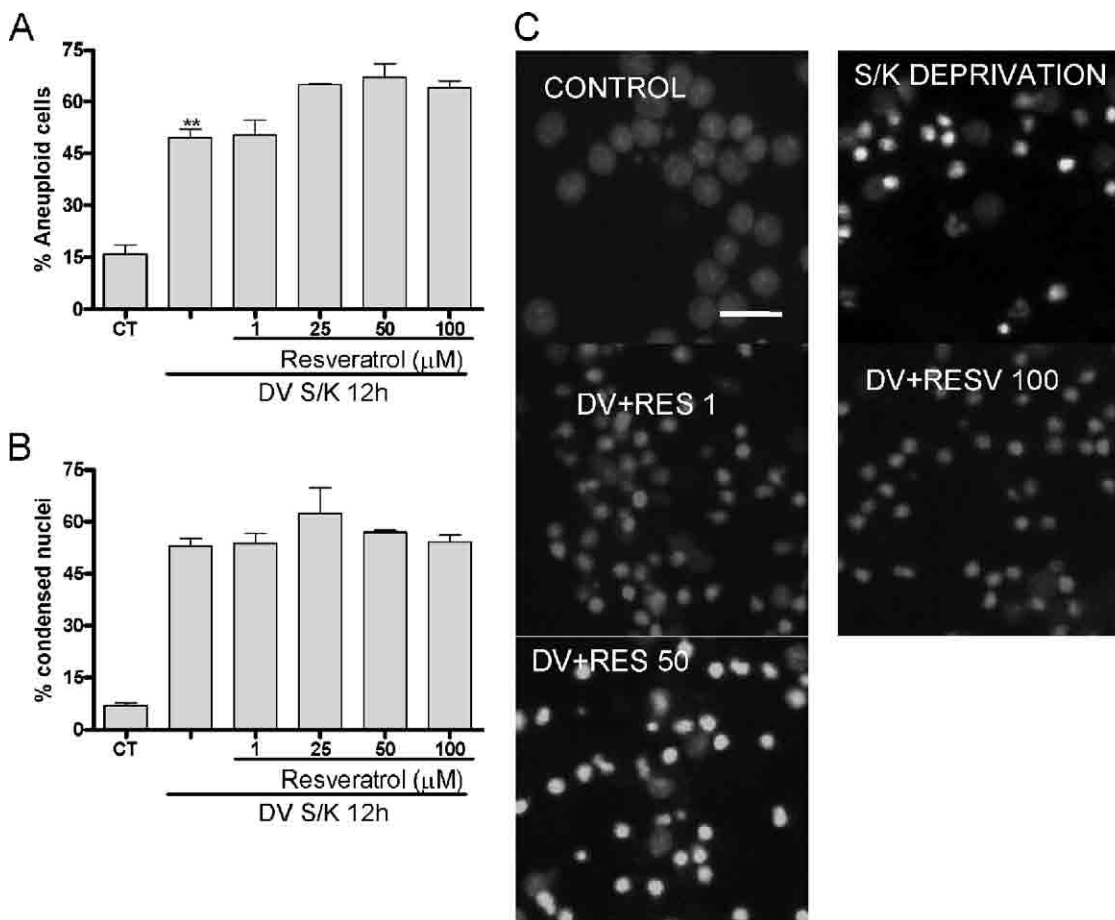


Fig. 7. Bar chart showing the effects of RESV on S/K withdrawal induces apoptosis in CGNs exposed for 12 h. (A) Flow cytometry analysis (B) and nuclei condensation. (C) Representative fluorescence photomicrographs showing the effects of RESV (1 μM 50 μM and 100 μM) on chromatin condensation in permeabilized CGNs exposed to S/K withdrawal for 12 h. Scale bar=10 μM . DV=S/K withdrawal.

creases the expression of SIRT1 in CGNs; c) RESV does not prevent apoptosis mediated by S/K deprivation in CGNs, however, in this apoptotic stimulus an increase in SIRT1 expression was found; d) resveratrol 100 μM increase significantly the SIRT1 protein and mRNA expression in CGNs. Furthermore, the present study shows that

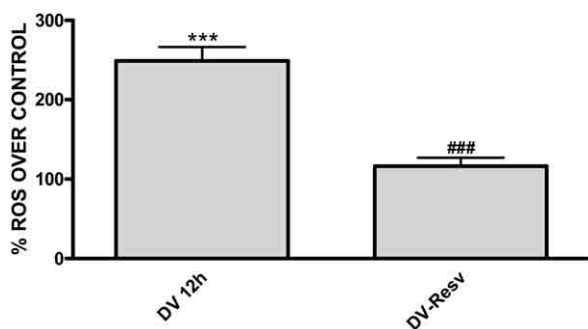


Fig. 8. RESV prevents oxidative stress production mediated by S/K withdrawal. Results are the mean of three or four separate experiments with four different culture preparations. Statistical analyses were carried out using one-way ANOVA followed by Tukey's tests *** $P < 0.001$, vs. control; ### $P < 0.001$ vs. S/K withdrawal. DV=S/K withdrawal.

RESV decreases ROS production mediated by MPP^+ . This, last observation is in accordance with previous studies showing that antioxidants prevent MPP^+ neurotoxicity in neuronal cell cultures and in rat treated with the neurotoxin MPTP (Gonzalez-Polo et al., 2003, 2004b; Tretter et al., 2004).

The results of our study suggest that in this model of inhibition of mitochondrial complex I, ROS could be the signaling messengers that cause neuronal cell death and also apoptosis. Previous studies have demonstrated the involvement of several transduction pathways in the process of apoptosis mediated by complex I inhibition, among them the classical intrinsic apoptotic pathway mediated by caspase 3 activation, the caspase independent apoptotic pathway mediated by the release of apoptosis inducing factor (AIF), JNK activation and DNA damage together with p53 induction (Duan et al., 2002; Chu et al., 2005). Because SIRT1 is involved in the regulation of intracellular transduction signals, we investigated whether the neuroprotective effects of RESV are mediated by the activation of SIRT1. A novel finding of this study, apart from the evidence for the existence of SIRT1 in CGNs by Western blot, is that treatment with MPP^+ 200 μM decreases the

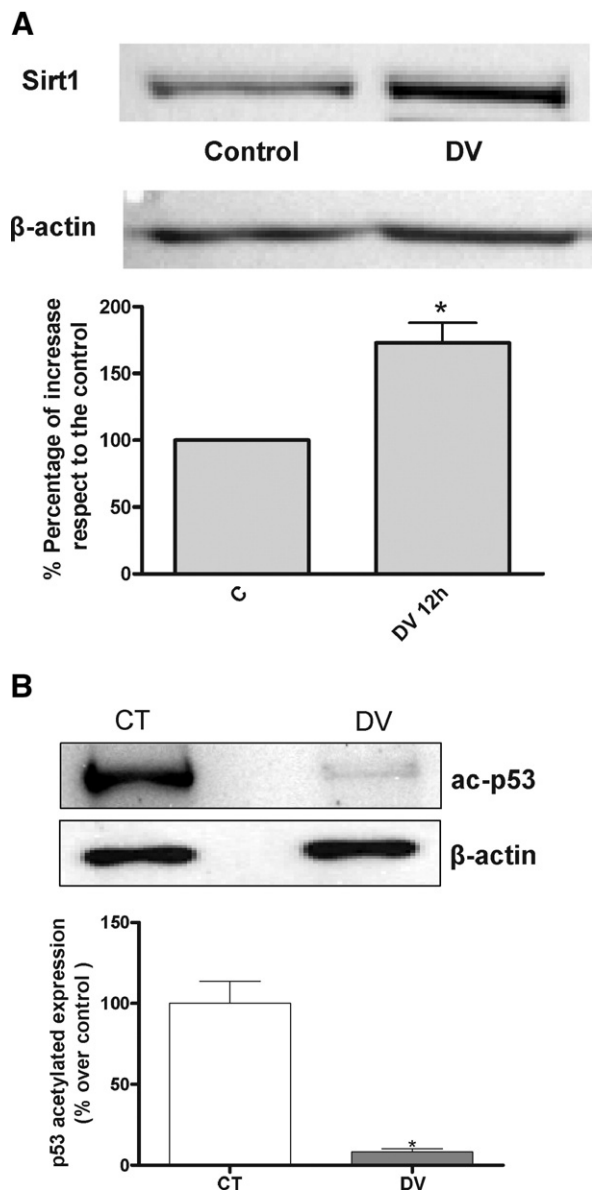


Fig. 9. (A) Western-blot analysis of the levels of SIRT1 in CGNs. (B) Western-blot analysis of the levels of acetylated p53. Cultures were treated with S/K withdrawal alone for 12 h. At the end of the treatments, cells were lysed and the cell lysates were subjected to immunoblot analysis with an antibody directed against SIRT1 (see Experimental Procedures). DV=S/K withdrawal. Changes in the band intensities were calculated as percentages of the control band intensity. Columns and bars represent means \pm S.E.M. of three or four separate experiments with four different culture preparations. Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Tukey's tests: * $P < 0.05$ vs. control.

expression of the protein SIRT1. So, it is possible to speculate that the loss of SIRT1 expression is responsible for the neuroprotective effects of RESV not being mediated through SIRT1. However, since RESV was added to the CGNs before the addition of MPP⁺, we believe that this decrease in protein expression is not the reason. Furthermore, another finding in the present study is that sirtinol, an

inhibitor of SIRT1, did not attenuate the antiapoptotic effects of MPP⁺, nor did it counteract the antiapoptotic effects of RESV. These results therefore confirm that RESV neuroprotective effects are not mediated through the stimulation of SIRT1.

However, other investigators have demonstrated that the neuroprotective effects of RESV in ischemic rat models are due to its stimulation of SIRT1, since treatment with sirtinol attenuates the neuroprotective effects of this drug. Indeed SIRT1 activation is involved in axonal neuroprotection (Raval et al., 2006). It has been proposed that SIRT1 can promote neuronal survival in neuronal cell cultures by acting as an antiapoptotic factor (Anekonda, 2006). Consequently, the loss of SIRT1 expression could contribute to the process of MPP⁺-induced apoptosis and when CGNs were treated with RESV the SIRT1 levels increased to control levels. So, ROS generation by complex I inhibition could be responsible for the decreased SIRT1 expression that favors the apoptotic route. Another plausible explanation for additional neuroprotective effects of RESV is its ability to restore the levels of SIRT1 protein, which activate intracellular neuroprotective signals, as we comment above.

Furthermore, we demonstrated that MPP⁺ treatment increased the levels of acetylated p53, so these data are in agreement with previous studies (Okawara et al., 2007), and suggest that changes in SIRT-1 expression contribute to the regulation of apoptosis through changes in p53 acetylation.

Therefore, our data on the neuroprotective effects of RESV on MPP⁺ are in line with previous *in vitro* studies that demonstrate the neuroprotective and antioxidant effects of this drug on MPP⁺-induced apoptosis in PC12 cells, β -amyloid neurotoxicity and in oxygen-glucose deprivation (Gelinas and Martinoli, 2002; Jang and Surh, 2003; Savaskan et al., 2003; Raval et al., 2006; Chen et al., 2005; Lu et al., 2006). Studies performed in rodents also suggest this drug has a good neuroprotective profile

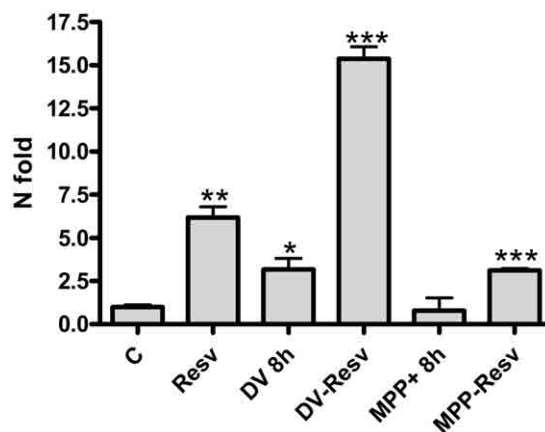


Fig. 10. Bars chart showing the effects of RESV on SIRT1 gene expression in CGNs after S/K withdrawal and MPP⁺ treatment. Columns and bars represent means \pm S.E.M. of three experiments with four different culture preparations. Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Tukey's tests: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. control.

(Wang et al., 2004; Baur and Sinclair, 2006). RESV showed broad neuroprotective effects in ischemic models, in the administration of the neurotoxin kainic acid and in traumatic brain injury (Wang et al., 2004; Ates et al., 2007).

Another interesting finding of the present study is that RESV did not attenuate S/K withdrawal-induced apoptosis. We have shown that RESV does not prevent DNA fragmentation or nuclear condensation. Moreover, our experiments showed that RESV decreased ROS production, however, apoptosis was not prevented. Therefore, from our data we suggest that although ROS could contribute to the apoptotic process in CGNs after S/K withdrawal, it does not play a prominent role. However, we demonstrated that S/K withdrawal significantly increases the expression of SIRT1 protein, decreases the expression of acetylated p53 and increases SIRT-1 mRNA. With reference to the increase in SIRT1 protein expression and mRNA, we suggest that it constitutes a neuroprotective signal against intracellular death signals that are generated to induce apoptosis.

CONCLUSION

To sum up, this work shows that SIRT1 is not involved in the neuroprotective effects of RESV in two apoptotic models. However, we demonstrate different changes in SIRT1 expression and believe that alterations in SIRT1 could be associated with a role of this enzyme in the regulation of neuronal survival, or it could be a mechanism involved in counteracting routes involved in the process of neuronal cell death. We suggest that in the apoptotic process a balance exists between the activation of neuroprotective signals (for example, bcl2, cdk5, etc.) (Smith et al., 2004) and death signals (Bax, p53, etc). Thus, the activation of SIRT1 by RESV could be a neuronal defense and antiaging signal pathway involved in the apoptotic process. This remains to be evaluated in further studies.

Acknowledgments—Experimental studies performed by the authors were supported by grants from the Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2005-01604, SAF2005-05179, SAF2006-13092), from the Instituto de Salud Carlos III (PI 041300). We thank to the Generalitat de Catalunya (support to research groups 2005/SGR00893) and la Marató de TV3 (0633230).

REFERENCES

- Anekonda TS (2006) Resveratrol: a boon for treating Alzheimer's disease? *Brain Res Brain Res Rev* 52:316–326.
- Anekonda TS, Reddy PH (2006) Neuronal protection by sirtuins in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 96:305–313.
- Araki T, Sasaki Y, Milbrandt J (2004) Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. *Science* 305:1010–1013.
- Ates O, Cayli S, Altinoz E, Gurses I, Yucel N, Sener M, Kocak A, Yologlu S (2007) Neuroprotection by resveratrol against traumatic brain injury in rats. *Mol Cell Biochem* 294:137–144.
- Bastianetto S, Quirion R (2002) Natural extracts as possible protective agents of brain aging. *Neurobiol Aging* 23:891–897.
- Baur J, Sinclair DA (2006) Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* 5:493–506.
- Chen J, Zhou Y, Mueller-Steiner S, Chen LF, Kwon H, Yi S, Mucke L, Gan L (2005) SIRT1 protects against microglia-dependent amyloid-beta toxicity through inhibiting NF-kappaB signaling. *J Biol Chem* 280:40364–40374.
- Chu CT, Zhu JH, Cao G, Signore A, Wang S, Chen J (2005) Apoptosis inducing factor mediates caspase-independent 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity in dopaminergic cells. *J Neurochem* 94:1685–1695.
- De Ruvo C, Amodio R, Algeri S, Martelli N, Intiliangelo A, D'Ancona GM, Esposito E (2000) Nutritional antioxidants as antidegenerative agents. *Int J Dev Neurosci* 18:359–366.
- Duan W, Zhu X, Ladenheim B, Yu QS, Guo Z, Oyler J, Cutler RG, Cadet JL, Greig NH, Mattson MP (2002) P53 inhibitors preserve dopamine neurons and motor function in experimental Parkinsonism. *Ann Neurol* 52:597–606.
- Gao ZB, Chen XQ, Hu GY (2006) Inhibition of excitatory synaptic transmission by trans-resveratrol in rat hippocampus. *Brain Res* 1111:41–47.
- Gao ZB, Hu GY (2005) Trans-resveratrol, a red wine ingredient, inhibits voltage-activated potassium currents in rat hippocampal neurons. *Brain Res* 1056:68–75.
- Gelinas S, Martinoli MG (2002) Neuroprotective effect of estradiol and phytoestrogens on MPP⁺-induced cytotoxicity in neuronal PC12 cells. *J Neurosci Res* 70:90–96.
- Gonzalez-Polo RA, Soler G, Alvarez A, Fabregat I, Fuentes JM (2003) Vitamin E blocks early events induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) in cerebellar granule cells. *J Neurochem* 84:305–315.
- Gonzalez-Polo RA, Soler G, Fuentes JM (2004a) MPP⁺: mechanism for its toxicity in cerebellar granule cells. *Mol Neurobiol* 30:253–264.
- Gonzalez-Polo RA, Soler G, Rodriguez-Martin A, Moran JM, Fuentes JM (2004b) Protection against MPP⁺ neurotoxicity in cerebellar granule cells by antioxidants. *Cell Biol Int* 28:373–380.
- Grubisha O, Smith BC, Denu JM (2005) Small molecule regulation of Sir2 protein deacetylases. *FEBS J* 272:4607–4616.
- Han YS, Zheng WH, Bastianetto S, Chabot JG, Quirion R (2004) Neuroprotective effects of resveratrol against beta-amyloid-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons: involvement of protein kinase C. *Br J Pharmacol* 141:997–1005.
- Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA (2003) Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425:191–196.
- Jang JH, Surh YJ (2003) Protective effect of resveratrol on β -amyloid-induced oxidative PC12 cell death. *Free Rad Biol Med* 34:1100–1110.
- Kasdallah-Grissa A, Mornagui B, Aouani E, Hammami M, Gharbi N, Kamoun A, El-Fazaa S (2006) Protective effect of resveratrol on ethanol-induced lipid peroxidation in rats. *Alcohol* 41:236–239.
- Kim HI, Kim TH, Song JH (2005) Resveratrol inhibits Na⁺ currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res* 1045:134–141.
- Kobayashi Y, Furukawa-Hibi Y, Chen C, Horio Y, Isoke K, Ikeda K, Motoyama N (2005) SIRT1 is critical regulator of FOXO-mediated transcription in response to oxidative stress. *Int J Mol Med* 16:237–243.
- Krantic S, Mechawar N, Reix S, Quirion R (2005) Molecular basis of programmed cell death involved in neurodegeneration. *Trends Neurosci* 28:670–676.
- Kruszewski M, Szumiel I (2005) Sirtuins (histone deacetylases III) in the cellular response to DNA damage. Facts and hypotheses. *DNA repair* 4:1306–1313.
- Lu KT, Chiou RY, Chen LG, Chen MH, Tseng WT, Hsieh HT, Yang YL (2006) Neuroprotective effects of resveratrol on cerebral ischemia-induced neuron loss mediated by free radical scavenging and cerebral blood flow elevation. *J Agric Food Chem* 54:3126–3131.

- Mattson MP, Cheng A (2006) Neurohormetic phytochemicals: low-dose toxins that induce adaptive neuronal stress responses. *Trends Neurosci* 29:632–639.
- Miloso M, Bertelli AA, Nicolini G, Tredici G (1999) Resveratrol-induced activation of the mitogen-activated protein kinases, ERK1 and ERK2, in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett* 264:141–144.
- Moore DJ, West AB, Dawson VL, Dawson TM (2005) Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci* 28:57–87.
- Okawara M, Katsuki H, Kurimoto E, Shibata H, Kume T, Akaie A (2007) Resveratrol protects dopaminergic neurons in midbrain slice from multiple insults. *Biochem Pharmacol* 73:550–560.
- Parker JA, Arango M, Abderrahmane S, Lambert E, Tourette C, Catoire H, Neri C (2005) Resveratrol rescues mutant polyglutamine cytotoxicity in nematode and mammalian neurons. *Nat Genet* 37:349–350.
- Przedborski S, Tieu K, Perier C, Vila M (2004) MPTP as a mitochondrial neurotoxic model of Parkinson's disease. *J Bioener Biomem* 36:375–379.
- Raval AP, Dave KR, Perez-Pinzón MA (2006) Resveratrol mimics ischemic preconditioning in the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:1141–1147.
- Savaskan E, Olivieri G, Meier F, Seifritz E, Wirz-Justice A, Muller-Spahn F (2003) Red wine ingredient resveratrol protects from beta-amyloid neurotoxicity. *Gerontology* 49:380–383.
- Shimizu T, Nakato T, Xian MJ, Sagawa M, Ikeda Y, Kizaki M (2006) Resveratrol induces apoptosis of human malignant B cells by activation of caspase-3 and p38 MAP kinase pathways. *Biochem Pharmacol* 71:742–750.
- Smith PD, O'Hare MJ, Park DS (2004) CDKs: taking on a role as mediators of dopaminergic loss in Parkinson's disease. *Trends Mol Med* 10:445–451.
- Sovak M (2001) Grape extract, resveratrol, and its analogs. A review. *J Med Food* 4:93–105.
- Sun AY, Simonyi A, Sun GY (2002) The "French paradox" and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. *Free Radic Biol Med* 32:314–318.
- Tredici G, Miloso M, Nicolini G, Galbiati S, Cavaletti G, Bertelli A (1999) Resveratrol, map kinases and neuronal cells: might wine be a neuroprotectant? *Drugs Exp Clin Res* 25:99–103.
- Tretter L, Sipos I, Adam-Vizzi V (2004) Initiation of neuronal damage by complex I deficiency and oxidative stress in Parkinson's disease. *Neurochem Res* 29:569–577.
- Valenzano DR, Cellerino A (2006) Resveratrol and the pharmacology of ageing. *Cell Cycle* 5:1027–1032.
- Verdaguer E, Garcia-Jorda E, Canudas AM, Dominguez E, Jimenez A, Pubill D, Escubedo E, Camarasa J, Pallas M, Camins A (2002) Kainic acid-induced apoptosis in cerebellar granule neurons: an attempt at cell cycle re-entry. *Neuroreport* 13:413–416.
- Verdaguer E, Jimenez A, Canudas AM, Jorda EG, Sureda FX, Pallas M, Camins A (2004) Inhibition of cell cycle pathway by flavopiridol promotes survival of cerebellar granule cells after an excitotoxic treatment. *J Pharmacol Exp Ther* 308:609–616.
- Wang Q, Xu J, Rottinghaus GE, Simonyi A, Lubahn D, Sun GY, Sun AY (2002) Resveratrol protects against global cerebral ischemic injury in gerbils. *Brain Res* 958:439–447.
- Wang Q, Yu S, Simonyi A, Rottinghaus G, Sun GY, Sun AY (2004) Resveratrol protects against neurotoxicity induced by kainic acid. *Neurochem Res* 29:2105–2112.
- Zamin LL, Dillenburg-Pilla P, Argenta-Comiran R, Horn AP, Simao F, Nassif M, Gerhardt D, Frozza RL, Salbego C (2006) Protective effect of resveratrol against oxygen-glucose deprivation in organotypic hippocampal slice cultures: Involvement of PI3-K pathway. *Neurobiol Dis* 24:170–182.
- Zhuang H, Kim YS, Koehler RC, Dore S (2003) Potential mechanism by which resveratrol, a red wine constituent, protects neurons. *Ann N Y Acad Sci* 993:276–286.

(Accepted 17 April 2007)
(Available online 20 June 2007)

Discussió general

5. DISCUSSIÓ GENERAL

L'apoptosi és un procés fisiològic que es produeix al llarg de la morfogènesi i el desenvolupament fetal de l'organisme. El paper de l'apoptosi és múltiple, participant també en els processos de renovació cel·lular i d'eliminació de cèl·lules danyades potencialment perilloses per a l'organisme, en la selecció clonal de cèl·lules immunitàries o en els processos de plasticitat sinàptica. No obstant això, l'apoptosi també intervé en diferents situacions patològiques, com en les malalties neurodegeneratives, on una activació aberrant o excessiva de l'apoptosi condueix a la mort de diferents grups neuronals. Molts dels mecanismes que condueixen a aquesta mort apoptòtica encara romanen desconeguts, especialment els de les etapes inicials, i un major coneixement d'aquests podria facilitar la creació de nous fàrmacs dirigits a prevenir l'aparició o la progressió d'aquestes malalties, ja que actualment la majoria de tractaments farmacològics són simptomàtics. Així doncs, l'objectiu d'aquest treball de tesi doctoral ha estat l'estudi dels mecanismes que condueixen a la mort apoptòtica neuronal, amb especial atenció a les vies de regulació que intervenen en les etapes inicials d'aquest procés.

La deprivació de sèrum i potassi en cèl·lules granulars de cerebel com a model per estudiar l'apoptosi

El model escollit per estudiar els mecanismes que condueixen a l'apoptosi neuronal ha estat la deprivació de sèrum i potassi en cèl·lules granulars de cerebel. Durant el desenvolupament del sistema nerviós més de la meitat de les CGC moren per apoptosi (Wood *et al.* 1993) i aquest fenomen es pot reproduir *in vitro* utilitzant cultius primaris d'aquestes cèl·lules, que poden mantenir-se vives més de 7 dies si el medi conté sèrum i concentracions despolaritzants de potassi (Gallo *et al.* 1987). Aquest model presenta moltes avantatges, en primer lloc permet tenir un cultiu purament neuronal amb molt poca contaminació, només un 5% de cèl·lules no neuronals, que són principalment astròcits (Burgoyne *et al.* 1993). Una altra avantatge és que el rendiment d'obtenció de CGC és molt alt, uns 20 milions per animal, ja que les CGC són unes de les neurones més abundants del sistema nerviós (Gallo *et al.* 1987). També és molt important que la mort induïda per la DV S/K en CGC és una mort principalment apoptòtica (D'Mello *et al.* 1993). Per aquests motius aquest model és un dels més utilitzats en l'estudi dels mecanismes que condueixen a la mort apoptòtica neuronal.

Està descrit que la DV S/K condueix a la mort neuronal mitjançant l'activació de diferents vies de mort. La més important és la que depèn de l'activitat de les caspases, que s'ha descrit que s'indueix mitjançant la via intrínseca o mitocondrial, però no mitjançant la via extrínseca (Gerhardt *et al.* 2001). També s'ha demostrat que intervenen altres vies independents de les caspases, com la de l'AIF (Slagsvold *et al.* 2003), la de les catepsines (Nath *et al.* 1996) o l'autofàgia i les catepsines (Canu *et al.* 2005;Kaasik *et al.* 2005). A més, aquestes poden interactuar entre elles i amb la de les caspases. La regulació d'aquestes molècules efectores és complexa i el seu estudi constitueix el tema central d'aquest treball de tesi doctoral. Hi intervenen molècules que pertanyen al grup de les MAPK, com la JNK (Coffey *et al.* 2002) i la p38 (Yamagishi *et al.* 2001), molècules quinases com la GSK3 (Mora *et al.* 2001) i la CDK5/p25 (Verdaguer *et al.* 2005), molècules implicades en la progressió del cycle cel·lular (Padmanabhan *et al.* 1999) o diferents proteïnes proapoptòtiques de la família Bcl2 com Bax (Xifro *et al.* 2006), Bim (Shi *et al.* 2005) o DP5 (Ma *et al.* 2007). La mort neuronal no només ve donada per l'activació de les vies de mort, sinó que també pot ser deguda a la inhibició de les vies de supervivència. Així, està demostrat que la DV S/K inhibeix la via de l'AKT/PKB (Lafon-Cazal *et al.* 2002) i la via del NF- κ B (Koulich *et al.* 2001).

Paper de la GSK3 en la mort neuronal induïda per DV S/K

La GSK3 és una quinasa que juga un paper important en la mort neuronal i conseqüentment en les malalties neurodegeneratives. Està demostrat que la GSK3 s'activa en molts models d'apoptosi *in vitro*, com el tractament amb pèptid β -amiloide, amb glutamat o la DV S/K. També està demostrat que la seva sobreexpressió és suficient per induir la mort neuronal i que juga un paper clau en la malaltia d'Alzheimer, ja que intervé en la hiperfosforilació de la proteïna Tau que conduirà a la formació dels cabdells neurofibril·lars típics d'aquesta malaltia, així com en el processament de l'APP que conduirà a la formació de les plaques senils també típiques d'aquesta malaltia (Revisat per Grimes and Jope 2001).

Un dels primers objectius que es van plantejar en aquest treball de tesi doctoral, va ser el de determinar si la inhibició de la GSK3 té efectes neuroprotectors en el model de mort neuronal induïda per la DV S/K en cultius primaris de CGC. Una primera aproximació per assolir aquest objectiu va ser utilitzar el liti, un conegut inhibidor de la GSK3, que prèviament ja s'havia demostrat que protegeix de la mort apoptòtica provocada per la DV S/K (D'Mello *et al.* 1994). Es va observar que el liti prevé la disminució de la viabilitat cel·lular provocada per la DV S/K. Paral·lelament, al

quantificar l'apoptosi, tant mesurant la fragmentació de l'ADN per citometria de fluxe com per comptatge de nuclis condensats, també es va observar aquesta protecció, confirmant els resultats publicats per altres laboratoris. El següent pas va ser plantejar-se si aquesta neuroprotecció és universal o específica del model utilitzat, per confirmar-ho es van tractar les CGC amb altres estímuls neurotòxics com el nocodazol, un agent disruptor del citoesquelet, el kainat, un agonista dels receptors no-NMDA del glutamat, i el MPP+ (1-methyl-4-phenylpyridinium), un inhibidor del complex I mitocondrial. Tots tres estímuls provoquen un augment de l'activitat de la GSK3, al disminuir la fosforilació que inactiva a aquest enzim. El tractament amb liti inhibeix aquest efecte, exactament igual que en el cas de la DV S/K. En canvi, s'ha observat que el liti pot prevenir la mort induïda per aquests compostos, únicament quan les cèl·lules són tractades amb nocodazol. Una possible explicació és que la neuroprotecció induïda per la inhibició de la GSK3, depèn de quina és la via efectora principal responsable d'induir la mort.

Per demostrar aquesta hipòtesi, es va estudiar la via d'activació de les caspases, més concretament a nivell de la caspasa executora 3. Es va mesurar directament l'activitat caspasa 3 i indirectament, valorant el processament de la α -espectrina. Es va determinar que el tractament amb nocodazol i la DV S/K provoquen una gran activació de la caspasa 3. Contràriament, el kainat i el MPP+ només l'incrementen lleugerament. Per tant, es pot formular la hipòtesi de que la inhibició de la GSK3 protegeix les cèl·lules de la mort per apoptosi, quan la via de mort principal és la de les caspases. Aquest fet explicaria perquè la inhibició de la GSK3 protegeix en el cas de la DV S/K i del nocodazol, però no en el del kainat i el del MPP+. Per confirmar aquesta hipòtesi es va utilitzar el z.VAD-fmk, que és un inhibidor de les caspases, i es va determinar que prevé la mort induïda per nocodazol. Aquest mateix efecte protector s'ha observat en cèl·lules exposades a DV S/K (Verdaguer *et al.* 2005), però no en cèl·lules exposades a kainat (Verdaguer *et al.* 2002) ni a MPP+ (Alvira *et al.* 2007; Chu *et al.* 2005). Un altra evidència que confirma aquesta hipòtesi, és que el tractament amb liti també prevé la mort neuronal causada per l'exposició al pèptid β -amiloide, que s'ha demostrat que provoca un augment dels nivells d'activitat de la caspasa 3 (Marin *et al.* 2000; Wei *et al.* 2000). Això demostra que la GSK3 té un paper important en la regulació de la via de les caspases, afirmació que concorda amb el fet demostrat que la GSK3 regula algunes proteïnes claus per l'activació d'aquesta via, com per exemple Bax (Linseman *et al.* 2004).

El principal problema que presenta el liti a l'hora d'estudiar el paper de la GSK3 és que la seva especificitat és molt baixa, ja que a més d'inhibir la GSK3 també pot activar la via de supervivència AKT/PKB mitjançant la inhibició de la PP2A (Mora *et al.*

2002), així com inhibir altres quinases com la MAPKAPK-2 (Davies *et al.* 2000) o inhibir a les monofosfoesterases (Gould *et al.* 2004). Per tant, aquests efectes addicionals, sobretot l'activació de l'AKT/PKB, podrien influir en la neuroprotecció promoguda pel liti. Així doncs, es va decidir utilitzar altres inhibidors més específics de la GSK3, com són el SB-415286 i l'AR-A014418. El primer que es va determinar va ser, mitjançant assaigs d'activitat de la GSK3, que tots dos inhibidors són igual d'eficients que el liti en inhibir l'augment d'activitat de la GSK3 induït per la DV S/K. També es va estudiar l'efecte protector d'aquests compostos, obtenint que el SB-415286 protegeix de la mort provocada per la DV S/K, resultat que confirma els resultats anteriors obtinguts per altres laboratoris (Cross *et al.* 2001; Enguita *et al.* 2005), però que en canvi l'AR-A014418 no protegeix d'aquesta mort. Aquests resultats aparentment contradictoris s'expliquen perquè el tractament amb l'AR-A014418 és per si mateix tòxic per les cèl·lules (resultats no presentats), per tant, la manca de protecció amb l'AR-A014418 no és suficient per descartar el paper neuroprotector de la GSK3. Així, els efectes antiapoptòtics del liti i el SB-415286 permeten concloure que la inhibició de la GSK3 protegeix de la apoptosi induïda per la DV S/K.

Paper de la GSK3 en la regulació del cicle cel·lular

Al llarg dels darrers anys s'ha estudiat intensament la implicació del cicle cel·lular en l'apoptosi neuronal i en la neurodegeneració, demostrant-se que les connexions entre l'intent d'entrada al cicle i la posterior mort cel·lular són múltiples, tant *in vivo* com *in vitro* (Nguyen *et al.* 2002; Byrnes and Faden 2007). Per tant, l'estudi dels mecanismes que provoquen i regulen aquesta entrada aberrant al cicle cel·lular pot ser important pel desenvolupament de noves teràpies inhibidores de la mort neuronal. Aquest va ser el motiu que va conduir a plantejar la hipòtesi de que la GSK3 podria estar d'alguna manera involucrada en la regulació del cicle cel·lular.

Per contrastar aquesta hipòtesi es va utilitzar novament el model de la DV S/K en CGC. Estudis previs havien demostrat que l'exposició de les CGC a la DV S/K provocava una activació aberrant del cicle cel·lular i que aquesta estava involucrada en la mort provocada per aquest estímul, ja que diferents inhibidors de les CDK prevenien aquesta mort (Padmanabhan *et al.* 1999). Per detectar l'entrada al cicle cel·lular es varen estudiar diferents proteïnes involucrades en aquest procés, com són la ciclina D1, que activa la CDK4 i la 6 durant la fase G1 del cicle cel·lular, la ciclina E, que activa la CDK2 també durant la fase G1, la Rb, que al ser fosforilada per les CDK2, 4 i 6 permet que s'alliberi el factor de transcripció E2F-1 al qual segresta, i el propi E2F-1, que un cop alliberat pot activar la transcripció de gens involucrats en el pas a la fase S.

L'estudi de l'expressió proteica d'aquests marcadors del cicle cel·lular, va ser realitzat mitjançant la tècnica de Western blot i confirmat per la tècnica d'immunocitoquímica. Els resultats obtinguts van ser un augment de l'expressió proteica de la ciclina D1, la ciclina E i l'E2F-1 després de sotmetre les cèl·lules a la DV S/K, confirmant l'intent d'entrada al cicle cel·lular provocat per aquest estímul. El tractament previ a la DV S/K amb els inhibidors de la GSK3 (liti, SB-415286 i AR-A014418) prevé l'augment de l'expressió de la ciclina E i de l'E2F-1, que resten a uns nivells pràcticament idèntics als de les cèl·lules control. En el cas de la ciclina D1 la prevenció d'aquest augment, tot i donar-se, no és tan eficient com en el cas de les altres dos proteïnes. Aquestes dades demostren que la GSK3 pot activar el cicle cel·lular mitjançant algun mecanisme desconegut, ja que a l'inhibir l'activitat GSK3 durant l'exposició de les CGC a la DV S/K, no augmenta l'expressió de proteïnes del cicle cel·lular.

La següent pregunta que es va formular va ser per quin mecanisme la GSK3 regularia el cicle cel·lular. Una proteïna clau en la regulació del cicle cel·lular, més concretament en el pas de la fase G1 a la S, és la Rb. Com s'ha esmentat anteriorment, la Rb hipofosforilada està unida a l'E2F-1, al qual segresta impedit que actuï com a factor de transcripció. Quan la Rb es fosforila, s'allibera E2F-1, el qual activarà la transcripció del seus gens diana, que estan involucrats en diferents mecanismes cel·lulars, com el pas a la fase S del cicle cel·lular, la reparació de l'ADN o la inducció de l'apoptosi. La fosforilació de la Rb normalment ve donada pels complexos formats per la ciclina D1 amb la CDK4 i la CDK6 i el format per la ciclina E i la CDK2. Darrerament, però, s'ha demostrat que altres quinases també poden estar implicades. Un cas seria el de la CDK5, que s'ha demostrat que en neurones pot inhibir directament la Rb (Hamdane *et al.* 2005). Així doncs, es va formular la hipòtesi de que potser la GSK3 podia influir d'alguna manera en la fosforilació de la Rb, fet que concordaria amb la fosforilació mitjançant la GSK3 de la p130, una proteïna de la família de la Rb, observada en cèl·lules no neuronals (Litovchick *et al.* 2004). Per procedir a l'estudi de la fosforilació de la Rb, es va utilitzar un anticòs dirigit contra la seva forma fosforilada en el residu serina 780. Mitjançant la tècnica de Western Blot, es va observar que l'exposició de les cèl·lules a la DV S/K provocava un augment significatiu de la fosforilació de la Rb als 30 minuts i que, posteriorment, aquesta fosforilació augmentava progressivament assolint un pic màxim a les dues hores d'haver iniciat el tractament. S'ha detectat que a períodes de temps més llargs, la fosforilació de la Rb decau, probablement degut a que aquesta estimula la seva pròpia degradació (Padmanabhan *et al.* 1999). Un cop determinat que l'augment màxim de la fosforilació de la Rb és a les dues hores de la DV S/K, es va estudiar quin és l'efecte del tractament previ de les cèl·lules amb els inhibidors de la GSK3 en aquest

període de temps. Es va observar que tots tres inhibidors prevenen aquesta fosforilació. Per tant, es pot afirmar que la GSK3 provocaria la fosforilació de la Rb i que a través d'aquesta acció activaria el cicle cel·lular. Es podria suggerir que, per determinar si l'efecte de la GSK3 sobre la fosforilació de la Rb és directe o a través d'intermediaris, caldria realitzar assaigs d'activitat quinasa *in vitro*.

La fosforilació directa o indirecta de la Rb per la GSK3, conduirà a l'alliberació d'E2F-1, que activarà la transcripció del gen de la ciclina E i al seu propi gen E2F-1, entre d'altres (Neuman *et al.* 1994; Pardee *et al.* 2004). En canvi no està descrit que E2F-1 reguli la transcripció de la ciclina D1. Això explicaria que els inhibidors de la GSK3 siguin més eficients prevenint l'augment provocat per la DV S/K de la expressió proteica de la ciclina E i de l'E2F-1, que no pas el de la ciclina D1, ja que el gen d'aquesta no està regulat per E2F-1. Tot i això, es detecta una petita prevenció de l'expressió de la ciclina D1, per a la qual encara no es tindria una explicació.

El factor de transcripció E2F-1, a més d'induir l'expressió de gens involucrats en la progressió del cicle cel·lular, també activa la transcripció de diferents gens apoptòtics. Un dels principals mecanismes pel qual E2F-1 promou l'apoptosi és a través de la p53, a la qual activa indirectament promovent l'expressió del gen *p19^{ARF}*, que a l'unir-se a Mdm2, impedeix que aquest últim inhibeixi a la p53 (Sherr and Weber 2000). En el model de DV S/K en CGC s'ha descrit que E2F-1 intervé en la inducció de l'apoptosi, però per un mecanisme independent de la p53 (D'Mello and Chin 2005). S'ha demostrat que E2F-1 provoca la mort a través de l'activació de la transcripció del gen de la CDK1, la qual al seu torn fosforila a Bad, permetent que aquesta s'alliberi de la proteïna 14-3-3 i pugui anar a la mitocòndria per col·laborar en l'alliberació de factors proapoptòtics des de la mitocòndria (Konishi and Bonni 2003). Encara que tampoc es pot descartar que E2F-1 també activi a altres dels seus gens dianes, com el de p73 o els de les proteïnes BH3.

Es pot resumir dient que la GSK3 regula el cicle cel·lular en les CGC mitjançant la fosforilació, directa o indirecta, de la Rb, fet que condueix a l'alliberació del factor de transcripció E2F-1, que activarà la transcripció de gens necessaris per entrar a la fase S del cicle cel·lular, com el de la ciclina E o al propi gen E2F-1, així com la de gens inductors de l'apoptosis (Fig. 1). Aquest resultat es pot considerar rellevant des del punt de vista farmacològic, ja que la inhibició de la GSK3 podria evitar que les neurones activessin el programa d'apoptosi com a resposta a l'entrada al cicle cel·lular.

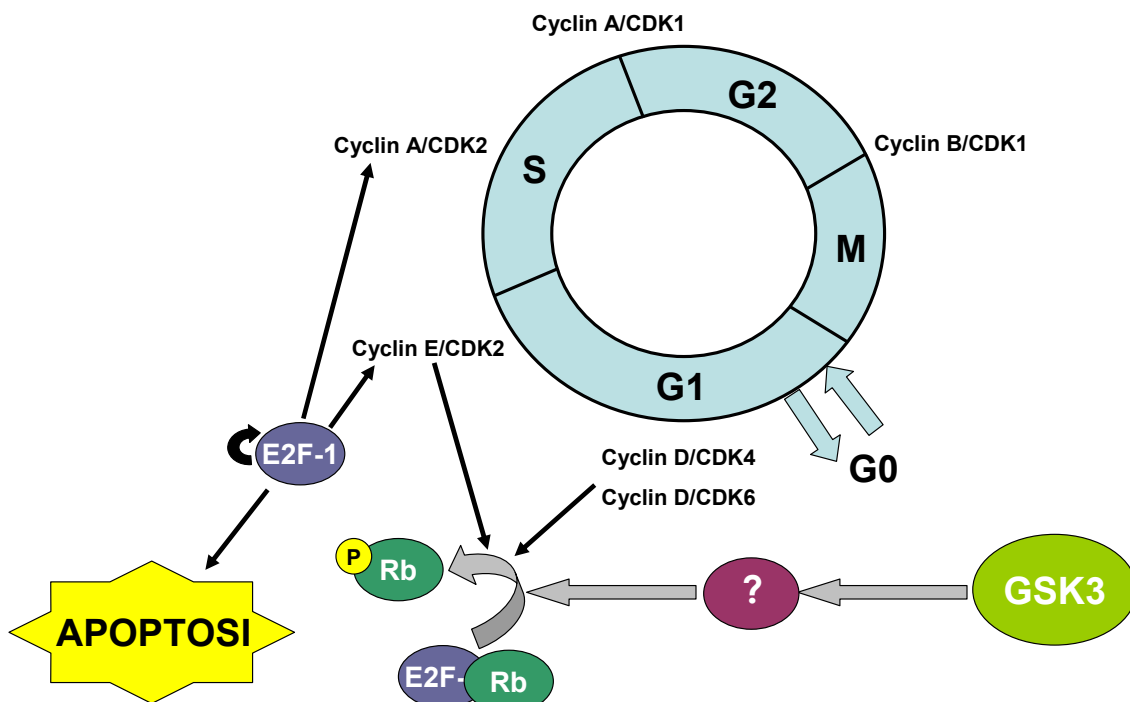


Figura 1. Regulació del cicle cel·lular mitjançant la GSK3

Paper de la GSK3 i de l'AIF en l'estrès oxidatiu

Després d'abordar l'estudi del paper de la GSK3 en la promoció de l'apoptosi i en la regulació del cicle cel·lular, es va proposar estudiar el paper de la GSK3 en una situació d'estrès oxidatiu. L'estrès oxidatiu és un dels principals factors desencadenants de l'apoptosi neuronal, ja que provoca la formació d'espècies reactives d'oxigen (ROS), que conduiran al dany de l'ADN, de les proteïnes i dels lípids, canvis que acabaran produint la mort de la neurona. Les espècies reactives d'oxigen es generen inevitablement durant el metabolisme oxidatiu, fet que fa especialment sensibles a les neurones ja que tenen una gran demanda energètica. Diverses situacions patològiques poden agreujar aquesta situació a l'induir un augment de la producció de ROS. Està demostrat que la DV S/K condueix a la formació de ROS (Atabay *et al.* 1996; Schulz *et al.* 1996), així doncs aquest és un bon model per estudiar la relació entre la GSK3 i l'estrès oxidatiu.

Per caracteritzar la producció de ROS es va mesurar la producció de ROS, utilitzant la sonda fluorescent $H_2DCF-DA$ (2, 7-dichlorodihidrofluoresceïn-diacetate). Aquesta sonda, quan es oxidada per les ROS, emet fluorescència i la intensitat d'aquesta és proporcional a la quantitat de ROS. La DV S/K de les neurones produeix un gran increment en la producció de ROS, al voltant d'un 150% més que el control. Per tal d'avaluar els efectes de la inhibició de la GSK3 en una situació d'estrès oxidatiu, es va utilitzar el liti i el SB-415286. Com a control positiu es va utilitzar un antioxidant ben caracteritzat, el resveratrol. A l'estudiar l'efecte del liti i el SB-415286 es va detectar que el primer no prevé l'augment de ROS provocat per la DV S/K, però en canvi el segon el disminueix pràcticament al nivells dels controls, de forma similar al detectat amb el resveratrol. Paral·lelament, es va comprovar que en les condicions experimental (temps i dosi) en que s'han utilitzat aquests inhibidors de la GSK3, aquesta quinasa està inhibida. Donat que ambdós inhibidors inactiven la GSK3 i que només el tractament amb SB-415286 prevé la formació de ROS, sembla clar que la GSK3 no és la proteïna implicada en l'efecte antioxidant obtingut amb el SB-415286. En quant al liti, el resultat obtingut contradiu els detectats anteriorment per altres grups, que demostren les propietats antioxidants del liti (Schafer *et al.* 2004; Shao *et al.* 2005). Encara que existeix certa controvèrsia en quant a si les propietats antioxidants del liti són degudes a la inhibició de la GSK3 que s'aconsegueix amb pretractaments curts, de dues hores a un dia (Lee *et al.* 2007; Schafer *et al.* 2004), o contràriament només s'aconsegueixen després de pretractaments crònics, d'una setmana aproximadament (Shao *et al.* 2005). Això porta a pensar que els efectes antioxidants del liti depenen del temps de pretractament, del tipus cel·lular i de l'estímul que condueix a l'estrès oxidatiu. En els experiments del present treball es van pretractar les cèl·lules amb liti durant 24 hores, temps suficient per inhibir la GSK3, però no es va detectar prevenció de l'increment de ROS produït per la DV S/K. S'ha observat que els tractaments crònics amb liti augmenten l'expressió de la glutatió S-transferasa, un enzim antioxidant (Shao *et al.* 2008), així com la de la xaperona GRP78 i de la proteïna Bcl2, totes dues implicades en establir la funció mitocondrial i, per tant, prevenir l'increment de la producció de ROS (Hiroi *et al.* 2005). Aquestes dades serien una bona explicació de per què els tractaments crònics amb liti prevenen la formació de ROS i, en canvi, els tractaments curts no. Per tant, els nostres resultats s'afegeixen als que demostren que la inhibició de la GSK3 no és suficient per prevenir la producció de ROS, ja que tant el liti com el SB-415286 inhibeixen GSK3, però només l'últim prevé la formació de ROS.

Un cop descartada la implicació de la GSK3, la següent pregunta que es va formular va ser com el SB-415286 prevé la formació de ROS. Així doncs, es va abordar l'estudi de l'expressió proteica i de la localització d'AIF, ja que es conegut que juga un

paper important en la homeòstasi de la mitocòndria (Krantic *et al.* 2007). La funció d'AIF depèn de la seva localització, en situacions fisiològiques es troba dins la mitocòndria situat al costat del complex I de la cadena respiratòria, mantenint la funció d'aquesta, i actuant com a scavenger de ROS. En canvi, després de diferents estímuls apoptòtics s'allibera de la mitocòndria, translocant-se al nucli, on indueix l'activació de l'apoptosi independentment de les caspases (Porter and Urbano 2006). A l'estudiar l'expressió proteica d'AIF en extractes mitocondrials, es va detectar que la DV S/K provoca una disminució de la seva expressió, que segurament ve donada per l'alliberament d'AIF de la mitocòndria. Aquest resultat concorda amb el publicat prèviament on es demostra que durant la DV S/K es dona una redistribució d'AIF i que aquest està implicat en la inducció de l'apoptosi (Slagsvold *et al.* 2003). Aquesta sortida d'AIF de la mitocòndria també pot explicar en part l'increment de la producció de ROS després de la DV S/K, ja que AIF un cop alliberat no pot realitzar la seva funció fisiològica. El pretractament, tant amb liti com amb el SB-415286, prevé l'alliberament d'AIF de la mitocòndria, per tant, aquest no pot ser el mecanisme antioxidant del SB-415286, ja que aleshores el liti també hauria de tenir efectes antioxidants. Un mecanisme pel qual, tant el liti com el SB-415286, podrien prevenir l'alliberació d'AIF podria ser a través del factor de transcripció E2F-1. En cèl·lules tumorals s'ha demostrat que l'augment d'E2F-1 va lligat amb una alliberació d'AIF cap al citoplasma (Vorburger *et al.* 2003), que juntament amb el fet que tots dos inhibidors de la GSK3 prevenen l'augment d'E2F-1, com s'ha explicat a l'apartat anterior, ens permet formular la hipòtesi de que, tant el liti com el SB-415286, podrien evitar l'alliberació d'AIF de la mitocòndria al prevenir l'augment de l'expressió d'E2F-1.

Es pot concloure que aquests estudis posen de manifest que la molècula SB-415286 té propietats antioxidants i que aquestes són independents de l'activitat de la GSK3 i d'AIF. Podria ser que aquesta molècula tingués propietats antioxidants *per se*, per demostrar-ho caldria dur a terme estudis en sistemes aïllats i lliures de cèl·lules, on es podria valorar la capacitat antioxidant intrínseca de la molècula.

Per últim, afegir que també es van avaluar els efectes antioxidants i protectors del liti i el SB-415286 enfront de la mort de les CGC provocada pel tractament amb H₂O₂. El H₂O₂ és un estímul àmpliament utilitzat per produir estrès oxidatiu extrínsec a les cèl·lules, que normalment condueix a la mort cel·lular. Primerament es va estudiar la producció de ROS provocada per el tractament amb H₂O₂ mitjançant estudis de dosi-resposta. Es va observar que el H₂O₂ a una concentració de 100 µM provoca un gran increment de ROS, al voltant de 10 vegades més que el control. A l'estudiar l'efecte antioxidant del SB-415286 es va detectar que aquest disminueix la producció de ROS

de manera dosi dependent. El SB-415286 a 30 μM redueix en un 50% les ROS generades per el H_2O_2 . A l'estudiar l'efecte del liti es va detectar novament que aquest no té cap efecte antioxidant, confirmant els resultats obtinguts en CGC sotmeses a la DV S/K. També es va valorar la capacitat protectora d'aquests compostos enfront la mort produïda per el H_2O_2 a 100 μM , que produeix una disminució de la viabilitat cel·lular al voltant del 50%. Es va detectar que el SB-415286, a 20 i 30 μM , és capaç de prevenir al voltant del 25% de la mort cel·lular provocada per el H_2O_2 a 100 μM , mentre que el liti no té cap efecte significatiu en aquest sentit. Aquests resultats reforcen la hipòtesi de que la capacitat protectora del SB-415286 front l'acció tòxica del H_2O_2 es deguda a les seves propietats antioxidants. Aquest resultat difereix de l'obtingut en la mort de les CGC provocada per la DV S/K, que es previnguda tant pel SB-415286 com pel liti. La explicació d'aquesta divergència és que, mentre el H_2O_2 provoca la mort principalment per l'augment de ROS, la DV S/K, encara que també provoca un augment de ROS, aquest no és tant gran i a més es donen altres canvis que també tenen un paper important en el procés de mort cel·lular. Aquest raonament concorda amb el fet que no tots els antioxidants són capaços de protegir de la mort provocada per la DV S/K (De *et al.* 2000).

Finalment, després d'estudiar els efectes del SB-415286 front dos estímuls que provoquen un estrès oxidatiu, es pot concloure que aquest compost té propietats antioxidants i que aquestes no es deuen a la inhibició de la GSK3 ni a la prevenció de l'alliberament d'AIF de la mitocòndria.

Paper de la JNK en la mort neuronal induïda per DV S/K i la seva interacció amb altres vies

La mort neuronal mediada per l'activació de vies apoptòtiques és fruit d'una complexa interacció entre molècules reguladores amb efectes antagònics, pel que fa a la inducció de les molècules efectores de la mort cel·lular. Moltes d'aquestes molècules reguladores tenen activitat quinasa i són responsables de comunicar senyals de mort o de supervivència del citoplasma al nucli de la cèl·lula. Un grup important d'aquestes molècules és el format per les MAPK, que està format per tres quinases diferents: la JNK i la p38, que responen a senyals extracel·lulars d'estrès promovent l'apoptosi, i l'ERK, que promou la proliferació cel·lular i la supervivència. La JNK és el membre més important d'aquesta família en quant a la regulació de l'apoptosi neuronal (D'Mello and Chin 2005). Recentment, s'ha posat de manifest l'interès que poden tenir els inhibidors de la JNK, per la seva potencial capacitat terapèutica, que podria ser d'utilitat en el tractament de malalties neurodegeneratives, com l'Alzheimer

o el Parkinson entre d'altres (Manning and Davis 2003). D'altra banda, manca informació pel que fa a les interrelacions que poden donar-se entre la molècula GSK3 i la JNK, totes dues implicades en la promoció de l'apoptosi. Donat que existeixen evidències de que totes dues poden interaccionar per provocar la mort neuronal (Hongisto *et al.* 2003), es va proposar estudiar més profundament aquesta interacció.

Existeixen diferents isoformes de la JNK que estan codificades per tres gens diferents. La JNK3 s'expressa exclusivament en cervell i és la principal implicada en l'apoptosi neuronal (Davis 2000). La JNK pot provocar l'apoptosi directament fosforilant diferents substrats, com Bad (Donovan *et al.* 2002), o indirectament fosforilant i activant diferents factors de transcripció, com c-Jun i ATF-2 (Herdegen and Waetzig 2001), que posteriorment activaran l'expressió de gens apoptòtics, com DP5 o Bim (Harris and Johnson, Jr. 2001).

Està demostrat que la via de la JNK està activada i participa en l'apoptosi induïda per la DV S/K en CGC (Harris *et al.* 2002) per tant, el primer objectiu va ser determinar si la inhibició de la JNK té algun efecte protector front la mort induïda per la DV S/K. Per inhibir la JNK es va utilitzar un inhibidor específic anomenat SP-600125, que inhibeix la JNK al competir pel seu lloc d'unió a l'ATP (Bennett *et al.* 2001). Al realitzar estudis de dosi-resposta, es va detectar que el SP-600125, a una concentració de 10 μM , és capaç de prevenir l'apoptosi provocada per la DV S/K. Aquest resultat concorda amb els obtinguts per altres grups (Xifro *et al.* 2006). El següent pas va ser determinar si a aquesta concentració el SP-600125 està inhibint la JNK. Es va estudiar la inhibició de la JNK indirectament determinant els nivells de fosforilació del factor de transcripció c-Jun, que és un dels substrats més coneguts de la JNK i que es fosforilat principalment per aquesta. Es va immunodetectar la c-Jun mitjançant un anticòs dirigit contra la fosforilació al residu serina 73. Els resultats obtinguts van ser que mentre a les cèl·lules control no es detectava cap senyal, a les cèl·lules exposades a la DV S/K durant 4 hores, es detectava un gran increment de la c-Jun fosforilada. El tractament previ amb SP-600125, 10 μM , prevenia aquest augment de la forma fosforilada de c-Jun i això posa de manifest que, efectivament, la JNK es troba inhibida. Per confirmar aquest resultat es va estudiar l'activitat transcripcional del gen DP5, que es troba regulada per c-Jun, mitjançant la tècnica de PCR Real-time semiquantitativa. A les 8 hores d'iniciar la DV S/K, l'expressió de l'ARN missatger de DP5 augmenta unes 4 vegades respecte el control i aquest augment es previngut pel pretractament amb SP-600125, confirmant també d'aquesta manera la seva acció inhibidora sobre la JNK.

Una vegada determinada la concentració protectora del SP-600125 i comprovat que a aquesta concentració la JNK es troba inhibida, el següent objectiu que es va plantejar va ser l'estudi de la interacció de les vies de la JNK i de l'AKT. L'apoptosi està controlada mitjançant un equilibri entre les senyals de supervivència i les de mort, entre les quals es troben la JNK i l'AKT respectivament. Quan es dona un desequilibri d'aquestes es pot desencadenar l'apoptosi. S'ha demostrat que l'activació de la JNK condueix a la mort neuronal i que ho fa a través de múltiples molècules proapoptòtiques, el que encara no es coneix és si la mort que provoca es en part deguda a la inhibició de les vies de supervivència. La via de la PI3-K/AKT és una de les més important en la supervivència de les CGC (D'Mello *et al.* 1997), així que es va proposar estudiar si es troba afectada per la inhibició de la JNK. La primera aproximació a l'estudi d'aquesta via de supervivència va ser determinar la fosforilació de l'AKT a la serina 473, ja que és necessària per l'activació d'aquesta quinasa. Es va detectar que la DV S/K provoca una defosforilació de l'AKT, el que significa que s'inhibeix, i que el pretractament amb SP-600125 prevé aquest efecte. Aquest resultat es pot interpretar com que la inhibició de la JNK manté activa l'AKT o, el que és el mateix, que la activació de la JNK inhibeix l'AKT.

Per confirmar aquesta hipòtesi es va decidir estudiar la fosforilació de diferents substrats de l'AKT com són la GSK3, que al ser fosforilada per l'AKT a la serina 9 s'inactiva i no pot promoure l'apoptosis, el factor de transcripció FOXO1, que al ser fosforilat a la serina 256 queda retingut al nucli i no pot activar la transcripció de gens proapoptòtics, i el factor de transcripció CREB, que al ser fosforilat a la serina 133 s'activa i promou la transcripció de gens antiapoptòtics. En tots tres casos la DV S/K produeix la seva defosforilació, conduint a l'activació de diverses vies de mort, i el pretractament amb SP-600125 prevé aquesta defosforilació, confirmant que a l'inhibir la JNK, l'AKT es manté activa.

Recentment es va demostrar que l'expressió proteica de la p35 pot ser induïda per l'AKT (Bogush *et al.* 2007). En situacions fisiològiques aquesta proteïna es troba unida a la membrana plasmàtica i activa a la CDK5, la qual pot promoure la supervivència. En canvi quan la p35 es tallada per proteases com les calpaïnes, es forma un fragment més petit, la p25, la qual s'allibera de la membrana i al tenir més capacitat activadora, sobreactiva a la CDK5 que, a més, quan es troba al citoplasma pot promoure l'apoptosi. Es va observar que l'exposició de les cèl·lules a la DV S/K provoca una disminució de l'expressió proteica de la p35, segurament provocada pel processament d'aquesta per formar el fragment p25. Aquesta disminució de la p35 es previnguda pel pretractament amb SP-600125, efecte que pot venir donat perquè

l'AKT es mantingui activa i indueixi l'expressió de la p35, compensant així els efectes de la seva hidròlisi provocada per la DV S/K. Per tant, novament, aquest resultat confirma que la inhibició de la JNK manté l'AKT activada i també que l'augment de la p35 es troba entre les accions protectores de la inhibició de la JNK.

Després de demostrar que inhibint la JNK es manté activada l'AKT, es va plantejar si en la prevenció de l'apoptosis aconseguida mitjançant la inhibició de la JNK també hi participa l'AKT. Així, es van pretractar les cèl·lules amb el SP-600125 conjuntament amb el LY294002, un conegut inhibidor de la via PI3-K/AKT, per tal de detectar si la inhibició de l'AKT afecta a la protecció obtinguda amb el SP-600125. Es va observar que a l'inhibir l'AKT es perd una part de la protecció obtinguda amb el SP-600125, resultat que demostra que l'AKT està involucrada en la protecció obtinguda amb la inhibició de la JNK.

Per tant, es pot concloure que la inhibició de la JNK manté activada la via de l'AKT, ja que s'ha demostrat de tres formes diferents: estudiant la fosforilació que condueix a l'activació de l'AKT, estudiant la fosforilació de diferents substrats de l'AKT i per últim, demostrant que la inhibició de l'AKT comporta una pèrdua de la protecció obtinguda amb la inhibició de la JNK. Aquest resultat es pot considerar rellevant des del punt de vista farmacològic, ja que la inhibició farmacològica de la JNK neutralitzaria la senyalització proapoptòtica mediada per aquesta molècula i, a més, mantindria la funcionalitat de la via de supervivència constituïda per la PI3-K/AKT. Per tant, els inhibidors de la JNK podrien ser bons candidats a ser utilitzats com a fàrmacs en el tractament de les malalties neurodegeneratives. A més, aquests resultats mostren que existeix un nexa (*cross-talking*), que comunica la via de la JNK i la de la GSK3 a través de l'AKT. Com s'ha exposat anteriorment, la inhibició de la JNK mantindria activa la via de supervivència de l'AKT que, al seu torn, inhibiria a la GSK3 al fosforilar-la al residu serina 9.

La següent qüestió que es va formular va ser per quin mecanisme la inhibició de la JNK manté activa l'AKT. Per obtenir una resposta, es van estudiar diferents possibilitats. La via de la PI3-K/AKT pot ser activada per diferents lligands com els factors neurotròfics, el NMDA o la insulina, entre altres. Així, la primera possibilitat que es va estudiar va ser que la inhibició de la JNK mantingués activa la senyalització de la via de l'AKT a través dels factors neurotròfics i els seus receptors Trk, resultat que s'havia detectat anteriorment en altres estudis (Wang *et al.* 2005). Es va utilitzar la molècula K252a, que és un inhibidor de diferents quinases però que a 100 nM inhibeix específicament els receptors quinases de tirosina Trk, per tal de detectar si la inhibició

dels Trk afecta a la neuroprotecció obtinguda per la inhibició de la JNK. No es va detectar cap variació en la protecció i, per tant, es van descartar els factors neurotròfics i els Trk com a responsables de mantenir activada l'AKT. El següent objectiu va ser determinar si l'AKT es mantenia activada a través del receptor de NMDA, que està descrit que pot intervenir en l'activació de l'AKT (Zhu *et al.* 2002). Es va utilitzar el MK-801, un conegut antagonista dels receptors NMDA, i tampoc es va detectar cap canvi en la protecció, descartant també aquesta possibilitat. Així doncs, sembla que l'efecte no es dona a nivell dels receptors de membrana.

L'AKT pot ser activada per la família de quinases de tirosina Src, les quals fosforilen i activen l'AKT (Crossthwaite *et al.* 2004). La Src es regula per fosforilacions i per exemple, la fosforilació de la tirosina 257 la inhibeix. Per tant, una hipòtesi plausible seria que la JNK fosforilés a la Src, inhibint-la, i així aquesta no pogués activar l'AKT. A l'inhibir la JNK amb el SP-600125, la JNK no podria inhibir a la Src, la qual podria continuar activant l'AKT. Estudis previs han demostrat que l'inhibidor de la via de la JNK CEP1347, indueix l'activació de l'AKT mitjançant la Src (Roux *et al.* 2002). Per demostrar aquesta hipòtesi es va utilitzar un inhibidor de la Src anomenat PP2, per tal de detectar si afecta a la protecció obtinguda per la inhibició de la JNK. No es va detectar cap canvi i, per tant, també es va descartar que l'AKT es mantingui activada a través de la Src. La última hipòtesi que es va estudiar va ser la regulació de la via PI3-K/AKT a través de la fosfatasa PTEN, que inhibeix aquesta via a través de la defosforilació dels PIP₃ que es transformaran en PIP₂, per tant, l'AKT no es localitzarà a la membrana plasmàtica i no podrà ser activada per les seves quinases (Zhang *et al.* 2007). A l'estudiar l'expressió proteica del PTEN no es va detectar cap canvi de les cèl·lules control respecte a les deprivades, ni d'aquestes en relació a les tractades pel SP-600125. Per tant, en principi sembla que el PTEN tampoc seria el responsable, encara que s'hauria d'estudiar la seva fosforilació, ja que aquesta regula la seva activació.

Així doncs, queda per resoldre per quin mecanisme la inhibició de la JNK condueix a mantenir activada l'AKT. Tot i que encara no s'ha trobat, el que sí queda patent és que existeix un *cross-talking* entre aquestes dues vies, tant en el sentit que la inhibició de la JNK manté activa l'AKT, fet que hem demostrat de diferents maneres, com en el sentit que la inhibició de l'AKT activa la JNK, fet que havia estat demostrat anteriorment (Shimoke *et al.* 1999).

La JNK està implicada en l'activació del cicle cel·lular el qual, en neurones i com ja s'ha explicat prèviament, al ser cèl·lules quiescents pot activar l'apoptosis. Per tant, aquest mecanisme es podria afegir als ja coneguts, pels qual la JNK condueix a

l'apoptosi neuronal. La JNK activa el cicle cel·lular a través de la fosforilació i activació del factor transcripció c-Jun, el qual activa la transcripció del gen de la ciclina D1 (Wisdom *et al.* 1999) i reprimeix la transcripció del gen de la p21, que és un inhibidor de les CDK (Wang *et al.* 2000). A partir dels resultats experimentals d'aquesta tesi doctoral es proposaria un altre mecanisme mitjançant el qual la JNK regularia el cicle cel·lular. Com s'ha descrit anteriorment, s'ha demostrat que la GSK3, a través de la fosforilació directa o indirecta de la Rb, provoca l'entrada al cicle cel·lular. També s'ha demostrat en el present treball, que la inhibició de la JNK permet que l'AKT continuï activa i inhibeixi la GSK3. Per tant, es pot formular la hipòtesi de que en una situació experimental com la DV S/K en CGC, la JNK neutralitzaria l'activitat antiapoptòtica de l'AKT i això, al seu torn, permetria que la GSK3 conduís a la hiperfosforilació de la Rb i s'activés el mecanisme de posada en marxa del cicle cel·lular, que induiria la mort de la neurones per apoptosi. Per contrastar aquesta hipòtesi es va estudiar l'efecte del SP-600125 sobre la fosforilació de la Rb a les dues hores de DV S/K, que és el temps on es produeix la fosforilació màxima de la Rb. Es va observar que el SP-600125 impedeix la fosforilació de la Rb, resultat que concorda amb la hipòtesi formulada. Però també podria ser que la Rb no es fosforilés degut a la inhibició de la c-Jun, enlloc de per la inhibició de la GSK3, perquè c-Jun pot activar l'expressió de la ciclina D1, la qual s'uneix a la CDK4 i a la CDK6, que fosforilen a la Rb. Aquesta última possibilitat queda descartada degut als temps en que succeeixen els esdeveniments: la fosforilació màxima de la Rb es detecta a les dues hores, al mateix temps que l'activació de la GSK3, i en canvi la fosforilació de la c-Jun no es detecta fins les 4 hores (Watson *et al.* 1998).

A l'estudiar l'expressió proteica de diferents marcadors del cicle, com la ciclina D1, la ciclina E i E2F-1, es va detectar que el SP-600125 prevé l'augment provocat per la DV S/K, confirmant la hipòtesi formulada anteriorment. En el cas d'E2F-1, també es va estudiar la seva activitat transcripcional mitjançant Real-time PCR, detectant que a les 8 hores de privació la quantitat d'ARN missatger augmenta i que aquest augment es prevenint pel SP-600125. Així, l'efecte del SP-600125 seria, almenys en part, a nivell transcripcional, fet que concorda amb la hipòtesi formulada, ja que a l'inhibir la fosforilació del Rb, no s'allibera E2F-1, que és un factor de transcripció, que entre d'altres gens del cicle, activa l'activitat transcripcional del seu propi gen. També cal remarcar que, a diferència del detectat amb els inhibidors de la GSK3 que no prevenien gaire l'augment de la ciclina D1 provocat per la DV S/K, l'inhibidor de la JNK el prevé totalment, fet que s'explica perquè s'està inhibint l'activació de la ciclina D1 per c-Jun.

En resum es pot afirmar que la inhibició de la JNK proporciona una gran protecció enfront de l'apoptosis, perquè a més d'inhibir les accions apoptòtiques pròpies d'aquesta via, també manté activa la via de supervivència de l'AKT, que té múltiples accions antiapoptòtiques com la inhibició de FOXO o de GSK3, l'activació de CREB i p35, o indirectament la inhibició de l'entrada al cicle cel·lular (Fig. 2).

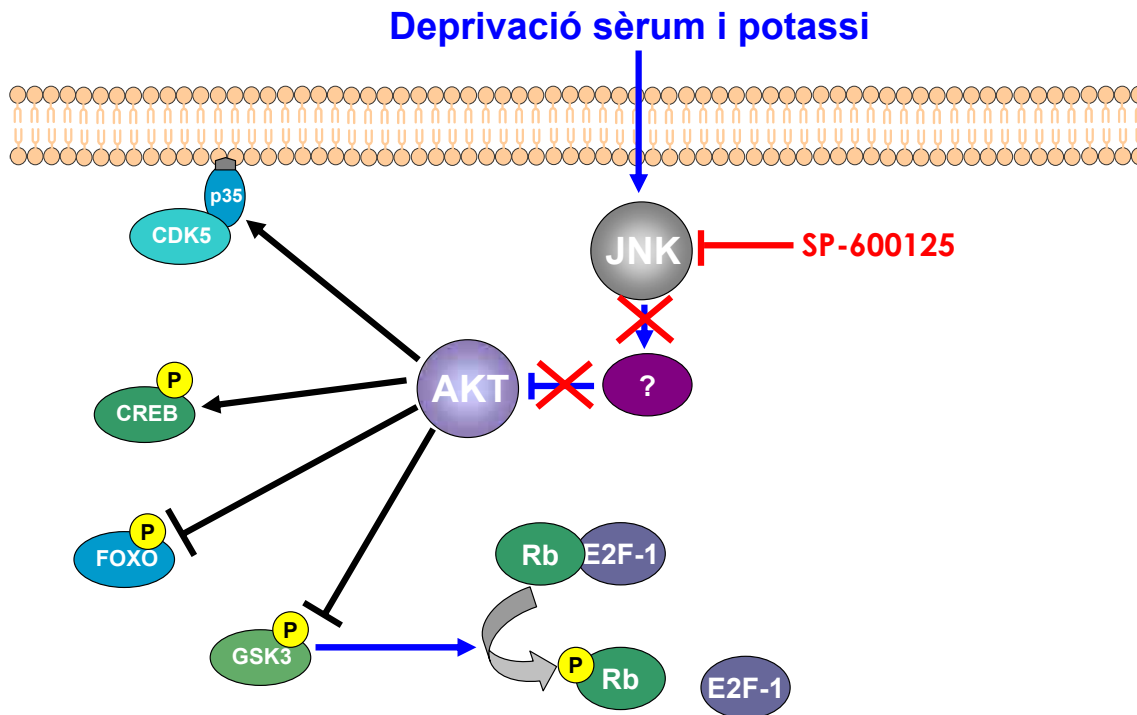


Figura 2. Accions de la inhibició de la JNK mitjançant el SP-600125 sobre la via de l'AKT

Paper de la p53 en l'apoptosis induïda per la DV S/K en CGC

La proteïna p53 és un factor de transcripció que pot regular diferents processos cel·lulars com la reparació de l'ADN, la progressió del cicle cel·lular o l'apoptosis (Ko and Prives 1996). Aquesta proteïna es pot activar mitjançant estímuls genotòxics que estimulen l'activació per fosforilació de la p53 per part de l'ATM (Appella and Anderson 2001), mitjançant l'E2F-1, que l'activa indirectament a través de p19^{ARF}, o mitjançant altres mecanismes. Per tant, seria lògic pensar que la p53 hauria de tenir un paper important en l'apoptosis induïda per la DV S/K, ja que aquest estímul condueix a la producció de ROS, que provoca un dany de l'ADN, el qual pot activar l'ATM i la p53, i a més també s'activa el cicle cel·lular que condueix a l'alliberació de l'E2F-1, el qual també pot activar p53. En canvi, està demostrat que la mort produïda per aquest

estímul és independent de la p53 (D'Mello and Chin 2005). Així doncs, un dels objectius del present treball de tesi doctoral va ser confirmar aquest fet i formular una hipòtesi al respecte.

Primerament es va estudiar si la cafeïna, un conegut inhibidor de l'ATM, tenia algun efecte protector front la DV S/K. No es va detectar protecció, confirmant que el model és independent de la p53. Per tant, si es descarta la via de l'ATM i de la p53, roman per determinar quin és el mecanisme pel qual el dany a l'ADN provocat per la DV S/K condueix a l'apoptosis. Una possibilitat seria a través de la JNK, ja que s'ha demostrat que aquesta s'activa mitjançant el dany de l'ADN (Bulmer *et al.* 2005).

Les sirtuïnes són unes desacetilases que regulen diferents processos com la repressió transcripcional o les respostes al dany de l'ADN. Està demostrat que una d'elles, la SIRT1 pot protegir de l'apoptosis a través de la desacetilació de la p53, que condueix a la seva inhibició (Vaziri *et al.* 2001). El resveratrol es una molècula present en fruites com el raïm, i s'ha demostrat que té propietats antioxidants a la vegada que és un activador de la SIRT1 (Baur and Sinclair 2006). Es va decidir estudiar si el resveratrol tenia algun efecte front la DV S/K i els resultats varen ser negatius. L'explicació a aquest fet podria ser que l'activació de la p53 no és clau en la DV S/K i, per tant, l'activació de la SIRT1, que inhibirà la p53, no té cap efecte protector. També es podria esperar que protegís a través dels seus efectes antioxidants, però està descrit que no tots els antioxidants protegeixen de la DV S/K (De *et al.* 2000). Tot i la coherència d'aquest resultat, es va decidir estudiar l'expressió de la SIRT1, tant a nivell d'ARN missatger com de proteïna. Es va detectar que a tots dos nivells la SIRT1 augmentava després de la DV S/K, fet que es podria explicar com un intent de protecció de la cèl·lula enfront de les senyals de mort. A més, també és una possible explicació al fet que la p53 no estigui implicada en la mort per la DV S/K, ja que la SIRT1 desacetilaria i inhibiria la p53, degut a que aquesta per unir-se a l'ADN ha d'estar acetilada. Es va confirmar aquesta hipòtesi al detectar que la quantitat de p53 acetilada disminueix després de la DV S/K.

Aquestes dades confirmen que la p53 no intervé en la mort apoptòtica induïda per la DV S/K, així com que aquest fet es pot explicar per l'activació de la SIRT1, que desacetila i inhibeix a la p53.

Els resultats obtinguts a partir del treball experimental corresponent a la present tesi doctoral, ens permeten concloure que les vies de senyalització modulades per la GSK3 i per la JNK tenen un paper molt important en la regulació de l'apoptosi

neuronal, ja que totes dues exerceixen múltiples accions que poden conduir a mort cel·lular. En el cas de la GSK3, a més dels efectes proapoptòtics que ja estaven descrits, com la fosforilació i la degradació del factor antiapoptòtic β -catenina, la inhibició de CREB, la fosforilació de la proteïna Tau o la fosforilació de l'APP, s'ha demostrat que també pot activar el cicle cel·lular, conduint a l'alliberació del factor proapoptòtic E2F-1, i que també pot intervenir en l'alliberament de l'AIF de la mitocòndria. Pel que fa a la JNK, a més de les accions proapoptòtiques ja conegudes com la fosforilació i activació de Bad, la inhibició de Bcl2 o l'activació dels factors de transcripció c-Jun o ATF-2, s'ha descrit que també pot inhibir la via de supervivència de l'AKT i que també pot regular el cicle cel·lular per un nou mecanisme, a través de la GSK3 i la Rb. A més, els resultats obtinguts en aquest treball ens permeten concloure que existeix una connexió entre les vies de la JNK i de la GSK3, donat que la JNK inhibeix l'AKT conduint a l'activació de la GSK3. Aquest mecanisme s'afegeix al, ja conegut, pel qual la GSK3 és necessària per la transcripció dels gens regulats per c-Jun. Per tant, es pot afirmar que a més de demostrar la importància d'aquestes dues vies, al detectar que tenen noves accions proapoptòtiques, també es posa de manifest que existeix una estreta relació entre elles. Per últim, també s'ha demostrat que, en CGC sotmeses a DV S/K, la mort apoptòtica és independent de la p53 i que aquest fet està relacionat amb l'activitat inhibidora de la SIRT1.

Conclusions

6. CONCLUSIONS

Les conclusions del treball experimental corresponent a aquesta tesi doctoral són les següents:

1. La inhibició de la GSK3 protegeix de l'apoptosi induïda per la privació de sèrum i potassi en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel de rata.

2. La GSK3 participa en els processos de senyalització intracel·lular responsables de l'activació del cicle cel·lular induït per la privació de sèrum i potassi en cèl·lules granulars de cerebel, ja que provoca, directa o indirectament, la fosforilació de la proteïna del retinoblastoma, que és clau en l'entrada al cicle cel·lular.

3. L'exposició dels cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel a SB-415286, un inhibidor de la GSK3, disminueix significativament la producció d'espècies reactives d'oxigen provocada per la privació de sèrum i potassi i per l'exposició a H₂O₂. Aquesta disminució en la formació d'espècies reactives d'oxigen és independent de l'activitat de la GSK3 i de la mobilització d'AIF.

4. La inhibició de la JNK protegeix de l'apoptosi induïda per la privació de sèrum i potassi en cèl·lules granulars de cerebel. Una part d'aquesta protecció front la mort apoptòtica ve donada perquè la inhibició de la JNK permet mantenir activada la via de supervivència regulada per l'AKT.

5. La JNK pot regular la reentrada al cicle cel·lular induïda per la privació de sèrum i potassi en cèl·lules granulars de cerebel per un nou mecanisme. L'activació de la JNK impedeix que l'AKT es mantingui activada, que tindrà com a efecte l'activació de la GSK3, la qual provocarà la fosforilació de la proteïna del retinoblastoma, que és un element clau en la regulació de l'entrada a la fase S del cicle cel·lular.

6. La mort apoptòtica induïda per la privació de sèrum i potassi en cèl·lules granulars de cerebel és independent de la via regulada per la proteïna ATM i de l'activitat de p53.

7. La privació de sèrum i potassi en cèl·lules granulars de cerebel incrementa l'expressió de la sirtuïna. Tot i que s'ha descrit que aquesta proteïna promou la

supervivència neuronal, la seva inducció no protegeix de l'apoptosi induïda per aquest estímul.

La conclusió general d'aquesta tesi doctoral és que les vies regulades per la GSK3 i per la JNK, són claus en la regulació de les etapes inicials de l'apoptosi neuronal i, conseqüentment, en el destí final de la cèl·lula, com ho demostra el fet que la inhibició de totes dues evita la mort de les cèl·lules granulars de cerebel. Aquesta prevenció de la mort cel·lular ve donada perquè tant la GSK3 com la JNK intervenen en les etapes inicials del procés de la mort neuronal i, per tant, a l'inhibir aquestes quinases evitem que s'activin o inhibeixin múltiples molècules, que intervenen en les etapes més avançades del procés apoptòtic.

Bibliografia

Alessi D. R., James S. R., Downes C. P., Holmes A. B., Gaffney P. R., Reese C. B. and Cohen P. (1997) Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . *Curr. Biol.* 7, 261-269.

Aleyasin H., Cregan S. P., Iyirhiaro G., O'Hare M. J., Callaghan S. M., Slack R. S. and Park D. S. (2004) Nuclear factor- κ B modulates the p53 response in neurons exposed to DNA damage. *J. Neurosci.* 24, 2963-2973.

Alvira D., Tajés M., Verdaguer E., de Arriba S. G., Allgaier C., Matute C., Trullas R., Jimenez A., Pallas M. and Camins A. (2007) Inhibition of cyclin-dependent kinases is neuroprotective in 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced apoptosis in neurons. *Neuroscience* 146, 350-365.

Andreyev A. Y., Kushnareva Y. E. and Starkov A. A. (2005) Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc.)* 70, 200-214.

Anekonda T. S. and Reddy P. H. (2006) Neuronal protection by sirtuins in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 96, 305-313.

Angel P. and Karin M. (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta* 1072, 129-157.

Antonsson B., Conti F., Ciavatta A., Montessuit S., Lewis S., Martinou I., Bernasconi L., Bernard A., Mermoud J. J., Mazzei G., Maundrell K., Gambale F., Sadoul R. and Martinou J. C. (1997) Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* 277, 370-372.

Antonsson B., Montessuit S., Lauper S., Eskes R. and Martinou J. C. (2000) Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem. J.* 345 Pt 2, 271-278.

Antonsson B., Montessuit S., Sanchez B. and Martinou J. C. (2001) Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J. Biol. Chem.* 276, 11615-11623.

Aoki K., Imajoh S., Ohno S., Emori Y., Koike M., Kosaki G. and Suzuki K. (1986) Complete amino acid sequence of the large subunit of the low-Ca²⁺-requiring form of human Ca²⁺-activated neutral protease (muCANP) deduced from its cDNA sequence. *FEBS Lett.* 205, 313-317.

Appella E. and Anderson C. W. (2001) Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur. J. Biochem.* 268, 2764-2772.

Arnoult D., Gaume B., Karbowski M., Sharpe J. C., Cecconi F. and Youle R. J. (2003) Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *EMBO J.* 22, 4385-4399.

Arthur J. S. and Cohen P. (2000) MSK1 is required for CREB phosphorylation in response to mitogens in mouse embryonic stem cells. *FEBS Lett.* 482, 44-48.

Atabay C., Cagnoli C. M., Kharlamov E., Ikonovic M. D. and Manev H. (1996) Removal of serum from primary cultures of cerebellar granule neurons induces oxidative stress and DNA fragmentation: protection with antioxidants and glutamate receptor antagonists. *J. Neurosci. Res.* 43, 465-475.

Attardi L. D., Reczek E. E., Cosmas C., Demicco E. G., McCurrach M. E., Lowe S. W. and Jacks T. (2000) PERP, an apoptosis-associated target of p53, is a novel member of the PMP-22/gas3 family. *Genes Dev.* 14, 704-718.

Balazs R., Jorgensen O. S. and Hack N. (1988) N-methyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells in culture. *Neuroscience* 27, 437-451.

Barnhart B. C., Lee J. C., Alappat E. C. and Peter M. E. (2003) The death effector domain protein family. *Oncogene* 22, 8634-8644.

Barthwal M. K., Sathyanarayana P., Kundu C. N., Rana B., Pradeep A., Sharma C., Woodgett J. R. and Rana A. (2003) Negative regulation of mixed lineage kinase 3 by protein kinase B/AKT leads to cell survival. *J. Biol. Chem.* 278, 3897-3902.

Basanez G., Nechushtan A., Drozhinin O., Chanturiya A., Choe E., Tutt S., Wood K. A., Hsu Y., Zimmerberg J. and Youle R. J. (1999) Bax, but not Bcl-xL, decreases the lifetime of planar phospholipid bilayer membranes at subnanomolar concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 5492-5497.

Bates S. and Vousden K. H. (1996) p53 in signaling checkpoint arrest or apoptosis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6, 12-18.

Baur J. A. and Sinclair D. A. (2006) Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 493-506.

Beal M. F. (1995) Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann. Neurol.* 38, 357-366.

Becker E. B. and Bonni A. (2004) Cell cycle regulation of neuronal apoptosis in development and disease. *Prog. Neurobiol.* 72, 1-25.

Bennett B. L., Sasaki D. T., Murray B. W., O'Leary E. C., Sakata S. T., Xu W., Leisten J. C., Motiwala A., Pierce S., Satoh Y., Bhagwat S. S., Manning A. M. and Anderson D. W. (2001) SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 13681-13686.

- Beurel E. and Jope R. S. (2006) The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. *Prog. Neurobiol.* 79, 173-189.
- Beyaert R., Vanhaesebroeck B., Suffys P., Van R. F. and Fiers W. (1989) Lithium chloride potentiates tumor necrosis factor-mediated cytotoxicity in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86, 9494-9498.
- Bijur G. N., De S. P. and Jope R. S. (2000) Glycogen synthase kinase-3beta facilitates staurosporine- and heat shock-induced apoptosis. Protection by lithium. *J. Biol. Chem.* 275, 7583-7590.
- Boehrer S., Nowak D., Puccetti E., Ruthardt M., Sattler N., Trepohl B., Schneider B., Hoelzer D., Mitrou P. S. and Chow K. U. (2006) Prostate-apoptosis-response-gene-4 increases sensitivity to TRAIL-induced apoptosis. *Leuk. Res.* 30, 597-605.
- Bogush A., Pedrini S., Pelta-Heller J., Chan T., Yang Q., Mao Z., Sluzas E., Gieringer T. and Ehrlich M. E. (2007) AKT and CDK5/p35 mediate brain-derived neurotrophic factor induction of DARPP-32 in medium size spiny neurons in vitro. *J. Biol. Chem.* 282, 7352-7359.
- Boulton T. G., Nye S. H., Robbins D. J., Ip N. Y., Radziejewska E., Morgenbesser S. D., DePinho R. A., Panayotatos N., Cobb M. H. and Yancopoulos G. D. (1991) ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 65, 663-675.
- Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Broker L. E., Krzyt F. A. and Giaccone G. (2005) Cell death independent of caspases: a review. *Clin. Cancer Res.* 11, 3155-3162.
- Brown V. M., Krynetski E. Y., Krynetskaia N. F., Grieger D., Mukatira S. T., Murti K. G., Slaughter C. A., Park H. W. and Evans W. E. (2004) A novel CRM1-mediated nuclear export signal governs nuclear accumulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase following genotoxic stress. *J. Biol. Chem.* 279, 5984-5992.
- Brunet A., Bonni A., Zigmond M. J., Lin M. Z., Juo P., Hu L. S., Anderson M. J., Arden K. C., Blenis J. and Greenberg M. E. (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-868.
- Brunet A., Park J., Tran H., Hu L. S., Hemmings B. A. and Greenberg M. E. (2001) Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHL1 (FOXO3a). *Mol. Cell Biol.* 21, 952-965.

Brunet A., Sweeney L. B., Sturgill J. F., Chua K. F., Greer P. L., Lin Y., Tran H., Ross S. E., Mostoslavsky R., Cohen H. Y., Hu L. S., Cheng H. L., Jedrychowski M. P., Gygi S. P., Sinclair D. A., Alt F. W. and Greenberg M. E. (2004) Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 303, 2011-2015.

Bulmer J. T., Zacal N. J. and Rainbow A. J. (2005) Human cells deficient in transcription-coupled repair show prolonged activation of the Jun N-terminal kinase and increased sensitivity following cisplatin treatment. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 56, 189-198.

Burgoyne R. D., Graham M. E. and Cambray-Deakin M. (1993) Neurotrophic effects of NMDA receptor activation on developing cerebellar granule cells. *J. Neurocytol.* 22, 689-695.

Burke J. R., Enghild J. J., Martin M. E., Jou Y. S., Myers R. M., Roses A. D., Vance J. M. and Strittmatter W. J. (1996) Huntingtin and DRPLA proteins selectively interact with the enzyme GAPDH. *Nat. Med.* 2, 347-350.

Bursch W. (2001) The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death. Differ.* 8, 569-581.

Byrnes K. R. and Faden A. I. (2007) Role of cell cycle proteins in CNS injury. *Neurochem. Res.* 32, 1799-1807.

Caivano M. and Cohen P. (2000) Role of mitogen-activated protein kinase cascades in mediating lipopolysaccharide-stimulated induction of cyclooxygenase-2 and IL-1 beta in RAW264 macrophages. *J. Immunol.* 164, 3018-3025.

Canu N., Tufi R., Serafino A. L., Amadoro G., Ciotti M. T. and Calissano P. (2005) Role of the autophagic-lysosomal system on low potassium-induced apoptosis in cultured cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* 92, 1228-1242.

Cardone M. H., Roy N., Stennicke H. R., Salvesen G. S., Franke T. F., Stanbridge E., Frisch S. and Reed J. C. (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282, 1318-1321.

Chandrasekaran Y. and Richburg J. H. (2005) The p53 protein influences the sensitivity of testicular germ cells to mono-(2-ethylhexyl) phthalate-induced apoptosis by increasing the membrane levels of Fas and DR5 and decreasing the intracellular amount of c-FLIP. *Biol. Reprod.* 72, 206-213.

Chang L., Jones Y., Ellisman M. H., Goldstein L. S. and Karin M. (2003) JNK1 is required for maintenance of neuronal microtubules and controls phosphorylation of microtubule-associated proteins. *Dev. Cell* 4, 521-533.

- Chen L., Willis S. N., Wei A., Smith B. J., Fletcher J. I., Hinds M. G., Colman P. M., Day C. L., Adams J. M. and Huang D. C. (2005) Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol. Cell* 17, 393-403.
- Chen R., Kim O., Yang J., Sato K., Eisenmann K. M., McCarthy J., Chen H. and Qiu Y. (2001) Regulation of Akt/PKB activation by tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 276, 31858-31862.
- Chen R. W., Saunders P. A., Wei H., Li Z., Seth P. and Chuang D. M. (1999) Involvement of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and p53 in neuronal apoptosis: evidence that GAPDH is upregulated by p53. *J. Neurosci.* 19, 9654-9662.
- Chin P. C., Liu L., Morrison B. E., Siddiq A., Ratan R. R., Bottiglieri T. and D'Mello S. R. (2004) The c-Raf inhibitor GW5074 provides neuroprotection in vitro and in an animal model of neurodegeneration through a MEK-ERK and Akt-independent mechanism. *J. Neurochem.* 90, 595-608.
- Choi D. W. (1992) Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol.* 23, 1261-1276.
- Chu C. T., Zhu J. H., Cao G., Signore A., Wang S. and Chen J. (2005) Apoptosis inducing factor mediates caspase-independent 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity in dopaminergic cells. *J. Neurochem.* 94, 1685-1695.
- Chwieralski C. E., Welte T. and Buhling F. (2006) Cathepsin-regulated apoptosis. *Apoptosis.* 11, 143-149.
- Coffey E. T., Smiciene G., Hongisto V., Cao J., Brecht S., Herdegen T. and Courtney M. J. (2002) c-Jun N-terminal protein kinase (JNK) 2/3 is specifically activated by stress, mediating c-Jun activation, in the presence of constitutive JNK1 activity in cerebellar neurons. *J. Neurosci.* 22, 4335-4345.
- Coghlan M. P., Culbert A. A., Cross D. A., Corcoran S. L., Yates J. W., Pearce N. J., Rausch O. L., Murphy G. J., Carter P. S., Roxbee C. L., Mills D., Brown M. J., Haigh D., Ward R. W., Smith D. G., Murray K. J., Reith A. D. and Holder J. C. (2000) Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription. *Chem. Biol.* 7, 793-803.
- Cohen G. M. (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 326 (Pt 1), 1-16.
- Conus N. M., Hannan K. M., Cristiano B. E., Hemmings B. A. and Pearson R. B. (2002) Direct identification of tyrosine 474 as a regulatory phosphorylation site for the Akt protein kinase. *J. Biol. Chem.* 277, 38021-38028.
- Cory S. and Adams J. M. (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer* 2, 647-656.
- Cregan S. P., Dawson V. L. and Slack R. S. (2004) Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene* 23, 2785-2796.

Crompton M. (1999) The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.* 341 (Pt 2), 233-249.

Cross D. A., Culbert A. A., Chalmers K. A., Facci L., Skaper S. D. and Reith A. D. (2001) Selective small-molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity protect primary neurones from death. *J. Neurochem.* 77, 94-102.

Crossthwaite A. J., Valli H. and Williams R. J. (2004) Inhibiting Src family tyrosine kinase activity blocks glutamate signalling to ERK1/2 and Akt/PKB but not JNK in cultured striatal neurones. *J. Neurochem.* 88, 1127-1139.

Cruzalegui F. H., Hardingham G. E. and Bading H. (1999) c-Jun functions as a calcium-regulated transcriptional activator in the absence of JNK/SAPK1 activation. *EMBO J.* 18, 1335-1344.

D'Mello S. R., Anelli R. and Calissano P. (1994) Lithium induces apoptosis in immature cerebellar granule cells but promotes survival of mature neurons. *Exp. Cell Res.* 211, 332-338.

D'Mello S. R., Borodez K. and Soltoff S. P. (1997) Insulin-like growth factor and potassium depolarization maintain neuronal survival by distinct pathways: possible involvement of PI 3-kinase in IGF-1 signaling. *J. Neurosci.* 17, 1548-1560.

D'Mello S. R. and Chin P. C. (2005) Treating neurodegenerative conditions through the understanding of neuronal apoptosis. *Curr. Drug Targets. CNS. Neurol. Disord.* 4, 3-23.

D'Mello S. R., Galli C., Ciotti T. and 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.

Dai F., Yu L., He H., Chen Y., Yu J., Yang Y., Xu Y., Ling W. and Zhao S. (2002) Human serum and glucocorticoid-inducible kinase-like kinase (SGKL) phosphorylates glycogen synthases kinase 3 beta (GSK-3beta) at serine-9 through direct interaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 1191-1196.

Datta S. R., Dudek H., Tao X., Masters S., Fu H., Gotoh Y. and Greenberg M. E. (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241.

Davies S. P., Reddy H., Caivano M. and Cohen P. (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J.* 351, 95-105.

Davis R. J. (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103, 239-252.

de Ruijter A. J., van Gennip A. H., Caron H. N., Kemp S. and van Kuilenburg A. B. (2003) Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem. J.* 370, 737-749.

De R. C., Amodio R., Algeri S., Martelli N., Intilangelo A., D'Ancona G. M. and Esposito E. (2000) Nutritional antioxidants as antidegenerative agents. *Int. J. Dev. Neurosci.* 18, 359-366.

Deak M., Clifton A. D., Lucocq L. M. and Alessi D. R. (1998) Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *EMBO J.* 17, 4426-4441.

Deng C., Zhang P., Harper J. W., Elledge S. J. and Leder P. (1995) Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 82, 675-684.

Derijard B., Hibi M., Wu I. H., Barrett T., Su B., Deng T., Karin M. and Davis R. J. (1994) JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 76, 1025-1037.

Desagher S. and Martinou J. C. (2000) Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* 10, 369-377.

Donovan N., Becker E. B., Konishi Y. and Bonni A. (2002) JNK phosphorylation and activation of BAD couples the stress-activated signaling pathway to the cell death machinery. *J. Biol. Chem.* 277, 40944-40949.

Du K. and Montminy M. (1998) CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J. Biol. Chem.* 273, 32377-32379.

Duan W., Zhang Z., Gash D. M. and Mattson M. P. (1999) Participation of prostate apoptosis response-4 in degeneration of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 46, 587-597.

E dinger A. L. and Thompson C. B. (2004) Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 663-669.

Eilers A., Whitfield J., Babij C., Rubin L. L. and Ham J. (1998) Role of the Jun kinase pathway in the regulation of c-Jun expression and apoptosis in sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 18, 1713-1724.

el-Deiry W. S., Tokino T., Velculescu V. E., Levy D. B., Parsons R., Trent J. M., Lin D., Mercer W. E., Kinzler K. W. and Vogelstein B. (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817-825.

Eldar-Finkelman H. and Ilouz R. (2003) Challenges and opportunities with glycogen synthase kinase-3 inhibitors for insulin resistance and Type 2 diabetes treatment. *Expert. Opin. Investig. Drugs* 12, 1511-1519.

Ellis H. M. and Horvitz H. R. (1986) Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44, 817-829.

Embi N., Rylatt D. B. and Cohen P. (1980) Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur. J. Biochem.* 107, 519-527.

Enguita M., Gregorio-Rocasolano N., Abad A. and Trullas R. (2005) Glycogen synthase kinase 3 activity mediates neuronal pentraxin 1 expression and cell death induced by potassium deprivation in cerebellar granule cells. *Mol. Pharmacol.* 67, 1237-1246.

Ewings K. E., Hadfield-Moorhouse K., Wiggins C. M., Wickenden J. A., Balmanno K., Gilley R., Degenhardt K., White E. and Cook S. J. (2007) ERK1/2-dependent phosphorylation of BimEL promotes its rapid dissociation from Mcl-1 and Bcl-xL. *EMBO J.* 26, 2856-2867.

Fernandez-Capetillo O. and Nussenzweig A. (2004) Linking histone deacetylation with the repair of DNA breaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 1427-1428.

Ferrell J. E., Jr. and Bhatt R. R. (1997) Mechanistic studies of the dual phosphorylation of mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 272, 19008-19016.

Ferrer I., Gomez-Isla T., Puig B., Freixes M., Ribe E., Dalfo E. and Avila J. (2005) Current advances on different kinases involved in tau phosphorylation, and implications in Alzheimer's disease and tauopathies. *Curr. Alzheimer Res.* 2, 3-18.

Ferri K. F. and Kroemer G. (2001) Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat. Cell Biol.* 3, E255-E263.

Fortin A., Maclaurin J. G., Arbour N., Cregan S. P., Kushwaha N., Callaghan S. M., Park D. S., Albert P. R. and Slack R. S. (2004) The proapoptotic gene SIVA is a direct transcriptional target for the tumor suppressors p53 and E2F1. *J. Biol. Chem.* 279, 28706-28714.

Francoz S., Froment P., Bogaerts S., De C. S., Maetens M., Doumont G., Bellefroid E. and Marine J. C. (2006) Mdm4 and Mdm2 cooperate to inhibit p53 activity in proliferating and quiescent cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 3232-3237.

Frebel K. and Wiese S. (2006) Signalling molecules essential for neuronal survival and differentiation. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 1287-1290.

Frodin M., Peraldi P. and Van O. E. (1994) Cyclic AMP activates the mitogen-activated protein kinase cascade in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 269, 6207-6214.

Fuchs S. Y., Adler V., Pincus M. R. and Ronai Z. (1998) MEKK1/JNK signaling stabilizes and activates p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 10541-10546.

Fujita E., Jinbo A., Matuzaki H., Konishi H., Kikkawa U. and Momoi T. (1999) Akt phosphorylation site found in human caspase-9 is absent in mouse caspase-9. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264, 550-555.

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

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

Giovanni A., Wirtz-Brugger F., Keramaris E., Slack R. and Park D. S. (1999) Involvement of cell cycle elements, cyclin-dependent kinases, pRb, and E2F x DP, in B-amyloid-induced neuronal death. *J. Biol. Chem.* 274, 19011-19016.

Goldstein L. S. (2001) Transduction. When worlds collide--trafficking in JNK. *Science* 291, 2102-2103.

Gong X., Tang X., Wiedmann M., Wang X., Peng J., Zheng D., Blair L. A., Marshall J. and Mao Z. (2003) Cdk5-mediated inhibition of the protective effects of transcription factor MEF2 in neurotoxicity-induced apoptosis. *Neuron* 38, 33-46.

Gottlieb E. and Oren M. (1998) p53 facilitates pRb cleavage in IL-3-deprived cells: novel proapoptotic activity of p53. *EMBO J.* 17, 3587-3596.

Gould T. D., Zarate C. A. and Manji H. K. (2004) Glycogen synthase kinase-3: a target for novel bipolar disorder treatments. *J. Clin. Psychiatry* 65, 10-21.

Griffiths G. J., Dubrez L., Morgan C. P., Jones N. A., Whitehouse J., Corfe B. M., Dive C. and Hickman J. A. (1999) Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J. Cell Biol.* 144, 903-914.

Grimes C. A. and Jope R. S. (2001) The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog. Neurobiol.* 65, 391-426.

Grinberg M., Sarig R., Zaltsman Y., Frumkin D., Grammatikakis N., Reuveny E. and Gross A. (2002) tBID Homooligomerizes in the mitochondrial membrane to induce apoptosis. *J. Biol. Chem.* 277, 12237-12245.

Guicciardi M. E., Leist M. and Gores G. J. (2004) Lysosomes in cell death. *Oncogene* 23, 2881-2890.

Guo Q., Fu W., Xie J., Luo H., Sells S. F., Geddes J. W., Bondada V., Rangnekar V. M. and Mattson M. P. (1998) Par-4 is a mediator of neuronal degeneration associated with the pathogenesis of Alzheimer disease. *Nat. Med.* 4, 957-962.

Hai T. and Curran T. (1991) Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 3720-3724.

- Hamdane M., Bretteville A., Sambo A. V., Schindowski K., Begard S., Delacourte A., Bertrand P. and Buee L. (2005) p25/Cdk5-mediated retinoblastoma phosphorylation is an early event in neuronal cell death. *J. Cell Sci.* 118, 1291-1298.
- Han J., Jiang Y., Li Z., Kravchenko V. V. and Ulevitch R. J. (1997) Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. *Nature* 386, 296-299.
- Hansen M. B., Nielsen S. E. and Berg K. (1989) Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods* 119, 203-210.
- Harris C. A. and Johnson E. M., Jr. (2001) BH3-only Bcl-2 family members are coordinately regulated by the JNK pathway and require Bax to induce apoptosis in neurons. *J. Biol. Chem.* 276, 37754-37760.
- Hartigan J. A., Xiong W. C. and Johnson G. V. (2001) Glycogen synthase kinase 3beta is tyrosine phosphorylated by PYK2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284, 485-489.
- Heintz N. (1993) Cell death and the cell cycle: a relationship between transformation and neurodegeneration? *Trends Biochem. Sci.* 18, 157-159.
- Herdegen T. and Waetzig V. (2001) AP-1 proteins in the adult brain: facts and fiction about effectors of neuroprotection and neurodegeneration. *Oncogene* 20, 2424-2437.
- Herrup K., Neve R., Ackerman S. L. and Copani A. (2004) Divide and die: cell cycle events as triggers of nerve cell death. *J. Neurosci.* 24, 9232-9239.
- Hershko T. and Ginsberg D. (2004) Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279, 8627-8634.
- Hetman M., Cavanaugh J. E., Kimelman D. and Xia Z. (2000) Role of glycogen synthase kinase-3beta in neuronal apoptosis induced by trophic withdrawal. *J. Neurosci.* 20, 2567-2574.
- Hiroi T., Wei H., Hough C., Leeds P. and Chuang D. M. (2005) Protracted lithium treatment protects against the ER stress elicited by thapsigargin in rat PC12 cells: roles of intracellular calcium, GRP78 and Bcl-2. *Pharmacogenomics. J.* 5, 102-111.
- Hirumura K., Pippin J. W., Blonski M. J., Roberts J. M. and Shankland S. J. (2002) The subcellular localization of cyclin dependent kinase 2 determines the fate of mesangial cells: role in apoptosis and proliferation. *Oncogene* 21, 1750-1758.
- Hoeflich K. P., Luo J., Rubie E. A., Tsao M. S., Jin O. and Woodgett J. R. (2000) Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature* 406, 86-90.

Hoshi M., Takashima A., Murayama M., Yasutake K., Yoshida N., Ishiguro K., Hoshino T. and Imahori K. (1997) Nontoxic amyloid beta peptide 1-42 suppresses acetylcholine synthesis. Possible role in cholinergic dysfunction in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 272, 2038-2041.

Howitz K. T., Bitterman K. J., Cohen H. Y., Lamming D. W., Lavu S., Wood J. G., Zipkin R. E., Chung P., Kisielewski A., Zhang L. L., Scherer B. and Sinclair D. A. (2003) Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425, 191-196.

Huang D. C. and Strasser A. (2000) BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* 103, 839-842.

Huber M., Helgason C. D., Damen J. E., Scheid M., Duronio V., Liu L., Ware M. D., Humphries R. K. and Krystal G. (1999) The role of SHIP in growth factor induced signalling. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 71, 423-434.

Ishitani R., Kimura M., Sunaga K., Katsube N., Tanaka M. and Chuang D. M. (1996) An antisense oligodeoxynucleotide to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase blocks age-induced apoptosis of mature cerebrocortical neurons in culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 278, 447-454.

Jacks T., Fazeli A., Schmitt E. M., Bronson R. T., Goodell M. A. and Weinberg R. A. (1992) Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature* 359, 295-300.

Janiak F., Leber B. and Andrews D. W. (1994) Assembly of Bcl-2 into microsomal and outer mitochondrial membranes. *J. Biol. Chem.* 269, 9842-9849.

Jeong J., Juhn K., Lee H., Kim S. H., Min B. H., Lee K. M., Cho M. H., Park G. H. and Lee K. H. (2007) SIRT1 promotes DNA repair activity and deacetylation of Ku70. *Exp. Mol. Med.* 39, 8-13.

Jiang X. and Wang X. (2000) Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J. Biol. Chem.* 275, 31199-31203.

Jin K., Mao X. O., Zhu Y. and Greenberg D. A. (2002) MEK and ERK protect hypoxic cortical neurons via phosphorylation of Bad. *J. Neurochem.* 80, 119-125.

Johnson G. V. and Bailey C. D. (2003) The p38 MAP kinase signaling pathway in Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* 183, 263-268.

Jope R. S. and Johnson G. V. (2004) The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem. Sci.* 29, 95-102.

Kaasik A., Rikk T., Piirsoo A., Zharkovsky T. and Zharkovsky A. (2005) Up-regulation of lysosomal cathepsin L and autophagy during neuronal death induced by reduced serum and potassium. *Eur. J. Neurosci.* 22, 1023-1031.

Kagedal K., Zhao M., Svensson I. and Brunk U. T. (2001) Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases. *Biochem. J.* 359, 335-343.

Kaplan D. R. and Miller F. D. (2000) Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 381-391.

Kerr J. F., Wyllie A. H. and Currie A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239-257.

Kim A. H., Khursigara G., Sun X., Franke T. F. and Chao M. V. (2001) Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol. Cell Biol.* 21, 893-901.

Kim A. H., Sasaki T. and Chao M. V. (2003) JNK-interacting protein 1 promotes Akt1 activation. *J. Biol. Chem.* 278, 29830-29836.

Kim A. H., Yano H., Cho H., Meyer D., Monks B., Margolis B., Birnbaum M. J. and Chao M. V. (2002) Akt1 regulates a JNK scaffold during excitotoxic apoptosis. *Neuron* 35, 697-709.

Kim I. J., Lee K. W., Park B. Y., Lee J. K., Park J., Choi I. Y., Eom S. J., Chang T. S., Kim M. J., Yeom Y. I., Chang S. K., Lee Y. D., Choi E. J. and Han P. L. (1999a) Molecular cloning of multiple splicing variants of JIP-1 preferentially expressed in brain. *J. Neurochem.* 72, 1335-1343.

Kim L., Liu J. and Kimmel A. R. (1999b) The novel tyrosine kinase ZAK1 activates GSK3 to direct cell fate specification. *Cell* 99, 399-408.

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

Klein P. S. and Melton D. A. (1996) A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 8455-8459.

Ko L. J. and Prives C. (1996) p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev.* 10, 1054-1072.

Konishi Y., Lehtinen M., Donovan N. and Bonni A. (2002) Cdc2 phosphorylation of BAD links the cell cycle to the cell death machinery. *Mol. Cell* 9, 1005-1016.

Koulich E., Nguyen T., Johnson K., Giardina C. and D'mello S. (2001) NF-kappaB is involved in the survival of cerebellar granule neurons: association of IkappaBbeta [correction of Ikappabeta] phosphorylation with cell survival. *J. Neurochem.* 76, 1188-1198.

Kouzarides T. (2000) Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J.* 19, 1176-1179.

Krantic S., Mechawar N., Reix S. and Quirion R. (2007) Apoptosis-inducing factor: a matter of neuron life and death. *Prog. Neurobiol.* 81, 179-196.

Krantic S., Mechawar N., Reix S. and Quirion R. (2005) Molecular basis of programmed cell death involved in neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 28, 670-676.

Kuan C. Y. and Burke R. E. (2005) Targeting the JNK signaling pathway for stroke and Parkinson's diseases therapy. *Curr. Drug Targets. CNS. Neurol. Disord.* 4, 63-67.

Kuan C. Y., Whitmarsh A. J., Yang D. D., Liao G., Schloemer A. J., Dong C., Bao J., Banasiak K. J., Haddad G. G., Flavell R. A., Davis R. J. and Rakic P. (2003) A critical role of neural-specific JNK3 for ischemic apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 15184-15189.

Kuan C. Y., Yang D. D., Samanta Roy D. R., Davis R. J., Rakic P. and Flavell R. A. (1999) The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron* 22, 667-676.

Kubo T., Nonomura T., Enokido Y. and Hatanaka H. (1995) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) can prevent apoptosis of rat cerebellar granule neurons in culture. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 85, 249-258.

Kudla G., Montessuit S., Eskes R., Berrier C., Martinou J. C., Ghazi A. and Antonsson B. (2000) The destabilization of lipid membranes induced by the C-terminal fragment of caspase 8-cleaved bid is inhibited by the N-terminal fragment. *J. Biol. Chem.* 275, 22713-22718.

Kumar S., Boehm J. and Lee J. C. (2003) p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 717-726.

Kusakawa G., Saito T., Onuki R., Ishiguro K., Kishimoto T. and Hisanaga S. (2000) Calpain-dependent proteolytic cleavage of the p35 cyclin-dependent kinase 5 activator to p25. *J. Biol. Chem.* 275, 17166-17172.

Kuwana T., Bouchier-Hayes L., Chipuk J. E., Bonzon C., Sullivan B. A., Green D. R. and Newmeyer D. D. (2005) BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol. Cell* 17, 525-535.

Lafon-Cazal M., Perez V., Bockaert J. and Marin P. (2002) Akt mediates the anti-apoptotic effect of NMDA but not that induced by potassium depolarization in cultured cerebellar granule cells. *Eur. J. Neurosci.* 16, 575-583.

Lang F. and Cohen P. (2001) Regulation and physiological roles of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase isoforms. *Sci. STKE.* 2001, RE17.

- Le-Niculescu H., Bonfoco E., Kasuya Y., Claret F. X., Green D. R. and Karin M. (1999) Withdrawal of survival factors results in activation of the JNK pathway in neuronal cells leading to Fas ligand induction and cell death. *Mol. Cell Biol.* 19, 751-763.
- Lee K. Y., Koh S. H., Noh M. Y., Park K. W., Lee Y. J. and Kim S. H. (2007) Glycogen synthase kinase-3beta activity plays very important roles in determining the fate of oxidative stress-inflicted neuronal cells. *Brain Res.* 1129, 89-99.
- Lee M. S., Kwon Y. T., Li M., Peng J., Friedlander R. M. and Tsai L. H. (2000) Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature* 405, 360-364.
- Leever S. J., Vanhaesebroeck B. and Waterfield M. D. (1999) Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 219-225.
- Lei K. and Davis R. J. (2003) JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 2432-2437.
- Leist M. and Jaattela M. (2001) Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 589-598.
- Leong M. L., Maiyar A. C., Kim B., O'Keeffe B. A. and Firestone G. L. (2003) Expression of the serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase, Sgk, is a cell survival response to multiple types of environmental stress stimuli in mammary epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 278, 5871-5882.
- Levi-Montalcini R. (1987) The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237, 1154-1162.
- Levine A. J. (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-331.
- Li B. S., Ma W., Jaffe H., Zheng Y., Takahashi S., Zhang L., Kulkarni A. B. and Pant H. C. (2003) Cyclin-dependent kinase-5 is involved in neuregulin-dependent activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Akt activity mediating neuronal survival. *J. Biol. Chem.* 278, 35702-35709.
- Li B. S., Zhang L., Takahashi S., Ma W., Jaffe H., Kulkarni A. B. and Pant H. C. (2002a) Cyclin-dependent kinase 5 prevents neuronal apoptosis by negative regulation of c-Jun N-terminal kinase 3. *EMBO J.* 21, 324-333.
- Li L. Y., Luo X. and Wang X. (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412, 95-99.
- Li S., Zhao Y., He X., Kim T. H., Kuharsky D. K., Rabinowich H., Chen J., Du C. and Yin X. M. (2002b) Relief of extrinsic pathway inhibition by the Bid-dependent mitochondrial release of Smac in Fas-mediated hepatocyte apoptosis. *J. Biol. Chem.* 277, 26912-26920.
- Li W., Yuan X., Nordgren G., Dalen H., Dubowchik G. M., Firestone R. A. and Brunk U. T. (2000) Induction of cell death by the lysosomotropic detergent MSDH. *FEBS Lett.* 470, 35-39.

Li X., Bijur G. N. and Jope R. S. (2002c) Glycogen synthase kinase-3beta, mood stabilizers, and neuroprotection. *Bipolar. Disord.* 4, 137-144.

Lin S. J., Defossez P. A. and Guarente L. (2000) Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 289, 2126-2128.

Linseman D. A., Butts B. D., Precht T. A., Phelps R. A., Le S. S., Laessig T. A., Bouchard R. J., Florez-McClure M. L. and Heidenreich K. A. (2004) Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylates Bax and promotes its mitochondrial localization during neuronal apoptosis. *J. Neurosci.* 24, 9993-10002.

Linseman D. A., Phelps R. A., Bouchard R. J., Le S. S., Laessig T. A., McClure M. L. and Heidenreich K. A. (2002) Insulin-like growth factor-I blocks Bcl-2 interacting mediator of cell death (Bim) induction and intrinsic death signaling in cerebellar granule neurons. *J. Neurosci.* 22, 9287-9297.

Litovchick L., Chestukhin A. and DeCaprio J. A. (2004) Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates RBL2/p130 during quiescence. *Mol. Cell Biol.* 24, 8970-8980.

Liu D. X. and Greene L. A. (2001) Regulation of neuronal survival and death by E2F-dependent gene repression and derepression. *Neuron* 32, 425-438.

Liu J., Yao F., Wu R., Morgan M., Thorburn A., Finley R. L., Jr. and Chen Y. Q. (2002) Mediation of the DCC apoptotic signal by DIP13 alpha. *J. Biol. Chem.* 277, 26281-26285.

Llambi F., Causeret F., Bloch-Gallego E. and Mehlen P. (2001) Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. *EMBO J.* 20, 2715-2722.

Lohrum M. A. and Vousden K. H. (2000) Regulation and function of the p53-related proteins: same family, different rules. *Trends Cell Biol.* 10, 197-202.

Lonze B. E. and Ginty D. D. (2002) Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35, 605-623.

Lozano G. and Zambetti G. P. (2005) What have animal models taught us about the p53 pathway? *J. Pathol.* 205, 206-220.

Luo J., Nikolaev A. Y., Imai S., Chen D., Su F., Shiloh A., Guarente L. and Gu W. (2001) Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* 107, 137-148.

Madesh M., Antonsson B., Srinivasula S. M., Alnemri E. S. and Hajnoczky G. (2002) Rapid kinetics of tBid-induced cytochrome c and Smac/DIABLO release and mitochondrial depolarization. *J. Biol. Chem.* 277, 5651-5659.

- Maira S. M., Galefic I., Brazil D. P., Kaech S., Ingley E., Thelen M. and Hemmings B. A. (2001) Carboxyl-terminal modulator protein (CTMP), a negative regulator of PKB/Akt and v-Akt at the plasma membrane. *Science* 294, 374-380.
- Manning A. M. and Davis R. J. (2003) Targeting JNK for therapeutic benefit: from junk to gold? *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 554-565.
- Manoukian A. S. and Woodgett J. R. (2002) Role of glycogen synthase kinase-3 in cancer: regulation by Wnts and other signaling pathways. *Adv. Cancer Res.* 84, 203-229.
- Mao Z., Bonni A., Xia F., Nadal-Vicens M. and Greenberg M. E. (1999) Neuronal activity-dependent cell survival mediated by transcription factor MEF2. *Science* 286, 785-790.
- Marin N., Romero B., Bosch-Morell F., Llansola M., Felipo V., Roma J. and Romero F. J. (2000) Beta-amyloid-induced activation of caspase-3 in primary cultures of rat neurons. *Mech. Ageing Dev.* 119, 63-67.
- Marzo I., Brenner C., Zamzami N., Susin S. A., Beutner G., Brdiczka D., Remy R., Xie Z. H., Reed J. C. and Kroemer G. (1998) The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J. Exp. Med.* 187, 1261-1271.
- Mathiasen I. S., Sergeev I. N., Bastholm L., Elling F., Norman A. W. and Jaattela M. (2002) Calcium and calpain as key mediators of apoptosis-like death induced by vitamin D compounds in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 277, 30738-30745.
- Matsuda S., Yasukawa T., Homma Y., Ito Y., Niikura T., Hiraki T., Hirai S., Ohno S., Kita Y., Kawasumi M., Kouyama K., Yamamoto T., Kyriakis J. M. and Nishimoto I. (2001) c-Jun N-terminal kinase (JNK)-interacting protein-1b/Islet-1 brain-1 scaffolds Alzheimer's amyloid precursor protein with JNK. *J. Neurosci.* 21, 6597-6607.
- Mattson M. P. and Magnus T. (2006) Ageing and neuronal vulnerability. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 278-294.
- McDonald P. H. and Lefkowitz R. J. (2001) Beta-Arrestins: new roles in regulating heptahelical receptors' functions. *Cell Signal.* 13, 683-689.
- McLaughlin M. M., Kumar S., McDonnell P. C., Van H. S., Lee J. C., Livi G. P. and Young P. R. (1996) Identification of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-3, a novel substrate of CSBP p38 MAP kinase. *J. Biol. Chem.* 271, 8488-8492.
- McManus E. J., Sakamoto K., Armit L. J., Ronaldson L., Shpiro N., Marquez R. and Alessi D. R. (2005) Role that phosphorylation of GSK3 plays in insulin and Wnt signalling defined by knockin analysis. *EMBO J.* 24, 1571-1583.

- Meijer L., Flajolet M. and Greengard P. (2004) Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3. *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 471-480.
- Mielke K. and Herdegen T. (2000) JNK and p38 stresskinases--degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 61, 45-60.
- Miller T. M. and Johnson E. M., Jr. (1996) Metabolic and genetic analyses of apoptosis in potassium/serum-deprived rat cerebellar granule cells. *J. Neurosci.* 16, 7487-7495.
- Miller T. M., Moulder K. L., Knudson C. M., Creedon D. J., Deshmukh M., Korsmeyer S. J. and Johnson E. M., Jr. (1997) Bax deletion further orders the cell death pathway in cerebellar granule cells and suggests a caspase-independent pathway to cell death. *J. Cell Biol.* 139, 205-217.
- Miyashita T., Harigai M., Hanada M. and Reed J. C. (1994) Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Res.* 54, 3131-3135.
- Mohrmann L. and Verrijzer C. P. (2005) Composition and functional specificity of SWI2/SNF2 class chromatin remodeling complexes. *Biochim. Biophys. Acta* 1681, 59-73.
- Moll U. M., Marchenko N. and Zhang X. K. (2006) p53 and Nur77/. *Oncogene* 25, 4725-4743.
- Montminy M. (1997) Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 807-822.
- Mora A., Sabio G., Gonzalez-Polo R. A., Cuenda A., Alessi D. R., Alonso J. C., Fuentes J. M., Soler G. and Centeno F. (2001) Lithium inhibits caspase 3 activation and dephosphorylation of PKB and GSK3 induced by K⁺ deprivation in cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* 78, 199-206.
- Mora A., Sabio G., Risco A. M., Cuenda A., Alonso J. C., Soler G. and Centeno F. (2002) Lithium blocks the PKB and GSK3 dephosphorylation induced by ceramide through protein phosphatase-2A. *Cell Signal.* 14, 557-562.
- Mori T., Wang X., Aoki T. and Lo E. H. (2002) Downregulation of matrix metalloproteinase-9 and attenuation of edema via inhibition of ERK mitogen activated protein kinase in traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 19, 1411-1419.
- Morishima N., Nakanishi K., Tsuchiya K., Shibata T. and Seiwa E. (2004) Translocation of Bim to the endoplasmic reticulum (ER) mediates ER stress signaling for activation of caspase-12 during ER stress-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279, 50375-50381.
- Morrison R. S., Kinoshita Y., Johnson M. D., Guo W. and Garden G. A. (2003) p53-dependent cell death signaling in neurons. *Neurochem. Res.* 28, 15-27.
- Mundle S. D. (2006) Par-4: a common facilitator/enhancer of extrinsic and intrinsic pathways of apoptosis. *Leuk. Res.* 30, 515-517.
- Mundle S. D. and Saberwal G. (2003) Evolving intricacies and implications of E2F1 regulation. *FASEB J.* 17, 569-574.

Nagy Z., Esiri M. M. and Smith A. D. (1997) Expression of cell division markers in the hippocampus in Alzheimer's disease and other neurodegenerative conditions. *Acta Neuropathol.* 93, 294-300.

Nahle Z., Polakoff J., Davuluri R. V., McCurrach M. E., Jacobson M. D., Narita M., Zhang M. Q., Lazebnik Y., Bar-Sagi D. and Lowe S. W. (2002) Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F. *Nat. Cell Biol.* 4, 859-864.

Nath R., Raser K. J., Stafford D., Hajimohammadreza I., Posner A., Allen H., Talanian R. V., Yuen P., Gilbertsen R. B. and Wang K. K. (1996) Non-erythroid alpha-spectrin breakdown by calpain and interleukin 1 beta-converting-enzyme-like protease(s) in apoptotic cells: contributory roles of both protease families in neuronal apoptosis. *Biochem. J.* 319 (Pt 3), 683-690.

Nehlig A., Daval J. L. and Debry G. (1992) Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 17, 139-170.

New L., Jiang Y., Zhao M., Liu K., Zhu W., Flood L. J., Kato Y., Parry G. C. and Han J. (1998) PRAK, a novel protein kinase regulated by the p38 MAP kinase. *EMBO J.* 17, 3372-3384.

Nguyen M. D., Lariviere R. C. and Julien J. P. (2001) Deregulation of Cdk5 in a mouse model of ALS: toxicity alleviated by perikaryal neurofilament inclusions. *Neuron* 30, 135-147.

Nguyen M. D., Mushynski W. E. and Julien J. P. (2002) Cycling at the interface between neurodevelopment and neurodegeneration. *Cell Death. Differ.* 9, 1294-1306.

Ni H., Wang X. S., Diener K. and Yao Z. (1998) MAPKAPK5, a novel mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase, is a substrate of the extracellular-regulated kinase (ERK) and p38 kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243, 492-496.

Noguchi K., Kitanaka C., Yamana H., Kokubu A., Mochizuki T. and Kuchino Y. (1999) Regulation of c-Myc through phosphorylation at Ser-62 and Ser-71 by c-Jun N-terminal kinase. *J. Biol. Chem.* 274, 32580-32587.

Nonaka S. and Chuang D. M. (1998) Neuroprotective effects of chronic lithium on focal cerebral ischemia in rats. *Neuroreport* 9, 2081-2084.

North B. J. and Verdin E. (2004) Sirtuins: Sir2-related NAD-dependent protein deacetylases. *Genome Biol.* 5, 224.

Nylandsted J., Wick W., Hirt U. A., Brand K., Rohde M., Leist M., Weller M. and Jaattela M. (2002) Eradication of glioblastoma, and breast and colon carcinoma xenografts by Hsp70 depletion. *Cancer Res.* 62, 7139-7142.

Oppenheimer R. W. (1991) Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 14, 453-501.

Othth C., Mendoza-Naranjo A., Mujica L., Zambrano A., Concha I. I. and Maccioni R. B. (2003) Modulation of the JNK and p38 pathways by cdk5 protein kinase in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroreport* 14, 2403-2409.

Padmanabhan J., Park D. S., Greene L. A. and Shelanski M. L. (1999) Role of cell cycle regulatory proteins in cerebellar granule neuron apoptosis. *J. Neurosci.* 19, 8747-8756.

Pap M. and Cooper G. M. (1998) Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway. *J. Biol. Chem.* 273, 19929-19932.

Park D. S., Levine B., Ferrari G. and Greene L. A. (1997) Cyclin dependent kinase inhibitors and dominant negative cyclin dependent kinase 4 and 6 promote survival of NGF-deprived sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 17, 8975-8983.

Park D. S., Morris E. J., Padmanabhan J., Shelanski M. L., Geller H. M. and Greene L. A. (1998) Cyclin-dependent kinases participate in death of neurons evoked by DNA-damaging agents. *J. Cell Biol.* 143, 457-467.

Park J., Leong M. L., Buse P., Maiyar A. C., Firestone G. L. and Hemmings B. A. (1999) Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI 3-kinase-stimulated signaling pathway. *EMBO J.* 18, 3024-3033.

Parone P. A., James D. and Martinou J. C. (2002) Mitochondria: regulating the inevitable. *Biochimie* 84, 105-111.

Patrick G. N., Zukerberg L., Nikolic M., de la M. S., Dikkes P. and Tsai L. H. (1999) Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* 402, 615-622.

Patzke H. and Tsai L. H. (2002) Calpain-mediated cleavage of the cyclin-dependent kinase-5 activator p39 to p29. *J. Biol. Chem.* 277, 8054-8060.

Pearson H., Graham M. E. and Burgoyne R. D. (1992) Relationship Between Intracellular Free Calcium Concentration and NMDA-induced Cerebellar Granule Cell Survival In Vitro. *Eur. J. Neurosci.* 4, 1369-1375.

Penaloza C., Lin L., Lockshin R. A. and Zakeri Z. (2006) Cell death in development: shaping the embryo. *Histochem. Cell Biol.* 126, 149-158.

Petros A. M., Medek A., Nettlesheim D. G., Kim D. H., Yoon H. S., Swift K., Matayoshi E. D., Oltersdorf T. and Fesik S. W. (2001) Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 3012-3017.

- Pevny L. and Rao M. S. (2003) The stem-cell menagerie. *Trends Neurosci.* 26, 351-359.
- Piel C. J., Wilson C. A., Lee V. M. and Klein P. S. (2003) GSK-3 α regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature* 423, 435-439.
- Phillips A. C., Ernst M. K., Bates S., Rice N. R. and Vousden K. H. (1999) E2F-1 potentiates cell death by blocking antiapoptotic signaling pathways. *Mol. Cell* 4, 771-781.
- Porter A. G. and Dhakshinamoorthy S. (2004) Apoptosis initiated by dependence receptors: a new paradigm for cell death? *Bioessays* 26, 656-664.
- Porter A. G. and Janicke R. U. (1999) Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death. Differ.* 6, 99-104.
- Porter A. G. and Urbano A. G. (2006) Does apoptosis-inducing factor (AIF) have both life and death functions in cells? *Bioessays* 28, 834-843.
- Prunell G. F. and Troy C. M. (2004) Balancing neuronal death. *J. Neurosci. Res.* 78, 1-6.
- Putcha G. V., Moulder K. L., Golden J. P., Bouillet P., Adams J. A., Strasser A. and Johnson E. M. (2001) Induction of BIM, a proapoptotic BH3-only BCL-2 family member, is critical for neuronal apoptosis. *Neuron* 29, 615-628.
- R**aingaud J., Gupta S., Rogers J. S., Dickens M., Han J., Ulevitch R. J. and Davis R. J. (1995) Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J. Biol. Chem.* 270, 7420-7426.
- Rao H. V., Thirumangalakudi L., Desmond P. and Grammas P. (2007) Cyclin D1, cdk4, and Bim are involved in thrombin-induced apoptosis in cultured cortical neurons. *J. Neurochem.* 101, 498-505.
- Ravagnan L., Gurbuxani S., Susin S. A., Maise C., Daugas E., Zamzami N., Mak T., Jaattela M., Penninger J. M., Garrido C. and Kroemer G. (2001) Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat. Cell Biol.* 3, 839-843.
- Reichardt L. F. (2006) Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 361, 1545-1564.
- Reynolds C. H., Nebreda A. R., Gibb G. M., Utton M. A. and Anderton B. H. (1997) Reactivating kinase/p38 phosphorylates tau protein in vitro. *J. Neurochem.* 69, 191-198.
- Roberts L. R., Kurosawa H., Bronk S. F., Fesmier P. J., Agellon L. B., Leung W. Y., Mao F. and Gores G. J. (1997) Cathepsin B contributes to bile salt-induced apoptosis of rat hepatocytes. *Gastroenterology* 113, 1714-1726.

Romashkova J. A. and Makarov S. S. (1999) NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* 401, 86-90.

Rudolph J. (2007) Cdc25 phosphatases: structure, specificity, and mechanism. *Biochemistry* 46, 3595-3604.

Ryder E. F. and Cepko C. L. (1994) Migration patterns of clonally related granule cells and their progenitors in the developing chick cerebellum. *Neuron* 12, 1011-1028.

Saelens X., Festjens N., Vande W. L., van G. M., van L. G. and Vandenabeele P. (2004) Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23, 2861-2874.

Sarbassov D. D., Guertin D. A., Ali S. M. and Sabatini D. M. (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098-1101.

Sastry P. S. and Rao K. S. (2000) Apoptosis and the nervous system. *J. Neurochem.* 74, 1-20.

Schaeffer H. J. and Weber M. J. (1999) Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol. Cell Biol.* 19, 2435-2444.

Schafer M., Goodenough S., Moosmann B. and Behl C. (2004) Inhibition of glycogen synthase kinase 3 beta is involved in the resistance to oxidative stress in neuronal HT22 cells. *Brain Res.* 1005, 84-89.

Schendel S. L., Azimov R., Pawlowski K., Godzik A., Kagan B. L. and Reed J. C. (1999) Ion channel activity of the BH3 only Bcl-2 family member, BID. *J. Biol. Chem.* 274, 21932-21936.

Schendel S. L., Montal M. and Reed J. C. (1998) Bcl-2 family proteins as ion-channels. *Cell Death Differ.* 5, 372-380.

Schulz J. B., Weller M. and Klockgether T. (1996) Potassium deprivation-induced apoptosis of cerebellar granule neurons: a sequential requirement for new mRNA and protein synthesis, ICE-like protease activity, and reactive oxygen species. *J. Neurosci.* 16, 4696-4706.

Scorrano L., Oakes S. A., Opferman J. T., Cheng E. H., Sorcinelli M. D., Pozzan T. and Korsmeyer S. J. (2003) BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science* 300, 135-139.

Sells S. F., Wood D. P., Jr., Joshi-Barve S. S., Muthukumar S., Jacob R. J., Crist S. A., Humphreys S. and Rangnekar V. M. (1994) Commonality of the gene programs induced by effectors of apoptosis in androgen-dependent and -independent prostate cells. *Cell Growth Differ.* 5, 457-466.

- Shao L., Cui J., Young L. T. and Wang J. F. (2008) The effect of mood stabilizer lithium on expression and activity of glutathione s-transferase isoenzymes. *Neuroscience* 151, 518-524.
- Shao L., Young L. T. and Wang J. F. (2005) Chronic treatment with mood stabilizers lithium and valproate prevents excitotoxicity by inhibiting oxidative stress in rat cerebral cortical cells. *Biol. Psychiatry* 58, 879-884.
- Sherr C. J. and Weber J. D. (2000) The ARF/p53 pathway. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 94-99.
- Shibue T. and Taniguchi T. (2006) BH3-only proteins: integrated control point of apoptosis. *Int. J. Cancer* 119, 2036-2043.
- Shimizu S., Narita M. and Tsujimoto Y. (1999) Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399, 483-487.
- Shimoke K., Yamagishi S., Yamada M., Ikeuchi T. and Hatanaka H. (1999) Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity elevates c-Jun N-terminal kinase activity in apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 112, 245-253.
- Shiozaki E. N., Chai J., Rigotti D. J., Riedl S. J., Li P., Srinivasula S. M., Alnemri E. S., Fairman R. and Shi Y. (2003) Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol. Cell* 11, 519-527.
- Simpson L. and Parsons R. (2001) PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp. Cell Res.* 264, 29-41.
- Sirover M. A. (1999) New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* 1432, 159-184.
- Sjolander A., Yamamoto K., Huber B. E. and Lapetina E. G. (1991) Association of p21ras with phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 7908-7912.
- Slagsvold H. H., Rosseland C. M., Jacobs C., Khuong E., Kristoffersen N., Gaarder M., Fallgren A. B., Huitfeldt H. S. and 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.
- Smith D. S., Greer P. L. and Tsai L. H. (2001) Cdk5 on the brain. *Cell Growth Differ.* 12, 277-283.
- Stanciu M. and DeFranco D. B. (2002) Prolonged nuclear retention of activated extracellular signal-regulated protein kinase promotes cell death generated by oxidative toxicity or proteasome inhibition in a neuronal cell line. *J. Biol. Chem.* 277, 4010-4017.
- Stanciu M., Wang Y., Kentor R., Burke N., Watkins S., Kress G., Reynolds I., Klann E., Angiolieri M. R., Johnson J. W. and DeFranco D. B. (2000) Persistent activation of ERK contributes to glutamate-induced oxidative toxicity in a neuronal cell line and primary cortical neuron cultures. *J. Biol. Chem.* 275, 12200-12206.

Subramaniam S., Zirrgiebel U., von Bohlen Und H. O., Strelau J., Laliberte C., Kaplan D. R. and Unsicker K. (2004) ERK activation promotes neuronal degeneration predominantly through plasma membrane damage and independently of caspase-3. *J. Cell Biol.* 165, 357-369.

Sunayama J., Tsuruta F., Masuyama N. and Gotoh Y. (2005) JNK antagonizes Akt-mediated survival signals by phosphorylating 14-3-3. *J. Cell Biol.* 170, 295-304.

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. and Kroemer G. (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-446.

Sutherland C., Leighton I. A. and Cohen P. (1993) Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochem. J.* 296 (Pt 1), 15-19.

Suzuki Y., Imai Y., Nakayama H., Takahashi K., Takio K. and Takahashi R. (2001) A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol. Cell* 8, 613-621.

Takeda K. and Ichijo H. (2002) Neuronal p38 MAPK signalling: an emerging regulator of cell fate and function in the nervous system. *Genes Cells* 7, 1099-1111.

Tan Y., Rouse J., Zhang A., Cariati S., Cohen P. and Comb M. J. (1996) FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2. *EMBO J.* 15, 4629-4642.

Tatton W. G., Chalmers-Redman R. M., Elstner M., Leesch W., Jagodzinski F. B., Stupak D. P., Sugrue M. M. and Tatton N. A. (2000) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in neurodegeneration and apoptosis signaling. *J. Neural Transm. Suppl* 77-100.

Taylor W. R. and Stark G. R. (2001) Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 20, 1803-1815.

Thangnipon W., Kingsbury A., Webb M. and Balazs R. (1983) Observations on rat cerebellar cells in vitro: influence of substratum, potassium concentration and relationship between neurones and astrocytes. *Brain Res.* 313, 177-189.

Thomas M. and Le W. D. (2004) Minocycline: neuroprotective mechanisms in Parkinson's disease. *Curr. Pharm. Des* 10, 679-686.

Trinh E., Boutillier A. L. and Loeffler J. P. (2001) Regulation of the retinoblastoma-dependent Mdm2 and E2F-1 signaling pathways during neuronal apoptosis. *Mol. Cell Neurosci.* 17, 342-353.

Turrens J. F. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol* 552, 335-344.

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T., Mazur M. and Telser J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44-84.

Van Etten R. A. (1999) Cycling, stressed-out and nervous: cellular functions of c-Abl. *Trends Cell Biol.* 9, 179-186.

Vander Heiden M. G., Chandel N. S., Schumacker P. T. and Thompson C. B. (1999) Bcl-xL prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange. *Mol. Cell* 3, 159-167.

Vander Heiden M. G., Chandel N. S., Williamson E. K., Schumacker P. T. and Thompson C. B. (1997) Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* 91, 627-637.

Vaziri H., Dessain S. K., Ng E. E., Imai S. I., Frye R. A., Pandita T. K., Guarente L. and Weinberg R. A. (2001) hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* 107, 149-159.

Verdaguer E., Alvira D., Jimenez A., Rimbau V., Camins A. and Pallas 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.

Verdaguer E., Garcia-Jorda E., Canudas A. M., Dominguez E., Jimenez A., Pubill D., Escubedo E., Pallas J. C. and Camins A. (2002a) Kainic acid-induced apoptosis in cerebellar granule neurons: an attempt at cell cycle re-entry. *Neuroreport* 13, 413-416.

Verdaguer E., Garcia-Jorda E., Jimenez A., Stranges A., Sureda F. X., Canudas A. M., Escubedo E., Camarasa J., Pallas M. and Camins A. (2002b) Kainic acid-induced neuronal cell death in cerebellar granule cells is not prevented by caspase inhibitors. *Br. J. Pharmacol.* 135, 1297-1307.

Vorburger S. A., Pataer A., Yoshida K., Liu Y., Lu X., Swisher S. G. and Hunt K. K. (2003) The mitochondrial apoptosis-inducing factor plays a role in E2F-1-induced apoptosis in human colon cancer cells. *Ann. Surg. Oncol.* 10, 314-322.

Waetzig V. and Herdegen T. (2003) A single c-Jun N-terminal kinase isoform (JNK3-p54) is an effector in both neuronal differentiation and cell death. *J. Biol. Chem.* 278, 567-572.

Wallace D. C. (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283, 1482-1488.

Wang C., Chen L., Hou X., Li Z., Kabra N., Ma Y., Nemoto S., Finkel T., Gu W., Cress W. D. and Chen J. (2006a) Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage. *Nat. Cell Biol.* 8, 1025-1031.

Wang C. H., Tsao Y. P., Chen H. J., Chen H. L., Wang H. W. and Chen S. L. (2000) Transcriptional repression of p21((Waf1/Cip1/Sdi1)) gene by c-jun through Sp1 site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270, 303-310.

Wang C. X., Song J. H., Song D. K., Yong V. W., Shuaib A. and Hao C. (2006b) Cyclin-dependent kinase-5 prevents neuronal apoptosis through ERK-mediated upregulation of Bcl-2. *Cell Death. Differ.* 13, 1203-1212.

Wang K. K. (2000) Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci.* 23, 20-26.

Wang L. H., Paden A. J. and Johnson E. M., Jr. (2005) Mixed-lineage kinase inhibitors require the activation of Trk receptors to maintain long-term neuronal trophism and survival. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 312, 1007-1019.

Wartiovaara K., Barnabe-Heider F., Miller F. D. and Kaplan D. R. (2002) N-myc promotes survival and induces S-phase entry of postmitotic sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 22, 815-824.

Waskiewicz A. J., Flynn A., Proud C. G. and Cooper J. A. (1997) Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO J.* 16, 1909-1920.

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

Webster G. A. and Perkins N. D. (1999) Transcriptional cross talk between NF-kappaB and p53. *Mol. Cell Biol.* 19, 3485-3495.

Wei H., Leeds P. R., Qian Y., Wei W., Chen R. and Chuang D. (2000) beta-amyloid peptide-induced death of PC 12 cells and cerebellar granule cell neurons is inhibited by long-term lithium treatment. *Eur. J. Pharmacol.* 392, 117-123.

Wei M. C., Zong W. X., Cheng E. H., Lindsten T., Panoutsakopoulou V., Ross A. J., Roth K. A., MacGregor G. R., Thompson C. B. and Korsmeyer S. J. (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292, 727-730.

Weissman B. and Aaronson S. A. (1985) Members of the src and ras oncogene families supplant the epidermal growth factor requirement of BALB/MK-2 keratinocytes and induce distinct alterations in their terminal differentiation program. *Mol. Cell Biol.* 5, 3386-3396.

West A. E., Chen W. G., Dalva M. B., Dolmetsch R. E., Kornhauser J. M., Shaywitz A. J., Takasu M. A., Tao X. and Greenberg M. E. (2001) Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 11024-11031.

Weston C. R. and Davis R. J. (2002) The JNK signal transduction pathway. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 14-21.

Whitmarsh A. J., Yang S. H., Su M. S., Sharrocks A. D. and Davis R. J. (1997) Role of p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in the activation of ternary complex factors. *Mol. Cell Biol.* 17, 2360-2371.

Wigdal S. S., Kirkland R. A., Franklin J. L. and Haak-Frendscho M. (2002) Cytochrome c release precedes mitochondrial membrane potential loss in cerebellar granule neuron apoptosis: lack of mitochondrial swelling. *J. Neurochem.* 82, 1029-1038.

Williams R. W. and Herrup K. (1988) The control of neuron number. *Annu. Rev. Neurosci.* 11, 423-453.

Wisdom R., Johnson R. S. and Moore C. (1999) c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. *EMBO J.* 18, 188-197.

Wood K. A., Dipasquale B. and 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, 621-632.

Woodgett J. R. (1990) Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO J.* 9, 2431-2438.

Wu Y., Mehew J. W., Heckman C. A., Arcinas M. and Boxer L. M. (2001) Negative regulation of bcl-2 expression by p53 in hematopoietic cells. *Oncogene* 20, 240-251.

Xifro X., Malagelada C., Minano A. and Rodriguez-Alvarez J. (2005) Brief exposure to NMDA produces long-term protection of cerebellar granule cells from apoptosis. *Eur. J. Neurosci.* 21, 827-840.

Xing J., Ginty D. D. and Greenberg M. E. (1996) Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science* 273, 959-963.

Yamagishi S., Yamada M., Ishikawa Y., Matsumoto T., Ikeuchi T. and Hatanaka H. (2001) p38 mitogen-activated protein kinase regulates low potassium-induced c-Jun phosphorylation and apoptosis in cultured cerebellar granule neurons. *J. Biol. Chem.* 276, 5129-5133.

Yamamoto H., Schoonjans K. and Auwerx J. (2007) Sirtuin functions in health and disease. *Mol. Endocrinol.* 21, 1745-1755.

Yamashima T., Kohda Y., Tsuchiya K., Ueno T., Yamashita J., Yoshioka T. and Kominami E. (1998) Inhibition of ischaemic hippocampal neuronal death in primates with cathepsin B inhibitor CA-074: a novel strategy for neuroprotection based on 'calpain-cathepsin hypothesis'. *Eur. J. Neurosci.* 10, 1723-1733.

Yang D. D., Kuan C. Y., Whitmarsh A. J., Rincon M., Zheng T. S., Davis R. J., Rakic P. and Flavell R. A. (1997) Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature* 389, 865-870.

Yang Q. H., Church-Hajduk R., Ren J., Newton M. L. and Du C. (2003) Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis. *Genes Dev.* 17, 1487-1496.

Ye H., Cande C., Stephanou N. C., Jiang S., Gurbuxani S., Larochette N., Daugas E., Garrido C., Kroemer G. and Wu H. (2002) DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat. Struct. Biol.* 9, 680-684.

Yoshikawa K. (2000) Cell cycle regulators in neural stem cells and postmitotic neurons. *Neurosci. Res.* 37, 1-14.

Yu S. W., Wang H., Poitras M. F., Coombs C., Bowers W. J., Federoff H. J., Poirier G. G., Dawson T. M. and Dawson V. L. (2002) Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 297, 259-263.

Zhang B. H., Tang E. D., Zhu T., Greenberg M. E., Vojtek A. B. and Guan K. L. (2001) Serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK phosphorylates and negatively regulates B-Raf. *J. Biol. Chem.* 276, 31620-31626.

Zhang Q. G., Wu D. N., Han D. and Zhang G. Y. (2007) Critical role of PTEN in the coupling between PI3K/Akt and JNK1/2 signaling in ischemic brain injury. *FEBS Lett.* 581, 495-505.

Zhao M., Antunes F., Eaton J. W. and Brunk U. T. (2003) Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis. *Eur. J. Biochem.* 270, 3778-3786.

Zhao M., Brunk U. T. and Eaton J. W. (2001) Delayed oxidant-induced cell death involves activation of phospholipase A2. *FEBS Lett.* 509, 399-404.

Zheng M., Leung C. L. and Liem R. K. (1998) Region-specific expression of cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) and its activators, p35 and p39, in the developing and adult rat central nervous system. *J. Neurobiol.* 35, 141-159.

Zhu D., Lipsky R. H. and Marini A. M. (2002) Co-activation of the phosphatidylinositol-3-kinase/Akt signaling pathway by N-methyl-D-aspartate and TrkB receptors in cerebellar granule cell neurons. *Amino. Acids* 23, 11-17.

Zong W. X., Lindsten T., Ross A. J., MacGregor G. R. and Thompson C. B. (2001) BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev.* 15, 1481-1486.

Zukerberg L. R., Patrick G. N., Nikolic M., Humbert S., Wu C. L., Lanier L. M., Gertler F. B., Vidal M., Van Etten R. A. and Tsai L. H. (2000) Cables links Cdk5 and c-Abl and facilitates Cdk5 tyrosine phosphorylation, kinase upregulation, and neurite outgrowth. *Neuron* 26, 633-646.

Annex

**DNA LOW-DENSITY ARRAY ANALYSIS OF COLCHICINE
NEUROTOXICITY IN RAT CEREBELLAR GRANULAR
NEURONS**

Marc Yeste-Velasco, Daniel Alvira, Francesc X. Sureda, Víctor Rimbau, Anna Forsby, Mercè Pallàs, Antoni Camins, Jaume Folch

NeuroToxicology (2008) 29: 309-317

DNA low-density array analysis of colchicine neurotoxicity in rat cerebellar granular neurons

Marc Yeste-Velasco^{a,c}, Daniel Alvira^{a,c}, Francesc X. Sureda^d, Victor Rimbau^{a,c},
Anna Forsby^e, Mercè Pallàs^{a,c,*}, Antoni Camins^{a,c}, Jaume Folch^b

^a *Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona,
Nucli Universitari de Pedralbes, 08028 Barcelona, Spain*

^b *Grup de Farmacobiologia, Unitat de Bioquímica, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut,
Universitat Rovira i Virgili, C./St. Llorenç 21 43201 Reus Tarragona, Spain*

^c *Institut de Biomedicina (IBUB), Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Nucli Universitari de Pedralbes, 08028 Barcelona, Spain*

^d *Unitat de Farmacologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, C./St. Llorenç 21 43201 Reus Tarragona, Spain*

^e *Department of Neurochemistry, The Arrhenius Laboratories for Natural Sciences, Stockholm University, Sweden*

Received 12 June 2007; accepted 30 November 2007

Available online 31 December 2007

Abstract

Cytoskeletal alteration is a key factor in neurodegenerative processes like Alzheimer's or Parkinson's disease. Colchicine is a microtubule-disrupting agent that binds to tubuline, inhibiting microtubule assembly, and which triggers apoptosis. The present research describes the transcriptional activation of molecules related to alternative forms of apoptosis, in an acute colchicine model of apoptosis in rat cerebellar granule neurons (CGNs). Treatment with colchicine up-regulated significantly the activity of genes related to oxidative stress: glutathione peroxidase 1 and catalase; altered significantly genes related to cell cycle control (cyclin D1 and cyclin-dependent kinase 2), genes related to classical apoptosis pathway (caspase 3) and a neuronal cell-related gene (pentraxin 1). Colchicine treatment also down-regulated the gene expression of calpain 1. In conclusion, our experiments demonstrate that the cell damage caused by exposure to colchicine activates the classical apoptosis pathway, but also promotes the up-regulation of several genes related to oxidative stress and cell cycle control. Present data may help to a better understanding of the molecular mechanisms involved in cytoskeletal degradation-induced apoptosis in neurons.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Colchicine; Apoptosis; Cell cycle; Caspase; Oxidative stress; Cerebellar granule neurons; Acute toxicity

1. Introduction

Understanding of the mechanism of neuronal cell death is vital to synthesize drugs for the treatment of neurological disorders (Pallas and Camins, 2006). The mitochondria and the nucleus appear to be key organelles in the process of neuronal demise (Chang and Reynolds, 2006; Jordán et al., 2003). It is widely accepted that apoptosis is the main process implicated in neuronal cell death in the majority of neurodegenerative diseases (Camins et al., 2006). However, it remains to be

clarified just how the apoptotic process is activated or initiated (Marks et al., 1998). One characteristic common to all neurodegenerative diseases is oxidative stress production at the mitochondrial level (Petersen et al., 2007; Zhu et al., 2007). Furthermore, apart of oxidative stress, mitochondria orchestrate the intrinsic apoptotic process by protein release of cytochrome *c*, which activates the classical apoptotic pathway (Krantic et al., 2005). Mitochondria may also release apoptosis-inducing factor (AIF), which translocates to the nucleus where it is responsible for activating an alternative caspase-independent mechanism of apoptotic death (Fonfria et al., 2002; Krantic et al., 2007).

DNA damage is also involved in the process of neuronal cell death. DNA damage is a target of oxidative stress, probably through the p53 induction (Copani et al., 2007). In addition, DNA damage induces the process of re-entry in the cell cycle.

* Corresponding author at: Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Nucli Universitari de Pedralbes, E-08028 Barcelona, Spain.

E-mail address: pallas@ub.edu (M. Pallàs).

In recent years it has become clear that a common characteristic of all patients with Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD) and other neurological disorders is the process of cell cycle re-entry that accompanies expression of the transcription factor E2F-1, a key transcription factor that modulates the activity of genes involved in cell cycle S phase progression (Bowser and Smith, 2002; Copani et al., 2007; Pallas and Camins, 2006).

Apart from the mitochondria and the nucleus, another key component of the neuronal architecture is the cytoskeleton. It has been shown that microtubule (MT) disruption is a common and characteristic phenomenon involved in several neurodegenerative diseases (Jorda et al., 2003; Plattner et al., 2006; Trojanowski et al., 2005). It is known that Tau is the major component of the intracellular filamentous deposits that define a number of neurodegenerative diseases, including the AD, progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration and Pick's disease (Jope et al., 2007). The primary effect of mutations of the tau gene is at the protein level, and they reduce the ability of tau protein to interact with MT and increase its propensity to assemble into abnormal filaments (Goedert, 2005). In AD, the hyperphosphorylation of tau protein seems to be related to the abnormal activity of cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) and glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β), which causes microtubule disruption and the accumulation of the abnormal protein (Pallas and Camins, 2006; Plattner et al., 2006). Because MT-stabilising compounds may counteract the loss of Tau function in AD and sustain effective axonal transport, MT-binding/stabilising drugs could potentially treat AD and other neurodegenerative disorders characterised by altered MT and impaired axonal transport (Trojanowski et al., 2005).

It is well known that colchicine triggers apoptosis in several neuronal *in vitro* models such as organotypic hippocampal slice cultures (Kristensen et al., 2003) or CGNs (Bonfoco et al., 1995; Gorman et al., 1999; Karla and Zharkovsky, 1999; Kim et al., 2002; Volbracht et al., 2001). Moreover, colchicine has been used as a model of acute MT-disruption and has proved to be useful in testing neuroprotective drugs like flavopiridol and lithium (Jorda et al., 2003; Jorda et al., 2004). Colchicine causes apoptosis through the activation of intrinsic apoptotic pathway by the cytochrome *c* release and caspase-3 activation in CGNs (Fig. 1) (Bonfoco et al., 1995; Gorman et al., 1999; Marks et al., 1998). Colchicine enhances apoptosis induced by oxidative stress, which starts causing damage in the cellular membranes (Canudas et al., 2004; Gahm et al., 2005; Tsuruga et al., 2003), and their effects can be reversed by inhibitors of cyclins such as flavopiridol or roscovitine (Jorda et al., 2003) and intracellular calcium chelators such as BAPTA-AM. These last findings indicate that cytoskeletal alteration induced by colchicine can compromise cdk5 activation and p25 formation (Jorda et al., 2005).

To sum up, cytoskeletal alteration is a key factor in neurodegenerative processes because causes apoptosis in neuronal cells not only by the classical pathway, but also through aberrant functioning of cell cycle related molecules. In the present research we evaluate the transcriptional activation

of those molecules related to alternative forms of apoptosis, in an acute colchicine model of apoptosis in rat CGNs. To the best of our knowledge, this is the first study of colchicine changes in gene expression in neurons.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Pharmacological agents used in this study include: colchicine and propidium iodide from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, U.S.A.). Cell culture media and foetal calf serum (FCS) from GIBCO (Life Technologies, Paisley, U.K.). Cell culture salts, enzymes, Mowiol[®]4-88 and Triton X-100 were purchased from Sigma. Round glass coverslips (1.1 cm ϕ) were purchased from Knittel-Glaser (Germany) and Fura-2 AM from Invitrogen (Invitrogen Corporation, Carlsbad CA, U.S.A.). LS50B fluorescence spectrometer, equipped with a fast-filter accessory for Fura-2 fluorescence ratio measurements, and FL Win-Lab 4.0 software were from Perkin Elmer. Trizol reagent was purchased from Invitrogen (Invitrogen Corporation, Carlsbad CA, U.S.A.). High-Capacity cDNA Archive Kit and low-density arrays were purchased from Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.). PCR reactions were developed in a Perkin Elmer 2400 Thermal Cycler and 7900HT system (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.). Real-time RT-PCR data were quantified using the SDS 2.2 software package (Applied Biosystems). Other chemical reagents were of analytical quality and purchased from Sharlab (Barcelona, Spain).

2.2. Granule cell culture and drug treatment

Primary cultures of CGNs were prepared from 7-day-old Sprague–Dawley rat pups, following to the method of Verdaguer et al. (2002). Briefly, cerebella were freed of meninges, minced, trypsinised and treated with DNase. Cells were dissociated by repeated pipetting, and separated from non-dissociated tissue by sedimentation. Cell density was adjusted to 8×10^5 cells/mL and cells were seeded on poly-L-lysine coated 96-well plates. Cultures were grown in Eagle's basal medium containing 10% fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine, 0.1 mg/mL gentamicin and 25 mM of KCl. Cytosine arabinoside (10 μ M) was added 16–18 h after plating, in order to inhibit the growth of non-neuronal cells. Cultures prepared by this method were enriched more than 95% in granule neurons.

2.3. Treatment of CGNs and evaluation of neuronal survival

After 7 days *in vitro* (DIV), CGNs were incubated for 16 h in medium containing colchicine (1 nM to 1 mM). To assess the loss of cell viability, we used the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT) method. MTT was added to the cells at a final concentration of 250 μ M, and cells were incubated for 1 h to allow the reduction of MTT to produce a

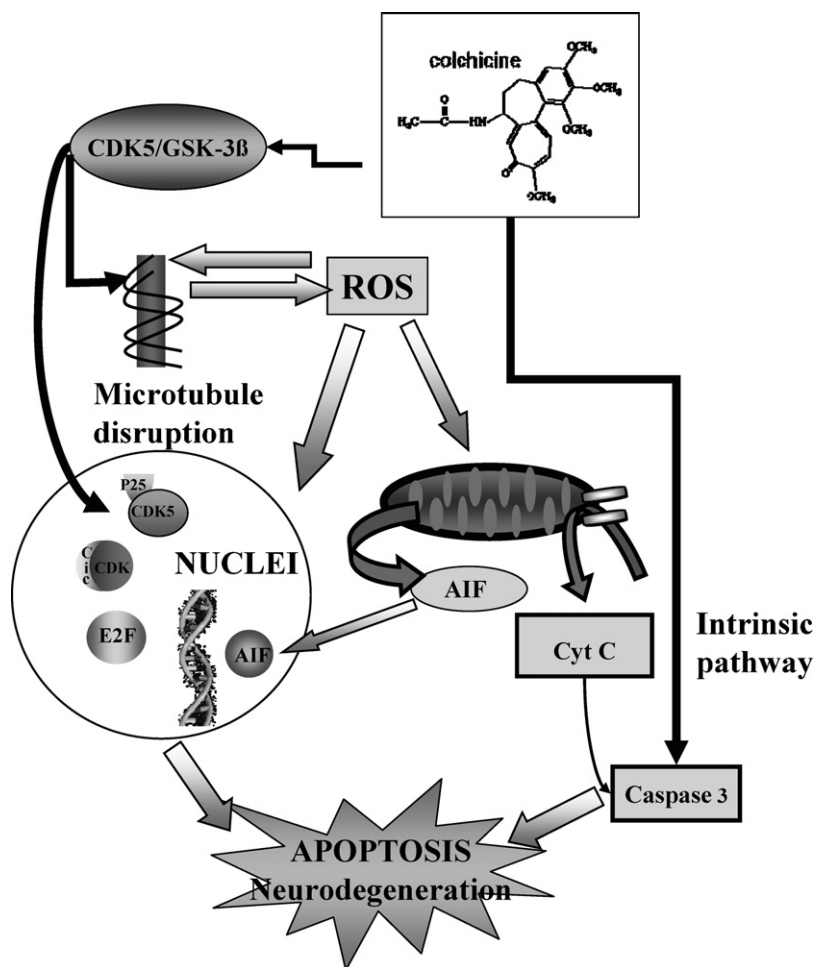


Fig. 1. Schematic representation of putative pathways involved in colchicine-induced apoptosis.

dark blue formazan product. Media was removed and cells were dissolved in dimethylsulfoxide. The formation of formazan was measured by absorbance change at 595 nm, using a microplate reader (BioRad Laboratories, Hercules, CA, U.S.A.). Viability results were expressed as percentages. The absorbance measured from non-treated cells was taken to be 100%.

2.4. Detection of condensed nuclei by microscopic cell counting

Propidium iodide (PI) staining was used to evaluate morphological evidence of apoptosis (condensed nuclei). After corresponding treatment, cells were fixed in 4% paraformaldehyde/(PBS), pH 7.4, for 1 h at room temperature. After washing with PBS, they were incubated for 3 min with a solution of PI in PBS (10 mg/mL). Coverslips were mounted in Mowiol 4–88. Stained cells were visualized under UV illumination using the 20 objective of a Nikon Eclipse fuomicroscope and digitized images were captured. Apoptotic cells contained shrunken, brightly fluorescent apoptotic nuclei with condensed chromatin, compared with non-apoptotic cells.

2.5. Analysis of DNA fragmentation by flow cytometry

Apoptosis was measured after 16 h of exposition to colchicine 0.01–1 mM. In brief, the culture medium was removed; cells were collected from culture plates by pipetting and then washed with phosphate-buffered saline solution (PBS). Flow cytometry experiments were carried out using an Epics XL flow cytometer, adding propidium iodide (10 mg/mL) 30 min. Before analysis, the instrument was set up with a standard configuration: excitation of the sample was performed using a 488 nm air-cooled argonion laser at 15 mW power. Forward scatter (FSC), side scatter (SSC) and red (620 nm) fluorescence for PI were acquired. Optical alignment was based on optimised signal from 10 nm fluorescent beads (Immunocheck, Epics Division). Time was used as a control of the instrument stability; red fluorescence was projected on a 1024 non-parametrical histogram. Aggregates were excluded, gating single cells by their area versus peak fluorescence signal.

2.6. Measurement of intracellular calcium increase

The increase in intracellular free Ca^{2+} was determined in cultured rat cerebellar granule cells as described in Verdaguer

et al. (2002) with minor modifications. Briefly, cells obtained as described in Section 2.2 were grown on poly-L-lysine-coated round glass coverslips (1.1 cm ϕ) at a density of 300,000 cells/cm². After 8–12 days *in vitro*, the cells were loaded with 6 μ M Fura-2 AM for 30 min at 37 °C using a Mg²⁺-free, Locke-HEPES buffer (LH-BSA), which consisted of 154 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 3.6 mM NaHCO₃, 1.3 mM CaCl₂, 5.6 mM D-glucose, 10 mM HEPES, and 0.1% (w/v) BSA (pH 7.35). For fluorescence recording, the coverslip was carefully rinsed in LH-BSA buffer, mounted on a specific holder, and placed in a quartz cuvette containing 1.3 mL LH-BSA buffer. Measurements were made at 37 °C under continuous mild stirring in an LS50B fluorescence spectrometer, equipped with a fast-filter accessory for Fura-2 fluorescence ratio measurements. Emission data (510 nm) were collected with alternate excitation at 340 and 380 nm every 0.32 s, and the ratio F_{340}/F_{380} was calculated in real time, using FL Win-Lab 4.0 software (Perkin Elmer).

To assess the effect of increasing concentrations of colchicine on glutamate-induced calcium increases, 100 μ M

of glutamate was added in the presence of 10 μ M glycine, and after 360 s, different concentrations of colchicine (range: 1 nM to 10 μ M) were added cumulatively at regular intervals (60 s). After the experiment, ionomycin (20 μ M) was added as a positive control. Experiments were carried in triplicate.

2.7. Determination of gene transcriptional activity by low-density array assays

Total RNA was extracted from CGNs using Trizol reagent. First strand cDNA was reverse transcribed from 25 μ L of total RNA, at 0.2 μ g/ μ L, by using a High-Capacity cDNA Archive Kit. Reaction mix was prepared according with the manufacturer's guidelines and the reaction was performed in a Perkin Elmer 2400 Thermal Cycler, according with the following program: step 1 at 65 °C for 5 min; step 2 at 50 °C for 120 min. The cDNA samples were used for TaqMan Low-Density Arrays analysis.

We designed the configuration of a Low-Density Array in a 32 assays format (Table 1). This format includes a mandatory

Table 1
The table shows the array configuration

Gene symbol	Gene name	Sequence reference	Assay ID
Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Gene Aliases Gapdh, RGD:2661	NM_017008.3	Rn99999916_s1
Actb	Actin, beta. Gene Aliases Actx, RGD:628837	NM_031144.2	Rn00667869_m1
Gsto1	Glutathione S-transferase omega 1. Gene Aliases MGC94845, RGD:70952	NM_001007602.1	Rn01444438_m1
Gpx1	Glutathione peroxidase 1. Gene Aliases RGD:2729	NM_030826.2	Rn00577994_g1
Cat	Catalase. Gene Aliases CS1, Cas1, Cs-1, RATCAT01, RATCATL, RGD:2279	NM_012520.1	Rn00560930_m1
Gsr	Glutathione reductase. Gene Aliases RGD:621747	NM_053906.1	Rn00588153_m1
Gsta3	Glutathione S-transferase A5. Gene Aliases GSTA3, Gsta1, MGC112704, RGD:2753, Yc1	NM_031509	Rn00580416_m1
Sod1	Superoxide dismutase 1. Gene Aliases CuZnSOD, RGD:3731	NM_017050.1	Rn00566938_m1
Sod2	Superoxide dismutase 2, mitochondria. Gene Aliases RGD:3732	NM_017051.2	Rn00566942_g1
Ccnd1	Cyclin D1. Gene Aliases RGD:68384	NM_171992.2	Rn00432359_m1
Cdk2	Cyclin-dependent kinase 2. Gene Aliases RGD:70486	NM_199501.1	Rn01529544_g1
Cdk4	Cyclin-dependent kinase 4. Gene Aliases RGD:621120	NM_053593.2	Rn00585909_m1
Cdkn2b	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4). Gene Aliases RGD:2324, p15	NM_130812.1	Rn00590746_m1
Cdk5	Cyclin-dependent kinase 5. Gene Aliases RGD:70514	NM_080885.1	Rn00590045_m1
Bcl2	Bcl-2. Gene Aliases RGD:2199	NM_016993.1	Rn99999125_m1
Tp53	Tumor protein p53. Gene Aliases MGC112612, RGD:3889, Trp53, p53	NM_030989.1	Rn00755717_m1
Casp3	Caspase 3. Gene Aliases Lice, MGC93645, RGD:2275	NM_012922.2	Rn00563902_m1
Casp8	Caspase 8. Gene Aliases RGD:620945	NM_022277.1	Rn00574069_m1
Casp9	Caspase 9. Gene Aliases Apaf3, Casp-9-CTD, Casp9_v1, Ice-Lap6, Mch6, RGD:61867	NM_031632.1	Rn00581212_m1
Diablo	Diablo homolog (<i>Drosophila</i>) (predicted). Gene Aliases Diablo, MGC105680, RGD:1310885, Smac	NM_001008292.1	Rn01480487_g1
Bid	BH3 interacting domain death agonist. Gene Aliases RGD:620160	NM_022684.1	Rn00575445_m1
Capn1	Calpain 1. Gene Aliases RGD:2267	NM_019152.2	Rn00569689_m1
Bad	Bcl2-associated death promoter. Gene Aliases RGD:620103	NM_022698.1	Rn00575519_m1
GSK3b	Glycogen synthase kinase 3 beta. Gene Aliases RGD:70982	NM_032080.1	Rn00583429_m1
Pcna	Proliferating cell nuclear antigen. Gene Aliases PCNAR, Pcna/cyclin, RGD:3269	NM_02238.1	Rn00574296_g1
Nptx1	Neuronal pentraxin . Gene Aliases RGD:628894	NM_153735.1	Rn00596666_m1
Sirt2	Sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 2 (<i>S. cerevisiae</i>). Gene Aliases MGC105900, RGD:621481	NM_001008368.1	Rn01457503_g1
Mapk1	Mitogen activated protein kinase 1. Gene Aliases Erk2, RGD:70500	NM_053842.1	Rn00587719_m1
Mapk3	Mitogen activated protein kinase 3. Gene Aliases ERK1, Erk-1, Esrk1, Prkm3, RGD:3046, p44, p44erk1, p44mapk	NM_017347.2	Rn00820922_g1
Aif1	Allograft inflammatory factor 1. Gene Aliases Bart1, RGD:61924, iba1, mrf-1	NM_017196.2	Rn00567906_g1
Tgfb1	Transforming growth factor, beta 1. Gene Aliases RGD:69051	NM_021578.1	Rn00572010_m1

The assays include cell cycle related genes, apoptosis genes and neuronal cell-related genes. Ribosomal 18S is not included in the table as far it was pre-configured by the supplier.

control designed by the manufacturer as a housekeeping gene: ribosomal 18S RNA. We choose primers and probes on line from Applied Biosystems Assays-on Demand™ Gene Expression Products. The Gene Expression Micro Fluidic Card contains eight sample-loading ports each connected by a micro channel to 48 miniature reaction chambers for a total of 384 wells per card. The system allows us to analyze four different samples at the same time (in our experiments control and colchicine 10–1000 μ M), in triplicates. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh) and beta-actin (Actb) genes were included as a common and widely used housekeeping reference genes. We included seven genes related to glutathion metabolism: glutathione S-transferase omega 1(Gsto1), glutathione peroxidase 1 (Gpx1), catalase (Cat), glutathione reductase (Gsr), glutathione S-transferase A5 (Gsta5), superoxide dismutase 1 (Sod1) and superoxide dismutase 2 mitochondrial (Sod2); five genes related to cell cycle control: cyclin D1 (Ccn1), cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2), cyclin-dependent kinase 4 (Cdk4), cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (Cdkn2b), cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5); nine genes related to apoptosis: Bcl-2 (Bcl2), tumor protein p53 (Tp53), caspase 3 (Casp3), caspase 8 (Casp8), caspase 9 (Casp 9), diablo homolog predicted (Diablo), BH3 interacting domain death agonist (Bid), calpain 1 (Capn1), Bcl-2 associated death promoter (Bad); and six neuronal-cell-related genes: glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 β), proliferating cell nuclear antigen (Pcna), neuronal pentraxin 1 (Nptx1), sirtuin 2 (Sirt2), mitogen activated protein kinase 1 (Mapk1), mitogen activated protein kinase 3 (Mapk3). In the assay were also included two genes expressed in CGNs but assumed to be used as negative controls: transforming growth factor beta 1 (Tgfb1) and allograft inflammatory factor 1 (Aif1).

In order to perform the amplification reaction, 100 ng of cDNA sample was loaded (per port) together with TaqMan® Universal PCR Master Mix into the TaqMan® array. The plate was centrifuged at 2000 g for 2 min to fill the chambers. Finally, the array was sealed and placed into the 7900HT system to start the Real-time PCR run. The calculations were performed according with the by comparative threshold cycle (C_t) method (Livak and Schmittgen, 2001). The method uses the formula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ to calculate the expression of target genes normalized to a calibrator (N° Fold). The threshold cycle C_t indicates the cycle number by which the amount of amplified target reaches a fixed threshold. The C_t data for all target genes and housekeeping genes in each sample were used to create ΔC_t values ($\Delta C_t = C_t$ (target gene) – C_t (housekeeping gene)). Thereafter, $\Delta\Delta C_t$ values were calculated by subtracting the calibrator from the ΔC_t value of each target. The relative quantity (RQ), or N° fold, were calculated with the equation: $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Jiang et al., 2006). Real-time RT-PCR data were quantified using the SDS 2.2 software package.

2.8. Statistical analysis

Data are given as mean \pm S.E.M. from 6 independent PCR reactions across 2 independent primary cultures. N° Fold values

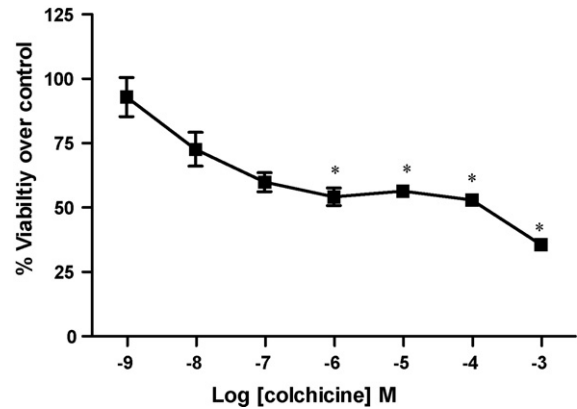


Fig. 2. Effects of the exposure of CGNs to colchicine (1 nM to 1 mM) for 16 h, on MTT reduction. Data are the mean \pm S.E.M. of three separate experiments performed in quadruplicate. Samples were evaluated using Student test. * $p < 0.05$ vs. control values.

in gene expression up to 0.5 and below 2 were assumed as non-significant according with values obtained from negative control genes. The gene expression differences among colchicine-treated samples were evaluated using an Independent-Samples t -test.

3. Results

3.1. Effects of colchicine in the apoptosis of CGNs

Although in previous studies we have demonstrated that colchicine induces neurotoxicity and apoptosis in CGNs (Jorda et al., 2003), present study a MTT dose-dependent curve was performed. Thus, exposure of CGNs on 7 DIV to colchicine (ranging from 1 nM to 1 mM) for 16 h resulted in a decrease in neuronal viability (Fig. 2). As can be deduced from curve-shape, colchicine induces more than 50% cell death at doses ranging from 0.01 to 1 mM. Then, next experiments were performed in a colchicine concentration range centred in this 50% cell death value. Furthermore, the MTT reduction was accompanied with nuclear DNA fragmentation at the same concentrations tested. The percentage of condensed apoptotic nuclei increased to 55% at 0.1 mM (Fig. 3A). Flow cytometry indicated that at 0.1 mM of colchicine, the percentage of nuclei with subdiploid peak was about 40% (Fig. 3B).

3.2. Effects of colchicine on intracellular calcium of CGNs

The cumulative addition of colchicine, from 1 nM to 10 μ M (Fig. 4), caused no changes in the intracellular calcium increase induced by 100 μ M of glutamate (in the presence of 10 μ M of glycine). The addition of higher concentrations of colchicine caused disturbances in the readings due to absorbance at relevant wavelengths resulting in a quenched Fura-2 fluorescence.

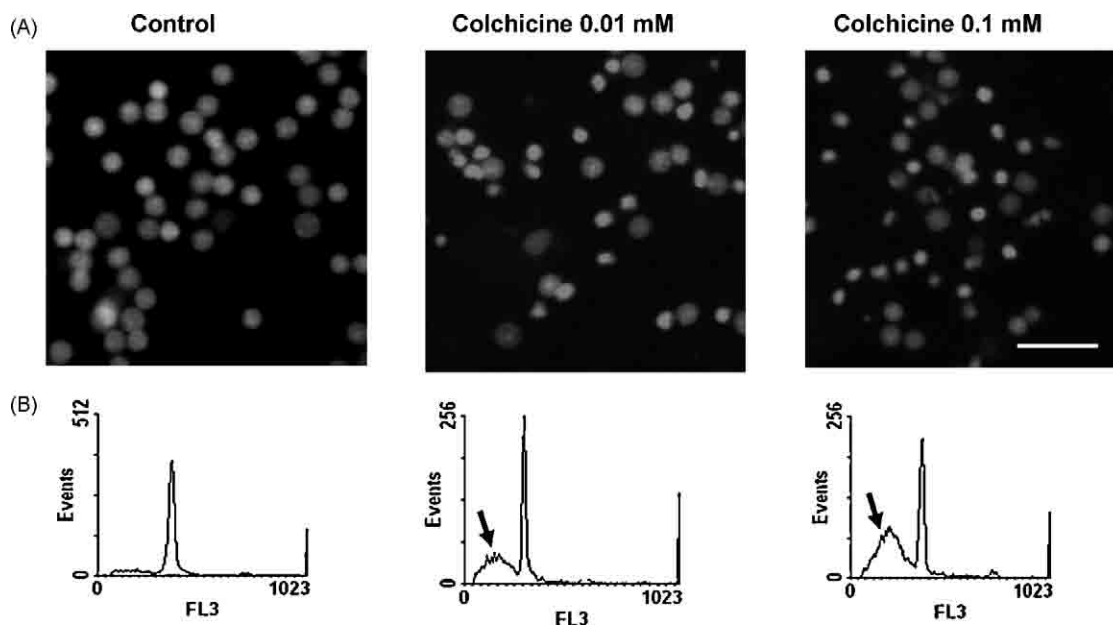


Fig. 3. Effect of the treatment with colchicine (0.01 and 0.1 mM) on CGNs for 16 h. (A) Fluorescence photomicrographs showing chromatin condensation in permeabilized CGNs. Calibration bar, 10 μ M. (B) Flow cytometry histograms of PI-stained cells after the treatment. Arrow indicated the population considered apoptotic. Data are the mean \pm S.E.M. of three separate experiments performed in quadruplicate.

3.3. Effects of colchicine in the transcriptional activity of CGNs

The transcriptional activity of ribosomal 18S RNA gene was far higher than that of the other genes studied. We decided to use Gapdh as a reference housekeeping because treatment with colchicine did not significantly alter the transcription of this gene.

When cultured CGNs were incubated with colchicine (0.01 and 0.1 mM) we found a slight alteration in two genes related to oxidative stress: glutathione peroxidase 1 and catalase (Fig. 5). Only non-significant changes were found in the other oxidative stress-related genes (Table 2B). Changes in gene expression may be related to an increase in the H_2O_2 detoxification activity.

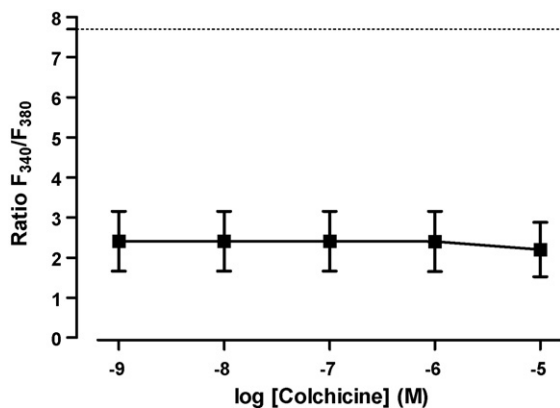


Fig. 4. Lack of effect of colchicine on glutamate-induced calcium increase in CGNs. The dotted line indicates the increase in intracellular calcium evoked by 20 μ M ionomycin. Data are the mean \pm S.E.M. of three separate experiments performed in quadruplicate.

We also studied colchicine activation of genes related to cell cycle control, including cyclin D1, cyclin-dependent kinases 2 and 4, and cyclin-dependent kinase inhibitor 2B. Our results suggest that colchicine is able to induce the activity of cyclin D1 and cyclin-dependent kinase 2 (Fig. 5). In previous studies we demonstrated a prominent role for Cdk5 in the apoptotic process mediated by colchicine (Jorda et al., 2003, 2005) and thus, in the present work we decided to study changes in Cdk5 gene expression. Interestingly, colchicine did not induce changes in Cdk5 gene expression (Table 2B).

We also found an up-regulation of genes related to the classical apoptosis pathway (specifically caspases 3 and 8) in a dose-dependent manner (Fig. 5). Interestingly, calpain I, another cysteine protease that is activated in the process of colchicine-induced apoptosis, was down-regulated after treatment with colchicine 0.1 mM (Fig. 5). Not only caspase genes were up-regulated in the presence of colchicine because pentraxin 1 also showed increased transcriptional activity. On the other hand, GSK-3 β activity was down-regulated. Finally, the other genes evaluated after treatment with colchicine were not significantly up-regulated (Table 2B).

4. Discussion

Colchicine is a neurotoxin that is widely used in neuropharmacology in order to study the effects of neuroprotective drugs that protect from cytoskeletal alteration (Jorda et al., 2004; Karla and Zharkovsky, 1999; Kim et al., 2002; Kristensen et al., 2003; Muller et al., 2006; Volbracht et al., 2001). Changes in cytoskeletal architecture are a common feature in AD and PD (Pallas and Camins, 2006). Previous studies have demonstrated that colchicine-induced apoptosis in neurons is mediated by the activation of the apoptotic intrinsic

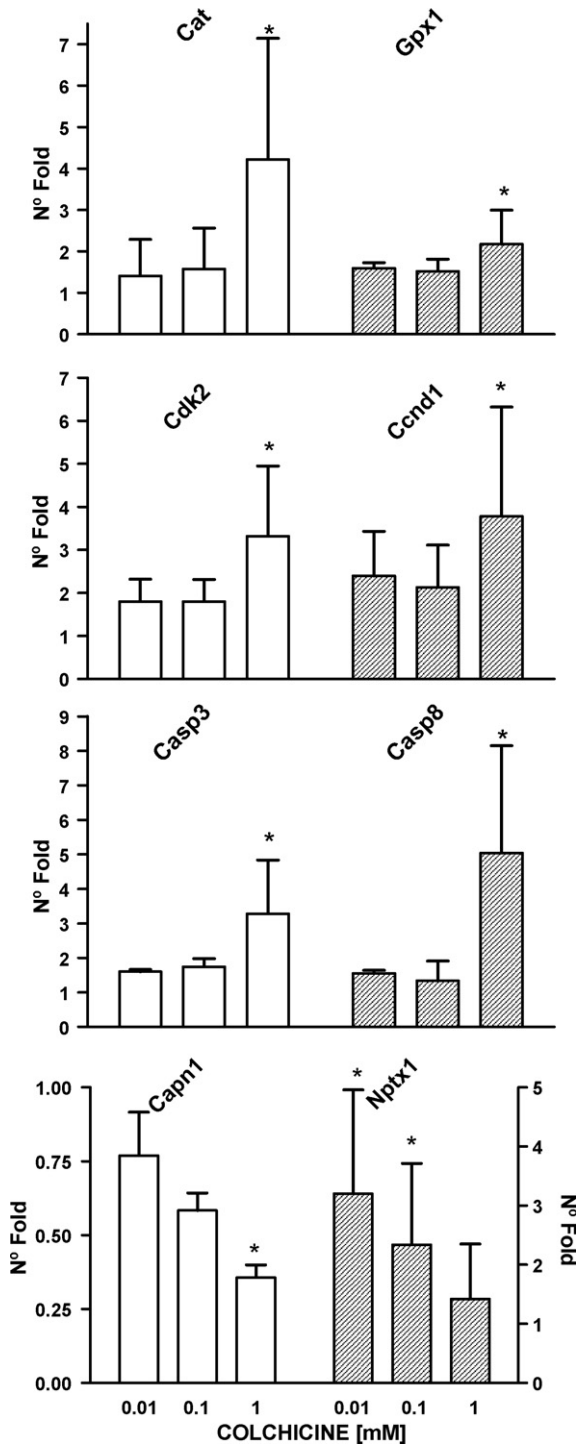


Fig. 5. Fold increase of mRNA expression levels for different genes after 16 h stimulation with colchicine. Data are given as mean \pm S.E.M. from 6 independent PCR reactions across 2 independent primary cultures. The gene expression differences among colchicine-treated samples were evaluated using an Independent-Samples *t*-test. $*p < 0.05$.

pathway through cytochrome *c* release from mitochondria and the activation of caspase 3 (Gorman et al., 1999; Jorda et al., 2004). Furthermore, we have demonstrated that cyclin-dependent kinase inhibitors (such as flavopiridol and roscovitine) inhibit colchicine-induced apoptosis through the inhibition of cdk5 (Jorda et al., 2003).

Table 2

Fold Increase of mRNA expression levels after 16 h exposure to different doses of colchicine. The gene expression differences among colchicine-treated samples were evaluated using an Independent-Samples *t*-test. $*p < 0.05$

Gene symbol	Colchicine 0.01 mM	Colchicine 0.1 mM	Colchicine 1 mM
(A) Fold increase of mRNA expression levels for negative control genes, Aif1 and Tgfb1			
Aif1	0.47 \pm 0.33*	0.21 \pm 0.22*	0.20 \pm 0.21*
Tgfb1	1.43 \pm 0.38	1.43 \pm 0.03	1.17 \pm 0.01
Gene symbol	Colchicine 0.01 mM	Colchicine 0.1 mM	Colchicine 1 mM

(B) Fold increase of mRNA expression levels for selected genes

Gsto1	1.22 \pm 0.54	1.13 \pm 0.52	1.90 \pm 1.27
Gsr	0.69 \pm 0.35	0.56 \pm 0.14	1.00 \pm 0.32
Gsta3	1.02 \pm 0.77	1.24 \pm 1.15	2.48 \pm 2.64
Sod1	1.15 \pm 0.6	1.26 \pm 0.84	2.18 \pm 1.70
Sod2	0.83 \pm 0.67	0.83 \pm 0.71	1.73 \pm 1.81
Cdk4	1.37 \pm 0.24	1.37 \pm 0.43	1.56 \pm 0.65
Cdkn2b	0.63 \pm 0.36	0.79 \pm 0.51	3.08 \pm 2.15
Cdk5	0.87 \pm 0.04	0.84 \pm 0.06	1.08 \pm 0.41
Casp9	1.20 \pm 0.10	1.27 \pm 0.28	1.34 \pm 0.29
Diablo	0.88 \pm 0.06	0.96 \pm 0.24	1.24 \pm 0.51
Bcl2	0.54 \pm 0.66	0.61 \pm 0.72	1.12 \pm 1.42
Tp53	1.78 \pm 0.67	1.56 \pm 0.69	1.78 \pm 0.85
GSK3 β	0.48 \pm 0.37*	0.57 \pm 0.50	1.15 \pm 1.23
Bid	0.81 \pm 0.27	0.76 \pm 0.31	0.88 \pm 0.52
Bad	1.01 \pm 0.08	1.04 \pm 0.31	1.21 \pm 0.31
Pcna	0.78 \pm 0.8	0.74 \pm 0.72	2.07 \pm 2.51
Sirt2	1.21 \pm 0.00	1.37 \pm 0.41	1.56 \pm 0.60
Mapk1	0.61 \pm 0.36	0.80 \pm 0.65	1.38 \pm 1.34
Mapk3	1.02 \pm 0.00	0.95 \pm 0.18	0.83 \pm 0.24

$*p < 0.05$.

Although in a previous studies it has been evaluated changes in gene expression induced by colchicine in a *in vitro* model of inflammatory disease (Ben-Chetrit et al., 2006), there are no studies using neuronal cell cultures to analyze changes in gene expression mediated by colchicine. So the present study is an extension of our previous work on CGNs to increase our understanding of the potential pathways involved in colchicine-induced apoptosis in a neuronal cell culture.

Our data show that colchicine at 0.01 mM significantly activates the transcriptional activity of caspase 3 and 8 genes, in agreement with reported activation of the classical apoptotic pathway by exposure to colchicine (Gorman et al., 1999; Jorda et al., 2003; Jorda et al., 2004; Karla and Zharkovsky, 1999; Kristensen et al., 2003; Muller et al., 2006). However, there are no significant changes in the expression level of caspase 9. This could be explained by the fact that the caspase cascade amplifies the effects on downstream molecules, such as caspase 3, once the pathway is activated, and it is not necessary to modify the transcriptional activity of this gene to produce physiological effects.

Calpain gene expression seems to be down-regulated as a result of exposure to colchicine. The calpains are a family of calcium-dependent, non-lysosomal cysteine proteases expressed ubiquitously in mammals and many lower organisms. Increases in calpain activity are due to intracellular Ca^{2+} increase. Calpain overexpression breaks down cytoskeletal

proteins such as spectrin, microtubule subunits, microtubule-associated proteins, and neurofilaments (Camins et al., 2006; Castillo and Babson, 1998). Our results show that calpain gene expression is not involved in colchicine-induced cell death.

In our experiments, Nptx1 was significantly up-regulated. Nptx1 is a secreted glycoprotein, whose expression is restricted to the nervous system that mediates neuronal death evoked by non-depolarizing conditions in CGNs (DeGregorio-Rocasolano et al., 2001; Enguita et al., 2005; Hossain et al., 2004).

We measured the involvement of MAP kinases in colchicine-induced neurotoxicity and it would appear that the transcriptional activity of neither MAPK-1 nor MAPK-3 genes was induced by the treatment. This is consistent with our previous experiments which studied the involvement of MAP kinases, JNK and p38 using the specific inhibitors SP600125 and minocyclin (Jorda et al., 2003; Li et al., 2002).

We also analyzed changes in the expression of genes involved in the process of cell cycle re-entry, because previous studies suggest that the cell cycle could be a common path in the process of neuronal cell death (Bowser and Smith, 2002; McShea et al., 1997, 1999) (Fig. 1). Our observations agree with this suggested involvement of aberrant over-expression of cyclins in neuronal death: cyclin D1 and cdk2 (involved in stage G1) are up-regulated in the presence of colchicine. By contrast, cdk5 is not directly involved in cell cycle progression but has a prominent role in neuronal apoptosis (Li et al., 2002). The expression of cdk5 induced by colchicine in cultures of CGNs was evaluated in previous studies, and we detected a significant increase in cdk5 expression by immunoblotting after treatment with colchicine (Jorda et al., 2003). In the present research no significant changes in the transcriptional activity of the cdk5 gene were found, probably due to the fact that the active form of the protein is regulated post-transcriptionally.

Not only does cdk5 activity appear to be regulated by post-transcriptional mechanisms, but GSK-3 β activities also seem to be controlled by phosphorylation rather than by gene transcription. Gene expression analysis also showed that GSK-3 β gene activity was down-regulated under our experimental conditions. GSK-3 β is a metabolic enzyme with a multi-tasking serine/threonine kinase activity that also appear to be involved in the regulation of several critical cellular functions such as structure, gene expression, mobility, and apoptosis (Jope and Roh, 2006; Jope et al., 2007). In fact, the activation of this enzyme seems to be more related to phosphorylation activity of kinases like PI3-kinase Akt than with gene regulation processes. In previous studies we demonstrated that colchicine was able to activate this enzyme by changes in its phosphorylation state (Jorda et al., 2004). The present results demonstrate that GSK-3 β gene activity is not up-regulated after colchicine treatment and thus, the changes in enzyme activity are due to post-transcriptional regulation.

To sum up, colchicine causes apoptosis in CGNs. This process is mediated by the activation of caspase 3 and 8 through the classical pathway. The process is also accompanied by the up-regulation of Nptx1 and down-regulation of GSK3. Likewise, over-expression of cell cycle related genes are involved.

Acknowledgements

We thank the Language Assessment Service of the University of Barcelona for revising the manuscript. This study was supported by grants LSHB-CT-2004-512051 from EECC, SAF-2006-13092 from Ministerio de Educación y Ciencia, PI041300, and Centros de Investigación Biomédica en Red (CIBER) from Instituto de Salud Carlos III. We also thank to Generalitat de Catalunya (2005/SGR00893) and Fundació La Marató de TV3.

References

- Ben-Chetrit E, Bergmann S, Sood R. Mechanism of the anti-inflammatory effect of colchicine in rheumatic diseases: a possible new outlook through microarray analysis. *Rheumatology* 2006;45:274–82.
- Bowser R, Smith MA. Cell cycle proteins in Alzheimer's disease: plenty of wheels but no cycle. *J Alzheimers Dis* 2002;4:249–54.
- Bonfoco E, Ceccatelli S, Mango L, Nicotera P. Colchicine induces apoptosis in cerebellar granule cells. *Exp Cell Res* 1995;218:189–200.
- Camins A, Verdaguer E, Folch J, Canudas AM, Pallas M. The role of CDK5/P25 formation/inhibition in neurodegeneration. *Drug News Perspect* 2006;19:453–60.
- Canudas AM, Jorda EG, Verdaguer E, Jimenez A, Sureda FX, Rimbau V, et al. Cyclosporin A enhances colchicine-induced apoptosis in rat cerebellar granule neurons. *Br J Pharmacol* 2004;141:661–9.
- Castillo MR, Babson JR. Ca(2+)-dependent mechanisms of cell injury in cultured cortical neurons. *Neuroscience* 1998;86:1133–44.
- Chang DT, Reynolds IJ. Mitochondrial trafficking and morphology in healthy and injured neurons. *Prog Neurobiol* 2006;80:241–68.
- Copani A, Caraci F, Hoozemans JJ, Calafiore M, Sortino MA, Nicoletti F. The nature of the cell cycle in neurons: focus on a “non-canonical” pathway of DNA replication causally related to death. *Biochim Biophys Acta* 2007;1772:409–12.
- DeGregorio-Rocasolano N, Gasull T, Trullas R. Overexpression of neuronal pentraxin 1 is involved in neuronal death evoked by low K(+) in cerebellar granule cells. *J Biol Chem* 2001;276:796–803.
- Enguita M, DeGregorio-Rocasolano N, Abad A, Trullas R. Glycogen synthase kinase 3 activity mediates neuronal pentraxin 1 expression and cell death induced by potassium deprivation in cerebellar granule cells. *Mol Pharmacol* 2005;67:1237–46.
- Fonfria E, Dare E, Benelli M, Sunol C, Ceccatelli S. Translocation of apoptosis-inducing factor in cerebellar granule cells exposed to neurotoxic agents inducing oxidative stress. *Eur J Neurosci* 2002;16:2013–6.
- Gahm C, Holmin S, Rudehill S, Mathiesen T. Neuronal degeneration and iNOS expression in experimental brain contusion following treatment with colchicine, dexamethasone, tirilazad mesylate and nimodipine. *Acta Neurochir (Wien)* 2005;147:1071–84.
- Goedert M. Tau gene mutations and their effects. *Mov Disord* 2005;20(Suppl. 12):S45–52.
- Gorman AM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Ceccatelli S. Cytochrome c release and caspase-3 activation during colchicine-induced apoptosis of cerebellar granule cells. *Eur J Neurosci* 1999;11:1067–72.
- Hossain MA, Russell JC, O'Brien R, Laterra J. Neuronal pentraxin 1: a novel mediator of hypoxic-ischemic injury in neonatal brain. *J Neurosci* 2004;24:4187–96. Hossain MA, Russell JC, O'Brien R, Laterra J. Neuronal pentraxin 1: a novel mediator of hypoxic-ischemic injury in neonatal brain. *J Clin Invest* 2004;111:785–93.
- Jiang Z, Hu J, Li X, Jiang Y, Zhou W, Lu D. Expression analyses of 27 DNA repair genes in astrocytoma by TaqMan low-density array. *Neurosci Lett* 2006;409:112–7.
- Jope RS, Roh MS. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in psychiatric diseases and therapeutic interventions. *Curr Drug Targets* 2006;7:1421–34.
- Jope RS, Yuskaitis CJ, Beurel E. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics. *Neurochem Res* 2007;32:577–95.

- Jorda EG, Verdaguer E, Canudas AM, Jimenez A, Bruna A, Caelles C, et al. Neuroprotective action of flavopiridol, a cyclin-dependent kinase inhibitor, in colchicine-induced apoptosis. *Neuropharmacology* 2003;45:672–83.
- Jorda EG, Verdaguer E, Morano A, Jimenez A, Canudas AM, Camins A, et al. Lithium prevents colchicine-induced apoptosis in rat cerebellar granule neurons. *Bipolar Disord* 2004;6:144–9.
- Jorda EG, Verdaguer E, Canudas AM, Jimenez A, Garcia de Arriba S, Allgaier C, et al. Implication of cyclin-dependent kinase 5 in the neuroprotective properties of lithium. *Neuroscience* 2005;134:1001–11.
- Jordán J, Galindo MF, González-García C, Ceña V. Reactive oxygen species induce swelling and cytochrome c release but not transmembrane depolarization in isolated rat brain mitochondria. *Br J Pharmacol* 2003;139:797–804.
- Karla A, Zharkovsky A. Metabotropic glutamate receptor agonists protect from oxygen-glucose deprivation- and colchicine-induced apoptosis in primary cultures of cerebellar granule cells. *Neuroscience* 1999;92:7–14.
- Kim JA, Mitsukawa K, Yamada MK, Nishiyama N, Matsuki N, Ikegaya Y. Cytoskeleton disruption causes apoptotic degeneration of dentate granule cells in hippocampal slice cultures. *Neuropharmacology* 2002;42:1109–18.
- Krantic S, Mechawar N, Reix S, Quirion R. Molecular basis of programmed cell death involved in neurodegeneration. *Trends Neurosci* 2005;28:670–6.
- Krantic S, Mechawar N, Reix S, Quirion R. Apoptosis-inducing factor: a matter of neuron life and death. *Prog Neurobiol* 2007;81:179–96.
- Kristensen BW, Noer H, Gramsbergen JB, Zimmer J, Norberg J. Colchicine induces apoptosis in organotypic hippocampal slice cultures. *Brain Res* 2003;964:264–78.
- Li BS, Zhang L, Takahashi S, Ma W, Jaffe H, Kulkarni AB, et al. Cyclin-dependent kinase 5 prevent neuronal apoptosis by negative regulation of c-Jun N-terminal kinase 3. *EMBO J* 2002;21:324–33.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402–8.
- Marks N, Berg MJ, Guidotti A, Saito M. Activation of caspase-3 and apoptosis in cerebellar granule cells. *J Neurosci Res* 1998;52:334–41.
- McShea A, Harris PL, Webster KR, Wahl AR, Smith MA. Abnormal expression of the cell cycle regulators P16 and CDK4 in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 1997;150:1933–9.
- McShea A, Zelasko DA, Gerst JL, Smith MA. Signal transduction abnormalities in Alzheimer's disease: evidence of a pathogenic stimuli. *Brain Res* 1999;815:237–42.
- Muller GJ, Geist MA, Veng LM, Willemsen MG, Johansen FF, Leist M, et al. A role for mixed lineage kinases in granule cell apoptosis induced by cytoskeletal disruption. *J Neurochem* 2006;96:1242–52.
- Pallas M, Camins A. Molecular and biochemical features in Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des* 2006;12:4389–408.
- Petersen RB, Nunomura A, Lee HG, Casadesus G, Perry G, Smith MA, et al. Signal transduction cascades associated with oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2007;11:143–52.
- Plattner F, Angelo M, Giese KP. The roles of cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase 3 in tau hyperphosphorylation. *J Biol Chem* 2006;281:25457–65.
- Trojanowski JQ, Smith AB, Hurn D, Lee VM. Microtubule-stabilising drugs for therapy of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders with axonal transport impairments. *Expert Opin Pharmacother* 2005;6:683–6.
- Tsuruga M, Dang Y, Shiono Y, Oka S, Yamazaki Y. Differential effects of vitamin E and three hydrophilic antioxidants on the actinomycin D-induced and colcemid-accelerated apoptosis in human leukemia CMK-7 cell line. *Mol Cell Biochem* 2003;250:131–7.
- Verdaguer E, Jorda EG, Jimenez A, et al. Kainic acid induced neuronal cell death in cerebellar granule cell is not prevented by caspase inhibitors. *Br J Pharmacol* 2002;135:1297–307.
- Volbracht C, Leist M, Kolb SA, Nicotera P. Apoptosis in caspase-inhibited neurons. *Mol Med* 2001;7:36–48.
- Zhu X, Su B, Wang X, Smith MA, Perry G. Causes of oxidative stress in Alzheimer disease. *Cell Mol Life Sci* 2007;7:2202–10.

