

Universitat de Lleida

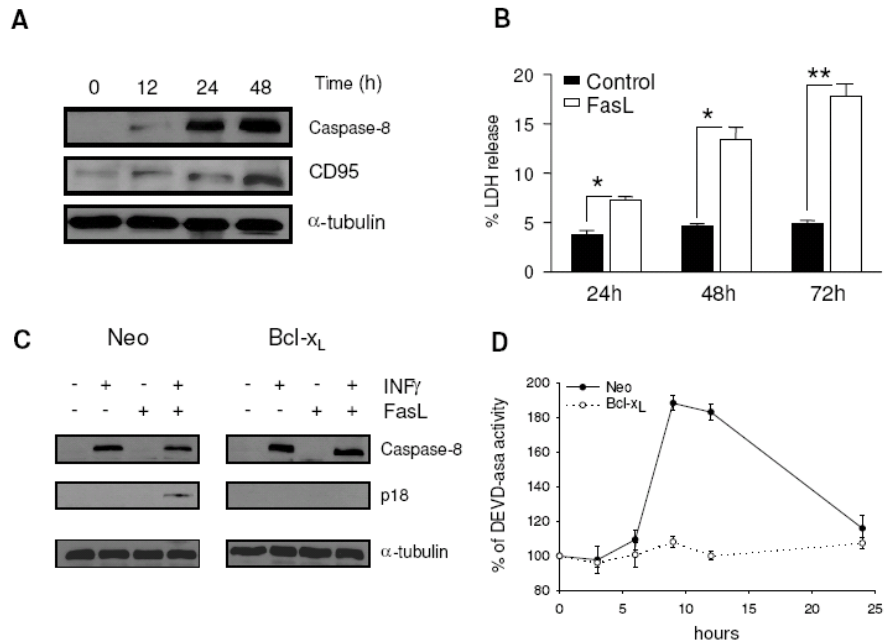
Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques

**CARACTERIZACIÓN DE LOS ANTAGONISTAS DEL
RECEPTOR DE MUERTE CD95/APO-1/FAS -FAIM_L Y
LIFEGUARD- EN EL SISTEMA NERVIOSO**

Miguel F. Segura Ginard

Lleida, Mayo 2006

Here we show that the treatment of SH-SY5Y cells with $\text{IFN}\gamma$ for 48 h induced a strong caspase-8 expression and a moderate upregulation of CD95 (Fig. 34A). To further investigate if these



upregulations reconstitute the CD95 induced cell death pathway, SH-SY5Y cells previously exposed to $\text{IFN}\gamma$ for 48h, were treated with soluble FasL (sFasL). Significant differences were observed from 24 h after treatment reaching the maximum differences after 72h (see fig. 34B).

Figure 34. $\text{IFN}\gamma$ sensitizes SH-SY5Y cells to CD95 induced cell death. **A**, Immunoblot of CD95 and caspase-8 after $\text{IFN}\gamma$ (50ng/ml) exposure at the indicated time points. **B**, SH-SY5Y wt cells were treated with soluble FasL (100ng/ml) and LDH release was monitored after 24, 48 and 72 h. **C**, In $\text{IFN}\gamma$ treated cells, cleavage of caspase-8 is analyzed after treatment with FasL, comparing SY-Neo (left panel) and SY-BclX_L (right panel). **D**, SY-Neo and SY-BclX_L were treated with $\text{IFN}\gamma$ for 48 and the DEVD-ase caspase activity assay was measured after treatment with CD95L. * indicates $p < 0.05$, ** indicates $p < 0.01$.

Moreover, we wanted to know whether CD95L induced apoptosis in SH-SY5Y cells was type I or type II. Then, we compared caspase activation in SH-SY5Y cells stably transfected with empty vector (SY-Neo) with those stably transfected with BclX_L (SY-BclX_L).

FasL and IFN γ co-treatment induced cleavage of caspase-8 in Neo cells whereas p18 active fragment of caspase-8 was absent in SY-BclX_L cells (Fig. 34B). In addition, DEVD-ase activity (indicative of caspase-3 activity) was also undetectable (Fig. 34D). These results indicate that IFN γ is able to reconstitute the apoptosis cascade activated by CD95 following the classical type II pathway, offering the possibility to study CD95 induced cell death in a neuron-like model.

4.1.4 mLFG inhibits CD95L induced apoptosis in neuronal cells

Antiapoptotic effects of LFG have been tested in cell types that normally do not show endogenous expression such as LN-18 astrocytoma cell line (Beier CP, *et al.*, 2005), cervical carcinoma HeLa cells and Jurkat T cell line (Somia NV, *et al.*, 1999). Giving that SH-SY5Y cells are a suitable model to test antiapoptotic effects of LFG against CD95 induced cell death, we first proceed to stably transfect mLFG in SH-SY5Y.

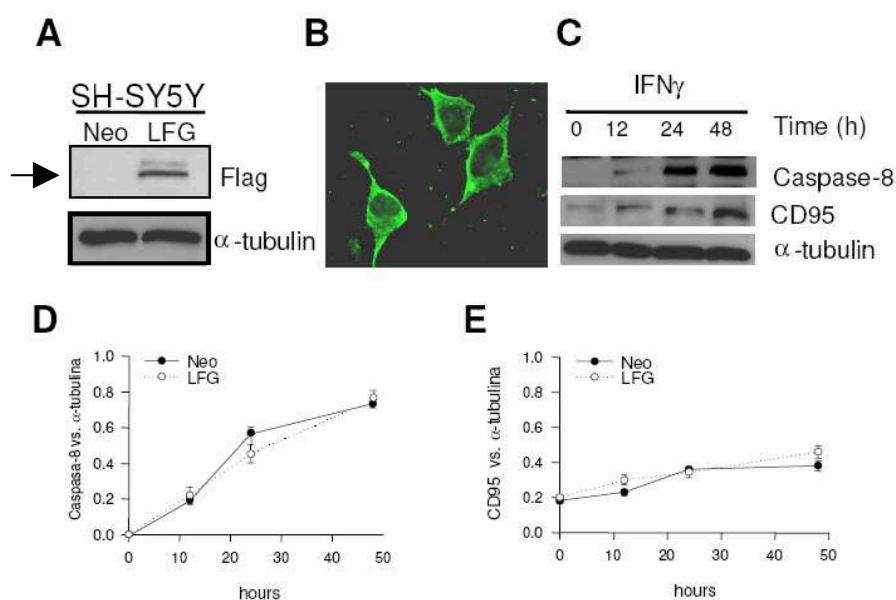


Figure 35. *mLFG expression does not affect caspase-8 and CD95 induced expression by IFN γ . A, extracts were prepared from flag tagged mLFG stably transfected SH-SY5Y cells and subjected to SDS-immunoblot analysis. The blot was sequentially probed with anti-Flag monoclonal antibody, and anti- α tubulin. The predicted 35 kDa band is indicated with an arrow. B, confocal microscopy of mLFG_L transfected SH-SY5Y cells. C, immunoblot of caspase-8 and CD95 in LFG overexpressing cells after IFN γ treatment. D and E, quantitative analysis of caspase-8 and CD95 levels in C immunoblots.*

Resistant clones were analyzed by Western Blot and those with high overexpression were selected. As it is shown in figure 35A, flag tagged mLFG_L overexpression in neuroblastoma cells gives a product of the expected size, around 35 kDa.

Moreover, when cellular distribution was analyzed by immunocytochemistry, a spotted pattern compatible with a membrane associated protein was observed (Fig. 35B). Expression of caspase-8 and CD95 after INF γ exposure were analyzed and no differences between mLFG (SY-LFG) and SY-Neo cells were found (Fig. 35 C, D and E).

Next, effects of mLFG overexpression on cell death induced by CD95 was explored. Figure 36A shows cell death after treatment with soluble FasL (sFasL). SY-Neo and SY-LFG cells were treated with IFN γ for 48 h and then were changed to sFasL containing medium. LDH release assay was performed after 24 h treatment. SY-Neo cell death increased with the sFasL treatment while mLFG overexpressing SH-SY5Y cells showed resistance to sFasL induced cell death (Fig. 36A).

Since caspase-8 is an apical caspase activated in FasL induction of apoptosis, we further investigated whether LFG affects its activity. sFasL treatment induced transient activation of caspase-8 up to 2,3 fold induction in SY-Neo cells reaching maximum levels 9 h after treatment.

However, SY-LFG cells showed a reduced and delayed increase in caspase-8 activity (Fig. 36B). Taken together, these results indicate that soluble FasL induces SH-SY5Y cell death and that overexpression of mLFG leads to resistance to FasL induced apoptosis.

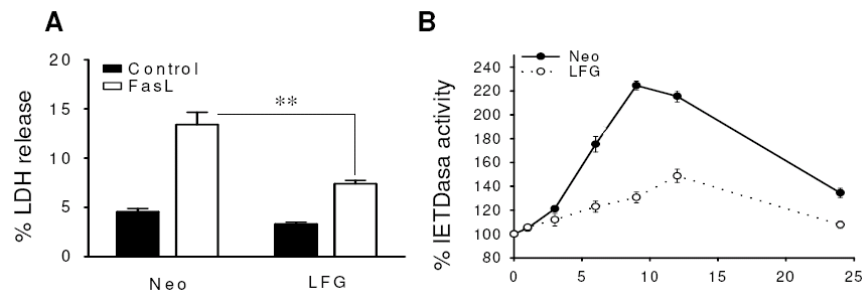


Figure 36. **A**, Twenty-four hours after sFasL treatment (100 ng/ml) SY-Neo cells showed an increase in the percentage of LDH release comparing to SY-LFG cells. **B**, caspase-8 activation after sFasL treatment was determined with the fluorescent peptide substrate Ac-IETD-AFC. Caspase-8 was activated in SY-Neo cells after FasL treatment and greatly reduced in mLFG overexpressing cells. ** indicates $p < 0.01$.

To ascertain whether or not mLFG has a similar effect on sFasL induced cell death in primary neurons, we repeated these experiments in embryonic cortical neurons, that had been reported to be sensitive to sFasL after six days *in vitro* (Zuliani C, *et al.*, 2005). E15 cortical neurons were plated and infected with empty vector containing Lentivirus (Lv-empty) or mLFG (Lv-mLFG). Both vectors contain green fluorescent protein (GFP) expression cassette downstream an internal ribosomal entry site (IRES). Neurons matured with no apparent differences between those infected with Lv-mLFG comparing to Lv-empty. After seven days *in vitro*, approximately 90% neurons were GFP positive, and they were treated with sFasL. Cell death was monitored after 48 h. Figure 37A shows that neurons expressing mLFG had a significant

reduction on percentage of LDH release, thus indicating a reduced cell death.

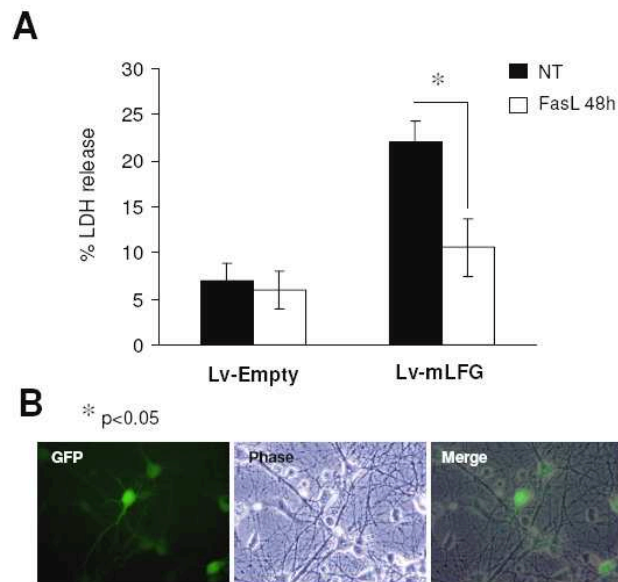


Figure 37. *mLFG protects mouse cortical neurons against FasL induced cell death. A*, E15 embryonic cortical neurons were infected with Lentivirus expressing either empty vector (Lv-empty) or *mLFG* (Lv-*mLFG*) for 7 days. Then, cells were treated with *sFasL* and LDH release assay was performed after 48 h. **B**, Representative micrographs of the infected culture at DIV7. * indicates $p < 0.05$

4.1.5 Antiapoptotic effects of *mLFG* are abolished by RNA interference.

In order to verify that the apoptotic effects of *mLFG* in SH-SY5Y cells were due to the specific overexpression of *LFG* we generated two RNA interference (RNAi) that targeted different sites of *mLFG* sequence to downregulate ectopic expression of *mLFG*. To analyze the efficacy of

the pSUPER-LFG-RNAi we transfected SY-LFG with different amounts of pSUPER-LFG-RNAi1, pSUPER-LFG-RNAi2 (data not shown) and a scrambled sequence in pSUPER-LFG-RNAiS. The expression of Flag-mLFG was measured after 72 h by western blot. As shown in figure 38A five micrograms of pSUPER-LFG-RNAi1 were enough to efficiently downregulate the ectopic expression of mLFG. Moreover, the downregulation of mLFG did not alter neither the levels of caspase-8 and CD95 induced by IFN γ (Fig. 38B) nor the sFasL induced cell death in SY-Neo (Fig. 38C).

However, the reduction of mLFG expression until undetectable levels by western blot abolished the protective effects of LFG. Treatment with sFasL induced LDH release in SY-LFG transfected cells with pSUPER-LFG-RNAi1 in a similar range to SY-Neo whereas pSUPER-LFG-RNAiS did not modify the resistance of SY-LFG (Fig. 38C and D).

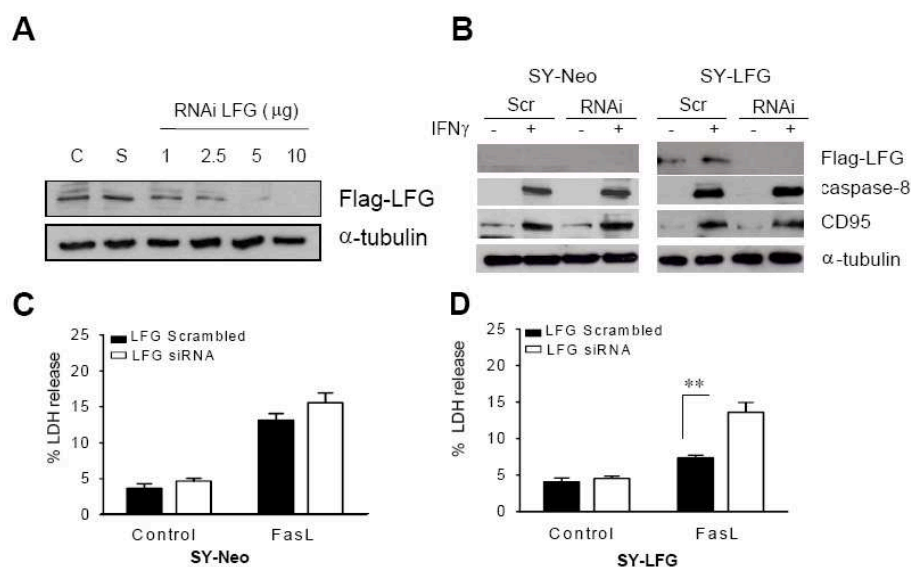
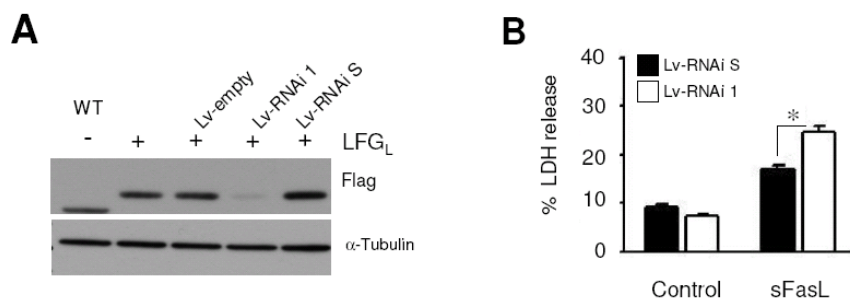


Figure 38. mLFG RNAi blocks protective effects of mLFG expression. **A**, Immunoblot of SY-LFG cells transfected with increasing amounts of pSUPER-RNAi for 72h. **B**, Analysis of caspase-8 and CD95 levels after downregulation of ectopic mLFG. **C**, LDH release assay in SY-Neo transfected with pSUPER-LFG-

RNAi. **D**, SY-LFG cells were transfected with pSUPER-LFG-RNAi 1/S, exposed to IFN γ for 48 h, and treated with sFasL for additional 24 h.

4.1.6 Endogenous LFG gives resistance to CD95 induced cell death in primary neurons

Neuronal sensitivity to CD95L during development and under pathological conditions has been studied so far, and appears to depend on cell population and state of differentiation. Thus, we wanted to analyze the role of endogenous LFG in embryonic cortical neurons, that are sensitive to CD95L, and in cerebellar granule neurons, that have been reported to be CD95 resistant. To test the effects of LFG-RNAi in primary neurons we generated Lentivirus constructs encoding the same RNAi sequence and promoter that pSUPER vectors. HEK293T cells



were transiently transfected with flag tagged mLFG and subsequently infected with Lentivirus carrying empty vector (Lv-empty), RNAi1 (Lv-RNAi1) and RNAi scrambled (Lv-RNAiS). The levels of flag-mLFG were tested 48 h post-infection and clearly demonstrate that Lv-RNAi downregulates ectopic expression of LFG efficiently (see fig. 39A).

Figure 39. A, Immunoblot anti-Flag to detect forced expression of mLFG after infection with lentivirus carrying the empty vector (Lv-empty), sequence RNAi1 (Lv-RNAi1) and scrambled sequence (Lv-RNAiS). **B**, E15 cortical neurons were

infected with *Lv-RNAi1* and *Lv-RNAiS* the day of plating. At DIV 7 cells were treated with sFasL at 100 ng/ml for 24 h. * indicates $p < 0,05$.

Cortical neurons after six days *in vitro* become sensitive to CD95L, despite the fact that they also express LFG. This fact indicates that LFG might not be the only responsible for maintaining the state of resistance. However, in figure 39 B we show that although sFasL induces LDH release in neurons infected with *Lv-RNAiS* (black bars), the blockade of endogenous mLFG expression increases the sensitivity of these neurons to sFasL (Fig. 39B white bars). Taken together these considerations, we can conclude that although the endogenous levels of mLFG are not enough to prevent CD95 induced cell death completely, LFG is affecting the apoptotic signal induced by CD95L.

Schweitzer *et al.* demonstrated that LFG is strongly upregulated during postnatal development (Schweitzer B, *et al.*, 1998) and one of the brain areas with high expression is the cerebellum (Somia NV, *et al.*, 1999). Then, we wanted to investigate the function of endogenous LFG in a previously reported resistant neuronal population, like cerebellar granule neurons (CGNs). At postnatal day 7, CGNs were plated and infected with Lentivirus containing vectors encoding for RNAi of specific sequence of mouse LFG (*Lv-RNAi 1*) and its scrambled sequence (*Lv-RNAi S*), with GFP as a reporter. Neuronal culture developed without any detectable abnormality. Infection efficiency was monitored by visual observation of GFP positive cells. At DIV 7, between 80 and 90% cells were GFP positive (Fig. 40A). Figure 40 B shows that CGNs express detectable levels of CD95 and caspase-8, indicating that these cells contain essential proteins for CD95 transduction signals. Moreover, CGNs express one of the most characterized CD95 antagonists, c-FLIP_L, but there is a reduction of its expression with days *in vitro*. Despite the c-FLIP_L decrease, CGNs are still resistant to CD95, indicating that it is not

the only antagonist responsible for CD95 resistance in this neuronal population. Next, we tested the effects of downregulating endogenous expression of LFG in CGNs sensitivity to CD95. The effectiveness of LFG RNAi is represented in figure 40C. Anti-LFG serum allowed us to detect endogenous expression of LFG in CGNs, probably due to the high levels of expression comparing to other neuronal populations or cell lines tested. The reduction of endogenous levels of LFG increased the sensitivity of CGNs to sFasL (Fig. 40 D) accompanied by an induction of caspase-8 activity. These results positioned LFG interference on CD95 signalling at the level or upstream caspase-8 activation.

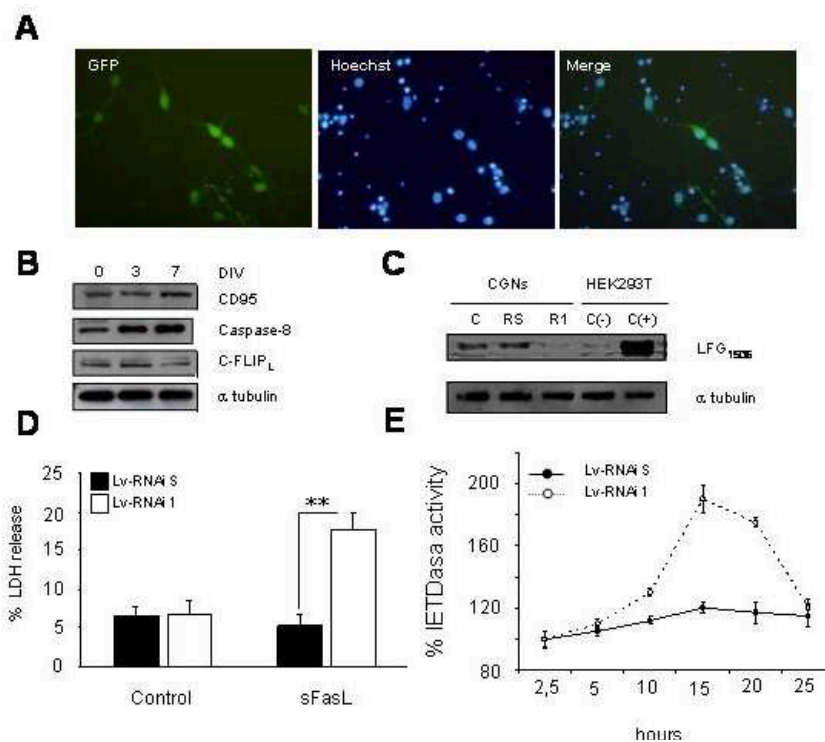
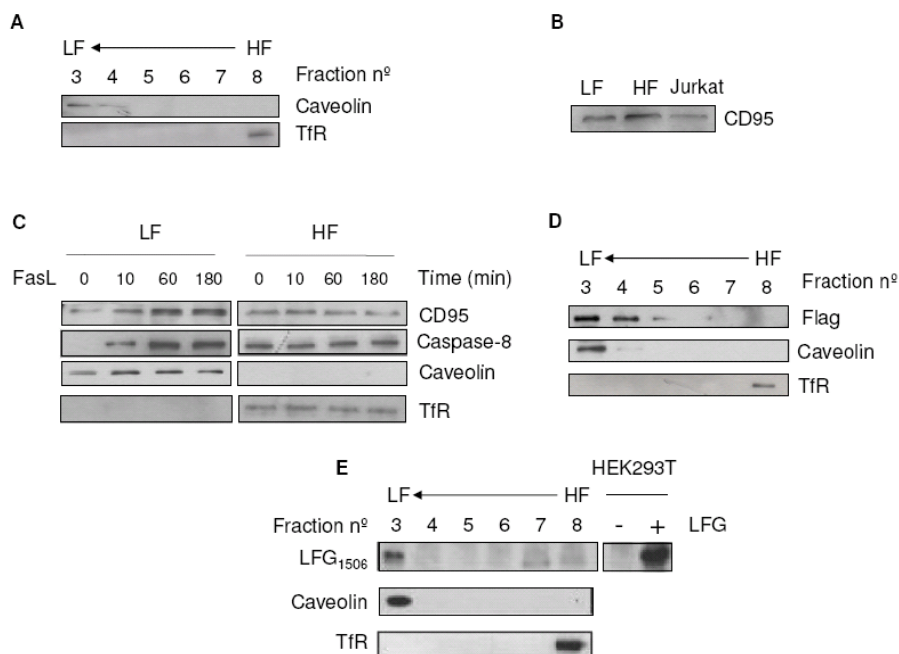


Figure 40. Knocking down LFG sensitizes CGNs to CD95 induced cell death. **A**, Representative micrographs of CGNs at DIV7 infected with lentivirus. **B**, expression of essential components of CD95 death signaling pathways during maturation of CGNs. **C**, Immunoblot anti-LFG to test the effectivity of LFG RNAi. Extracts of non infected (C), infected with scrambled (RS) and with RNAi 1 (R1) cells were loaded in a SDS-PAGE gel and blotted with anti-LFG serum. HEK293T non transfected (C-) or expressing mLFG (C+) were included as a control for molecular size. **D** and **E**, Infection with Lv-RNAi 1 alone did not alter

cell survival, whereas treatment with sFasL resulted in LDH release and caspase 8 activation. Infection with Lv-RNAi S had no such effect.

4.1.7 LFG antagonizes CD95 in the lipid rafts

Recent experimental evidences demonstrate that early CD95 signaling occurs primarily in lipid rafts which consistently appeared to be the major site of DISC formation and caspase-8 activation (Eramo A, *et al.*, 2004). Lipid rafts are distinct plasma membrane microdomains enriched in cholesterol and sphingolipids. As a consequence, upon



membrane solubilization by non-ionic detergents, like Triton X-100, at low temperatures (4 °C), rafts remain insoluble and float to low density following gradient ultracentrifugation (London E y Brown DA, 2000).

Figure 41. Distribution of CD95, caspase-8 and LFG in membrane microdomains. **A**, Caveolin and transferrin receptor (TfR) immunoblot analysis of Triton-X-100 soluble and insoluble cell fractions obtained from SH-SY5Y cells. **B**, CD95 immunoblot analysis of light fractions (LF), represented by fraction 3, and heavy fractions (HF) represented by fraction 8. Jurkat total cell lysate was added as a positive control for CD95 detection. **C**, Immunoblot analysis of light

and heavy fractions in SH-SY5Y cells stimulated with sFasL at the indicated time points. **D**, Analysis of flag tagged mLFG distribution in SY-LFG cells. **E**, Endogenous LFG immunoblot from soluble to insoluble fractions of P7 CGNs at DIV7. Right panel was loaded with HEK293T cell extracts with overexpression of LFG (+) or without LFG (-) as an internal control of the experiment.

To further investigate the molecular mechanisms of LFG function we analyzed the distribution of CD95, caspase-8 and LFG along the microdomains of plasma membrane. After OptiprepTM (idioxianol) gradient ultracentrifugation of cell lysates, detergent-resistant lipid rafts float to light density fractions (LF) because of their high lipid content, in contrast to the heavy density fractions (HF) with low lipid content. Caveolin was used as a marker of lipid rafts whereas transferrin receptor was used as exclusion marker. The transferrin receptor is a surface molecule that rapidly shuttles between the plasma membrane and endosomes and therefore has been used as a marker for endosomes and the non-raft fraction of the plasma membrane (Harder T, *et al.*, 1998).

In SH-SY5Y cells, immunoblot analysis performed on SDS-PAGE loaded with equal amounts of proteins for each sample showed that CD95 was equally distributed between light and heavy density fractions (Fig. 41 B). We next analyzed whether the distribution of CD95 was affected by receptor stimulation. We found that CD95 was concentrated into the light fractions after treatment with sFasL. Caspase-8 was predominantly in the heavy fractions, but was rapidly recruited to the insoluble fractions after CD95 engagement. Then, in SY-LFG cells the distribution of mLFG was analyzed. Unexpectedly LFG was mainly localized in light insoluble fractions (Fig. 41 D), indicating that the interaction between LFG and CD95 only takes place upon CD95 activation and concentration in rafts. To exclude the possibility that the localization of LFG was due to overexpressing effects, we analyzed the

distribution of endogenous LFG in CGNs. Confirming the previous results, LFG was specifically localized in the lighter fraction of the membrane (Fig. 41 E).

Taken all these results together we can conclude that LFG is mainly detectable in the raft fraction of plasma membrane where, when it is highly expressed, it is able to interact with CD95 and block caspase-8 activation. On the contrary, the absence of LFG in primary neurons allows CD95 induction of apoptotic cell death.

4.1.8 Two hybrid screening assay reveals possible regulators of LFG function

Two hybrid screening in yeast was performed by the BD MATCHMAKER Two-Hybrid System 3 to screen for proteins that associate directly with mLFG. The amino-terminal part of mLFG was cloned in-frame with the GAL4 DNA-binding domain (the bait plasmid). Screening was done using the adult mouse brain cDNA library, which is expressed as a fusion of GAL4 activation domain. After partial screening approximately 30 different cDNAs were isolated from yeast colonies with a positive interaction phenotype. These cDNAs are listed below:

<i>Nº</i>	<i>Name</i>	<i>Repet.</i>	<i>% of total</i>
1	Ubiquitin B	44	35.77
2	Ubiquitin A-52	18	14.63
3	Ribosomal protein S27a	9	7.32
4	Ubiquitin C	8	6.50
5	Ubiquilin 2	7	5.69
6	Tax 1 binding protein **	5	4.07
7	UBIN (Ubiquitin like protein)	3	2.44
8	TRAF and TNFR associated protein **	2	1.63
9	Clone rp23-114 Chsme 17	2	1.63
10	Ubiquitin associated domain	2	1.63
11	Ubiquilin 1	2	1.63

12	EGF pathway substrate	2	1.63
13	Splicing Factor SC35	2	1.63
14	Brain MY042 protein	1	0.81
15	Ancient Ubiquitous Protein	1	0.81
16	BAC clone RP24-322M5	1	0.81
17	Ring Finger protein 126	1	0.81
18	KIAA0312 protein	1	0.81
19	Hetero nuclear ribonucleoprot. A2/B1	1	0.81
20	Jun coactivator Jab1	1	0.81
21	BAC clone RP23-212H18 Cezanne 2	1	0.81
22	BAC clone RP23-198J15	1	0.81
23	Quinescin Q6-like 1 **	1	0.81
24	Epsin 1	1	0.81
25	MKK7 binding protein 2	1	0.81
26	Myelin proteolipid protein gene	1	0.81
27	Hypoth. Ubiquitin-associated protein	1	0.81
28	Similar to tyr kinase, non-receptor 2	1	0.81
29	GTP-binding protein (drg2)	1	0.81
30	Cox II	1	0.81
	TOTAL SCREENED CLONIES	123	100%

Table 6. List of cDNA after yeast colonies screening. Repet: Number of independent colonies that encoded the same protein. % of total: Percentage of the all colonies screened. ** Selected proteins of potential interest.

What we first noticed was that most of the cDNAs obtained were ubiquitin related proteins. Although it is known that ubiquitin is one of the major false positives found in two-hybrid systems, the high number of cDNA obtained did not allow us to discard a possible role in mLFG function. Ubiquitylation of proteins has emerged as one of the main regulatory mechanism in eukaryotic cells, and one of its principal roles is to regulate the half-life of proteins by targeting them for proteasomal regulation.

If several clones containing the same proteins are found, the redundancy of the interaction can be a clue for the relevance of

interaction. Using this criteria we selected some candidates of potential interest that are described below:

One of the most represented cDNAs obtained in this assay, non related to ubiquitin, encoded a portion of the mouse homologue for the human T-cell leukaemia virus type I (HTLV-I) Tax-binding protein (**TXBP151**). The biological role of TXBP151, that encodes a protein of approximately 86 kDa, is still not clear, but it has been reported to interact with the anti-apoptotic zinc finger protein A20. Moreover, transfection of antisense TXBP151 partially abolished the anti-apoptotic effect of A20.

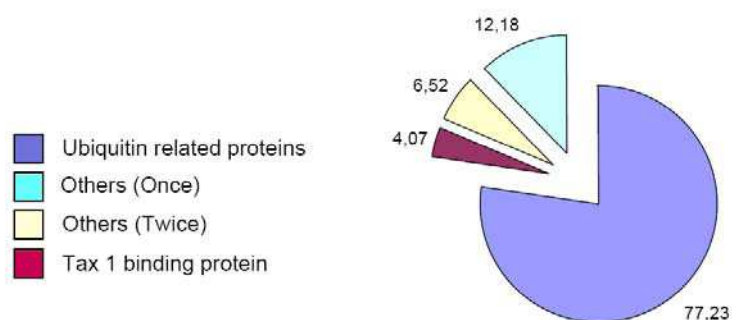


Figure 42. Schematic representation of the results obtained in the two-hybrid assay. **Blue** represents all the cDNAs encoding for ubiquitin related proteins. **Light blue** represents the cDNAs represented only once in the screening, and **light yellow** represents the percentage of cDNAs found twice. **Red** represents the percentage of Tax 1 binding protein, of which five independent clones were found in the assay.

Furthermore, apoptosis induced by $\text{TNF}\alpha$ or CD95 was associated with proteolysis of TXBP151 (De Valck D, *et al.*, 1999). TXBP151 is also named T6BP, because it is a TRAF6-interacting protein demonstrated to be involved in interleukin 1 signaling (Ling L y Goeddel DV, 2000). As

occurs in mLFG protein sequence, TXBP151 also contains a specific consensus sequence for binding 14-3-3 proteins, which might act as adaptors for proteins involved in TNF or CD95 signaling pathway.

TTRAP (TRAF and TNF receptor-associated protein) encoding cDNA was found twice in this partial screening. TTRAP has been reported to interact with CD30, CD40, TNFR1, as well as TRAFs 2, 3, 5 and 6. The binding properties of TTRAP resemble some of those described previously for the TRAFs and are indicative for a role of TTRAP in the signaling cascade induced by ligands of the TNF family (Pype S, *et al.*, 2000).

Another potential gene candidate to interact with mLFG is the Quinescin Q6-like 1, also known as **SOXN** (neuroblastoma-derived sulfhydryl oxidase). We found this gene represented only once in the screening, but we included it as a gene of potential interest due its role on apoptosis. The SOXN protein is predominantly located in the plasma and nuclear membrane, and it has been reported to be a major player in regulating the sensitization of neuroblastoma cells for IFN γ -induced apoptosis (Wittke I, *et al.*, 2003).

The interactions described above remain to be validated by additional biological experiments that are in progress.

4.2 THE LONG FORM OF FAIM IS REGULATED DURING BRAIN DEVELOPMENT AND PROTECTS NEURONS AGAINST DEATH RECEPTOR INDUCED CELL DEATH.

Fas apoptosis inhibitory molecule (FAIM) is a protein identified in 1999 as an antagonist of Fas/CD95 induced cell death. Two years later, an alternative spliced form was reported. The new form of FAIM was 22 aminoacids longer at the N-terminus part of the protein, and that is why it was called FAIM long (FAIM_L). Whereas FAIM_S is widely expressed in many tissues, FAIM_L is dominantly expressed in nervous system. Recent work in our laboratory demonstrated that FAIM_S is highly conserved among multiple animal phyla. FAIM_L is also highly conserved but only in superior vertebrates (See Fig. 43A).

A

```

R. norvegicus 1 MASGDDSPIFEDDESPLCSLEKMTD VAVWDVALSDGVHRIEPEHGITSGRRVYVDGKE
M. musculus 1 MASGDDSPIFEDDESPLYSLKMTD VAVWDVALSDGVHRIEPEHGITSGRRVYVDGKE
H. sapiens 1 MASGDDSPIFEDDESPPYSLEKMTD VAVWDVALSDGVHRIEPEHGITSGRRVYVDGKE
G. gallus 1 -----MTD VAVWEVALSDGVHRIEPEHGITSGRRVYVDGKE
D. rerio 1 -----MSGD VAWDVALSDGVHRIEPEHGITSGRRVYVDGKE
C. elegans 1 -----MPEGD VAWVPLHAQVHRIEPEHGITSGRRVIRLDQNV
D. melanogaster 1 -----MTQDH VEDQRYNKQNIYRIEPEHGITSGRRVIRLDQNV

R. norvegicus 61 EIRREWMFKLVGKETEYVGAAKTATINIDAVSGFAYEYILEIDGKSLKKYMNRSSTTN
M. musculus 61 EIRREWMFKLVGKETEYVGAAKTATINIDAVSGFAYEYILEIDGKSLKKYMNRSSTTS
H. sapiens 61 EIRREWMFKLVGKETEYVGAAKTATINIDAVSGFAYEYILEIDGKSLKKYMNDRSSTTN
G. gallus 39 IIRKEWMFKLVGKETEYVGVSKTATINIDAVSGFAYEYILEIDGKSLKKYMNRSSTTN
D. rerio 40 VLRDWMFKLVGKETEYVGTDAATITIBAITGFAYEYILEIDGKSLQTLNRSRISK
C. elegans 41 IIRRDWMFKLVGKETAERVG--DMKCIINVBALGTFAYEYSLDNGKIFNKFKBEQNRRLH
D. melanogaster 41 VLRDWMFKLVGKETEHRID--QTSCTIRVDPAPGFRYEYSLYIDGKSHDQYEDMTNQRV

R. norvegicus 121 TWVLHLDGEELR----VVLEKTTMDVWQNGQRMETAGEFVDDGTEHFSVGNHDCYIKR
M. musculus 121 TWVLRLDGEDLR----VVLEKTTMDVWQNGQKMETAGEFVDDGTEHFSVGNHGDCYIKR
H. sapiens 121 TWVLRHMDGENFR----IVLEKTAEDVWQNGKLETAGEFVDDGTEHFSVGNHDCYIKR
G. gallus 99 TWVLSLGCTDYR----VVLEKTTMDVWQNGEKMETAGEFVDDGTEHFSVGDHDCYIKR
D. rerio 100 TWVMKLDGADY-----LEKTTMDVWQNGQKMETAGEFVDDGTEHFTLGDHDCYIKR
C. elegans 99 SWETTLSSHQWR----VVLDKSMETWANGNNDTAGEFVDNGTHTHFLGKNPCKYIA
D. melanogaster 99 LWLYTDDAARDAPQEYRIMKLETSLVYVNDLRLTEESVFWHGTEHFLQDTEFVLCR

R. norvegicus 176 VSSGKRREGIHTLIVDNREIPELTQ-----
M. musculus 176 VSSGKRREGIHTLIVDNREIPELTQ-----
H. sapiens 176 VSSGKRREGIHTLIVDNREIPEIAS-----
G. gallus 154 VSSGKRREGIHTLIVDDREIPEAVE-----
D. rerio 152 VSSGKRREGIHTLLVDGMEIPEAE-----
C. elegans 154 QSSGKKRTGHTLYVNGEIVPSTVDKPNPSNQPSS----
D. melanogaster 159 RSSGNKHGILVHTLLANGVAVPEAKIQEIMQEPVSIQSSN

```

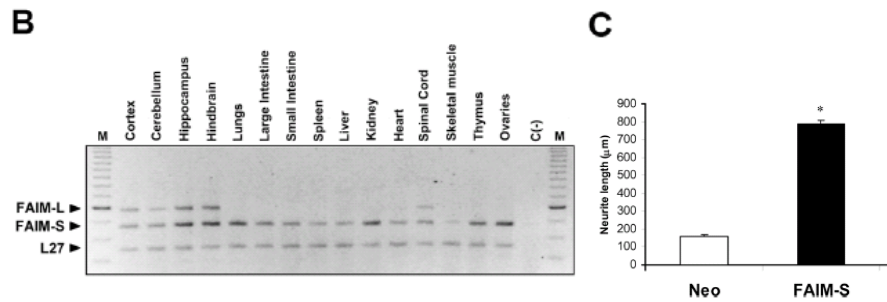


Figure 43. Role of FAIM_S in nervous system. **A**, Comparison of FAIM protein sequences from rat, mouse, human, *C. elegans*, *D. melanogaster*, *G. gallus* and *D. rerio*. Identical aminoacids are shaded in black, and those with conservative changes in grey. The extra 22 aminoacids of the long form are underlined. **B**, Semi-quantitative RT-PCR quantification of FAIM_S and FAIM_L expression in different rat tissues. **C**, Neurite length measurements of PC12 cells treated with NGF (100 ng/ml) for 1 day (Sole C, et al., 2004).

We also reported that FAIM_S overexpression greatly enhanced neurite outgrowth in PC12 cells, in contrast with its established role in modulating CD95 signaling and regulating cell survival in the immune system (Fig. 43C).

4.2.1 Characterization of anti-FAIM_L antibodies

Since the differential sequence between FAIM_S and FAIM_L are only 22 aminoacids from de N-terminus part of the protein, a sequence of 16 of the different 22 aminoacids was selected as an antigen peptide. Several antipeptide polyclonal antibodies were obtained after rabbit immunization, and two of them were selected for the present study.

To demonstrate antibody specificity, we analyzed tissue lysates of brain (positive control) and tissue lysates of liver (used as a negative control). Both antibodies recognized the same immunoreactive band only in brain lysates with an apparent molecular weight of 23 kDa on Western blot (Fig. 43B). It was further confirmed that the 23 kDa band corresponded to FAIM_L by an immunoblot experiment using transient

transfection of increasing amounts of N-terminally flag-tagged FAIM_L in HEK293T cells. The same samples were loaded onto two different SDS-PAGE gels and one of them was blotted with anti-Flag and the other with anti-FAIM_L. Both antibodies recognized the same band with increasing intensities corresponding to increasing amounts of DNA transfected.

Moreover, we wanted to analyze whether anti-FAIM_L antibodies were able to detect the protein in non-denaturing conditions. For this purpose, we synthesized FAIM_L using an *in vitro* transcription and translation system. Two different amounts of reticulocyte suspension were subjected to immunoprecipitation using anti-FAIM_L antibody. Immunoprecipitates were resolved on SDS-PAGE gels and blotted with anti-Flag.

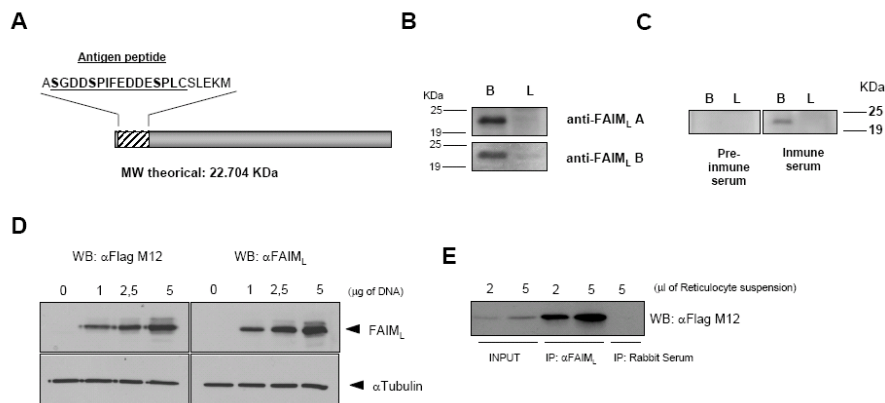


Figure 44. Characterization of anti-FAIM_L antibodies. **A**, schematic representation of FAIM_L protein. White and black regions represent differential aminoacids respect to FAIM_S. Aminoacids corresponding to antigen peptide are underlined. **B**, immunoblot of brain and liver lysates with two antipeptide generated antibodies. **C**, Specificity of antisera was determined by comparisons of immune and preimmune serum. **D**, HEK293T cells were transfected with different amounts of cDNA encoding flag-tagged FAIM_L. Cell extracts were prepared 1 day later and subjected to SDS/PAGE immunoblot analysis, comparing anti-flag antibody (left panel) and anti-FAIM_L antibody (right panel). **E**, *In vitro* translated flag-FAIM_L was immunoprecipitated with polyclonal anti-FAIM_L and non relevant rabbit anti-serum. Immunoblot analysis anti-Flag was performed.

Figure 44 D shows that anti-FAIM_L antibodies were able to immunoprecipitate FAIM_L while no signal was detected using another rabbit immune serum.

4.2.2 FAIM_L is predominantly expressed in the nervous system

The anti-FAIM_L antiserum was used to analyze protein expression in different tissues by Western blot. An immunoreactive band of approximately 23 kDa was detected in lysates from different regions of the adult brain; the highest signal was found in hippocampus and spinal cord, it was low in cortex and barely detectable in cerebellum. No band was detected in heart, skeletal muscle, kidney, liver or lung (Fig. 45). The tissue distribution of the protein confirms the pattern of FAIM_L expression predicted by RT-PCR (Fig. 43B).

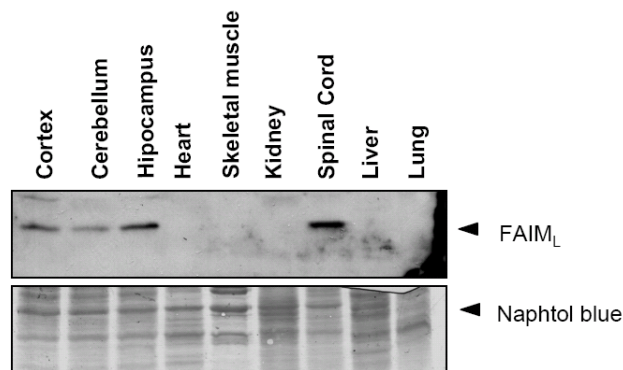


Figure 45. Expression of FAIM_L in different tissues. Immunoblot analysis of FAIM_L in mouse adult tissues (upper panel). As a protein loading control, the membrane was stained with naphthol blue (bottom panel).

To characterize the localization of FAIM_L during development of the central nervous system we performed immunohistochemistry using the FAIM_L specific antibody. FAIM_L was found in most brain regions. Higher levels of staining were detected in the telencephalon (cerebral cortex and hippocampus) and in the cerebellum.

Some brain regions such as the thalamus, the septum, the caudate putamen and globus pallidus showed FAIM_L-immunostaining. No expression of FAIM_L was found in axonal tracts in any regions of the brain or cerebellum (not shown).

In the embryonic cerebral cortex, labelled cells were located in the cortical plate (CP) and in the subplate (SP), probably corresponding to post-mitotic neurons in these layers (Fig. 46A). At P0 cortical plate neurons maintained FAIM_L expression, and in addition some FAIM_L-positive cells were found in the early cortical layer V (Fig. 46B). At P5, the soma and dendrites of layer V cortical neurons presented high FAIM_L-immunostaining (Fig. 46C). During all postnatal stages and in adults, many cortical neurons, mainly in layer V and II-III, showed FAIM_L-immunolabeling (fig. 46D,E).

In the embryonic hippocampus, cells in the hippocampal plate expressed FAIM_L (not shown). At postnatal stages, pyramidal neurons in CA1-3 and some interneurons through all hippocampal layers expressed FAIM_L. A weak staining was found in the granular neurons of the dentate gyrus (Fig. 46F-H). The immunoreactivity in the hippocampal interneurons was not restricted to the somatic region. The initial part of the dendrites also presented FAIM_L immunostaining. The distribution of FAIM_L-positive cells in the hippocampus was maintained in the adulthood (not shown).

The cerebellum also showed an intense FAIM_L-immunolabeling. FAIM_L was present in migratory Purkinje cells in the embryonic cerebellum (not shown). At early postnatal stages (P5), the soma of the Purkinje neurons expressed high levels of FAIM_L, and the Purkinje cells dendrites also presented an intense FAIM_L-immunostaining which

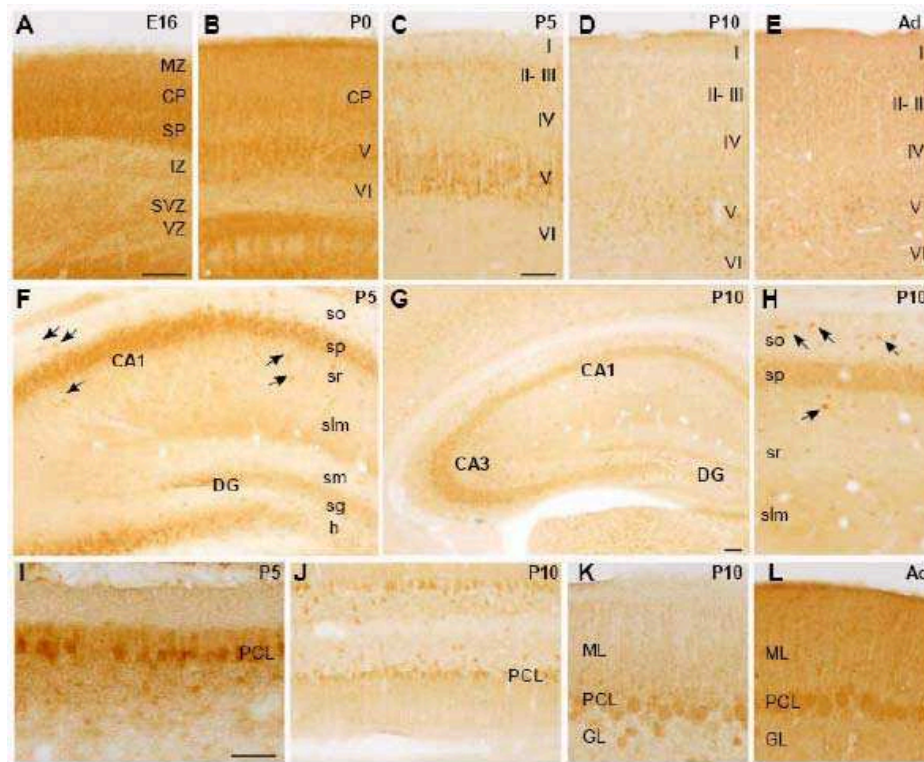


Figure 46. Distribution of FAIM_L-immunoreactive cells during the development of mice brain. **A-E**, in the cortex many neuronal cell bodies show immunohistochemical labelling. **A**, at E16 neurons in the cortical plate (CP) and subplate (SP) contain FAIM_L. **B**, at P0, some neurons in the incipient layer V are FAIM_L-positive cells. In postnatal stages many neuronal cell bodies and dendrites present FAIM_L-immunolabelling, mainly in layer V (arrows in C). **F-H**, in the hippocampus many pyramidal neurons and hippocampal interneurons express FAIM_L, granular neurons in the dentate gyrus (DG) present weak immunostaining. Some hippocampal interneurons scattered through the whole hippocampal layer show a strong immunostaining signal (arrows in F and H). **I-L**, in the cerebellum, the soma and dendrites of Purkinje cells show immunohistochemical staining at all postnatal stages analyzed. Also some interneurons located in the granular layer (GL) express FAIM_L (arrows in J). MZ, marginal zone; IZ, intermediate zone; SVZ, subventricular zone; VZ, ventricular zone; CA1-CA3 hippocampal fields; so, stratum oriens; sp, stratum pyramidale; sr, stratum radiatum; slm, stratum lacunosum-moleculare; sm, stratum moleculare; sg, stratum granulosum; h, hilus; ML, molecular layer; PCL, Purkinje cell layer. Scale bar in A, 100 μm (also applies to B, F, J, H); in C, 100 μm (also applies to D, E); in G, 100 μm; and in I, 100 μm (also applies to K, L).

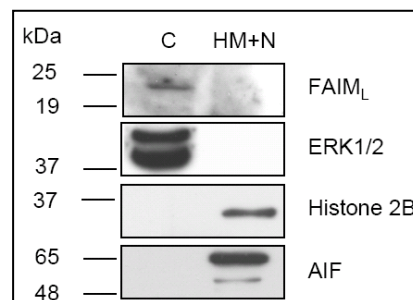
occupied the incipient molecular layer (Fig. 46I). In addition, at P5 and P10 some interneurons located in the early internal granular layer were positive for FAIM_L-immunostaining (Fig. 46J,K). Purkinje neurons and some cerebellar interneurons maintained the FAIM_L expression at posterior stages and also at adulthood (Fig. 46 J-L).

Considering the data we can conclude that FAIM_L is mainly expressed in neurons, both in soma and dendrites. The highest signal intensities were observed in mature neurons of early postnatal stages. The strongest staining was observed in pyramidal neurons of cortical layers II-III and V, pyramidal neurons of CA1-3 regions in hippocampus and Purkinje neurons in the cerebellum.

4.2.3 Intracellular distribution of FAIM_L in neurons

Since immunohistochemistry showed a diffuse cytosolic pattern, we examined the subcellular localization of FAIM_L to rule out the possibility that the protein could also be located in other cell compartments. Thus, PC12 cells were lysed in hypotonic buffer and separated by centrifugation into two subcellular fractions, one containing only cytosolic proteins (C) and the other containing heavy membranes (HM) and nuclei (N).

Figure 47. Subcellular expression of FAIM_L. PC12 cells were lysed in a hypotonic solution, and two crude subcellular fractions were prepared. Equivalent proportions of each fraction were subjected to SDS/PAGE immunoblot analysis using antibodies specific for FAIM_L, pan-ERK (cytosolic marker), Histone H1 (nuclear marker) and AIF (mitochondria marker).



As determined by immunoblot analysis, FAIM_L was detected in the pure cytosolic fraction as well as the cytosolic proteins ERK1/2. The signal was not detected in the non-cytosolic fraction that includes membranes, mitochondria and nuclei. Reprobing the same blots with antibodies against mitochondrial (AIF), cytosolic (ERK1/2) and nuclear (Histone H1) proteins validated the fractionation procedure.

To further confirm the staining pattern observed in immunohistochemistry we performed an immunofluorescence staining of cortical neurons forced to transient expression of flag-tagged FAIM_L. Confocal microscopy corroborated a diffuse cytosolic staining in the soma excluding the nucleus. Neurite arbours were also positive.

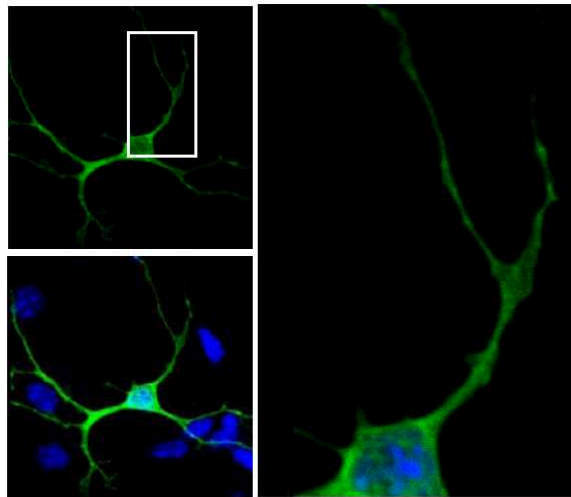


Figure 48. Subcellular distribution of FAIM_L. Confocal microscopy (x60) of E15 cortical cells transfected with flag-FAIM_L and immunofluorescence with anti-Flag coupled to a secondary anti-mouse conjugated to FITC.

We therefore conclude that FAIM_L is in the cytosol, based on computational prediction, subcellular fractionation studies and confocal immunofluorescence microscopy.

4.2.4 FAIM_L is upregulated during development

To examine whether FAIM_L expression is regulated during ontogenesis, immunoblots were performed with cortical tissue lysates of mouse brains from different ages. FAIM_L was barely detectable at embryonic day 12. A moderate increase was detected from day 15 and maximum signal was detected at day 18. Then, FAIM_L levels were stabilized in the early postnatal stages.

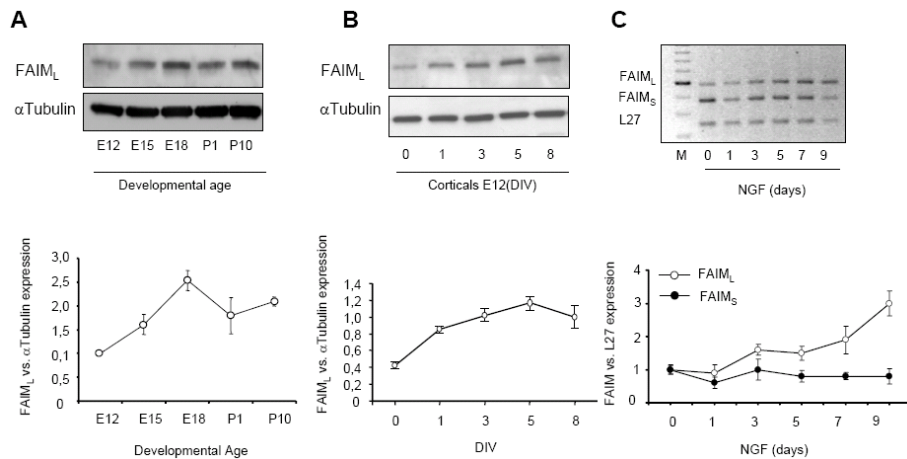


Figure 49. Developmental regulation of FAIM_L expression in nervous system. **A**, The temporal profile of FAIM_L expression at the indicated developmental stages. Cortical brain lysates of different embryos were processed and immunoblot anti FAIM_L was performed. α Tubulin was used as an internal control. Lower panel shows quantification of two independent experiments. **B**, immunoblot of FAIM_L expression in E12 embryonic cortical neurons at the indicated time points. Lower panel represents quantification of three different experiments. **C**, FAIM mRNA expression during NGF differentiation in PC12 cells was assessed using RT-PCR and compared with L27 housekeeping gene, shown as relative data. Graph is one representative of three independent experiments.

In order to know whether FAIM_L is more expressed in mature cells, levels of the protein were analyzed in cultured cortical neurons. The FAIM_L signal was low at day 0 (few hours after plating), but increased by three times with time in culture (See fig. 49B). Moreover, expression levels detected by RT-PCR during NGF induced differentiation in PC12 cells, showed an increase in FAIM_L expression up to 3-fold comparing with

proliferating control levels. Furthermore, levels of FAIM_S were not altered during PC12 differentiation, reinforcing the hypothesis that both isoforms could play different roles in the nervous system. Altogether, these data suggest that the degree of cell maturation influences the level of FAIM_L.

4.2.5 FAIM_L NGF induced upregulation is mediated by ERK/MAPK pathway

NGF is a member of the neurotrophin family of trophic factors that have been reported to be essential for the survival and development of sympathetic neurons and a subset of sensory neurons. NGF exerts its effects mainly by the interaction with the specific receptor Trk A, which leads to the activation of several intracellular-signaling pathways related to cell survival and differentiation (Chao MV, 2003).

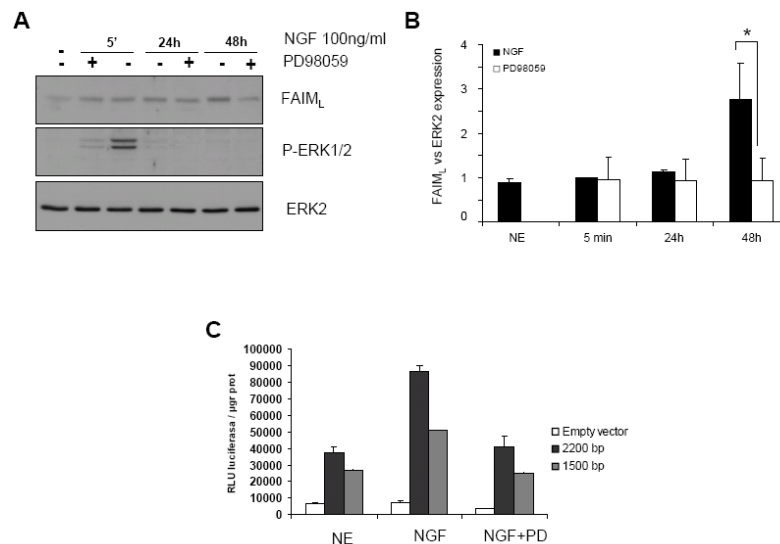


Figure 50. FAIM promoter activity regulated by ERK/MAPK in PC12 cells. **A**, immunoblot analysis of FAIM_L levels after NGF exposure with (+) or without (-) MEK1 inhibitor PD98059 50 μ M. P-ERK1/2 immunoblot was performed to control the effect of NGF and PD98059. **B**, histogram shows the quantification of FAIM_L levels of three independent experiments. * indicates $p < 0.05$. **C**, cells were transfected with reporter constructs, pGL3 (empty vector), pGL3-2200bp and pGL3-1500bp and incubated as indicated (100 ng/ml NGF, 50 μ M PD98059). Reporter gene activities were measured 48h after transfection and 24h after treatment.

One of these pathways is the cascade of kinases of the extracellular-regulated kinase (ERK) mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway. The first kinase in the cascade is the serine-threonine kinase Raf, which phosphorylates and activates MAP/ERK kinase 1 (MEK1) and MEK2, which, in turn, phosphorylate and activate ERK1 and ERK2. ERK proteins translocate to the nucleus where they can phosphorylate transcription factors that regulate gene expression.

Since FAIM_L was upregulated in response to NFG, we wanted to investigate whether ERK/MAPK pathway was involved. According to results observed in figure 49C, NGF treatment in PC12 cells induces upregulation of FAIM_L, not only the transcript but also the protein, up to 2-3 fold increase comparing with proliferating cells. Treatment with MEK inhibitor PD98059 blocked the increase of FAIM_L after NGF exposure, thus indicating that the ERK/MAPK pathway is responsible for FAIM_L induction.

To further investigate the regulation of FAIM_L transcription, we cloned the rat FAIM promoter into the luciferase reporter plasmid pGL3-basic (Promega). Two different constructs were generated, one containing the full promoter, 2200 bp upstream ATG, and the other containing the immediately 1500 bp upstream Exon I. There was a marked activation of the two FAIM_L reporter plasmids in PC12 cells without stimulation, probably due to the fact that PC12 cells express FAIM. Treatment with NGF, an activator of the ERK/MAPK pathway, further increased luciferase signal. After incubation with MEK1 inhibitor PD98059, the activity of FAIM promoter was reduced close to background levels, suggesting that the ERK/MAPK dependent signaling pathway is the main activator of FAIM_L transcription in PC12 cells.

4.2.6 *FAIM_L* does not have the same effects as *FAIM_S* in nervous system

Previous work of our laboratory demonstrated that *FAIM_S* overexpression caused an increase in neurite length induced by NGF, both in PC12 cells and in SCG neurons. Nonetheless, reduction of endogenous *FAIM_S* by RNAi significantly decreased NGF-stimulated neurite outgrowth from PC12 cells and SCG neurons. By contrast, when forced expression of *FAIM_L* was tested in the same assays, no enhanced neurite outgrowth was observed (data not shown). However, the effects of endogenous *FAIM_L* were not monitored and the possibility that *FAIM_L* is necessary for neurite formation was not ruled out. For this purpose, we generated a specific RNAi that targets different sites of *FAIM* sequence, and that could knock down specifically *FAIM_L* or both splicing isoforms.

RNAi n° 1 (R1), that was designed at the differential sequence between isoforms, efficiently downregulated *FAIM_L* as it is shown in figure 51B. RNAi n° 2 was targeted to 19 nucleotides after differential sequence of the *FAIM_L* and also efficiently knocked down endogenous *FAIM_L*. Since part of coding sequence in *FAIM_L* serves as a part of the 5' untranslated region of *FAIM_S* we further investigated whether the RNAi against *FAIM_L* was able to modify *FAIM_S* expression. In figure 51C it is shown that R1 did not affect forced expression of flag-*FAIM_S* in PC12 cells while flag-*FAIM_L* was strongly reduced. R2 completely abolished expression of *FAIM_L* and *FAIM_S*. Thus, we have developed a powerful RNAi that will allow us to discriminate between endogenous functions of *FAIM_S* and *FAIM_L*.

The next step was to investigate if endogenous *FAIM_L* was required for NGF-induced neurite outgrowth. To analyze the effect of RNAi on neurite length, PC12 cells were infected with lentivirus carrying the

vectors encoding for the different RNAi. After 72 h, the cells were treated with NGF (100 ng/ml) plus 0,5% HS for 1 d, after which random pictures were taken and neurite length was measured. PC12 cells transduced with scrambled RNAi sequence developed neurite arbours identical to non-infected (NI) cells, indicating that lentiviral infection does not affect NGF-induced neurite outgrowth.

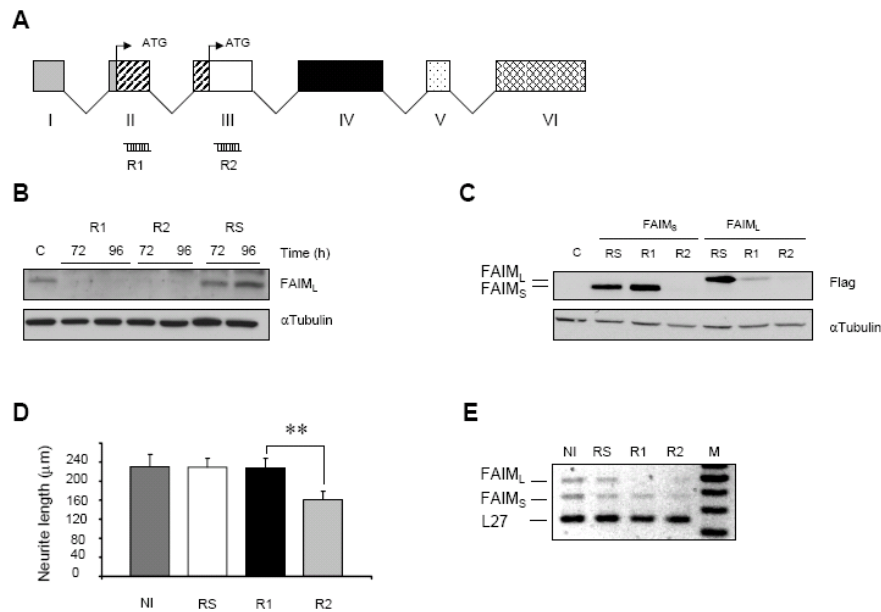


Figure 51. FAIM_L is dispensable for NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells. **A**, Genomic structure of FAIM locus. Positions for the different RNAi are indicated, R1 is sequence specific for FAIM_L and R2 is in shared sequence. **B**, PC12 cells were infected with R1, R2, and RS (scrambled) for the indicated times and the effects on FAIM_L expression were analyzed by Western blot with anti-FAIM_L. **C**, Analysis of R1, R2 and RS on transiently transfected PC12 cells with flag-FAIM_S and flag-FAIM_L. PC12 cells were transfected with flag-tagged sequences of FAIM and immediately infected with lentivirus encoding RNAi sequences. Extracts were collected after 48 post-infection. **D**, PC12 cells were infected with lentivirus for 72 h and then treated with NGF (100ng/ml) for 1 d. Histogram shows the neurite length measurements of the labelled and digitally acquired cultures infected with the indicated RNAi. **E**, RT-PCR showing effects of RNAi on FAIM_S and FAIM_L transcripts levels. Ni: Non-infected. ** indicates $p < 0.01$

Moreover, PC12 cells infected with R1, specific for FAIM_L, developed normal neurites indistinguishable from NI or RS infected cells. As expected, PC12 cells infected with R2, that knocks down FAIM_L and FAIM_S, produced a 29,14% significant decrease in total neurite length compared with R1 infected cells. The decrease in neurite outgrowth with the RNAi construct correlates with the level of FAIM_S transcript but not with the levels of FAIM_L, demonstrating that FAIM_L does not play a role in regulating neurite outgrowth in NGF-stimulated PC12 cells (Fig. 51D).

4.2.7 FAIM_L protects neuronal cells against death receptor induced cell death

Because FAIM_S was initially cloned as an antagonist of CD95/Fas, we wanted to ascertain if FAIM_L had similar antiapoptotic effects in neuronal cells. We first treated PC12 cells stably transfected with FAIM_L with staurosporine (STP), an inducer of intrinsic apoptotic pathway. We observed no differences between empty vector stably transfected PC12 cells (Neo) and those expressing FAIM_L after a wide range of STP doses.

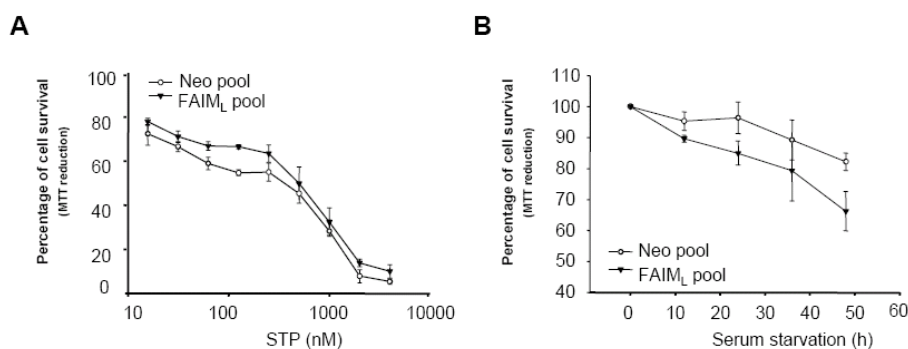


Figure 52. FAIM_L does not affect intrinsic apoptotic pathway. PC12 cells were stably transfected with empty vector (Neo) or FAIM_L. Pools of transfectants were treated with **A**, staurosporine (STP) from 10 nM to 5 μ M during 24 h or **B**, serum starved for the indicated times. Cell survival was measured with the MTT reduction assay and expressed as a percentage of non treated cells.

To further confirm the effects of FAIM_L on mitochondrial involved apoptosis we subjected the Neo and FAIM_L overexpressing PC12 cells to serum deprivation, another type of stimulus thought to operate primarily through the mitochondrial death pathway. Again, forced expression of FAIM_L did not significantly alter PC12 cell death induced by serum deprivation.

Then, we tested the extrinsic pathway that is normally induced by activation of death receptors. PC12 cells are not sensitive to death receptor induced cell death, and Actinomycin D (ActD) was used to increase the sensitivity of PC12 to death ligands such as sFasL or TNF α . Cell viability after sFasL or TNF α was determined by direct counting condensed nuclei after Hoechst staining. Uniformly stained nuclei were scored as healthy, viable cells, while condensed or fragmented nuclei were scored as apoptotic.

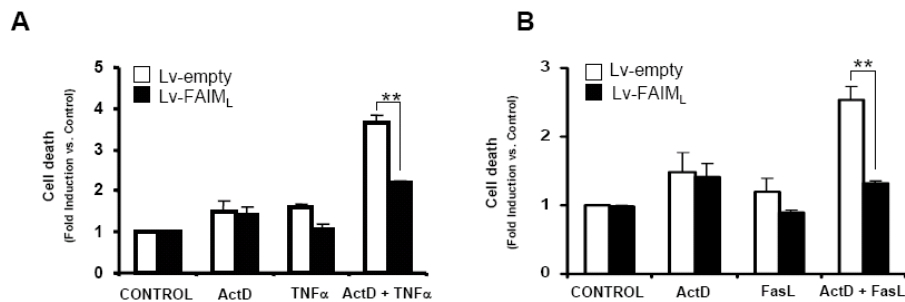


Figure 53. FAIM_L overexpression protects PC12 cells from death receptor induced cell death. Cell death was measured by counting condensed nuclei after Hoechst staining. PC12 cells were infected with lentivirus carrying empty vector (Lv-empty) or FAIM_L (Lv-FAIM_L) for 72 h and then they were treated in **A**, with TNF α (100ng/ml) for additional 24 h or in **B**, with sFasL (100 ng/ml) for 24 h, alone and in combination with ActD. Data are shown as normalized to respective controls (n=3). ** indicates $p < 0,01$.

According to previously reported data, sFasL (Wu S, *et al.*, 2004) or TNF α (Mielke K y Herdegen T, 2002) alone did not induced cell death in PC12 cells whereas combined with ActD induced 13% \pm 1,5 of cell death for sFasL and 20% \pm 0.96 for TNF α . After both treatments, FAIM_L vector infected PC12 cells showed resistance compared to control vector infected cells (See fig. 53).

Next, we tested if neuron-like PC12 cells could be sensitized to apoptosis by downregulating endogenous FAIM_L expression using RNAi. PC12 cells transiently infected with FAIM_L acquired sensitivity to TNF α alone induced cell death. In contrast, PC12 cells infected with the scrambled RNAi were still resistant to TNF α (Fig. 54A).

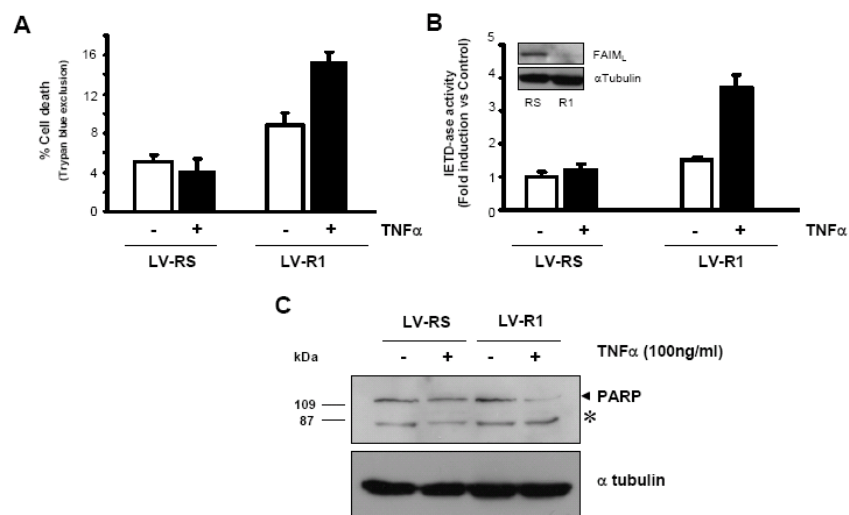


Figure 54. Endogenous FAIM_L protects PC12 cells against TNF α induced cell death. **A,B** PC12 cells were infected with Lv-RS or Lv-R1 for 72h and then were treated with TNF α 100ng/ml for additional 24 h. Left graph shows percentage of cell death measured by trypan blue exclusion assay. Right panel represents IETD-ase activity of cell lysates after 24 h of treatment with TNF α . Data are normalized to non-treated scrambled infected cells. **C**, Same lysates were subjected to SDS/PAGE immunoblot analysis to detect PARP, a protein cleaved by executor caspases. * Unspecific band.

To investigate the mechanism of prevention of TNF α mediated apoptosis by FAIM_L in PC12 cells, we studied the role of caspases. Because caspase-8 has been defined as an apical caspase in both TNF α and CD95 induced cell death, the cleavage of the fluorescent peptide substrate AC-IETD-AFC specific for caspase-8 was measured. Caspase-8 activity increased after TNF α treatment in FAIM_L knocked down PC12 cells while no activity was detected in scrambled infected cells. Furthermore, caspase-8 activity was transduced in cleavage of the executor caspase substrate PARP, indicating a complete caspase cascade activation. These data suggest that FAIM_L is blocking death receptor induced apoptosis at the level or upstream caspase-8 activation.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1 LIFEGUARD CONFIERE RESISTENCIA A LAS NEURONAS DE LA MUERTE MEDIADA POR EL RECEPTOR CD95/Fas/APO-1 A TRAVÉS DE UN MECANISMO DEPENDIENTE DE SU LOCALIZACIÓN EN LIPID RAFTS.

Han quedado atrás los días en que se creía que la función de los receptores de muerte se centraba en el sistema inmune, donde existe una mejor y más amplia caracterización. Sin embargo, los receptores de muerte se expresan en multitud de tejidos, entre ellos, el sistema nervioso. De entre todos los receptores de muerte pertenecientes a la superfamilia del receptor de TNF, CD95/Fas/Apo-1 ha sido uno de los más y mejor estudiados. Su relevancia funcional en sistema nervioso aún no ha sido ampliamente caracterizada, pero parece ser que sus funciones van más allá de la inducción de muerte. De hecho, los resultados más esclarecedores respecto a su función apuntan a que pueda ser responsable del modelado neuritogénico. Prueba de ello es que los ratones transgénicos para el receptor (*lpr*) o para el ligando (*gld*) se desarrollan casi con toda normalidad en lo que se refiere a sistema nervioso, a excepción de defectos de comportamiento o bien de reducción de la arborización neurítica de determinadas poblaciones neuronales (Desbarats J, *et al.*, 2003, Zuliani C, *et al.*, 2005). El hecho de que ratones nulos para otras proteínas proapoptóticas de la misma vía inductora de muerte, como la caspasa-8 o FADD, presenten un fenotipo letal embrionario debido, entre otras cosas, a malformaciones cardíacas (Varfolomeev EE, *et al.*, 1998, Yeh WC, *et al.*, 1998), refuerza la teoría de que CD95 no ejerce una función proapoptótica en el desarrollo del sistema nervioso, o bien que su déficit como inductor de muerte está contrareestado por la acción de otros receptores de muerte.

Los resultados observados en el caso de patologías del sistema nervioso apoyan la teoría de que los receptores de muerte presentan también una dualidad funcional. En determinados casos, su déficit puede mitigar respuestas inflamatorias tras procesos traumáticos (Demjen D, *et al.*, 2004, Martin-Villalba A, *et al.*, 1999, Wildbaum G, *et al.*, 2000) o neurodegenerativos (Bamberger ME y Landreth GE, 2002, Combs CK, *et al.*, 2001, Chen Z, *et al.*, 2005, Sriram K, *et al.*, 2002). Pero por otra parte, su ausencia puede exacerbar la muerte neuronal en determinadas enfermedades neurodegenerativas (Ciusani E, *et al.*, 2001, Lambert C, *et al.*, 2003, Landau AM, *et al.*, 2005).

Así pues, el conocimiento de los factores que dirijan los efectos de CD95 hacia la muerte celular apoptótica, o bien hacia fenómenos implicados en la mejora de la comunicación y plasticidad neuronal, constituyen una necesidad fundamental. En la primera parte del presente trabajo se aporta la caracterización del ortólogo de ratón *Lifeguard* (del inglés, salvavidas), apodado así por su efecto bloqueante de la muerte inducida por CD95.

5.1.1 SH-SY5Y como modelo neuronal para el estudio de la señalización por CD95

Hasta este momento, las propiedades antiapoptóticas de LFG se han presentado en modelos no neuronales, como las células HeLa (células de ovario), Jurkat (linfocitos) o LN-18 (glioblastoma) que endógenamente no expresan LFG. Por tanto, era necesario validar los resultados en un linaje neuronal, donde LFG estuviera en su contexto celular más fisiológico. Sin embargo, los modelos en sistema nervioso para el estudio de la muerte inducida por CD95 son escasos. En este estudio hemos presentado un modelo celular basado en la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y, línea celular ampliamente utilizada en

la bibliografía para el estudio de supervivencia y muerte neuronal (Encinas M, *et al.*, 2000, Kaplan DR, *et al.*, 1993). Las células SH-SY5Y son resistentes a la muerte inducida por CD95 debido principalmente a la ausencia de expresión de caspasa-8. Al igual que se había visto para otros neuroblastomas, el tratamiento con IFN γ induce la expresión de caspasa-8 (Casciano I, *et al.*, 2004, Fulda S, *et al.*, 2001, Fulda S y Debatin KM, 2002) y también del receptor CD95. Al cabo de 48 h de tratamiento, los niveles alcanzados de expresión son suficientes para restituir la vía apoptótica desencadenada por CD95. Y es más, las células SH-SY5Y tratadas con CD95L siguen una vía apoptótica tipo II, es decir, que los niveles de caspasa-8 activa no son suficientes para la activación directa de caspasas ejecutoras, y que precisan de la vía mitocondrial para un correcto desarrollo del programa de muerte. Este hecho viene demostrado por la capacidad que tiene la proteína antiapoptótica de la familia de Bcl-2, Bcl-X_L de bloquear la activación de caspasa-8 en células SH-SY5Y ante el estímulo apoptótico de CD95 (Ver Figura 34D).

5.1.2 Los niveles de expresión de LFG determinan sus propiedades antiapoptóticas

La construcción pcDNA3-mLFG da lugar a la expresión de mLFG bajo el promotor de citomegalovirus (CMV). Esta expresión es perfectamente detectable en células muy sobreexpresoras como son las líneas celulares COS7 o HEK293T. En cambio, en líneas celulares como Jurkat, PC12 o SH-SY5Y, LFG se expresa aunque a niveles bajos, incluso no detectables por Western-Blot. Ha sido precisamente este hecho el que durante bastante tiempo nos ha confundido respecto a la función de LFG. Se han realizado *pools* de células transfectadas de modo estable con LFG en PC12, Jurkat y SH-SY5Y, pero en ninguno de ellos se obtuvieron niveles suficientes para ser detectados por Western-

blot. En cambio, al inmunoprecipitar y enriquecer los lisados con LFG sí que era detectable. Seguramente, la pobre expresión hizo que no obtuviéramos reproducibilidad en los ensayos de supervivencia en experimentos de inducción de muerte por CD95 (datos no presentados). Para resolver este problema se decidió obtener clones sobreexpresores de LFG en SH-SY5Y. De un total de más de 50 clones, se obtuvieron 3 con diferentes grados de sobreexpresión de los cuales se eligió el que mayor nivel presentaba. Este clon demostró responder al IFN γ de la misma forma que las células control (establemente transfectadas con el vector vacío), es decir, presentaban el mismo grado de regulación de caspasa-8 y de CD95 al ser tratadas con IFN γ . Sin embargo, este clon mostró ser resistente a la muerte inducida por CD95. Para demostrar que esta resistencia no se debía a un efecto de la selección clonal, se transfectaron transitoriamente con RNAi de interferencia. La reducción de los niveles de LFG restauró la sensibilidad a la muerte inducida por CD95 a niveles comparables con células salvajes.

Estos resultados obtenidos han sido validados en cultivos primarios de neuronas. Varios estudios muestran que las neuronas embrionales corticales maduras, a día *in vitro* 7, son moderadamente sensibles a la muerte por CD95 (Cheema ZF, *et al.*, 1999, Qiu J, *et al.*, 2002, Zuliani C, *et al.*, 2005). Como hemos demostrado, estas neuronas expresan LFG, pero aún así son sensibles a CD95. Sin embargo, cuando se induce la expresión forzada de LFG, en este caso, por infección con lentivirus, se recupera la resistencia a CD95 comparable a células no tratadas. Además, al reducir los niveles endógenos por RNA de interferencia, se observa una mayor sensibilidad indicando inequívocamente que LFG está afectando a la funcionalidad de CD95.

Reforzando esta teoría, se presentan también los resultados obtenidos en células granulares de cerebelo. Como se había descrito por Schweitzer y colaboradores (Schweitzer B, *et al.*, 1998), la expresión de LFG va aumentando durante el desarrollo. Las células granulares de cerebelo se cultivan a partir de embriones postnatales, y durante su maduración *in vitro* también se ha observado un incremento en la expresión de LFG (Beier CP, *et al.*, 2005). Este aumento de expresión va ligado a una resistencia a CD95, puesto que resultados presentes en este estudio, así como los conseguidos recientemente por Beier y colaboradores, demuestran que la disminución de los niveles endógenos de LFG por RNA de interferencia sensibiliza a estas neuronas a la muerte por CD95.

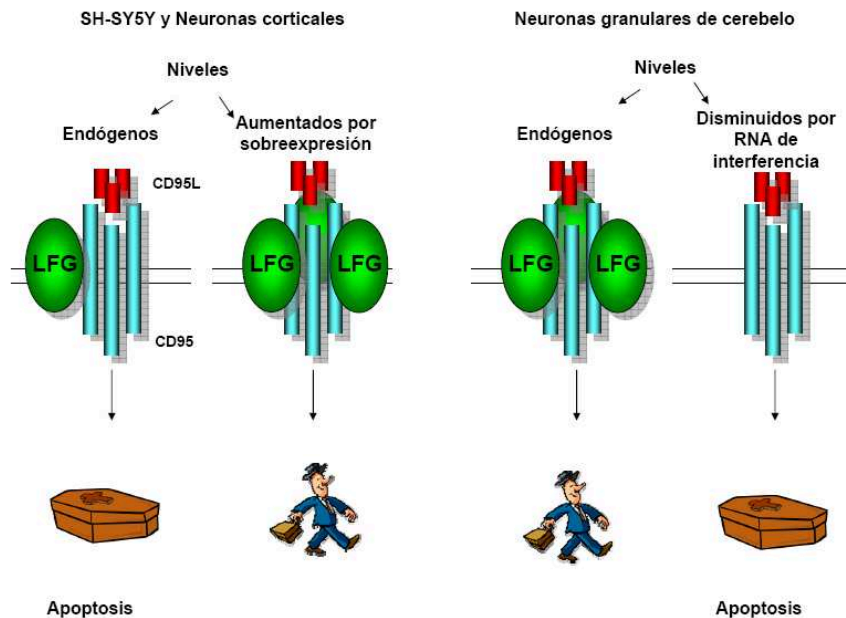


Figura 55. Esquema de la posible funcionalidad de LFG.

En definitiva, tal y como se observa en la figura 55, las células SH-SY5Y tratadas con $IFN\gamma$, o bien las neuronas corticales tras su

maduración en cultivo, son sensibles a la muerte inducida por CD95, a pesar de que ha sido detectada la expresión del RNA mensajero de LFG. Sin embargo, al inducirse la expresión forzada de LFG se obtiene resistencia a CD95. En cambio, en las neuronas granulares de cerebelo, con expresión endógena elevada, ya son resistentes a CD95. Si se disminuye su expresión endógena por RNA de interferencia, las neuronas muestran una sensibilidad marcada a CD95.

Así pues, los resultados presentados en este estudio conducen a pensar que los niveles de expresión de LFG determinarán su resistencia a CD95 en las distintas poblaciones neuronales estudiadas y que puede constituir una de las señales por las cuales los efectos de CD95, tras la interacción con su ligando, se traduzcan en la muerte celular o bien en otros efectos aún por determinar.

5.1.3 La función de LFG depende de su localización en los Lipid Raft y del bloqueo de la actividad de caspasa-8.

Existe una cierta controversia respecto a que la señalización por CD95 tiene lugar en microdominios específicos de la membrana plasmática llamados *lipid rafts* (Algeciras-Schimnich A, *et al.*, 2002, Eramo A, *et al.*, 2004). Estas regiones están enriquecidas en colesterol y esfingolípidos, lo que les aporta un mayor orden y una menor fluidez en comparación a las zonas ricas en fosfolípidos. Estas propiedades permiten su separación por ultracentrifugación en gradiente de densidad. Los rafts permanecen insolubles y “flotan” quedando retenidos en las fracciones de menor densidad.

De acuerdo con numerosos estudios en otros tipos celulares (Aouad SM, *et al.*, 2004, Eramo A, *et al.*, 2004, Gajate C, *et al.*, 2004), hemos demostrado que, en células SH-SY5Y, CD95 se distribuye tanto

en las fracciones *raft* como fuera de ellas. Pero al igual que sucede en otros tipos celulares, al producirse la unión con el ligando, ocurre una concentración de CD95 en la fracción *raft*, así como la incorporación de moléculas clave para el desencadenamiento de la apoptosis como la caspasa-8 (Figura 41C). Estos resultados conducen a pensar que, en neuronas, la señalización por CD95 ocurre principalmente en los *lipid rafts*.

Al ser LFG una proteína transmembrana quisimos averiguar su distribución en las diferentes fracciones membranas tras su separación por gradiente de densidad. Sorprendentemente, vimos que en las células SH-SY5Y sobreexpresoras de LFG, la expresión de LFG se acumulaba en las fracciones menos densas, que suponen la fracción *raft* de membrana. Puesto que esta distribución podía ser consecuencia de su expresión forzada, decidimos investigar la proteína endógena en el modelo de neuronas granulares de cerebelo. De acuerdo con lo esperado, LFG tan solo fue detectado en las fracciones menos densas, donde co-localizaba con el marcador de *rafts*, caveolina.

Resultados publicados anteriormente proclaman que LFG interacciona con CD95. Estos resultados fueron llevados a cabo en células HEK293T y sobreexpresando tanto LFG como CD95 en ensayos de co-inmunoprecipitación. A pesar de lo sugerido por Beier y colaboradores, a partir de los resultados de inmunoprecipitación y co-localización por inmunofluorescencia, no se puede inferir una interacción directa con CD95. En este trabajo presentamos las evidencias que indican que LFG tan sólo interaccionaría con CD95 presente en los *rafts*. Ello implica que LFG pudiera tener menor efecto protector en aquellos tipos celulares en los que la señalización por CD95 es independiente de su localización en los *rafts*.

Profundizando en el mecanismo molecular de acción, Somia y colaboradores inicialmente emplazaron a la acción de LFG a nivel de FADD o superior basándose en dos criterios. El primero es que cantidades en aumento LFG no eran capaces de desplazar la unión de CD95 con FADD, y por tanto LFG no interfería en la unión FADD-CD95. El segundo criterio se basaba en las diferencias en la señalización entre CD95 y TNFR. TNFR se diferencia de CD95 por requerir un adaptador adicional, TRADD, que no necesita CD95, y por lo demás comparten FADD y caspasa-8. Como LFG no protegía de la muerte mediada por $TNF\alpha$, su acción debía situarse a nivel de las diferencias entre ambos receptores, es decir, a nivel del receptor o de la interacción CD95-FADD. Con el tiempo se ha demostrado que la señalización por $TNF\alpha$ difiere bastante de la de CD95 y actualmente la suposición de Somia y otros no podría considerarse válida. En primer lugar, tal y como se ha explicado en el apartado 1.3.2.2.2 de la introducción, la señalización por $TNF\alpha$ implica al formación de dos complejos macromoleculares. En el primero, formado en la membrana plasmática, se activa principalmente $NF\kappa B$ y que como principal resultado da lugar a la síntesis de proteínas antiapoptóticas que regularán la actividad del complejo II. La formación del complejo II, que incluye FADD-caspasa-8 no tiene lugar en la membrana plasmática, tal y como ocurre en el caso de CD95, y en estas condiciones LFG, una proteína exclusivamente membranaria, no podría realizar su función bloqueante. Por tanto, de los experimentos de Somia no se puede concluir que LFG sea un antagonista exclusivo de CD95 y que no pueda estar regulando directa o indirectamente la activación de caspasa-8. Así pues, no es descartable que LFG pueda regular la actividad de otros DRs cuya formación del DISC tenga lugar en la membrana plasmática, como es el caso de TRAILR1 y TRAILR2.

Nuestros resultados demuestran que la expresión forzada de LFG disminuye la actividad de la caspasa-8 en células SH-SY5Y y que la reducción de sus niveles endógenos promueve un incremento de la actividad caspasa-8 en neuronas granulares de cerebelo. Estos resultados demuestran que LFG impide la activación de caspasa-8. Como LFG no presenta DD, al igual que otros antagonistas como FLIP, no parece que el mecanismo de LFG pase por la interacción directa con caspasa-8.

5.1.4 LFG puede interferir directamente en la función de CD95.

Los diferentes antagonistas de la función de CD95 no siempre utilizan las mismas estrategias para bloquear su función. En casos, los efectos antagonistas no se sitúan al nivel del bloqueo de la propagación de la señal sino que tienen que ver con la estabilidad del receptor en la membrana o las modificaciones postraduccionales que pueda sufrir.

Con los resultados presentados hasta el momento no podemos descartar que LFG altere la formación del DISC, o incluso la unión y composición estequiométrica de las moléculas que lo conforman. Los resultados aportados por las herramientas bioinformáticas, junto con los obtenidos en el ensayo de doble híbrido, sugieren posibles mecanismos de acción que se describen a continuación:

Por una parte, la secuencia de LFG muestra hasta cinco motivos PDZ de clase III, todos ellos en zonas expuestas de la proteína. Estos dominios han demostrado ser importantes para el ensamblaje de grandes complejos multiproteicos en localizaciones subcelulares específicas. Otros antagonistas de CD95 como FAP-1 contienen motivos PDZ de clase III en su estructura y han demostrado ser los responsables de su unión con el extremo C-terminal de CD95 (Sato T, *et al.*, 1995). La

unión de FAP-1 con CD95 atenúa la exportación de CD95 a la superficie de la célula (Ivanov VN, *et al.*, 2003), proporcionando así un nuevo modelo de regulación en el tráfico de CD95. En las imágenes de co-localización con CD95 presentadas por Beier y colaboradores, y también con la distribución que LFG presenta en células SH-SY5Y se observa un marcaje en todo el interior celular además de en membrana plasmática y neuritas. Por tanto, LFG podría interactuar con CD95 no sólo en la membrana plasmática, sino a través de su ruta de endocitosis y regular de alguna forma su estabilidad en los *lipid rafts* tras la acción del ligando.

En segundo lugar, en la búsqueda de proteínas con interacción directa con LFG, un 77,23% mostraron ser cDNAs que codificaban con proteínas relacionadas con el sistema ubiquitina. La ubiquitinización es uno de los principales mecanismos para regular la vida media de las proteínas (Vaux DL y Silke J, 2005). En la reacción de ubiquitinización interviene en primer lugar un enzima que activa a la ubiquitina, al que se denomina E1. Entonces la ubiquitina se transfiere a un residuo de cisteína de un enzima conjugante de ubiquitina, E2. Esta proteína E2, sola o bien con la ayuda de una proteína ubiquitin-ligasa, E3, cataliza la transferencia de la ubiquitina a un residuo de lisina de la proteína que va a ser marcada para su degradación por el proteasoma. En la búsqueda de proteínas que interactúan con el extremo C-terminal de CD95, se aisló un clon de cDNA que codificaba para la proteína UBC9, miembro de la familia de enzimas conjugadores de ubiquitina E2 (Becker K, *et al.*, 1997). Aunque no está claro el papel que pueda desempeñar la unión de proteínas del sistema ubiquitina con CD95, hay varias posibilidades. En primer lugar puede que estén directamente implicadas en la ubiquitinización directa de CD95 para su posterior degradación a través del proteasoma. Por otro lado, estas proteínas pueden reclutar a enzimas relacionados con la ubiquitinización de proteínas vecinas

implicadas en la regulación de la apoptosis. Pero no sólo la ubiquitinización es responsable de conducir directamente a las proteínas al proteasoma para su degradación, sino que además puede tener otras consecuencias como por ejemplo actuar como señal de endocitosis (Hicke L y Riezman H, 1996).

Por su parte, LFG contiene una secuencia de degradación PEST, que podría regular su propio recambio proteico a través del proteasoma. Estas secuencias son un motivo proteico que se encuentra en un gran número de proteínas de vida media corta. Estas regiones se caracterizan por ser ricas en residuos de prolina (P), glutamato/aspartato (E/D), serina (S) y treonina (T) flanqueadas por aminoácidos básicos. Además, LFG contiene en su secuencia primaria motivos de interacción WW. Estos motivos han sido implicados en la interacción de proteínas y en procesos celulares como la degradación mediada por ubiquitina.

Otra de las proteínas que pueden interaccionar directamente con LFG es la proteína Tax binding *protein* 1, también llamada TXP151 o T6BP (TRAF6 binding *protein*). Esta proteína puede interaccionar y regular la actividad de la proteína antiapoptótica A20, que puede bloquear la apoptosis inducida por receptores de muerte (De Valck D, *et al.*, 1999). T6BP puede también interaccionar directamente con TRAF6, que tiene actividad E3 ubiquitin-ligasa y que se ha visto implicada en la señalización de receptores de la familia del TNF (Geetha T, *et al.*, 2005).

En resumen, estas posibles interacciones representan indicios sobre la regulación de la función de LFG, que deberán ser validados experimentalmente, pero que constituyen una buena alternativa a seguir en la caracterización de los mecanismos moleculares de su funcionalidad.

5.2 FAIM_L ES UNA PROTEÍNA EXCLUSIVA DEL SISTEMA NERVIOSO Y CAPAZ DE BLOQUEAR LA APOPTOSIS MEDIADA POR RECEPTORES DE MUERTE.

La conservación de las neuronas a lo largo de la vida de un individuo requiere un gran esfuerzo por parte del organismo, dado que las neuronas estarán sujetas a multitud de estímulos que pueden afectar su integridad. Entre estos estímulos destaca, en general, la inducción de apoptosis y más concretamente la mediada por receptores de muerte, cuya participación en la pérdida patológica de neuronas ha sido sobradamente probada. Por tanto, la expresión de proteínas que puedan bloquear la señalización apoptótica, jugarán un papel clave en la protección de la muerte neuronal.

A finales de la década de los 90 se aisló un nuevo gen al que se le llamó FAIM (del inglés, *Fas Apoptosis Inhibitory Molecule*), ya que su sobreexpresión bloqueaba la apoptosis inducida por Fas/CD95/APO-1 en un modelo de células B (Schneider TJ, *et al.*, 1999). Posteriormente, fue identificada una variante alternativa de *splicing*, con 22 aminoácidos extra en el extremo N-terminal, y a la que se le llamó FAIM_L. El RNA mensajero de FAIM_L se expresa de manera diferencial a FAIM_S, y su expresión se limita tan sólo a tejidos del sistema nervioso, principalmente en cerebro y médula espinal, mientras que FAIM_S se expresa de manera ubicua en todos los tejidos estudiados (Zhong X, *et al.*, 2001). La secuencia de FAIM_S está altamente conservada durante la evolución, desde *C. elegans* hasta *H. sapiens*. Sin embargo, los 22 aminoácidos adicionales de FAIM_L tan sólo están conservados en vertebrados superiores. Es interesante remarcar que, de todos los genes implicados la maquinaria apoptótica de la célula, los DRs fueron los últimos en aparecer en términos evolutivos (Gordeeva AV, *et al.*, 2004)

hallándose sólo en vertebrados. Un análisis filogenético detallado de la familia de los receptores de muerte los clasifica en dos grandes ramas. El primer gran grupo estaría compuesto por los receptores p75^{NTR}, EDAR y DR6, todos ellos implicados en el desarrollo embrionario. En el segundo gran grupo se englobarían el resto de receptores. La divergencia ancestral de este segundo grupo de receptores coincide con la adquisición de la respuesta inmune por parte de los vertebrados (Bridgham JT, *et al.*, 2003). El hecho de que FAIM_L sólo se encuentre en vertebrados podría explicarse por uno de los mecanismos generales propuestos para la modulación de la actividad de proteínas implicadas en la apoptosis. Este mecanismo es a través de *splicing* alternativo, obteniéndose a partir de un único gen dos productos con funciones diferentes, como por ejemplo TRID que actúa como DcR de TRAIL (Pan G, *et al.*, 1997) o CED-4L para CED4 (Aravind L, *et al.*, 1999).

Resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que FAIM_S no juega ningún papel relevante en la muerte por falta de soporte trófico de las neuronas de ganglio cervical superior o de las células PC12, células utilizadas como modelo de neuronas en desarrollo. A diferencia de sus efectos descritos en células B, FAIM_S regula el crecimiento neurítico. La sobreexpresión de FAIM_S tiene un efecto promotor de la neuritogénesis promovida por NGF, mientras que la reducción de sus niveles endógenos la disminuyen muy significativamente, tanto en células PC12 como en neuronas del ganglio cervical superior (Sole C, *et al.*, 2004). Resulta paradójico que la isoforma FAIM_S tenga este efecto, mientras que FAIM_L, específico de sistema nervioso, no afecte, al menos por sobreexpresión, al crecimiento neurítico inducido por NGF. Estos resultados, junto con la expresión diferencial de ambas isoformas, inducen a pensar que puedan tener funciones diferentes.

Uno de los grandes inconvenientes para el estudio de proteínas poco caracterizadas es la ausencia de herramientas comerciales. Por tanto, nuestro primer objetivo fue el diseño de anticuerpos específicos que detectaran exclusivamente FAIM_L. En la primera parte de este trabajo hemos demostrado como sueros procedentes de dos conejos diferentes inmunizados con el péptido específico de FAIM_L detectan la misma banda inmunoreactiva, con un peso molecular aparente de aproximadamente 23 kDa, que coincide con el peso molecular teórico de la proteína. Además, la misma banda no se detecta al utilizar el suero preinmune. Los sueros inmune generados son capaces también de detectar la proteína nativa, puesto que demostraron ser eficaces en un ensayo de inmunoprecipitación (Ver figura 44).

Esta nueva herramienta nos ha permitido corroborar los resultados de expresión de FAIM_L, previamente obtenidos por RT-PCR, comprobando que de todos los tejidos estudiados, la proteína FAIM_L se expresa únicamente en las diferentes áreas del cerebro y también en la médula espinal.

5.2.1 Distribución de FAIM_L en el cerebro en desarrollo

Del estudio más detallado de su distribución anatómica, se deduce que FAIM_L se expresa exclusivamente en neuronas y de manera diferencial entre las distintas poblaciones. En etapas tempranas del desarrollo se detecta una expresión más difusa que ocupa toda la capa y subcapa cortical. En los primeros estadios postnatales se observa un marcaje más restringido, siendo notable su expresión sobretodo en las neuronas piramidales de la capa V y en menor medida en las capas II-III de la corteza cerebral. La expresión en las otras áreas del cerebro estudiadas tampoco es generalizada. En el hipocampo se observa una elevada reactividad en las neuronas de las zonas CA1 a CA3, como

también en interneuronas repartidas a lo largo de las diferentes capas. Y en el cerebelo, las células de Purkinje muestran una marcada inmunoreactividad tanto en el soma como en las prolongaciones neuríticas. Puesto que se observaba un marcaje difuso en el citosol y neuritas de las neuronas marcadas quisimos comprobar si FAIM_L podía estar asociado a otras estructuras celulares. Un subfraccionamiento simple, junto con imágenes de microscopía confocal, nos permitió determinar que la expresión de FAIM_L es estrictamente citosólica.

Aunque la expresión de receptores de muerte en sistema nervioso ha estado más relacionada con procesos inflamatorios o neurodegenerativos, su expresión durante el desarrollo también ha sido descrita. Sin embargo, la presencia de CD95, de su ligando, o de ambos puede ser “permissiva” pero no suficiente para la inducción de muerte mediada por CD95. Ello implica la posibilidad de que las moléculas clave para la inducción de apoptosis no estén disponibles o bien que la presencia de inhibidores bloquee la señalización apoptótica. De hecho son muy pocos los datos experimentales que apoyan la relación entre muerte apoptótica durante el desarrollo y los receptores de muerte, a excepción del receptor p75^{NTR}.

Reforzando la hipótesis de que los receptores de muerte jueguen un papel alternativo a la inducción de apoptosis durante el desarrollo, los resultados de la expresión de FAIM_L nos proporcionan un ejemplo en el que existe una coincidencia en espacio y en el tiempo de la expresión de un receptor de muerte como CD95 y de uno de sus posibles antagonistas. La expresión de CD95 parece coincidir con la observada para FAIM_L tanto en momentos concretos del desarrollo como en determinadas áreas del cerebro. CD95 empieza a ser detectable a día de desarrollo embrionario 15, sobretodo en la corteza cerebral e

hipocampo (Cheema ZF, *et al.*, 1999). El día embrionario 15 coincide con el término de muerte celular apoptótica que ocurre en la formación de la placa cortical (Bayer SA AJ, 1991). CD95 también se expresa en estructuras neurales transitorias que incluyen el epitelio ventricular, la subplaca y la zona marginal de la corteza (Al-Ghoul WM y Miller MW, 1989, Luskin MB y Shatz CJ, 1985, Shatz CJ, *et al.*, 1990). Los primeros estadios postnatales corresponden a otro pico de inducción de muerte y selección neural durante el desarrollo. Y es justamente entre los estadios P1 y P5, cuando la expresión de CD95 es máxima en las capas neuronales del hipocampo y también en las capas II-III y V de la corteza, con mayor inmunoreactividad en las neuronas piramidales (Zuliani C, *et al.*, 2005). Esta localización coincide plenamente con la observada para FAIM_L en este estudio (Ver figura 46).

Para confirmar la regulación de la expresión de FAIM_L durante el desarrollo, estudiamos los niveles de expresión por *Western-blot* durante el desarrollo de embriones de ratón. A estadios tan tempranos como a día 12 de desarrollo embrionario ya se aprecia una leve expresión, que va aumentando progresivamente hasta llegar a niveles máximos en el día 18 de gestación. En los primeros estadios postnatales hay una disminución de la expresión que dará lugar a una estabilización posterior. Los efectos de la maduración celular sobre la expresión de FAIM_L también ocurren *in vitro*. En neuronas corticales extraídas a día de gestación 12 los niveles de FAIM_L son apenas detectables, pero incrementan rápidamente durante los días en cultivo. En los primeros días de cultivo las neuronas están aisladas y empiezan a emitir prolongaciones neuríticas, mientras que en días más avanzados del cultivo se puede observar como la red neurítica se va extendiendo y el cultivo alcanza su madurez. Este período, alrededor del DIV 5, coincide con la máxima expresión de FAIM_L. Posteriormente, a partir de DIV 8,

los cultivos de neuronas aisladas, es decir, sin presencia de células gliales, empiezan a degenerar, observándose también una leve caída en la expresión de FAIM_L. Los niveles de expresión de FAIM_L también se correlacionan en un modelo neuronal de línea celular. Las células PC12, procedentes de un feocromocitoma de rata, adquieren características fenotípicas neuronales en presencia del factor neurotrófico NGF. Al igual que ocurre en las neuronas corticales, durante el período de diferenciación de las células PC12 también se observa un incremento del transcrito de FAIM_L. Curiosamente, FAIM_S no se ve alterado en el transcurso de esta diferenciación, potenciando aún más la teoría de que ambas isoformas juegan papeles diferentes en el sistema nervioso.

Siendo NGF responsable del aumento de la expresión del RNA mensajero de FAIM_L, quisimos profundizar en el estudio de las vías moleculares implicadas en dicho efecto. La vía de las ERK/MAPK es una de las vías que se activan en PC12 en respuesta a NGF y que tienen como consecuencia la promoción del crecimiento neurítico (Qui MS y Green SH, 1992, Robbins DJ, *et al.*, 1992, Wood KW, *et al.*, 1992). La inhibición farmacológica de la vía ERK/MAPK con el inhibidor de MEK1, PD98059, dio como resultado que los niveles de FAIM_L se mantuvieran estables, es decir, no aumentaron en respuesta a NGF. Los estudios posteriores del análisis del promotor de FAIM mostraron un incremento de su actividad en respuesta a NGF y además, dicha actividad retornaba a valores basales en presencia del inhibidor PD98059. Todo ello parece indicar que la diferenciación celular promovida, en este caso, por NGF conlleva la síntesis de proteínas antiapoptóticas como FAIM_L, que pueden participar en el mantenimiento de la integridad celular ante posibles estímulos nocivos.

5.2.2 FAIM_L ejerce como antagonista de los receptores de muerte

Como se ha mencionado anteriormente, a diferencia de FAIM_S, la expresión forzada de FAIM_L no tiene efectos promotores sobre el crecimiento neurítico, pero no se excluía la posibilidad de que fuese necesario para la neuritogénesis. La mejor estrategia para demostrarlo fue a través de la reducción de sus niveles de expresión endógena por la técnica del RNA de interferencia. La reducción eficaz y diferencial de FAIM_L no tuvo efecto sobre el crecimiento neurítico, evidenciando así su papel diferencial respecto a su isoforma más corta, al menos en sistema nervioso. Era entonces adecuado pensar que si FAIM_S tenía funciones antiapoptóticas en linfocitos B, donde no se expresa FAIM_L, puede que en el sistema nervioso FAIM_L realizara esa función. Para averiguar su papel protector ante estímulos apoptóticos se realizaron ensayos de expresión forzada de FAIM_L. En primer lugar, se probó su efecto ante estímulos que afectaran principalmente a la vía mitocondrial. Ello permitiría conocer si la función antiapoptótica de FAIM_L se sitúa a nivel o por debajo de las alteraciones mitocondriales que ocurren en el proceso de muerte celular. Se sometió a células PC12 establemente transfectadas con el vector vacío o con FAIM_L a dos estímulos que inducen muerte celular a través de la mitocondria. Las células sobreexpresoras de FAIM_L no mostraron un comportamiento diferencial a aquellas transfectadas con el vector vacío ni ante un amplio rango de dosis de estaurosporina, un potente inhibidor de quinasas inductor de la vía intrínseca, ni tras la retirada de soporte trófico.

Seguidamente se investigó si FAIM_L era capaz de afectar a la apoptosis inducida por receptores de muerte. Las células PC12 son en principio resistentes a estímulos apoptóticos mediados por receptores de muerte, como CD95L y TNF α , y requieren de la presencia de inhibidores de la transcripción o traducción como son la ActD o la Cicloheximida. Así

pues, la combinación de sFasL o TNF α con ActD induce muerte apoptótica en células PC12, cuantificada por la condensación y/o fragmentación nuclear tras tinción con bis-benzimida de Hoechst. El porcentaje de inducción de muerte fue siempre mayor en el caso del TNF α , debido a que seguramente la afinidad de los ligandos sobre el receptor CD95 de rata disponibles comercialmente, como sFasL, no es óptima.

La sobreexpresión transitoria de FAIM_L bloqueó significativamente la muerte celular inducida por TNF α o sFasL en presencia de ActD, mostrando así su función como antagonista de receptores de muerte. Debido a que los estudios de sobreexpresión pueden conllevar resultados artefactuales, se procedió a evaluar los efectos de TNF α , el inductor de muerte celular más potente en nuestro caso, sobre células infectadas con un RNA de interferencia control y con el RNA de interferencia específico para FAIM_L. El tratamiento con TNF α solo, es decir, sin presencia de ActD, indujo de forma significativa la muerte de las células infectadas con lentivirus portador de la construcción del RNAi de interferencia específico para FAIM_L, mientras que no se observó muerte celular en las células infectadas con la construcción control. Esta muerte celular está acompañada de la inducción de la actividad caspasa-8 tal y como se demuestra en los experimentos de procesamiento del sustrato específico de caspasa-8 Ac-IETD-AFC. Además, hemos demostrado que esta actividad caspasa-8 es funcional y proapoptótica, puesto que en los mismos extractos celulares se evidencia procesamiento de la proteína PARP, sustrato ampliamente descrito de las caspasas ejecutoras. Estos resultados apuntan a que FAIM_L actúa bloqueando la señal de muerte a niveles muy cercanos al receptor, puesto que su presencia es responsable, al menos en parte, de mantener la caspasa-8 inactiva.

¿Qué papel puede desempeñar FAIM_L endógeno en sistema nervioso?. De forma interesante, las células PC12 son, en principio, resistentes a estímulos apoptóticos mediados por receptores de muerte, como CD95L y TNF α . En cambio, durante la diferenciación las células PC12 se van haciendo menos sensibles a la muerte por CD95L por una disminución en la expresión tanto del receptor CD95 como su ligando, CD95L (Facchinetti F, *et al.*, 2002). Por el contrario, se ha descrito un aumento de la sensibilidad a TNF α en células PC12 diferenciadas, por un aumento de la expresión del receptor así como la de uno de sus adaptadores, TRAF2 (Mielke K y Herdegen T, 2002). Sin embargo, los autores no parecen tener en cuenta que las células PC12 no diferenciadas se sensibilizan a la muerte por TNF α en presencia del inhibidor de la transcripción ActD. Ello indica que la célula posee todos los engranajes moleculares para la ejecución del programa de muerte. Además, el porcentaje de muerte que se consigue en 24 h al tratar las células PC12 con TNF α más ActD es el mismo que se obtiene en PC12 diferenciadas tras 72 h de tratamiento. Esta diferencia en la temporalidad del programa de muerte podría ser explicada por la necesidad de la transcripción *de novo* de proteínas necesarias para la cascada de señales apoptóticas, seguramente a consecuencia de la activación de JNKs. Este programa de muerte sería sustancialmente diferente al que ocurre en la muerte inducida por la combinación conjunta de ActD y TNF α , explicando así que los niveles de FAIM_L adquiridos durante la diferenciación no sean suficientes para el bloqueo de la inducción de muerte a través de la vía JNKs.

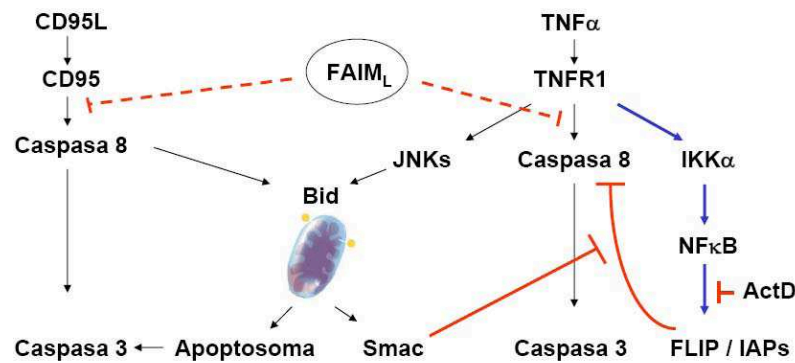


Figura 56. Esquema propuesto para la funcionalidad de FAIM_L. Las líneas azules representan señales prosupervivencia, las negras representan inducción del programa de muerte, y en rojo las acciones inhibitorias.

El hecho de que FAIM_L sea capaz de antagonizar la apoptosis inducida por los receptores de muerte CD95 y TNFR1 nos lleva a pensar en el bloqueo de un mecanismo común entre ambos receptores. Aunque CD95 puede activar otras vías independientes de caspasa, su camino preferencial es la activación de caspasa-8, mientras que la señalización de TNFR1 es un tanto más compleja, y es probable que se activen conjuntamente las vías apuntadas en la figura 55. El desequilibrio de unas de las cascadas de señalización posibles determinará la supervivencia o muerte de la célula. En el caso de la muerte inducida por la combinación de TNFα y ActD, la ActD podría estar bloqueando la actividad transcripcional de NFκB y por tanto, los inhibidores de recambio rápido como son FLIP y las IAPs, dejarían de ejercer su función, dejando libre a la caspasa-8 para el inicio del programa de muerte. En este caso, los bajos niveles de FAIM_L no son suficientes para bloquear completamente el programa de inducción de muerte, o quizás el efecto inhibitor de la ActD repercute indirectamente en la función de FAIM_L. En cambio, su reducción completa sí permite una activación de caspasa-8 tras el tratamiento con TNFα solo, indicando que,

endógicamente, FAIM_L está impidiendo directa o indirectamente la activación de caspasa-8. Sin embargo, los resultados de Mielke y colaboradores demuestran que, en el modelo de PC12 diferenciadas, la vía principal de inducción de muerte se ejecuta a través de JNKs, aunque no se demuestra la implicación de caspasa-8. Estos resultados estarían en consonancia con el hecho de que FAIM_L afectara tan sólo a la vía directa entre TNFR y caspasa-8, puesto que de alguna forma las células PC12 diferenciadas se siguen muriendo a pesar de los altos niveles de FAIM_L.

No podemos obviar que en el paradigma experimental de las células PC12, NGF se une tanto al receptor TrkA como a p75^{NTR}. Parece ser que p75^{NTR} puede jugar papeles diferenciales, señalizando apoptosis o ayudando a los efectos prosupervivencia del NGF, dependiendo del estado fisiológico o del momento durante el desarrollo en que se encuentra una población neuronal. Existe una tendencia a creer que p75^{NTR} ejerce un efecto pro-apoptótico constitutivo, que en condiciones normales es superado por la acción del NGF a través de TrkA (Ver figura 57).

Según el modelo que se deduce de los experimentos de Barret y colaboradores (Barrett GL, 2000), juntamente con Bredesen y otros (Rabizadeh S, *et al.*, 1993), la señalización de TrkA en respuesta a NGF tiene como consecuencia la transcripción de un factor o factores "X" que impiden la señal proapoptótica constitutiva de p75^{NTR}. En ausencia de TrkA, p75^{NTR} tiene vía libre para inducir la muerte apoptótica de la célula.

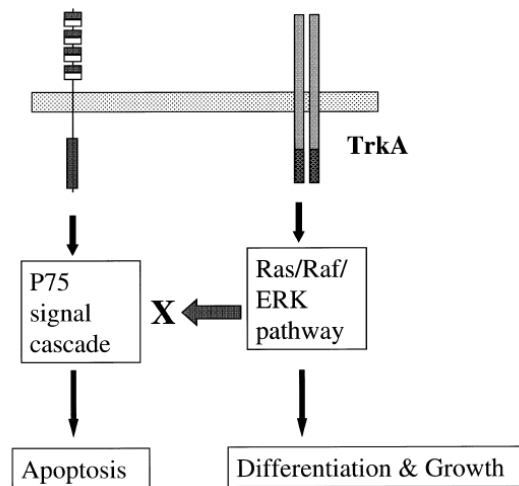


Figura 57. Modelo de interacción entre los receptores TrkA y p75^{NTR}. En presencia de TrkA, la señalización de NGF a través de TrkA bloquea cualquier señal proapoptótica activada por p75^{NTR}. En ausencia de NGF, la ausencia de señalización por TrkA permite la señalización pro-apoptótica de p75^{NTR} (Barrett GL, 2000).

Siendo p75^{NTR} un receptor de muerte, y habiendo demostrado que FAIM_L puede actuar como antagonista de los DRs, no es descabellado pensar que FAIM_L puede ser el factor o uno de los factores “X” responsables de mantener la señalización proapoptótica de p75^{NTR} bloqueada. En primer lugar, la señalización por NGF a través de TrkA y la vía ERK / MAPK tiene como consecuencia el aumento de expresión de FAIM_L (figura 49C y 50). En segundo lugar, experimentos muy preliminares, y por tanto, no expuestos en la parte de resultados, muestran que la disminución endógena de FAIM_L va acompañada de una muerte celular tardía en la línea PC12 en presencia de NGF. Otra posibilidad es que FAIM_L sea necesario para la activación de vías de supervivencia y/o diferenciación en respuesta a NGF a través de TrkA.

El descubrimiento de que la forma no procesada de NGF, proNGF, se unía preferencialmente a p75^{NTR} señalizando apoptosis en células que expresan tanto TrkA como p75^{NTR} (Lee R, *et al.*, 2001), planteó un nuevo escenario en el que la *ratio* proNGF/NGF maduro es un factor de regulación crítico para el mantenimiento del balance entre supervivencia y muerte neuronal (Chao MV y Bothwell M, 2002). Posteriormente, se ha comprobado que proNGF actúa a través de un complejo de dos receptores, p75^{NTR} y la proteína transmembrana tipo I sortilina (Nykjaer A, *et al.*, 2004). La sortilina actúa como un co-receptor, imprescindible para la transmisión de señales proapoptóticas en respuesta a proneurotrofinas. Esta nueva situación implica que durante el desarrollo, FAIM_L puede contribuir al desplazamiento del balance entre señales anti y proapoptóticas hacia la supervivencia de la célula, proporcionando a las poblaciones neuronales que lo expresen un mecanismo más para la prevención de la muerte apoptótica.

Resumiendo, FAIM_L es una proteína cuya expresión varía durante el desarrollo. Su expresión aumenta al final del primer período de la muerte apoptótica neuronal, coincidiendo a su vez con el patrón observado para el receptor de muerte CD95. Al igual que el receptor, su expresión se localiza en estructuras neuronales transitorias así como en determinadas neuronas maduras, sobretodo en los primeros estadios postnatales. Aunque el papel de receptores de muerte como CD95 o TNFR1 en la muerte celular programada durante el desarrollo no ha sido suficientemente probado, sí ha sido demostrada su implicación en el modelado neurítico indicando posibles funciones relevantes en el establecimiento de conexiones y plasticidad sináptica. Por tanto, la proteína FAIM_L puede jugar un papel relevante en la protección de las neuronas que utilizan el sistema CD95 para ejercer otras funciones distintas a la inducción de la apoptosis. En cambio, en el caso de

poblaciones neuronales que expresan p75^{NTR} y cuya función es relevante en el desarrollo, como por ejemplo en neuronas sensoriales (Hamanoue M, *et al.*, 1999), cambios en los niveles de FAIM_L podrían determinar la supervivencia de estas neuronas en respuesta a factores como el NGF.

En este trabajo se han caracterizado dos proteínas cuya función en el sistema nervioso no había sido definida. Estos resultados contribuirán a la mejora del conocimiento del papel que desempeñan los receptores de muerte en el Sistema Nervioso en condiciones fisiológicas, tanto en el desarrollo embrionario como en el sistema nervioso maduro. Además, la caracterización de antagonistas selectivos de los DRs (Lifeguard para CD95) o de espectro más amplio (FAIM_L) permitirá un mejor abordaje en el diseño de herramientas terapéuticas para el tratamiento de patologías que afecten al sistema nervioso en el cual los DRs juegan un papel clave.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

Primera: La línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y tratada con $\text{IFN}\gamma$ constituye un buen modelo para el estudio de la señalización por el receptor de muerte CD95/Fas en el sistema nervioso.

Segunda: La sobreexpresión del antagonista de CD95, Lifeguard, conduce a la inhibición de la muerte apoptótica desencadenada por CD95 en la línea celular SH-SY5Y y en neuronas corticales embrionales de ratón.

Tercera: La disminución de la expresión endógena de Lifeguard, por la técnica del RNA de interferencia, sensibiliza a la apoptosis inducida por CD95 en neuronas corticales y granulares de cerebelo.

Cuarta: Lifeguard se localiza en los microdominios de membrana *Lipid Rafts*, lo que le puede permitir su interacción con el receptor CD95/Fas y bloquear la señalización apoptótica a través de caspasas iniciadoras como la caspasa-8.

Quinta: FAIM_L , a diferencia de FAIM_S , no tiene efectos promotores sobre el crecimiento neurítico ni tampoco es necesario para la diferenciación inducida por NGF; ello indica que ambas isoformas pueden realizar funciones diferentes en el sistema nervioso.

Sexta: La expresión de FAIM_L aumenta durante el desarrollo en la corteza cerebral de ratón *in vivo* e *in vitro*, durante la maduración de células PC12 tratadas con el factor neurotrófico NGF, así como también en cultivo de neuronas primarias corticales de ratón.

Séptima: La sobreexpresión de FAIM_L es capaz de bloquear la muerte apoptótica inducida por los receptores de muerte CD95/Fas y TNFR1 en células PC12.

Octava: Los niveles de expresión endógenos de FAIM_L son, en parte, responsables de la resistencia a la muerte por TNF α en células PC12, por un mecanismo dependiente directa o indirectamente del bloqueo de la activación de la caspasa-8.

La perfección se alcanza, no cuando ya no hay nada más que añadir, sino cuando ya no queda nada más que quitar. Antoine de Saint-Exupery (1900-1944);

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- 1.-Al-Ghoul, WM and Miller, MW (1989). *Transient expression of Alz-50 immunoreactivity in developing rat neocortex: a marker for naturally occurring neuronal death?* **Brain Res.**481(2).361-7.
- 2.-Algeciras-Schimmich, A, Shen, L, Barnhart, BC, Murmann, AE, Burkhardt, JK and Peter, ME (2002). *Molecular ordering of the initial signaling events of CD95.* **Mol Cell Biol.**22(1).207-20.
- 3.-Aouad, SM, Cohen, LY, Sharif-Askari, E, Haddad, EK, Alam, A and Sekaly, RP (2004). *Caspase-3 is a component of Fas death-inducing signaling complex in lipid rafts and its activity is required for complete caspase-8 activation during Fas-mediated cell death.* **J Immunol.**172(4).2316-23.
- 4.-Araujo, H, Danziger, N, Cordier, J, Glowinski, J and Chneiweiss, H (1993). *Characterization of PEA-15, a major substrate for protein kinase C in astrocytes.* **J Biol Chem.**268(8).5911-20.
- 5.-Aravind, L, Dixit, VM and Koonin, EV (1999). *The domains of death: evolution of the apoptosis machinery.* **Trends Biochem Sci.**24(2).47-53.
- 6.-Ashkenazi, A and Dixit, VM (1998). *Death receptors: signaling and modulation.* **Science.**281(5381).1305-8.
- 7.-Bamberger, ME and Landreth, GE (2002). *Inflammation, apoptosis, and Alzheimer's disease.* **Neuroscientist.**8(3).276-83.
- 8.-Barnhart, BC and Peter, ME (2003). *The TNF receptor 1: a split personality complex.* **Cell.**114(2).148-50.
- 9.-Barrett, GL (2000). *The p75 neurotrophin receptor and neuronal apoptosis.* **Prog Neurobiol.**61(2).205-29.
- 10.-Bayer SA, AJ.(1991). *Neocortical development.* New York. Lippincott Williams & Wilkins
- 11.-Becker, K, Schneider, P, Hofmann, K, Mattmann, C and Tschopp, J (1997). *Interaction of Fas(Apo-1/CD95) with proteins implicated in the ubiquitination pathway.* **FEBS Lett.**412(1).102-6.
- 12.-Beier, CP, Wischhusen, J, Gleichmann, M, Gerhardt, E, Pekanovic, A, Krueger, A, Taylor, V, Suter, U, Krammer, PH, Endres, M, Weller, M and Schulz, JB (2005). *FasL (CD95L/APO-1L) resistance of neurons mediated by phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/protein kinase B-dependent expression of lifeguard/neuronal membrane protein 35.* **J Neurosci.**25(29).6765-74.
- 13.-Besnault-Mascard, L, Leprince, C, Auffredou, MT, Meunier, B, Bourgeade, MF, Camonis, J, Lorenzo, HK and Vazquez, A (2005). *Caspase-8 sumoylation is associated with nuclear localization.* **Oncogene.**24(20).3268-73.
- 14.-Boatright, KM, Renshaw, M, Scott, FL, Sperandio, S, Shin, H, Pedersen, IM, Ricci, JE, Edris, WA, Sutherlin, DP, Green, DR and Salvesen, GS (2003). *A unified model for apical caspase activation.* **Mol Cell.**11(2).529-41.
- 15.-Boatright, KM, Deis, C, Denault, JB, Sutherlin, DP and Salvesen, GS (2004). *Activation of caspases-8 and -10 by FLIP(L).* **Biochem J.**382(Pt 2).651-7.
- 16.-Boldin, MP, Varfolomeev, EE, Pancer, Z, Mett, IL, Camonis, JH and Wallach, D (1995). *A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain.* **J Biol Chem.**270(14).7795-8.
- 17.-Bridgham, JT, Wilder, JA, Hollocher, H and Johnson, AL (2003). *All in the family: evolutionary and functional relationships*

- among death receptors.**Cell Death Differ.**10(1).19-25.
- 18.-Brustovetsky, N, Dubinsky, JM, Antonsson, B and Jemmerson, R (2003). *Two pathways for tBID-induced cytochrome c release from rat brain mitochondria: BAX-versus BAX-dependence.***J Neurochem.**84(1).196-207.
- 19.-Casciano, I, De Ambrosis, A, Croce, M, Pagnan, G, Di Vinci, A, Allemanni, G, Banelli, B, Ponzoni, M, Romani, M and Ferrini, S (2004). *Expression of the caspase-8 gene in neuroblastoma cells is regulated through an essential interferon-sensitive response element (ISRE).***Cell Death Differ.**11(1).131-4.
- 20.-Ceccatelli, S, Tamm, C, Sleeper, E and Orrenius, S (2004). *Neural stem cells and cell death.***Toxicol Lett.**149(1-3).59-66.
- 21.-Ciusani, E, Gelati, M, Frigerio, S, Pollo, B, Massa, G, Sacerdote, P, Panerai, AE and Salmaggi, A (2001). *Modulation of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats by administration of a peptide of Fas ligand.***J Autoimmun.**17(4).273-80.
- 22.-Cohen, PL and Eisenberg, RA (1992). *The lpr and gld genes in systemic autoimmunity: life and death in the Fas lane.***Immunol Today.**13(11).427-8.
- 23.-Combs, CK, Karlo, JC, Kao, SC and Landreth, GE (2001). *beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFalpha-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis.***J Neurosci.**21(4).1179-88.
- 24.-Cotman, CW and Su, JH (1996). *Mechanisms of neuronal death in Alzheimer's disease.***Brain Pathol.**6(4).493-506.
- 25.-Cremesti, A, Paris, F, Grassme, H, Holler, N, Tschopp, J, Fuks, Z, Gulbins, E and Kolesnick, R (2001). *Ceramide enables fas to cap and kill.***J Biol Chem.**276(26).23954-61.
- 26.-Curtin, JF and Cotter, TG (2003). *Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis.***Cell Signal.**15(11).983-92.
- 27.-Chan, FK, Chun, HJ, Zheng, L, Siegel, RM, Bui, KL and Lenardo, MJ (2000). *A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling.***Science.**288(5475).2351-4.
- 28.-Chang, DW, Xing, Z, Pan, Y, Algeciras-Schimmich, A, Barnhart, BC, Yaish-Ohad, S, Peter, ME and Yang, X (2002). *c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis.***Embo J.**21(14).3704-14.
- 29.-Chao, MV and Bothwell, M (2002). *Neurotrophins: to cleave or not to cleave.***Neuron.**33(1).9-12.
- 30.-Chao, MV (2003). *Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways.***Nat Rev Neurosci.**4(4).299-309.
- 31.-Cheema, ZF, Wade, SB, Sata, M, Walsh, K, Sohrabji, F and Miranda, RC (1999). *Fas/Apo [apoptosis]-1 and associated proteins in the differentiating cerebral cortex: induction of caspase-dependent cell death and activation of NF-kappaB.***J Neurosci.**19(5).1754-70.
- 32.-Chen, Z, Duan, RS, Lepecheur, M, Paly, E, London, J and Zhu, J (2005). *SOD-1 inhibits FAS expression in cortex of APP transgenic mice.***Apoptosis.**10(3).499-502.
- 33.-Chipuk, JE and Green, DR (2005). *Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death?***Nat Rev Mol Cell Biol.**6(3).268-75.
- 34.-Choi, C and Benveniste, EN (2004). *Fas ligand/Fas system in the brain: regulator of immune and apoptotic responses.***Brain Res Brain Res Rev.**44(1).65-81.
- 35.-Danial, NN and Korsmeyer, SJ (2004). *Cell death: critical control points.***Cell.**116(2).205-19.

- 36.-Dauer, W and Przedborski, S (2003). *Parkinson's disease: mechanisms and models*. **Neuron**.39(6).889-909.
- 37.-Davies, AM (2000). *Neurotrophins: neurotrophic modulation of neurite growth*. **Curr Biol**.10(5).R198-200.
- 38.-De Valck, D, Jin, DY, Heyninck, K, Van de Craen, M, Contreras, R, Fiers, W, Jeang, KT and Beyaert, R (1999). *The zinc finger protein A20 interacts with a novel anti-apoptotic protein which is cleaved by specific caspases*. **Oncogene**.18(29).4182-90.
- 39.-Dechant, G and Barde, YA (1997). *Signalling through the neurotrophin receptor p75NTR*. **Curr Opin Neurobiol**.7(3).413-8.
- 40.-Demjen, D, Klussmann, S, Kleber, S, Zuliani, C, Stieltjes, B, Metzger, C, Hirt, UA, Walczak, H, Falk, W, Essig, M, Edler, L, Krammer, PH and Martin-Villalba, A (2004). *Neutralization of CD95 ligand promotes regeneration and functional recovery after spinal cord injury*. **Nat Med**.10(4).389-95.
- 41.-Deng, Y, Ren, X, Yang, L, Lin, Y and Wu, X (2003). *A JNK-dependent pathway is required for TNF α -induced apoptosis*. **Cell**.115(1).61-70.
- 42.-Desbarats, J, Birge, RB, Mimouni-Rongy, M, Weinstein, DE, Palerme, JS and Newell, MK (2003). *Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation*. **Nat Cell Biol**.5(2).118-25.
- 43.-Ellis, HM and Horvitz, HR (1986). *Genetic control of programmed cell death in the nematode C. elegans*. **Cell**.44(6).817-29.
- 44.-Encinas, M, Iglesias, M, Liu, Y, Wang, H, Muhaisen, A, Cena, V, Gallego, C and Comella, JX (2000). *Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells*. **J Neurochem**.75(3).991-1003.
- 45.-Endres, R, Hacker, G, Brosch, I and Pfeffer, K (2003). *Apparently normal tumor necrosis factor receptor 1 signaling in the absence of the silencer of death domains*. **Mol Cell Biol**.23(18).6609-17.
- 46.-Eramo, A, Sargiacomo, M, Ricci-Vitiani, L, Todaro, M, Stassi, G, Messina, CG, Parolini, I, Lotti, F, Sette, G, Peschle, C and De Maria, R (2004). *CD95 death-inducing signaling complex formation and internalization occur in lipid rafts of type I and type II cells*. **Eur J Immunol**.34(7).1930-40.
- 47.-Estelles, A, Charlton, CA and Blau, HM (1999). *The phosphoprotein protein PEA-15 inhibits Fas- but increases TNF-R1-mediated caspase-8 activity and apoptosis*. **Dev Biol**.216(1).16-28.
- 48.-Estojak, J, Brent, R and Golemis, EA (1995). *Correlation of two-hybrid affinity data with in vitro measurements*. **Mol Cell Biol**.15(10).5820-9.
- 49.-Ethell, DW and Buhler, LA (2003). *Fas ligand-mediated apoptosis in degenerative disorders of the brain*. **J Clin Immunol**.23(6).439-46.
- 50.-Evan, G and Littlewood, T (1998). *A matter of life and cell death*. **Science**.281(5381).1317-22.
- 51.-Facchinetti, F, Furegato, S, Terrazzino, S and Leon, A (2002). *H(2)O(2) induces upregulation of Fas and Fas ligand expression in NGF-differentiated PC12 cells: modulation by cAMP*. **J Neurosci Res**.69(2).178-88.
- 52.-Faden, AI, Demediuk, P, Panter, SS and Vink, R (1989). *The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury*. **Science**.244(4906).798-800.
- 53.-Ferrer, I, Blanco, R, Cutillas, B and Ambrosio, S (2000). *Fas and Fas-L expression in Huntington's disease and Parkinson's disease*. **Neuropathol Appl Neurobiol**.26(5).424-33.
- 54.-Foehr, ED, Lin, X, O'Mahony, A, Geleziunas, R, Bradshaw, RA and Greene,

- WC (2000). *NF-kappa B signaling promotes both cell survival and neurite process formation in nerve growth factor-stimulated PC12 cells.* **J Neurosci.**20(20).7556-63.
- 55.-Foehr, ED, Lorente, G, Vincent, V, Nikolich, K and Urfer, R (2005). *FAS associated phosphatase (FAP-1) blocks apoptosis of astrocytomas through dephosphorylation of FAS.* **J Neurooncol.**74(3).241-8.
- 56.-Frade, JM, Rodriguez-Tebar, A and Barde, YA (1996). *Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor.* **Nature.**383(6596).166-8.
- 57.-Fulda, S, Kufer, MU, Meyer, E, van Valen, F, Dockhorn-Dworniczak, B and Debatin, KM (2001). *Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer.* **Oncogene.**20(41).5865-77.
- 58.-Fulda, S and Debatin, KM (2002). *IFN-gamma sensitizes for apoptosis by upregulating caspase-8 expression through the Stat1 pathway.* **Oncogene.**21(15).2295-308.
- 59.-Fulda, S and Debatin, KM (2004). *Exploiting death receptor signaling pathways for tumor therapy.* **Biochim Biophys Acta.**1705(1).27-41.
- 60.-Gajate, C, Del Canto-Janez, E, Acuna, AU, Amat-Guerri, F, Geijo, E, Santos-Beneit, AM, Veldman, RJ and Mollinedo, F (2004). *Intracellular triggering of Fas aggregation and recruitment of apoptotic molecules into Fas-enriched rafts in selective tumor cell apoptosis.* **J Exp Med.**200(3).353-65.
- 61.-Geetha, T, Kenchappa, RS, Wooten, MW and Carter, BD (2005). *TRAF6-mediated ubiquitination regulates nuclear translocation of NRIF, the p75 receptor interactor.* **Embo J.**24(22).3859-68.
- 62.-Golks, A, Brenner, D, Fritsch, C, Krammer, PH and Lavrik, IN (2005). *c-FLIPR, a New Regulator of Death Receptor-induced Apoptosis.* **J Biol Chem.**280(15).14507-13.
- 63.-Golstein, P (2000). *Signal transduction. FasL binds preassembled Fas.* **Science.**288(5475).2328-9.
- 64.-Gordeeva, AV, Labas, YA and Zvyagilskaya, RA (2004). *Apoptosis in unicellular organisms: mechanisms and evolution.* **Biochemistry (Moscow).**69(10).1055-66.
- 65.-Green, DR and Ferguson, TA (2001). *The role of Fas ligand in immune privilege.* **Nat Rev Mol Cell Biol.**2(12).917-24.
- 66.-Grell, M, Zimmermann, G, Gottfried, E, Chen, CM, Grunwald, U, Huang, DC, Wu Lee, YH, Durkop, H, Engelmann, H, Scheurich, P, Wajant, H and Strasser, A (1999). *Induction of cell death by tumour necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40 and CD30: a role for TNF-R1 activation by endogenous membrane-anchored TNF.* **Embo J.**18(11).3034-43.
- 67.-Gross, A, McDonnell, JM and Korsmeyer, SJ (1999). *BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis.* **Genes Dev.**13(15).1899-911.
- 68.-Guarente, L (1993). *Strategies for the identification of interacting proteins.* **Proc Natl Acad Sci U S A.**90(5).1639-41.
- 69.-Guerra-Crespo, M, Charli, JL, Rosales-Garcia, VH, Pedraza-Alva, G and Perez-Martinez, L (2003). *Polyethylenimine improves the transfection efficiency of primary cultures of post-mitotic rat fetal hypothalamic neurons.* **J Neurosci Methods.**127(2).179-92.
- 70.-Hamanoue, M, Middleton, G, Wyatt, S, Jaffray, E, Hay, RT and Davies, AM (1999). *p75-mediated NF-kappaB activation enhances the survival response of developing sensory neurons to nerve growth factor.* **Mol Cell Neurosci.**14(1).28-40.
- 71.-Harder, T, Scheiffele, P, Verkade, P and Simons, K (1998). *Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components.* **J Cell Biol.**141(4).929-42.

- 72.-Hayashi, N, Shirakura, H, Uehara, T and Nomura, Y (2006). *Relationship between SUMO-1 modification of caspase-7 and its nuclear localization in human neuronal cells.* **Neurosci Lett.**397(1-2).5-9.
- 73.-He, KL and Ting, AT (2002). *A20 inhibits tumor necrosis factor (TNF) alpha-induced apoptosis by disrupting recruitment of TRADD and RIP to the TNF receptor 1 complex in Jurkat T cells.* **Mol Cell Biol.**22(17).6034-45.
- 74.-Hengartner, MO (2000). *The biochemistry of apoptosis.* **Nature.**407(6805).770-6.
- 75.-Hicke, L and Riezman, H (1996). *Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis.* **Cell.**84(2).277-87.
- 76.-Hofmann, K, Bucher, P and Tschopp, J (1997). *The CARD domain: a new apoptotic signalling motif.* **Trends Biochem Sci.**22(5).155-6.
- 77.-Holler, N, Zaru, R, Micheau, O, Thome, M, Attinger, A, Valitutti, S, Bodmer, JL, Schneider, P, Seed, B and Tschopp, J (2000). *Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule.* **Nat Immunol.**1(6).489-95.
- 78.-Holler, N, Tardivel, A, Kovacovics-Bankowski, M, Hertig, S, Gaide, O, Martinon, F, Tinel, A, Deperthes, D, Calderara, S, Schulthess, T, Engel, J, Schneider, P and Tschopp, J (2003). *Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex.* **Mol Cell Biol.**23(4).1428-40.
- 79.-Huang, TT, Wuerzberger-Davis, SM, Wu, ZH and Miyamoto, S (2003). *Sequential modification of NEMO/IKKgamma by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF-kappaB activation by genotoxic stress.* **Cell.**115(5).565-76.
- 80.-Imamura, R, Konaka, K, Matsumoto, N, Hasegawa, M, Fukui, M, Mukaida, N, Kinoshita, T and Suda, T (2004). *Fas ligand induces cell-autonomous NF-kappaB activation and interleukin-8 production by a mechanism distinct from that of tumor necrosis factor-alpha.* **J Biol Chem.**279(45).46415-23.
- 81.-Irmiler, M, Thome, M, Hahne, M, Schneider, P, Hofmann, K, Steiner, V, Bodmer, JL, Schroter, M, Burns, K, Mattmann, C, Rimoldi, D, French, LE and Tschopp, J (1997). *Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP.* **Nature.**388(6638).190-5.
- 82.-Itoh, N, Yonehara, S, Ishii, A, Yonehara, M, Mizushima, S, Sameshima, M, Hase, A, Seto, Y and Nagata, S (1991). *The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis.* **Cell.**66(2).233-43.
- 83.-Ivanov, VN, Lopez Bergami, P, Maulit, G, Sato, TA, Sassoon, D and Ronai, Z (2003). *FAP-1 association with Fas (Apo-1) inhibits Fas expression on the cell surface.* **Mol Cell Biol.**23(10).3623-35.
- 84.-Ivanov, VN, Ronai, Z and Hei, TK (2006). *Opposite roles of FAP-1 and dynamin in the regulation of Fas (CD95) translocation to the cell surface and susceptibility to Fas ligand-mediated apoptosis.* **J Biol Chem.**281(3).1840-52.
- 85.-Jiang, Y, Woronicz, JD, Liu, W and Goeddel, DV (1999). *Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains.* **Science.**283(5401).543-6.
- 86.-Joza, N, Kroemer, G and Penninger, JM (2002). *Genetic analysis of the mammalian cell death machinery.* **Trends Genet.**18(3).142-9.
- 87.-Kaplan, DR, Matsumoto, K, Lucarelli, E and Thiele, CJ (1993). *Induction of TrkB by retinoic acid mediates biologic responsiveness to BDNF and differentiation of human neuroblastoma cells.* **Eukaryotic Signal Transduction Group.** **Neuron.**11(2).321-31.
- 88.-Kataoka, T, Budd, RC, Holler, N, Thome, M, Martinon, F, Irmiler, M, Burns, K, Hahne, M, Kennedy, N, Kovacovics, M and Tschopp, J (2000). *The caspase-8 inhibitor*

- FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signaling pathways.* **Curr Biol.**10(11).640-8.
- 89.-Kataoka, T and Tschopp, J (2004). *N-terminal fragment of c-FLIP(L) processed by caspase 8 specifically interacts with TRAF2 and induces activation of the NF-kappaB signaling pathway.* **Mol Cell Biol.**24(7).2627-36.
- 90.-Keppler, OT, Peter, ME, Hinderlich, S, Moldenhauer, G, Stehling, P, Schmitz, I, Schwartz-Albiez, R, Reutter, W and Pawlita, M (1999). *Differential sialylation of cell surface glycoconjugates in a human B lymphoma cell line regulates susceptibility for CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis and for infection by a lymphotropic virus.* **Glycobiology.**9(6).557-69.
- 91.-Kerr, JF, Wyllie, AH and Currie, AR (1972). *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.* **Br J Cancer.**26(4).239-57.
- 92.-Khosravi-Far, R and Esposti, MD (2004). *Death receptor signals to mitochondria.* **Cancer Biol Ther.**3(11).1051-7.
- 93.-Kim, JS (1996). *Cytokines and adhesion molecules in stroke and related diseases.* **J Neurol Sci.**137(2).69-78.
- 94.-Kim, S, Kang, J, Evers, BM and Chung, DH (2004). *Interferon-gamma induces caspase-8 in neuroblastomas without affecting methylation of caspase-8 promoter.* **J Pediatr Surg.**39(4).509-15.
- 95.-Kitsberg, D, Formstecher, E, Fauquet, M, Kubes, M, Cordier, J, Canton, B, Pan, G, Rolli, M, Glowinski, J and Chneiweiss, H (1999). *Knock-out of the neural death effector domain protein PEA-15 demonstrates that its expression protects astrocytes from TNFalpha-induced apoptosis.* **J Neurosci.**19(19).8244-51.
- 96.-Kovac, AD, Grammig, J, Mahlo, J, Steiner, B, Roth, K, Nitsch, R and Bechmann, I (2002). *Comparison of neuronal density and subfield sizes in the hippocampus of CD95L-deficient (gld), CD95-deficient (lpr) and nondeficient mice.* **Eur J Neurosci.**16(1).159-63.
- 97.-Krajewski, S, Tanaka, S, Takayama, S, Schibler, MJ, Fenton, W and Reed, JC (1993). *Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes.* **Cancer Res.**53(19).4701-14.
- 98.-Kreuz, S, Siegmund, D, Rumpf, JJ, Samel, D, Leverkus, M, Janssen, O, Hacker, G, Dittrich-Breiholz, O, Kracht, M, Scheurich, P and Wajant, H (2004). *NFkappaB activation by Fas is mediated through FADD, caspase-8, and RIP and is inhibited by FLIP.* **J Cell Biol.**166(3).369-80.
- 99.-Krueger, A, Baumann, S, Krammer, PH and Kirchhoff, S (2001). *FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis.* **Mol Cell Biol.**21(24).8247-54.
- 100.-Krueger, J, Chou, FL, Glading, A, Schaefer, E and Ginsberg, MH (2005). *Phosphorylation of phosphoprotein enriched in astrocytes (PEA-15) regulates extracellular signal-regulated kinase-dependent transcription and cell proliferation.* **Mol Biol Cell.**16(8).3552-61.
- 101.-Kumar, KN, Tilakaratne, N, Johnson, PS, Allen, AE and Michaelis, EK (1991). *Cloning of cDNA for the glutamate-binding subunit of an NMDA receptor complex.* **Nature.**354(6348).70-3.
- 102.-Lademann, U, Kallunki, T and Jaattela, M (2001). *A20 zinc finger protein inhibits TNF-induced apoptosis and stress response early in the signaling cascades and independently of binding to TRAF2 or 14-3-3 proteins.* **Cell Death Differ.**8(3).265-72.
- 103.-Laemmli, UK (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* **Nature.**227(5259).680-5.
- 104.-Lambert, C, Landau, AM and Desbarats, J (2003). *Fas-beyond death: a*

- regenerative role for Fas in the nervous system. **Apoptosis**.8(6).551-62.
- 105.-Landau, AM, Luk, KC, Jones, ML, Siegrist-Johnstone, R, Young, YK, Kouassi, E, Rymar, VV, Dagher, A, Sadikot, AF and Desbarats, J (2005). *Defective Fas expression exacerbates neurotoxicity in a model of Parkinson's disease*. **J Exp Med**.202(5).575-81.
- 106.-Lavrik, I, Golks, A and Krammer, PH (2005). *Death receptor signaling*. **J Cell Sci**.118(Pt 2).265-7.
- 107.-Lee, EG, Boone, DL, Chai, S, Libby, SL, Chien, M, Lodolce, JP and Ma, A (2000). *Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice*. **Science**.289(5488).2350-4.
- 108.-Lee, R, Kermani, P, Teng, KK and Hempstead, BL (2001). *Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins*. **Science**.294(5548).1945-8.
- 109.-Lee, YS, Jang, MS, Lee, JS, Choi, EJ and Kim, E (2005). *Erratum: SUMO-1 represses apoptosis signal-regulating kinase 1 activation through physical interaction and not through covalent modification*. **EMBO Rep**.6(11).1102-3.
- 110.-Legler, DF, Micheau, O, Doucey, MA, Tschopp, J and Bron, C (2003). *Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNFalpha-mediated NF-kappaB activation*. **Immunity**.18(5).655-64.
- 111.-Letai, A, Sorcinelli, MD, Beard, C and Korsmeyer, SJ (2004). *Antiapoptotic BCL-2 is required for maintenance of a model leukemia*. **Cancer Cell**.6(3).241-9.
- 112.-Levi-Montalcini, R and Cohen, S (1960). *Effects of the extract of the mouse submaxillary salivary glands on the sympathetic system of mammals*. **Ann N Y Acad Sci**.85(324-41).
- 113.-Levine, B and Klionsky, DJ (2004). *Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy*. **Dev Cell**.6(4).463-77.
- 114.-Li, P, Nijhawan, D, Budihardjo, I, Srinivasula, SM, Ahmad, M, Alnemri, ES and Wang, X (1997). *Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade*. **Cell**.91(4).479-89.
- 115.-Li, Y, Chopp, M, Jiang, N, Yao, F and Zaloga, C (1995). *Temporal profile of in situ DNA fragmentation after transient middle cerebral artery occlusion in the rat*. **J Cereb Blood Flow Metab**.15(3).389-97.
- 116.-Li, Y, Kanki, H, Hachiya, T, Ohyama, T, Irie, S, Tang, G, Mukai, J and Sato, T (2000). *Negative regulation of Fas-mediated apoptosis by FAP-1 in human cancer cells*. **Int J Cancer**.87(4).473-9.
- 117.-Ling, L and Goeddel, DV (2000). *T6BP, a TRAF6-interacting protein involved in IL-1 signaling*. **Proc Natl Acad Sci U S A**.97(17).9567-72.
- 118.-London, E and Brown, DA (2000). *Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts)*. **Biochim Biophys Acta**.1508(1-2).182-95.
- 119.-Lotocki, G, Alonso, OF, Dietrich, WD and Keane, RW (2004). *Tumor necrosis factor receptor 1 and its signaling intermediates are recruited to lipid rafts in the traumatized brain*. **J Neurosci**.24(49).11010-6.
- 120.-Luskin, MB and Shatz, CJ (1985). *Studies of the earliest generated cells of the cat's visual cortex: cogeneration of subplate and marginal zones*. **J Neurosci**.5(4).1062-75.
- 121.-Martin-Villalba, A, Herr, I, Jeremias, I, Hahne, M, Brandt, R, Vogel, J, Schenkel, J, Herdegen, T and Debatin, KM (1999). *CD95 ligand (Fas-L/APO-1L) and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediate ischemia-induced apoptosis in neurons*. **J Neurosci**.19(10).3809-17.

- 122.-Martin-Villalba, A, Hahne, M, Kleber, S, Vogel, J, Falk, W, Schenkel, J and Krammer, PH (2001). *Therapeutic neutralization of CD95-ligand and TNF attenuates brain damage in stroke.* **Cell Death Differ.**8(7).679-86.
- 123.-Matsumura, H, Shimizu, Y, Ohsawa, Y, Kawahara, A, Uchiyama, Y and Nagata, S (2000). *Necrotic death pathway in Fas receptor signaling.* **J Cell Biol.**151(6).1247-56.
- 124.-Miao, HS, Yu, LY, Hui, GZ and Guo, LH (2005). *Antiapoptotic effect both in vivo and in vitro of A20 gene when transfected into rat hippocampal neurons.* **Acta Pharmacol Sin.**26(1).33-8.
- 125.-Micheau, O, Thome, M, Schneider, P, Holler, N, Tschopp, J, Nicholson, DW, Briand, C and Grutter, MG (2002). *The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex.* **J Biol Chem.**277(47).45162-71.
- 126.-Micheau, O and Tschopp, J (2003). *Induction of TNF receptor 1-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes.* **Cell.**114(2).181-90.
- 127.-Mielke, K and Herdegen, T (2002). *Fatal shift of signal transduction is an integral part of neuronal differentiation: JNKs realize TNF α -mediated apoptosis in neuronlike, but not naive, PC12 cells.* **Mol Cell Neurosci.**20(2).211-24.
- 128.-Mogi, M, Harada, M, Kondo, T, Mizuno, Y, Narabayashi, H, Riederer, P and Nagatsu, T (1996). *The soluble form of Fas molecule is elevated in parkinsonian brain tissues.* **Neurosci Lett.**220(3).195-8.
- 129.-Monaghan, P, Robertson, D, Amos, TA, Dyer, MJ, Mason, DY and Greaves, MF (1992). *Ultrastructural localization of bcl-2 protein.* **J Histochem Cytochem.**40(12).1819-25.
- 130.-Muzio, M, Chinnaiyan, AM, Kischkel, FC, O'Rourke, K, Shevchenko, A, Ni, J, Scaffidi, C, Bretz, JD, Zhang, M, Gentz, R, Mann, M, Krammer, PH, Peter, ME and Dixit, VM (1996). *FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex.* **Cell.**85(6).817-27.
- 131.-Muzio, M, Stockwell, BR, Stennicke, HR, Salvesen, GS and Dixit, VM (1998). *An induced proximity model for caspase-8 activation.* **J Biol Chem.**273(5).2926-30.
- 132.-Nagata, S (1997). *Apoptosis by death factor.* **Cell.**88(3).355-65.
- 133.-Naldini, L, Blomer, U, Gage, FH, Trono, D and Verma, IM (1996). *Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector.* **Proc Natl Acad Sci U S A.**93(21).11382-8.
- 134.-Naldini, L, Blomer, U, Gallay, P, Ory, D, Mulligan, R, Gage, FH, Verma, IM and Trono, D (1996). *In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector.* **Science.**272(5259).263-7.
- 135.-Nicholson, DW (1999). *Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death.* **Cell Death Differ.**6(11).1028-42.
- 136.-Nykjaer, A, Lee, R, Teng, KK, Jansen, P, Madsen, P, Nielsen, MS, Jacobsen, C, Kliemann, M, Schwarz, E, Willnow, TE, Hempstead, BL and Petersen, CM (2004). *Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death.* **Nature.**427(6977).843-8.
- 137.-Okura, T, Gong, L, Kamitani, T, Wada, T, Okura, I, Wei, CF, Chang, HM and Yeh, ET (1996). *Protection against Fas/APO-1- and tumor necrosis factor-mediated cell death by a novel protein, sentrin.* **J Immunol.**157(10).4277-81.
- 138.-Opipari, AW, Jr., Boguski, MS and Dixit, VM (1990). *The A20 cDNA induced by tumor necrosis factor alpha encodes a novel type of zinc finger protein.* **J Biol Chem.**265(25).14705-8.
- 139.-Oppenheim, RW (1989). *The neurotrophic theory and naturally occurring*

- motoneuron death. **Trends Neurosci.**12(7).252-5.
- 140.-Pan, G, Ni, J, Wei, YF, Yu, G, Gentz, R and Dixit, VM (1997). *An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL.* **Science.**277(5327).815-8.
- 141.-Peter, ME and Krammer, PH (2003). *The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond.* **Cell Death Differ.**10(1).26-35.
- 142.-Peter, ME (2004). *The flip side of FLIP.* **Biochem J.**382(Pt 2).e1-3.
- 143.-Pettmann, B and Henderson, CE (1998). *Neuronal cell death.* **Neuron.**20(4).633-47.
- 144.-Puntervoll, P, Linding, R, Gemund, C, Chabanis-Davidson, S, Mattingdal, M, Cameron, S, Martin, DM, Ausiello, G, Brannetti, B, Costantini, A, Ferre, F, Maselli, V, Via, A, Cesareni, G, Diella, F, Superti-Furga, G, Wyrwicz, L, Ramu, C, McGuigan, C, Gudavalli, R, Letunic, I, Bork, P, Rychlewski, L, Kuster, B, Helmer-Citterich, M, Hunter, WN, Aasland, R and Gibson, TJ (2003). *ELM server: A new resource for investigating short functional sites in modular eukaryotic proteins.* **Nucleic Acids Res.**31(13).3625-30.
- 145.-Puthalakath, H and Strasser, A (2002). *Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins.* **Cell Death Differ.**9(5).505-12.
- 146.-Pype, S, Declercq, W, Ibrahim, A, Michiels, C, Van Rietschoten, JG, Dewulf, N, de Boer, M, Vandenabeele, P, Huylebroeck, D and Remacle, JE (2000). *TTRAP, a novel protein that associates with CD40, tumor necrosis factor (TNF) receptor-75 and TNF receptor-associated factors (TRAFs), and that inhibits nuclear factor-kappa B activation.* **J Biol Chem.**275(24).18586-93.
- 147.-Qiu, J, Whalen, MJ, Lowenstein, P, Fiskum, G, Fahy, B, Darwish, R, Aarabi, B, Yuan, J and Moskowitz, MA (2002). *Upregulation of the Fas receptor death-inducing signaling complex after traumatic brain injury in mice and humans.* **J Neurosci.**22(9).3504-11.
- 148.-Qui, MS and Green, SH (1992). *PC12 cell neuronal differentiation is associated with prolonged p21ras activity and consequent prolonged ERK activity.* **Neuron.**9(4).705-17.
- 149.-Rabizadeh, S, Oh, J, Zhong, LT, Yang, J, Bitler, CM, Butcher, LL and Bredesen, DE (1993). *Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor.* **Science.**261(5119).345-8.
- 150.-Rano, TA, Timkey, T, Peterson, EP, Rotonda, J, Nicholson, DW, Becker, JW, Chapman, KT and Thornberry, NA (1997). *A combinatorial approach for determining protease specificities: application to interleukin-1beta converting enzyme (ICE).* **Chem Biol.**4(2).149-55.
- 151.-Raoul, C, Henderson, CE and Pettmann, B (1999). *Programmed cell death of embryonic motoneurons triggered through the Fas death receptor.* **J Cell Biol.**147(5).1049-62.
- 152.-Raoul, C, Estevez, AG, Nishimune, H, Cleveland, DW, deLapeyriere, O, Henderson, CE, Haase, G and Pettmann, B (2002). *Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream of Fas. potentiation by ALS-linked SOD1 mutations.* **Neuron.**35(6).1067-83.
- 153.-Raoul, C, Barthelemy, C, Couzinet, A, Hancock, D, Pettmann, B and Hueber, AO (2005). *Expression of a dominant negative form of Daxx in vivo rescues motoneurons from Fas (CD95)-induced cell death.* **J Neurobiol.**62(2).178-88.
- 154.-Rasper, DM, Vaillancourt, JP, Hadano, S, Houtzager, VM, Seiden, I, Keen, SL, Tawa, P, Xanthoudakis, S, Nasir, J, Martindale, D, Koop, BF, Peterson, EP, Thornberry, NA, Huang, J, MacPherson, DP, Black, SC, Hornung, F, Lenardo, MJ, Hayden, MR, Roy, S and Nicholson, DW (1998). *Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex.* **Cell Death Differ.**5(4).271-88.

- 155.-Renganathan, H, Vaidyanathan, H, Knapinska, A and Ramos, JW (2005). *Phosphorylation of PEA-15 switches its binding specificity from ERK/MAPK to FADD*. **Biochem J**.390(Pt 3).729-35.
- 156.-Robbins, DJ, Cheng, M, Zhen, E, Vanderbilt, CA, Feig, LA and Cobb, MH (1992). *Evidence for a Ras-dependent extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) cascade*. **Proc Natl Acad Sci U S A**.89(15).6924-8.
- 157.-Rosenbaum, DM, Gupta, G, D'Amore, J, Singh, M, Weidenheim, K, Zhang, H and Kessler, JA (2000). *Fas (CD95/APO-1) plays a role in the pathophysiology of focal cerebral ischemia*. **J Neurosci Res**.61(6).686-92.
- 158.-Ross, SA, Halliday, MI, Campbell, GC, Byrnes, DP and Rowlands, BJ (1994). *The presence of tumour necrosis factor in CSF and plasma after severe head injury*. **Br J Neurosurg**.8(4).419-25.
- 159.-Roth, W, Kermer, P, Krajewska, M, Welsh, K, Davis, S, Krajewski, S and Reed, JC (2003). *Bifunctional apoptosis inhibitor (BAR) protects neurons from diverse cell death pathways*. **Cell Death Differ**.10(10).1178-87.
- 160.-Rothstein, TL, Zhong, X, Schram, BR, Negm, RS, Donohoe, TJ, Cabral, DS, Foote, LC and Schneider, TJ (2000). *Receptor-specific regulation of B-cell susceptibility to Fas-mediated apoptosis and a novel Fas apoptosis inhibitory molecule*. **Immunol Rev**.176(116-33).
- 161.-Saas, P, Walker, PR, Hahne, M, Quiquerez, AL, Schnuriger, V, Perrin, G, French, L, Van Meir, EG, de Tribolet, N, Tschopp, J and Dietrich, PY (1997). *Fas ligand expression by astrocytoma in vivo: maintaining immune privilege in the brain?* **J Clin Invest**.99(6).1173-8.
- 162.-Sakic, B, Szechtman, H, Denburg, JA, Gorny, G, Kolb, B and Whishaw, IQ (1998). *Progressive atrophy of pyramidal neuron dendrites in autoimmune MRL-lpr mice*. **J Neuroimmunol**.87(1-2).162-70.
- 163.-Sato, T, Irie, S, Kitada, S and Reed, JC (1995). *FAP-1: a protein tyrosine phosphatase that associates with Fas*. **Science**.268(5209).411-5.
- 164.-Scaffidi, C, Fulda, S, Srinivasan, A, Friesen, C, Li, F, Tomaselli, KJ, Debatin, KM, Krammer, PH and Peter, ME (1998). *Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways*. **Embo J**.17(6).1675-87.
- 165.-Scaffidi, C, Schmitz, I, Krammer, PH and Peter, ME (1999). *The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis*. **J Biol Chem**.274(3).1541-8.
- 166.-Schneider, TJ, Grillot, D, Foote, LC, Nunez, GE and Rothstein, TL (1997). *Bcl-x protects primary B cells against Fas-mediated apoptosis*. **J Immunol**.159(10).4834-9.
- 167.-Schneider, TJ, Fischer, GM, Donohoe, TJ, Colarusso, TP and Rothstein, TL (1999). *A novel gene coding for a Fas apoptosis inhibitory molecule (FAIM) isolated from inducibly Fas-resistant B lymphocytes*. **J Exp Med**.189(6).949-56.
- 168.-Schwartz, LM, Smith, SW, Jones, ME and Osborne, BA (1993). *Do all programmed cell deaths occur via apoptosis?* **Proc Natl Acad Sci U S A**.90(3).980-4.
- 169.-Schweitzer, B, Taylor, V, Welcher, AA, McClelland, M and Suter, U (1998). *Neural membrane protein 35 (NMP35): a novel member of a gene family which is highly expressed in the adult nervous system*. **Mol Cell Neurosci**.11(5-6).260-73.
- 170.-Schweitzer, B, Suter, U and Taylor, V (2002). *Neural membrane protein 35/Lifeguard is localized at postsynaptic sites and in dendrites*. **Brain Res Mol Brain Res**.107(1).47-56.
- 171.-Sharp, DA, Lawrence, DA and Ashkenazi, A (2005). *Selective knockdown of the long variant of cellular FLICE inhibitory protein augments death receptor-mediated caspase-8 activation and apoptosis*. **J Biol Chem**.280(19).19401-9.

- 172.-Shatz, CJ, Ghosh, A, McConnell, SK, Allendoerfer, KL, Friauf, E and Antonini, A (1990). *Pioneer neurons and target selection in cerebral cortical development*. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol.**55(469-80).
- 173.-Shimohama, S (2000). *Apoptosis in Alzheimer's disease--an update*. **Apoptosis.**5(1).9-16.
- 174.-Siegel, RM, Frederiksen, JK, Zacharias, DA, Chan, FK, Johnson, M, Lynch, D, Tsien, RY and Lenardo, MJ (2000). *Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations*. **Science.**288(5475).2354-7.
- 175.-Siegel, RM, Muppidi, JR, Sarker, M, Lobito, A, Jen, M, Martin, D, Straus, SE and Lenardo, MJ (2004). *SPOTS: signaling protein oligomeric transduction structures are early mediators of death receptor-induced apoptosis at the plasma membrane*. **J Cell Biol.**167(4).735-44.
- 176.-Simons, K and Toomre, D (2000). *Lipid rafts and signal transduction*. **Nat Rev Mol Cell Biol.**1(1).31-9.
- 177.-Smith, CA, Farrah, T and Goodwin, RG (1994). *The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death*. **Cell.**76(6).959-62.
- 178.-Smith, MA, Hirai, K, Hsiao, K, Pappolla, MA, Harris, PL, Siedlak, SL, Tabaton, M and Perry, G (1998). *Amyloid-beta deposition in Alzheimer transgenic mice is associated with oxidative stress*. **J Neurochem.**70(5).2212-5.
- 179.-Sole, C, Dolcet, X, Segura, MF, Gutierrez, H, Diaz-Meco, MT, Gozzelino, R, Sanchis, D, Bayascas, JR, Gallego, C, Moscat, J, Davies, AM and Comella, JX (2004). *The death receptor antagonist FAIM promotes neurite outgrowth by a mechanism that depends on ERK and NF-kappa B signaling*. **J Cell Biol.**167(3).479-92.
- 180.-Somia, NV, Schmitt, MJ, Vetter, DE, Van Antwerp, D, Heinemann, SF and Verma, IM (1999). *LFG: an anti-apoptotic gene that provides protection from Fas-mediated cell death*. **Proc Natl Acad Sci U S A.**96(22).12667-72.
- 181.-Spierings, D, McStay, G, Saleh, M, Bender, C, Chipuk, J, Maurer, U and Green, DR (2005). *Connected to death: the (unexpurgated) mitochondrial pathway of apoptosis*. **Science.**310(5745).66-7.
- 182.-Sprick, MR, Rieser, E, Stahl, H, Grosse-Wilde, A, Weigand, MA and Walczak, H (2002). *Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8*. **Embo J.**21(17).4520-30.
- 183.-Sriram, K, Matheson, JM, Benkovic, SA, Miller, DB, Luster, MI and O'Callaghan, JP (2002). *Mice deficient in TNF receptors are protected against dopaminergic neurotoxicity: implications for Parkinson's disease*. **FASEB J.**16(11).1474-6.
- 184.-Stegh, AH, Barnhart, BC, Volkland, J, Algeciras-Schimmich, A, Ke, N, Reed, JC and Peter, ME (2002). *Inactivation of caspase-8 on mitochondria of Bcl-xL-expressing MCF7-Fas cells: role for the bifunctional apoptosis regulator protein*. **J Biol Chem.**277(6).4351-60.
- 185.-Susin, SA, Lorenzo, HK, Zamzami, N, Marzo, I, Snow, BE, Brothers, GM, Mangion, J, Jacotot, E, Costantini, P, Loeffler, M, Larochette, N, Goodlett, DR, Aebersold, R, Siderovski, DP, Penninger, JM and Kroemer, G (1999). *Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor*. **Nature.**397(6718).441-6.
- 186.-Swanborg, RH (1995). *Experimental autoimmune encephalomyelitis in rodents as a model for human demyelinating disease*. **Clin Immunol Immunopathol.**77(1).4-13.
- 187.-Takada, H, Chen, NJ, Mirtsos, C, Suzuki, S, Suzuki, N, Wakeham, A, Mak, TW and Yeh, WC (2003). *Role of SODD in regulation of tumor necrosis factor responses*. **Mol Cell Biol.**23(11).4026-33.

- 188.-Tang, G, Minemoto, Y, Dibling, B, Purcell, NH, Li, Z, Karin, M and Lin, A (2001). *Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes.* **Nature.**414(6861).313-7.
- 189.-Teitz, T, Wei, T, Valentine, MB, Vanin, EF, Grenet, J, Valentine, VA, Behm, FG, Look, AT, Lahti, JM and Kidd, VJ (2000). *Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN.* **Nat Med.**6(5).529-35.
- 190.-Teng, HK, Teng, KK, Lee, R, Wright, S, Tevar, S, Almeida, RD, Kermani, P, Torkin, R, Chen, ZY, Lee, FS, Kraemer, RT, Nykjaer, A and Hempstead, BL (2005). *ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin.* **J Neurosci.**25(22).5455-63.
- 191.-Thome, M, Schneider, P, Hofmann, K, Fickenscher, H, Meinl, E, Neipel, F, Mattmann, C, Burns, K, Bodmer, JL, Schroter, M, Scaffidi, C, Krammer, PH, Peter, ME and Tschopp, J (1997). *Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors.* **Nature.**386(6624).517-21.
- 192.-Thornberry, NA, Rano, TA, Peterson, EP, Rasper, DM, Timkey, T, Garcia-Calvo, M, Houtzager, VM, Nordstrom, PA, Roy, S, Vaillancourt, JP, Chapman, KT and Nicholson, DW (1997). *A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis.* **J Biol Chem.**272(29).17907-11.
- 193.-Tiranti, V, Rossi, E, Ruiz-Carrillo, A, Rossi, G, Rocchi, M, DiDonato, S, Zuffardi, O and Zeviani, M (1995). *Chromosomal localization of mitochondrial transcription factor A (TCF6), single-stranded DNA-binding protein (SSBP), and endonuclease G (ENDOG), three human housekeeping genes involved in mitochondrial biogenesis.* **Genomics.**25(2).559-64.
- 194.-Tran, SE, Holmstrom, TH, Ahonen, M, Kahari, VM and Eriksson, JE (2001). *MAPK/ERK overrides the apoptotic signaling from Fas, TNF, and TRAIL receptors.* **J Biol Chem.**276(19).16484-90.
- 195.-Trauth, BC, Klas, C, Peters, AM, Matzku, S, Moller, P, Falk, W, Debatin, KM and Krammer, PH (1989). *Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis.* **Science.**245(4915).301-5.
- 196.-Trauzold, A, Roder, C, Sipos, B, Karsten, K, Arlt, A, Jiang, P, Martin-Subero, JI, Siegmund, D, Muerkoster, S, Pagerols-Raluy, L, Siebert, R, Wajant, H and Kalthoff, H (2005). *CD95 and TRAF2 promote invasiveness of pancreatic cancer cells.* **Faseb J.**19(6).620-2.
- 197.-Trono, D (2000). *Lentiviral vectors: turning a deadly foe into a therapeutic agent.* **Gene Ther.**7(1).20-3.
- 198.-Tsujimoto, Y, Finger, LR, Yunis, J, Nowell, PC and Croce, CM (1984). *Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation.* **Science.**226(4678).1097-9.
- 199.-Varfolomeev, EE, Schuchmann, M, Luria, V, Chiannikulchai, N, Beckmann, JS, Mett, IL, Rebrikov, D, Brodianski, VM, Kemper, OC, Kollet, O, Lapidot, T, Soffer, D, Sobe, T, Avraham, KB, Goncharov, T, Holtmann, H, Lonai, P and Wallach, D (1998). *Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally.* **Immunity.**9(2).267-76.
- 200.-Vaux, DL, Cory, S and Adams, JM (1988). *Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells.* **Nature.**335(6189).440-2.
- 201.-Vaux, DL and Silke, J (2005). *IAPs, RINGs and ubiquitylation.* **Nat Rev Mol Cell Biol.**6(4).287-97.
- 202.-Vitarbo, EA, Chatzipanteli, K, Kinoshita, K, Truettner, JS, Alonso, OF and Dietrich, WD (2004). *Tumor necrosis factor alpha expression and protein levels after fluid percussion injury in rats: the effect of injury severity and brain temperature.* **Neurosurgery.**55(2).416-24; discussion 424-5.

- 203.-Vogt, M, Bauer, MK, Ferrari, D and Schulze-Osthoff, K (1998). *Oxidative stress and hypoxia/reoxygenation trigger CD95 (APO-1/Fas) ligand expression in microglial cells.* **FEBS Lett.**429(1).67-72.
- 204.-Wang, CY, Mayo, MW, Korneluk, RG, Goeddel, DV and Baldwin, AS, Jr. (1998). *NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation.* **Science.**281(5383).1680-3.
- 205.-Wei, MC, Zong, WX, Cheng, EH, Lindsten, T, Panoutsakopoulou, V, Ross, AJ, Roth, KA, MacGregor, GR, Thompson, CB and Korsmeyer, SJ (2001). *Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death.* **Science.**292(5517).727-30.
- 206.-White, LD and Barone, S, Jr. (2001). *Qualitative and quantitative estimates of apoptosis from birth to senescence in the rat brain.* **Cell Death Differ.**8(4).345-56.
- 207.-Wildbaum, G, Westermann, J, Maor, G and Karin, N (2000). *A targeted DNA vaccine encoding fas ligand defines its dual role in the regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis.* **J Clin Invest.**106(5).671-9.
- 208.-Wittke, I, Wiedemeyer, R, Pillmann, A, Savelyeva, L, Westermann, F and Schwab, M (2003). *Neuroblastoma-derived sulfhydryl oxidase, a new member of the sulfhydryl oxidase/Quiescin6 family, regulates sensitization to interferon gamma-induced cell death in human neuroblastoma cells.* **Cancer Res.**63(22).7742-52.
- 209.-Wood, KW, Samecki, C, Roberts, TM and Blenis, J (1992). *ras mediates nerve growth factor receptor modulation of three signal-transducing protein kinases: MAP kinase, Raf-1, and RSK.* **Cell.**68(6).1041-50.
- 210.-Wu, S, Zhou, L, Rose, M, Xiao, X and Graham, SH (2004). *c-FLIP-L recombinant adeno-associated virus vector infection prevents Fas-mediated but not nerve growth factor withdrawal-mediated cell death in PC12 cells.* **Brain Res Mol Brain Res.**122(1).79-87.
- 211.-Xu, Q and Reed, JC (1998). *Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast.* **Mol Cell.**1(3).337-46.
- 212.-Yao, H, Song, E, Chen, J and Hamar, P (2004). *Expression of FAP-1 by human colon adenocarcinoma: implication for resistance against Fas-mediated apoptosis in cancer.* **Br J Cancer.**91(9).1718-25.
- 213.-Yeh, WC, Pompa, JL, McCurrach, ME, Shu, HB, Elia, AJ, Shahinian, A, Ng, M, Wakeham, A, Khoo, W, Mitchell, K, El-Deiry, WS, Lowe, SW, Goeddel, DV and Mak, TW (1998). *FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis.* **Science.**279(5358).1954-8.
- 214.-Yeh, WC, Itie, A, Elia, AJ, Ng, M, Shu, HB, Wakeham, A, Mirtsos, C, Suzuki, N, Bonnard, M, Goeddel, DV and Mak, TW (2000). *Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development.* **Immunity.**12(6).633-42.
- 215.-Yonehara, S, Ishii, A and Yonehara, M (1989). *A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor.* **J Exp Med.**169(5).1747-56.
- 216.-Yu, L, Miao, H, Hou, Y, Zhang, B and Guo, L (2006). *Neuroprotective effect of A20 on TNF-induced postschismic apoptosis.* **Neurochem Res.**31(1).21-32.
- 217.-Yuste, VJ, Bayascas, JR, Llecha, N, Sanchez-Lopez, I, Boix, J and Comella, JX (2001). *The absence of oligonucleosomal DNA fragmentation during apoptosis of IMR-5 neuroblastoma cells: disappearance of the caspase-activated DNase.* **J Biol Chem.**276(25).22323-31.
- 218.-Yuste, VJ, Sanchez-Lopez, I, Sole, C, Moubarak, RS, Bayascas, JR, Dolcet, X, Encinas, M, Susin, SA and Comella, JX (2005). *The contribution of apoptosis-inducing factor, caspase-activated DNase, and inhibitor of caspase-activated DNase to the nuclear phenotype and DNA degradation during apoptosis.* **J Biol Chem.**280(42).35670-83.

219.-Zhai, D, Huang, X, Han, X and Yang, F (2000). *Characterization of tBid-induced cytochrome c release from mitochondria and liposomes*. **FEBS Lett.**472(2-3).293-6.

220.-Zhai, D, Miao, Q, Xin, X and Yang, F (2001). *Leakage and aggregation of phospholipid vesicles induced by the BH3-only Bcl-2 family member, BID*. **Eur J Biochem.**268(1).48-55.

221.-Zhang, H, Xu, Q, Krajewski, S, Krajewska, M, Xie, Z, Fuess, S, Kitada, S, Pawlowski, K, Godzik, A and Reed, JC (2000). *BAR: An apoptosis regulator at the intersection of caspases and Bcl-2 family proteins*. **Proc Natl Acad Sci U S A.**97(6).2597-602.

222.-Zhong, X, Schneider, TJ, Cabral, DS, Donohoe, TJ and Rothstein, TL (2001). *An alternatively spliced long form of Fas apoptosis inhibitory molecule (FAIM) with tissue-specific expression in the brain*. **Mol Immunol.**38(1).65-72.

223.-Zuliani, C, Kleber, S, Klussmann, S, Wenger, T, Kenzelmann, M, Schreglmann, N, Martinez, A, Del Rio, JA, Soriano, E, Vodrazka, P, Kuner, R, Groene, HJ, Herr, I, Krammer, PH and Martin-Villalba, A (2005). *Control of neuronal branching by the death receptor CD95 (Fas/Apo-1)*. **Cell Death Differ.**

ANEXO

8. ANEXO

8.1 COMUNICACIONES EN CONGRESOS

Autores: Segura MF, Iglesias M, Comella JX, Olmos G
Título: Papel de los receptores opioides en la mediación de la supervivencia neuronal
Tipo de participación: Presentación Comunicación
Congreso: Muerte Neuronal y Neurodegeneración III
Lugar de celebración: Pont de Suert (Lleida). ESPAÑA. Año: 2001

Autores: Iglesias M, Segura MF, Comella JX, Olmos G
Título: La activación del receptor mu-opioide protege de la apoptosis por privación trófica en neuronas corticales
Tipo de participación: Póster
Congreso: IX Congreso de la Sociedad Española de Neurociencia
Lugar de celebración: Santiago de Compostela . ESPAÑA. Año: 2001

Autores: Segura MF, Iglesias M, Comella JX, Olmos G
Título: Sistema Opiode y Supervivencia Neuronal
Tipo de participación: Presentación Comunicación
Congreso: XXII Reunion del Grupo Español de Neurotransmission
Lugar de celebración: Vielha (Lleida) . ESPAÑA. Año: 2001

Autores: Segura MF, Sole C, Martinou JC, Comella JX
Título: Clonaje y caracterización de los efectos antiapoptóticos del ortólogo de ratón del antagonista del receptor Fas, Lifeguard
Tipo de participación: Presentación Comunicación
Congreso: V APO-REUNIÓN
Lugar de celebración: Tordesillas (Valladolid) . ESPAÑA. Año: 2002

Autores: Segura, M.F.; Solé, C.; Martinou, JC; Comella, J.X.
Título: Mitochondrial apoptosis regulation by non Bcl-2 family members
Tipo de participación: Presentación Comunicación
Congreso: Signalling for death and survival in motoneurons
Lugar de celebración: Carry le Rouet . FRANCIA. Año: 2002

Autores: Segura, MF; Solé, C.; Martinou, JC; Comella, J.X.
Título: Antagonistas de la vía apoptótica mitocondrial no pertenientes a la familia de Bcl-2
Tipo de participación: Presentación Comunicación
Congreso: IV Simposi de Neurobiologia Experimental
Lugar de celebración: Barcelona (Barcelona) . ESPAÑA. Año: 2002

Autores: Segura M.F., Solé C., Gozzelino R., Comella J.X.
Título: Implicación de los antagonistas de Fas, FAIM y Lifeguard, en la apoptosis de células del tipo II: Implicaciones en el Sistema Nervioso

Tipo de participación: Presentación Comunicación
Congreso: X Congreso de la Sociedad Española de Neurociencia
Lugar de celebración: Lleida (Lleida) . ESPAÑA. Año: 2003

Autores: Segura, MF.; Gozzelino, R.; Solé, C.; Comella, JX
Título: Estudio de los mecanismos moleculares antiapoptóticos del antagonista de Fas, Lifeguard.
Tipo de participación: Presentación Comunicación
Congreso: II Red de grupos de Mecanismos moleculares de muerte neuronal en modelos animales y patología humana.
Lugar de celebración: Sant Feliu de Guixols (Gerona) . ESPAÑA. Año: 2003

Autores: MF Segura, M Fernandez, C Solé, R Gozzelino, V Ceña y JX Comella
Título: Lifeguard se localiza específicamente en los "Lipid Rafts" y antagoniza la función del receptor de muerte Fas en Sistema Nervioso.
Tipo de participación: Póster
Congreso: XXVIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular
Lugar de celebración: Zaragoza . ESPAÑA. Año: 2005

Autores: MF Segura, C Solé, R Gozzelino, JX Comella
Título: Patrón de expresión neuronal y posibles implicaciones funcionales del antagonista de Fas, FAIM-L
Tipo de participación: Póster
Congreso: XI Congreso de la Sociedad Española de Neurociencia
Lugar de celebración: Málaga . ESPAÑA. Año: 2005

Autores: MF Segura, M Pascual, C Sole, R Gozzelino, VJ Yste, JX Comella
Título: La forma alternativa de *splicing* de FAIM, FAIM-L, protege a las neuronas de la apoptosis inducida por receptores de muerte.
Tipo de participación: Presentación Comunicación
Congreso: Reunión de la red "Mecanismos moleculares de muerte neuronal en modelos animales y patología humana"
Lugar de celebración: Valencia . ESPAÑA. Año: 2006

8.1 PUBLICACIONES

8.2.1 Artículos Publicados

1. Sergi Simó, Lluís Pujadas, **Miguel F. Segura**, Anna La Torre, Jesús M. Ureña, Joan X. Comella and Eduardo Soriano
Reelin induces the detachment of subventricular zone cells and the expression of the Egr-1 transcription factor through the activation of Erk1/2
Cerebral Cortex. Accepted February 2006
2. Carme Solé, Xavier Dolcet, **Miguel F. Segura**, Humberto Gutierrez, Maria-Teresa Diaz-Meco, Raffaella Gozzelino, Daniel Sanchis, Jose R. Bayascas, Carme Gallego, Jorge Moscat, Alun M. Davies and Joan X. Comella.
The death receptor antagonist FAIM promotes neurite outgrowth by a mechanism that depends on ERK and NF- κ B signalling.
J Cell Biol. 2004 Nov 8;167(3):479-492
3. J.R.Bayascas*, V.J.Yuste*, C.Sole, I.Sanchez-Lopez, **M.F.Segura**, R.Perera, J.X.Comella. Characterization of splice variants of human caspase-activated DNase with CIDE-N structure and function. **FEBS Letters**. 566:234-240. 2004. (* co-authors)
4. Iglesias M, **Segura M.F.**, Comella J.X., Olmos G. Mu-opioid receptor activation prevents apoptosis following serum withdrawal in differentiated SH-SY5Y cells and cortical neurons via phosphatidylinositol 3-kinase.
Neuropharmacology. 2003 Mar;44(4):482-92.

8.2.2 Artículos en preparación

Segura MF, Sole C, Pascual M, Encinas M, Gozzelino R, Soriano E, Yuste VJ, Comella JX
Neurotrophic factor dependent expression of FAIM_L protects neurons against Death Receptor induced cell death.

Fernandez M*, **Segura MF***, Sole C, Comella JX, Cena V
Neuronal Fas resistance is mediated by specific Lipid Raft localization of Lifeguard.
(*co-authors)

Sole C, Perez-Garcia MJ, Gutierrez H, Gozzelino R, **Segura MF**, Dolcet X, Yuste VJ, Davies AM, Comella JX. Neurotrophic factor-induced neuronal differentiation is mediated by the death receptor antagonist FLIP.

Gozzelino R, Sole C, Llecha N, **Segura, MF**, Trullas R, Yuste VJ, Comella JX.
BclX_L levels are critical to regulate the responsiveness to TNF-alpha-induced apoptosis in both, PC12 cells and isolated cortical neurons.