

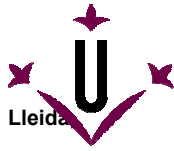
Universitat de Lleida

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



Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Universitat de

C/ Montserrat Roig, nº 2. 25198 Lleida

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

MIGUEL F. SEGURA GINARD

Tesis PhD

Lleida 2006

Director de Tesis

Joan X. Comella Carnicé

A Mary i a la meva família

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo supone para mí el final de una etapa y el comienzo de una nueva, por el momento desconocida y llena de interrogantes. Dicen que más vale lo malo conocido que lo bueno por conocer, pero durante estos 6 años (uff!) que he pasado en Lleida he conocido pocas cosas malas. Ello debo agradecerlo, en primer lugar, a mi director Joan Comella, que me dio la oportunidad de empezar y continuar esta tesis doctoral. Creo poder presumir de haberme empapado de su manera de entender la ciencia y espero que esta relación de trabajo y amistad que hemos tenido no acabe aquí.

Debo agradecer también a la gente del Departamento de Bioquímica de la UIB por haberme incitado a dar mis primeros pasos en ciencia, en especial a Joan Ribot, becario predoctoral por aquellos entonces, que me dejó ser su “sombra”. Gracias también, como no, a mis amigos de la carrera, Vicent, Roberto, Guillermo, Marga, David, Dani, Celia, Raúl, Víctor, Joana, Mónica, Elsa, Paloma y muy especialmente a Toni y Ana con los que compartimos muchas horas de estudio y distracción.

Gracias a mis “colegas de toda la vida” que, a pesar de la distancia, han mantenido su amistad, como son: Jose, Rafa Pecos, Mateu, Jordi, Xisco, Rafa, Toni y mi primo “gemelo” David.

No pueden faltar en estos agradecimientos los responsables de que esté yo hoy aquí. Gracias a Gabriel Olmos y a Montse Iglesias por confiar en mí y permitirme dar el salto de la isla a Lleida. Si ellos fueron los responsables de la llegada, muchos otros contribuyeron a que me quedara. Por ello, gracias a todos los miembros del antiguo NBM, Joaquín, Mario, Xavi, Carme Espinet, Rosa, Imma, Isu, Roser, Montse Comella y especialmente a Jose y Sonia, y a Víctor que actualmente me está prestando una inestimable ayuda en este tramo final. Incluyo también a Mari Sánchez-Vera, reportera de “radio-departamento” que siempre la hemos considerado como una más del grupo.

Agradezco a todos los componentes del Departamento de Ciencias Médicas Básicas su apoyo y ayuda que siempre me han estado dispuestos a ofrecer, sobretodo al grupo de Martí Aldea y Carme Gallego. Gracias a Eloi por introducirme en el mundo de las levaduras y en el de los dolores de cabeza con el *Two Hybrid*. Gracias en especial a los precarios de “mi generación” y alguno posterior Judit, Emili, Micaela, Chema, Esther, Gema Nieto, Ana Cardús, Serafí, Petar, Felip que saben de buena tinta lo “bonito y gratificante” que es el doctorado. Gracias también a la gente del PAS como Emilià, los Manolos, Araceli, Yolanda, David y Emeterio que contribuyen al buen funcionamiento de la Facultad.

Gracias también a los miembros del equipo de fútbol “U.E. Recerca” de la temporada 2004-05 y a los del equipo “Facultat” de la temporada 2005-06 que comparten conmigo uno de mis pocos momentos de relajación y distracción fuera del laboratorio.

Quiero expresar también mi agradecimiento y desearles mucha suerte a las nuevas incorporaciones de NBM que dieron paso a nuestro actual grupo SCiA: Dani, Marta, Núria, Jisheng, Carles, Gordana, Judit, Mónica, Andree, Sonia, Esteban y, como no, a Raffaella a la que debo agradecerle mi creciente interés por la Fórmula 1. Gracias también a nuestros “vecinos” de nefro Eva, Sara, Ana, Cristina, Valdi y a todos los de anatomía, muy especialmente a David, con el que compartimos las horas más intempestivas del laboratorio.

Vielen dank a la Dra. Ana Martín-Villalba y a Peter H Krammer de la “Division of Immunogenetics” del DKFZ en Heidelberg por acogerme en su laboratorio durante mi estancia breve y en especial al grupo de Neuro: Nina, Suse, Stephan, Alex y Ceci que hicieron mi estancia mucho más llevadera. Gracias también a la gente del Departamento de Farmacología de Albacete por acogerme en mis reiteradas visitas que han contribuido muy notablemente a los resultados de esta tesis.

Y por último, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a las personas más me han ayudado a superar las penas y a compartir las glorias (de éstas, pocas) en todo este tiempo y que han hecho que estos años sean una etapa inolvidable . Gracias al "Barbadillo team": a Carme (la Pon de Pin y...) con la que he tenido la suerte de trabajar y aprender codo con codo estos últimos 5 años y a Damià, su "research assistant" con el que compartimos, entre otras cosas, el buen gusto por las rutas gastronómicas. A Yolanda, especial promotora de actividades lúdico-deportivas y fiel amiga que siempre ha estado allí cuando la hemos necesitado. Dejo para el final al último componente del equipo, a Mary, con la que no tengo suficientes palabras para agradecer su paciencia infinita tanto en casa (ahí, no tanto) como con todo lo relacionado con el trabajo. Gracias por formar parte de mi equipo durante todos estos años y por querer acompañarme el resto de mi vida. Gracias también a mi familia que ha comprendido el que me fuera lejos de casa y me ha mostrado su apoyo en todo momento.

Miquel

Lleida, Mayo 2006

RESUMEN

RESUMEN

La apoptosis es un mecanismo fisiológico que contribuye a regular el número de células de un organismo de tal forma que aquellas que realizan funciones transitorias, que están lesionadas, o en exceso, serán eliminadas. Éste es un proceso estrictamente regulado durante el desarrollo embrionario e íntimamente ligado con el inicio o progresión de determinadas patologías. Así pues, el exceso de apoptosis contribuye al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas mientras que su defecto sería el origen de neoplasias. El principal regulador del proceso apoptótico es la activación de las caspasas, cisteína-proteasas con especificidad para residuos de aspartato. Los principales mecanismos que activan las caspasas son la salida de citocromo C de la mitocondria por una alteración de la función mitocondrial, y la activación de proteínas de membrana denominadas receptores de muerte (DRs, *Death Receptors*). Estos últimos han sido ampliamente caracterizados en el sistema inmune, mientras que en tejidos como el sistema nervioso sus funciones están en las fases iniciales de caracterización.

El objetivo del presente trabajo es contribuir a esclarecer los mecanismos moleculares que regulan la actividad de estos receptores en el sistema nervioso, a través de la caracterización funcional de dos nuevas proteínas, FAIM y *Lifeguard*, propuestas inicialmente como antagonistas del receptor de muerte CD95/Fas/APO-1. Para ello se han usado las líneas celulares PC12 y SH-SY5Y, ampliamente utilizadas en modelos de diferenciación y muerte celular, junto con cultivos primarios de neuronas corticales y neuronas granulares de cerebelo.

En la primera parte de este trabajo se describe la clonación del ortólogo de ratón de *Lifeguard*, y su caracterización como antagonista funcional de CD95 en el sistema nervioso. Hemos demostrado que su sobreexpresión es capaz de bloquear la muerte inducida por CD95 en el modelo del neuroblastoma humano SH-SY5Y así como en neuronas

corticales murinas. También hemos comprobado que la disminución de sus niveles endógenos sensibiliza a las neuronas granulares y las corticales de ratón. Además, se ha constatado que su mecanismo molecular de acción depende de su localización exclusiva en microdominios de membrana llamados *Lipid Rafts*, donde puede interactuar con CD95 e inhibir la activación de caspasas iniciadoras.

De los resultados obtenidos en la segunda parte del trabajo se deduce que los niveles de la isoforma larga del antagonista FAIM, FAIM_L, específica del sistema nervioso, aumentan durante el desarrollo embrionario. Su máxima expresión es en los períodos del desarrollo en los que se modelan y ajustan las estructuras neurales que darán lugar al cerebro adulto. Funcionalmente, hemos demostrado que no participa en procesos de neuritogénesis (a diferencia de la isoforma corta de FAIM, FAIM_S) y que no bloquea la muerte apoptótica inducida a través de estímulos mitocondriales. Sin embargo, FAIM_L es capaz de antagonizar la apoptosis inducida a través de los DRs CD95 y TNFR1. Los ensayos con RNA de interferencia nos han permitido elucidar que FAIM_L es, al menos en parte, responsable del bloqueo de la actividad de caspasas iniciadoras activadas por DRs.

Por tanto, este trabajo aporta claves sobre las bases moleculares que regulan la actividad de los DRs en el sistema nervioso y que pueden constituir una base para el desarrollo de estrategias terapéuticas en neuropatologías en las que los DRs participan de forma relevante.

ABSTRACT

Apoptosis is a physiological process by which the number of cells in metazoan organisms is regulated. Thus, cells with transient function, supranumerary cells or damaged ones are selectively eliminated by this process. Apoptosis is strictly regulated and recently it has been suggested that it could be involved in the pathogenesis of some nervous system diseases. In that sense, an excess of cell death could contribute to neurodegenerative disorders and, on the other hand, a defect could be one of the reasons for neoplasia development. The main regulator of apoptosis is the activation of caspases. These are cysteine-proteases which have cleavage specificity for aspartic residues. Caspases are activated by two main mechanisms: (1) release of citochrome C from altered mitochondria to the cytoplasm and (2) activation of membrane receptors called death receptors (DRs). These proteins have been widely characterized in the immune system, whereas in the nervous system their functions are at the initial stages of characterization.

The present project is focussed on the characterization of two novel antagonists of the death receptor CD95/Fas/APO-1 which are specifically expressed in the nervous system, Lifeguard and FAIM. For this purpose PC12 and SH-SY5Y cell lines, widely used in models of differentiation and cell death, have been used along with primary cultures of cortical neurons and cerebellar granule neurons.

Results obtained in the first part of this study allowed us to clone mouse Lifeguard, and describe its function as an antagonist of CD95 in the nervous system. We have demonstrated that its overexpression is able to block CD95 induced cell death in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y, and in mouse embryonic cortical neurons. Furthermore, reduction of Lifeguard endogenous levels sensitizes both, mouse granular and cortical neurons to CD95 induced apoptosis. In addition, it

has been stated that the molecular mechanism of action of Lifeguard depends on its exclusive location in plasma membrane microdomains called Lipid Rafts, where it can interact with CD95 and inhibit the activation of initiator caspases.

In the second part of this study, our results demonstrate that the expression of the long form of the CD95 antagonist FAIM, FAIM_L, specific of the nervous system, increases during the embryonic development. It reaches maximum levels in the periods of the development in which the neural structures are being defined, thus creating adult brain structures. Functionally, we have demonstrated that FAIM_L, in contrast to the short form of FAIM (FAIM_S), does not participate in neurotrophic factor induced neurite outgrowth and it is not able to block apoptotic induced cell death through mitochondrial stimuli. Nevertheless, FAIM_L is able to antagonize the apoptosis induced through DRs CD95 and TNFR1. FAIM_L RNA interference efficiently reduced its endogenous levels and allowed us to conclude that FAIM_L is one of the molecules responsible for maintaining initiator caspases inactive upon receptor engagement.

Therefore, this work will contribute to the understanding of the molecular basis for DRs activity regulation in the nervous system, and it could constitute a starting point for the development of new therapeutic strategies for DRs associated neuropathologies.

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS

1. INTRODUCCIÓN

1.1 MUERTE NEURONAL	1
1.2 MECANISMOS DE MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS	4
1.2.1 Las Caspasas	5
1.2.2 Las proteínas de la familia de Bcl-2	9
1.3 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN APOPTÓTICA	12
1.3.1 Vía Intrínseca o mitocondrial.....	12
1.3.2 Vía Extrínseca	16
1.3.2.1 Receptores de muerte. Familia del TNFR	16
1.3.2.2 Vías de señalización mediadas por DRs	19
1.3.2.2.1 Señalización mediada por CD95/Fas	19
1.3.2.2.2 Señalización mediada por TNFR1.....	28
1.4 RECEPTORES DE MUERTE EN EL SISTEMA NERVIOSO	32
1.4.1 Papel en el desarrollo embrionario	33
1.4.2 Implicaciones de los DRs en patologías	37
1.4.2.1 Isquemia	37
1.4.2.2 Enfermedades inflamatorias	39
1.4.2.3 Patologías con daño traumático	40
1.4.2.4 Enfermedades neurodegenerativas.....	42

1.4.3 Otras funciones	45
1.5 ANTAGONISTAS DE LOS RECEPTORES DE MUERTE	46
1.5.1 Lifeguard	47
1.5.2 FAIM.....	50
1.5.3 FLIP	54
1.5.4 Otros antagonistas	59
2. OBJETIVOS	69
3. MATERIAL Y MÉTODOS	71
3.1 ANTICUERPOS Y REACTIVOS	73
3.1.1 Generación anticuerpos policlonales	73
3.1.1.1 Diseño y síntesis de péptidos.....	74
3.1.1.2 Inmunización.....	75
3.2 CONSTRUCCIONES PLASMÍDICAS.....	79
3.2.1 Construcciones en vector de expresión para células de mamífero	79
3.2.2 Construcciones lentivirales	80

3.2.3 Construcciones para el ensayo luciferasa	80
3.2.4 Construcciones para el sistema de doble híbrido	81
3.3 CULTIVOS CELULARES	82
3.3.1 Cultivo de líneas celulares	82
3.3.2 Cultivo primario de neuronas	82
3.4 MÉTODOS DE TRANSFECCIÓN.....	83
3.4.1 Fosfato cálcico	83
3.4.2 Agentes liposolubles catiónicos	84
3.4.3 Producción de Lentivirus	86
3.5 RT-PCR.....	89
3.6 VALORACIÓN DE LA MUERTE CELULAR	89
3.6.1 Tinción con bis-benzimida de Hoechst	90
3.6.2 Reducción del MTT	91
3.6.3 Liberación de lactato deshidrogenasa (LDH).....	92
3.6.4 Actividad Caspasa	93
3.7 INMUNODETECCIÓN	94
3.7.1 Obtención de los extractos proteicos.....	94

3.7.2 Ensayo de Western-Blot	95
3.7.3 Inmunocitoquímica	95
3.7.4 Inmunohistoquímica	96
3.8 AISLAMIENTO DE <i>LIPID RAFTS</i>	96
3.9 ENSAYO LUCIFERASA.....	97
3.10 DOBLE HÍBRIDO	98
4. RESULTADOS	103
4.1 LIFEGUARD	103
4.1.1 Mouse Lifeguard cloning and expression	103
4.1.2 Structural analysis of mLFG.....	105
4.1.3 IFN γ renders neuroblastoma cell line SH-SY5Y to a type II CD95L induced cell death	110
4.1.4 mLFG inhibits CD95L induced apoptosis in neuronal cells ...	112
4.1.5 Antiapoptotic effects of mLFG are abolished by RNA interference.....	115
4.1.6 Endogenous LFG gives resistance to CD95 in primary neurons	117
4.1.7 LFG antagonizes CD95 in the lipid rafts	119
4.1.8 Two hybrid screening assay reveals possible regulators of LFG function.....	122

4.2 FAIM _L	127
4.2.1 Characterization of anti-FAIM _L antibodies	128
4.2.2 FAIM _L is predominantly expressed in nervous system	130
4.2.3 Intracellular distribution of FAIM _L in neurons	133
4.2.4 FAIM _L is upregulated during development.....	135
4.2.5 FAIM _L NGF induced upregulation is mediated by ERK pathway.....	136
4.2.6 FAIM _L does not have the same effects of FAIMS on nervous system	138
4.2.7 FAIM _L protects neuronal cells against death receptor induced cell death	140
5. DISCUSIÓN	147
5.1 LIFEGUARD CONFIERE RESISTENCIA A LAS NEURONAS DE LA MUERTE MEDIADA POR EL RECEPTOR FAS/CD95/APO-1 A TRAVÉS DE UN MECANISMO DEPENDIENTE DE SU LOCALIZACIÓN EN <i>LIPID RAFTS</i>	147
5.1.1 SH-SY5Y como modelo neuronal para el estudio de la señalización por CD95	148
5.1.2 Los niveles de expresión de LFG determinan sus propiedades antiapoptóticas.....	149
5.1.3 La función de LFG depende de su localización en los Lipid	

Raft y del bloqueo de la actividad de caspasa-8.....	152
5.1.4 LFG puede interferir directamente en la función de CD95	155
5.2 FAIM _L ES UNA PROTEÍNA EXCLUSIVA DEL SISTEMA NERVIOSO CAPAZ DE BLOQUEAR LA APOPTOSIS INDUCIDA POR RECEPTORES DE MUERTE.....	159
5.2.1 Distribución de FAIM _L en el cerebro en desarrollo.....	161
5.2.2 FAIM _L ejerce como antagonista de los receptores de muerte ...	165
6. CONCLUSIONES	177
7. BIBLIOGRAFÍA	181
8. ANEXO	197
8.1 COMUNICACIONES EN CONGRESOS.....	197
8.2 PUBLICACIONES.....	199
8.2.1 Artículos publicados	199
8.2.2 Artículos en preparación	199

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ActD	Actinomicina D
AD	<i>Alzheimer disease</i>
AFC	Adyuvante de Freund Completo
AFI	Adyuvante de Freund Incompleto
AIF	<i>Apoptosis Inducing Factor</i>
APAF-1	<i>Apoptotic protease activation factor 1</i>
ASK1	<i>Apoptosis signal-regulating kinase-1</i>
ATCC	<i>American Tissue Cultura Collection</i>
BAR	<i>Bifunctional Apoptosis Regulator</i>
BSA	<i>Bovin Sero Albumine</i>
C-	Carboxi
CARD	Dominio de unión a Caspasas (<i>Caspase Recruitment Domain</i>)
CICD	Muerte celular independiente de caspasas (<i>Caspase Independent Cell Death</i>)
CMV	Citomegalovirus
CRD	<i>Cystein Rich Domain</i>
DcR	Receptores “señuelo” (<i>Decoy Receptors</i>)
DD	<i>Death Domain</i>
DED	Dominio inductor de muerte (<i>Death Efector Domain</i>)
DIV	Días <i>in vitro</i>
DMEM	<i>Dulbecco’s modified Eagle’s medium</i>
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Desoxirribonucleic acid</i>)
DR	Receptores de Muerte (<i>Death Receptors</i>)
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
EAE	<i>Experimental allergin encephalomyelitis</i>
ERK	<i>Extracellular regulated kinase</i>

FADD	<i>Fas associated death domain</i>
FAIM	<i>Fas apoptosis inhibitory molecule</i>
FAP	<i>Fas Associated Phosphatase</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FLASH	<i>FLICE-Associated Huge Protein</i>
FLICE	<i>FADD-like interleukin-1-beta-converting enzyme</i>
FLIP	<i>Fas-associated death domain-like interleukin-1-beta-converting enzyme-inhibitory protein</i>
Glu	Glutámico
GST	<i>Glutathione S Transferase</i>
HIV	Virus de la Inmunodeficiencia humana
HS	<i>Horse Serum</i>
IAP	<i>Inhibitor of Apoptosis Protein</i>
IFNγ	Interferón gamma
IL-1β	<i>Interleukin-1 beta</i>
IPTG	<i>Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside</i>
JNK	<i>c-jun N-terminal kinase</i>
LBD	<i>Ligand Binding Domain</i>
LDH	Lactato deshidrogenasa
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MoMLV	Virus de la Leucemia murina de Moloney
MOMP	<i>Mitochondrial outer membrane permeabilization</i>
MPP	1-metil-4-fenilpiridiminio
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropirina
MS	<i>Multiple sclerosis</i>
MTT	3-[4.5-dimetiltiazol-2-il]-2.5-difeniltetrazolio
N-	Amino

NFκB	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
NMP35	<i>Neural Membrane Protein 35</i>
nNOS	<i>neuronal Nitric Oxide Sintase</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
p75^{NTR}	Receptor p75 de neurotrofina
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate buffer saline</i>)
PCD	Muerte Celular Programada (<i>Programmed Cell Death</i>)
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PD	<i>Parkinson disease</i>
PEI	<i>Polyethylenimine</i>
PFA	Paraformaldehido
PI-3K	Fosfatidil-inositoles-3-fosfato quinasa
PLAD	<i>Preligand Association Domain</i>
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic Acid</i>)
ROS	Especies reactivas de oxígeno (<i>Reactive Oxigen Species</i>)
SAM	<i>Sterile Alpha Motif</i>
SCG	<i>Superior Cervical Ganglion</i>
SCI	<i>Spinal Cord Injury</i>
Smac	<i>Second Mitochondria-derived Activator of Caspase</i>
SNC	Sistema Nervioso Central
SODD	<i>Silencer of death domains</i>
SPOTS	<i>Signaling Protein Oligomerization Transduction Structures</i>
STP	Staurosporine
TA	Temperatura Ambiente
TBI	<i>Traumatic Brain Injury</i>
tBid	Truncated Bid
TM	Transmembrana
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>

TRADD	<i>TNFR-Associated Death Domain Protein</i>
UAF	Unidades Arbitrarias de Fluorescencia
UV	Ultravioleta
VSV	<i>Vesicular Stomatitis Virus</i>

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 MUERTE CELULAR

La muerte celular es un proceso irreversible que lleva a la pérdida de la función celular. El gran número de estudios acerca de los mecanismos de muerte celular ha propiciado la aparición de diversas nomenclaturas y clasificaciones en función de distintos criterios. Es evidente que la muerte celular puede tener lugar por diferentes mecanismos dando lugar a distintas morfologías. A continuación, describiremos brevemente la nomenclatura utilizada en este trabajo y los tipos de muerte asociados al desarrollo y degeneración del sistema nervioso.

La **Muerte Celular Programada (PCD)** es el principal tipo de muerte celular implicado en procesos de desarrollo, regeneración, proliferación e incluso degeneración patológica en el Sistema Nervioso Central (Choi C y Benveniste EN, 2004). Descubierta y redescubierta varias veces durante los últimos doscientos años por distintos biólogos y citólogos, la muerte celular programada tuvo diferentes nombres, hasta que finalmente en el laboratorio del Dr. Currie se acuñó con el término **apoptosis**. Los autores observaron que durante el proceso de muerte de los hepatocitos había una serie de características morfológicas que se repetían en otros tejidos y tipos celulares, y que eran diferentes a aquellas observadas en fenómenos patológicos y de muerte necrótica (Kerr JF, *et al.*, 1972). Diferencias de nomenclaturas han llevado a cierta confusión entre los términos de apoptosis y PCD. Definiremos PCD como aquella muerte celular que ocurre en un instante preciso del desarrollo (de ahí, el término "Programada"). Debido a que la mayoría de ejemplos de PCD ocurren por apoptosis, y la apoptosis parece ser un evento "programado" de la célula, ambos términos se usan con frecuencia indistintamente. Sin embargo, hay ejemplos muy concretos

como el que ocurre en el desarrollo de la polilla del tabaco. Durante su desarrollo, precisa de músculos intersegmentales para salir del capullo. Después de la eclosión, estos músculos no se necesitarán nunca más y se eliminan por PCD sin que se aprecie ninguna característica distintiva de apoptosis (Schwartz LM, *et al.*, 1993).

Las características morfológicas que distinguen la apoptosis son básicamente una disminución del volumen celular, condensación de la cromatina, fragmentación nuclear, aparición de protuberancias en la membrana plasmática llamadas *blebbing* y la formación de los cuerpos apoptóticos, sin que haya alteración estructural de los orgánulos.

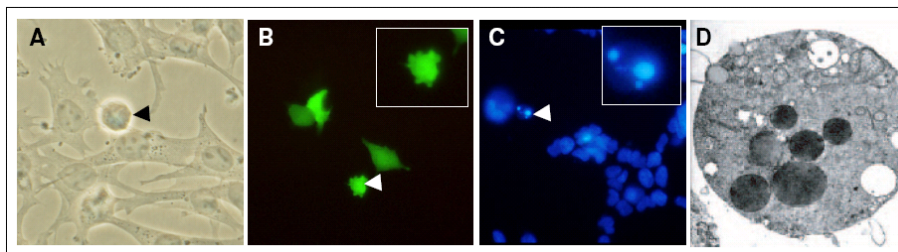


Figura 1. *A*, Disminución del volumen celular de una célula que entra en apoptosis. *B*, blebbing. *C*, Condensación y fragmentación de la cromatina. *D*, Microscopía electrónica donde se aprecia la formación de los cuerpos apoptóticos.

Está generalmente aceptado que las proteasas caspasas son las responsables de estas características distintivas. Este programa de suicidio celular está ligado a la actividad de los receptores de muerte, a la ausencia de factores tróficos y, en general, a todo tipo de estrés celular que desemboque en una activación de las caspasas ejecutoras que, finalmente, acabará en una muerte y fagocitosis de la célula.

En otros casos, se puede hablar de **muerte celular independiente de caspasas** (CICD, del inglés *Caspase-independent cell death*). CICD se puede iniciar por los mismos mecanismos que la

apoptosis, y no se detiene por inhibición de caspasas. Las características morfológicas pueden ser compartidas entre otras formas de muerte celular como apoptosis, necrosis o autofagia.

Otro tipo de muerte celular definido por sus características morfológicas es la **autofagia**. En este tipo de muerte celular se observa un reordenamiento de las membranas subcelulares que dan lugar a una masiva vacuolización del citoplasma sin que se aprecie condensación de la cromatina. Estas vacuolas están formadas, por definición, por una doble membrana y contienen orgánulos citoplasmáticos en degeneración o citosol (Levine B y Klionsky DJ, 2004).

La **necrosis** es considerada normalmente como un tipo de muerte celular sin características evidentes de apoptosis o autofagia. Este proceso aparece en situaciones patológicas en las que la severidad del insulto sobrepasa los umbrales a los que la célula puede responder con un programa coordinado de muerte. Durante el proceso, ocurre un aumento del volumen nuclear, la rotura de orgánulos y, finalmente, la rotura de las membranas nuclear y plasmática con la consiguiente degradación del DNA. Este proceso provocará la liberación de enzimas citosólicos que pueden actuar sobre los tejidos circundantes, desencadenando una respuesta inflamatoria.

Otra forma de muerte celular ligada a las neuronas es la **muerte excitotóxica**. Ocurre cuando aminoácidos excitatorios, como el glutamato, provocan la apertura de canales de calcio tipo NMDA (*N-methyl-D-aspartate*). Un exceso de calcio será el desencadenante de la muerte celular. Es posible que comparta características morfológicas de otros tipos de muerte celular, por lo que una mayor caracterización molecular permitirá en un futuro saber si se puede considerar como

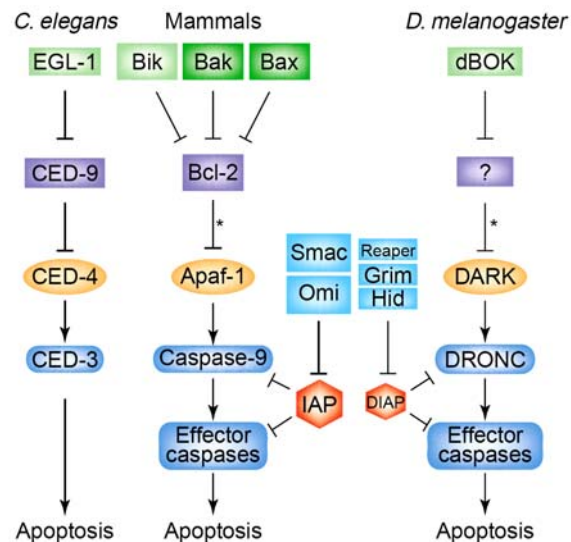
fenómeno independiente o como parte de otros procesos generales (Ceccatelli S, *et al.*, 2004).

1.2 MECANISMOS DE MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS

Durante los últimos años, la apoptosis se ha convertido en un amplio campo de investigación en bioquímica y biología molecular. Constantemente aparecen en la bibliografía nuevas moléculas relacionadas directamente con la apoptosis, configurando así el mapa, todavía en expansión, de las rutas moleculares implicadas. La apoptosis es un campo tan amplio como complicado, que exige un riguroso control. Antes de entrar en el detalle de los mecanismos propiamente dichos, conviene hacer una recopilación de las proteínas y complejos moleculares que intervienen en ella.

La caracterización de los componentes moleculares de la vía apoptótica han tenido su base en los estudios genéticos llevados a cabo en *Caenorhabditis elegans* (Ellis HM y Horvitz HR, 1986) . Durante su desarrollo, 131 de 1090 células somáticas mueren por apoptosis, quedando el adulto con 959 células.

Figura 2. El Sistema Apoptótico de *C.elegans* y sus homólogos en mamíferos y *Drosophila Melanogaster*. En células destinadas a morir, la expresión de *EGL-1* provoca un desplazamiento de *CED-4* y la subsiguiente activación de *CED-3*, provocando la muerte celular. Adaptado de (Joza N, *et al.*, 2002)



El *screening* genético de mutantes defectivos en muerte celular ha permitido identificar genes específicos para la regulación, ejecución y resolución de la apoptosis. *Ced-3*, *ced-4* y *egl-1* son requeridos para la muerte celular, mientras que *ced-9* juega un papel inhibidor de la apoptosis.

Este mecanismo molecular básico permanecerá conservado durante la evolución de los metazoos e irá incorporando mejoras para una correcta regulación. Ced-3 codifica para una cisteína-proteasa perteneciente a una amplia familia de las llamadas caspasas (por su predilección por la rotura de enlaces en residuos de aspártico), y de las cuales hay hasta 14 miembros descritos en mamíferos. CED-4 (Apaf-1 en mamíferos) es una proteína adaptadora indispensable para la función de CED-3. Su habilidad para activar CED-3 vendrá determinada por el producto del gen *ced-9* que actúa como supresor de la muerte. CED-9 representa el homólogo en mamíferos de la familia de Bcl-2, especialmente de sus miembros antiapoptóticos. Sólo cuando EGL-1 (con dominio BH3, homólogo a miembros proapoptóticos de la familia de Bcl-2) desplaza la inhibición de CED-9 sobre CED-4, CED-3 puede ejercer su acción proteolítica que acabará con la muerte programada de las 131 células del nematodo.

1.2.1 Las Caspasas

La mayoría de los cambios morfológicos observados por Kerr y sus colaboradores son causados por la activación específica de un conjunto de cisteína-proteasas. Estas proteínas son homólogas entre ellas y pertenecen a una gran familia denominada **caspasas** (Hengartner MO, 2000). Se han descrito hasta un total de 14 caspasas, de las cuales 11 se expresan en humanos. Como enzimas proteolíticas comparten características generales de las proteasas, como pueden ser:

- Su síntesis es en forma de precursores o zimógenos, con actividad muy reducida o nula. Se activan por proteólisis, ya sea por la acción de otra proteasa o por autocatálisis, facilitada por la unión de cofactores o mediante la eliminación de inhibidores.
- Pueden tener regulación propia de su activación gracias a una serie de “circuitos” positivos, negativos o bien bucles de amplificación, o también pueden ser reguladas por la presencia de inhibidores.
- Las reacciones proteolíticas pueden ser específicas. La especificidad vendrá determinada por la combinación de las estructuras primaria, secundaria y terciaria de los sustratos.
- Los cambios que provocan son irreversibles.

Aparte de las características generales, tienen rasgos característicos que les confieren una alta especificidad y una estricta regulación. Se sintetizan en forma de zimógenos (llamados procaspasas) y estructuralmente constan de:

- Prodominio, situado en el extremo amino-terminal de la proteína, con un tamaño comprendido entre 3 y 24 kDa de peso molecular aparente.
- Subunidad larga o grande, que ocupa la parte central del enzima. Su tamaño oscila entre 17 y 21 kDa.
- Subunidad corta o pequeña, situada en el extremo carboxi-terminal, y con un tamaño que puede ir de los 10 a los 13 kDa.

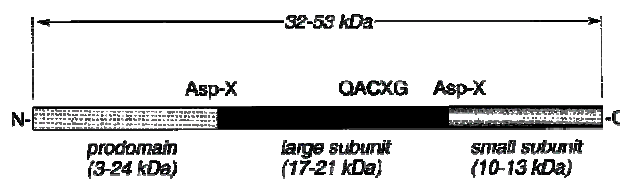


Figura 3. Esquema representativo de la organización de una procaspasa (Nicholson DW, 1999).

Tanto la subunidad larga como la corta, que juntas forman el enzima activo, se liberan del proenzima por el corte producido entre un residuo de aspártico (Asp) y otro aminoácido cualquiera (X) adyacente hacia el extremo carboxi-terminal. La presencia del Asp en los puntos de maduración es consistente con la habilidad que tienen las caspasas para la autoactivación o para que sean activadas por otras caspasas en una cascada de amplificación (Nicholson DW, 1999).

Las caspasas reconocen una secuencia tetrapeptídica específica presente en las proteínas diana. Como se observa en la Figura 4, las caspasas requieren que, en la secuencia de corte, haya exclusivamente un Asp en posición 1 (P_1), cierta promiscuidad en posición en P_2 , prefieren Glutámico (Glu) en P_3 y sus preferencias en P_4 determinan su clasificación en 3 grupos genéricos -I, II y III- (Rano TA, *et al.*, 1997, Thornberry NA, *et al.*, 1997).

- En el grupo I se incluye a las caspasa-1, -4, -5 y -13. Presentan una alta afinidad cuando el aminoácido del sustrato que ocupa la posición P_4 es hidrofóbico. La secuencia óptima es $W^{P_4}E^{P_3}H^{P_2}D^{P_1}$.
- En el grupo II, donde se clasifican las caspasas -2, -3, -7, -14 y CED-3, tienen actividad máxima cuando un Asp ocupa la posición P_4 . La secuencia ideal para este grupo de caspasas es $D^{P_4}E^{P_3}X^{P_2}D^{P_1}$.
- El grupo III comprende las caspasas -6, -8, -9 y -10. En la posición P_4 de su estructura pueden tener diferentes aminoácidos, pero hay una marcada preferencia por aquellos que son ramificados con cadenas alifáticas. La secuencia óptima es $(V,L)^{P_4}E^{P_3}H^{P_2}D^{P_1}$.

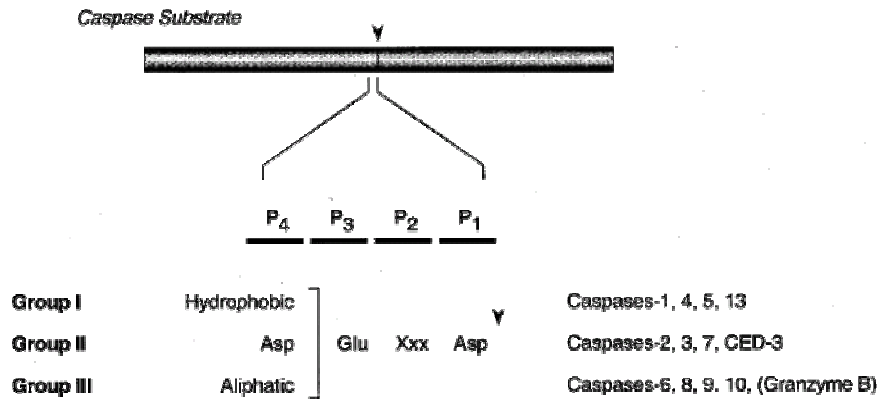


Figura 4. Especificidad proteolítica de las caspasas. Adaptada de (Nicholson DW, 1999)

Además de por su especificidad de corte, las caspasas pueden clasificarse por el tamaño de su prodominio. Siguiendo este criterio distinguimos entre las caspasas de “prodominio largo” (caspasas -1, -2, -4, -5, -8, -9 y -10) y caspasas de “prodominio corto” (caspasas -3, -6, -7 y -11). En general, las caspasas con prodominios largos permiten una mayor regulación de su activación. Este prodominio puede contener alternativamente dos tipos de secuencias conservadas. En unos casos la estructura contenida en el prodominio es el llamado “dominio efector de muerte” (del inglés *DED* o *death effector domain*), descrito para las caspasas -8 y -10, consistente en un dominio proteico que permite la interacción de la caspasa con moléculas adaptadoras clave en las vías de inducción de muerte. En otros casos, como el de las caspasas -1, -2, -4 y -9 y CED-3, el prodominio contiene el “dominio de reclutamiento de caspasa” -del inglés *CARD* o *caspase recruitment domain*- (Boldin MP, et al., 1995, Hofmann K, et al., 1997, Muzio M, et al., 1996). Este dominio, por ejemplo, permite la interacción de caspasa-9 con Apaf-1, para dar lugar a la formación de un complejo capaz de procesar a otras caspasas.

Una tercera y última forma de clasificar a las caspasas es atendiendo a su funcionalidad. Podemos distinguir según este criterio las “caspasas inductoras” y las “caspasas ejecutoras” (Ver Tabla 1). El papel que juegan las caspasas iniciadoras y ejecutoras en la cascada proteolítica consiste en el reconocimiento de los motivos diana óptimos de las caspasas. Las iniciadoras tienen especificidad por secuencias similares a las diana de las caspasas, presentes en su propia secuencia (Thornberry NA, *et al.*, 1997), implicando así la posibilidad de autocatálisis. Además, estos motivos están presentes en la secuencia de varias procaspasas efectoras como la procaspasa-3 y procaspasa-7, indicando así que estas procaspasas están por debajo de las caspasas iniciadoras en la cascada proteolítica (Thornberry NA, *et al.*, 1997).

Grupo	Proteínas de <i>C.elegans</i>	Proteínas de mamífero
Caspasas Iniciadoras	CED-3	Caspasa (-2), -8, -9 y -10
Caspasas Ejecutoras	¿?	Caspasa (2), 3, 4, 5, 6, 7, 11, 12, 13

Tabla 1. Clasificación de las caspasas atendiendo a su funcionalidad.

1.2.2 Las proteínas de la familia de Bcl-2

No fue hasta una década después de la acuñación del término apoptosis, cuando se identificó el primer regulador de la PCD. La translocación cromosómica t(14:18), presente en los linfomas foliculares humanos, provoca una relocalización del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas uniéndolo a un gen denominado Bcl-2 (Tsujimoto Y, *et al.*, 1984). Contrariamente a los primeros oncogenes descritos, se vio que Bcl-2 promovía la supervivencia celular en lugar de la proliferación (Vaux DL, *et al.*, 1988). Este descubrimiento fue clave para el nacimiento del concepto que describe que el bloqueo de la apoptosis es un efecto clave en el desarrollo tumoral.

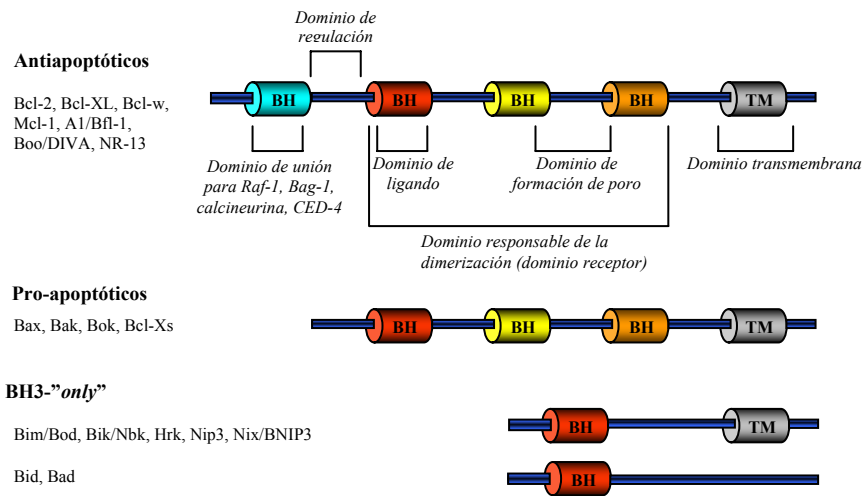


Figura 5. La familia de Bcl-2. Los miembros de la familia de Bcl-2 comparten un número variable de dominios conservados BH -del inglés Bcl-2 homology- y pueden ser clasificados en tres grupos basándose en análisis de estructura-función: miembros multidominio antiapoptóticos, proapoptóticos y proapoptóticos BH3-only. Adaptado de (Gross A, et al., 1999, Joza N, et al., 2002).

Bcl-2 dio nombre a toda una familia de proteínas, con 19 miembros identificados hasta la fecha. Ejercen un papel crucial en la regulación de la apoptosis, integrando señales pro y antiapoptóticas que determinarán el destino final de la célula. La familia de Bcl-2 se ha dividido en 2 grandes grupos, antiapoptóticos (por ej. Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1) y proapoptóticos (por ej. Bax, Bak, Bok). Los primeros quedan englobados dentro de la subfamilia de Bcl-2, mientras que los proapoptóticos se dividen en dos subfamilias: la subfamilia de Bax y la subfamilia de los BH3-only (ver figura 5).

Estos últimos provocan la muerte a través de la unión al dominio receptor de otros miembros multidominio de la familia de Bcl-2, inhibiéndolos (si son los antiapoptóticos) o activándolos (si son los

proapoptóticos). Algunos de sus miembros poseen una secuencia hidrofóbica en su extremo carboxi-terminal que les permitirá su integración en membrana.

Se han propuesto una serie de posibles mecanismos de acción de los miembros de la familia de Bcl-2 -revisado por (Hengartner MO, 2000)-. Según se observa en la figura 6, de izquierda a derecha se propone que actúen por:

- La formación de un poro, a través del cual, pueda salir citocromo c y otras proteínas del espacio intermembranal.
- Heterodimerización entre miembros pro y antiapoptóticos.
- Directa regulación de la caspasas a través de moléculas adaptadoras, como por ejemplo el caso de CED-4 en *C.elegans*.
- Interacción con otras proteínas mitocondriales como VDAC y el transportador de adenosina (ANT), bien para generar un poro que permita la salida de citocromo c, o bien para modular la homeostasis mitocondrial.
- Oligomerización y formación de un canal poco selectivo.

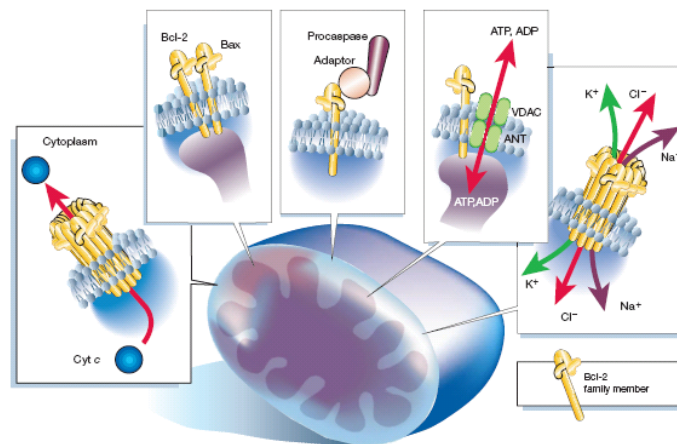


Figura 6. Posibles mecanismos de actuación de los miembros de la familia de Bcl-2. Adaptado de (Hengartner MO, 2000).

1.3 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN APOPTÓTICA

Se han descrito dos vías generales que conducen a la muerte apoptótica. La llamada vía endógena o **intrínseca** se activa por estímulos provenientes del interior celular desencadenando señales apoptóticas que concurren en la mitocondria. Sin embargo, en el caso de la vía exógena o **extrínseca**, los estímulos apoptóticos provienen del exterior celular y se transmiten a través de los llamados receptores de muerte (DR, del inglés *death receptors*).

1.3.1 La vía intrínseca o mitocondrial

En los comienzos de la disección molecular de la apoptosis, no se creía que la mitocondria pudiera jugar un papel relevante. Sin embargo, Monaghan y colaboradores en 1992 y, más tarde, Krajewski y colaboradores indicaban que la localización preferencial del miembro antiapoptótico de la familia de Bcl-2, Bcl-2, era la periferia de la mitocondria (Krajewski S, *et al.*, 1993, Monaghan P, *et al.*, 1992). A partir de aquí se comenzó a pensar que la mitocondria podría tener funciones adicionales a la función respiratoria. Las primeras hipótesis apuntaban a que los radicales libres de oxígeno, generados por la actividad de la cadena respiratoria de electrones, podían generar un estímulo apoptótico, y que Bcl-2 podría funcionar como molécula antioxidante.

Hoy día se conoce que la mitocondria contiene todo un “arsenal” de moléculas que determinarán si la célula sigue un proceso irreversible de muerte o no. El elemento clave de la vía mitocondrial es la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP, del inglés, *mitochondrial outer membrane permeabilization*).

En los eventos moleculares que activarán MOMP participan los miembros de la familia de Bcl-2. Las proteínas proapoptóticas Bax y Bak

parecen determinantes en la formación de aperturas en la membrana externa mitocondrial (Danial NN y Korsmeyer SJ, 2004); de hecho, células extraídas de ratones nulos para estas proteínas no activan MOMP tras una gran variedad de estímulos apoptóticos (Wei MC, *et al.*, 2001). En condiciones normales, Bak es una proteína transmembrana situada en la membrana mitocondrial externa, mientras que Bax puede encontrarse en el citosol y en la periferia de la mitocondria. Bax se mantiene inactivo gracias a la interacción con factores que le mantienen retenido en el citosol. Tras un estímulo citotóxico, Bax y Bak sufren cambios conformacionales en su estructura, generalmente provocados por la interacción con miembros BH3-*only* como Bid o Puma (Letai A, *et al.*, 2004) activados transcripcional o post-traduccionalmente. Bid puede truncarse ante diferentes estímulos por la acción de caspasas, y su forma truncada (tBid) se transloca a la mitocondria, donde, por sí solo (Zhai D, *et al.*, 2000, Zhai D, *et al.*, 2001) o bien a través de la interacción con Bax y/o Bak, tendrá lugar la final liberación de citocromo c (Brustovetsky N, *et al.*, 2003).

Bax se transloca a la mitocondria, se integra en la membrana mitocondrial externa y junto con Bak oligomerizan formando poros que darán lugar a la permeabilización de la membrana externa mitocondrial. Este proceso puede ser facilitado por el papel que pueden desempeñar otros miembros BH3-*only* como Bad o Noxa, que interaccionan con proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y Bcl-X_L (Puthalakath H y Strasser A, 2002).

Tras la permeabilización, proteínas del espacio intermembrana son liberadas al citosol. Una de ellas es el transportador de electrones citocromo c. A parte de su participación en la fosforilación oxidativa, al liberarse de la mitocondria, citocromo c se une a monómeros del factor

activador de proteasas apoptóticas 1 (APAF-1 del inglés, *apoptotic protease activating factor-1*). La interacción con citocromo c permite un cambio conformacional, mediado por ATP, en APAF-1, lo que permite su oligomerización para dar lugar al llamado **apoptosoma**. El apoptosoma se une entonces a la procaspasa-9 donde su oligomerización da lugar a la forma activa (Boatright KM, *et al.*, 2003, Li P, *et al.*, 1997). Caspasa-9 activa puede procesar caspasas ejecutoras como las caspasas 3 y 7, activándose y proteolizando sustratos vitales para la célula que darán lugar a la subsiguiente muerte celular. La activación de las caspasas, en este punto, puede regularse a su vez por las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs, del inglés, *inhibitor of apoptosis proteins*). Las IAPs pueden unirse y ubiquitinar a las caspasas para su degradación a través del proteasoma. La función de las IAPs se regula por interacción con inhibidores como por ejemplo Smac/DIABLO o Omi/HtrA2 que compiten con las caspasas para unirse a las IAPs. Al igual que citocromo c, Smac y Omi permanecen en el espacio intermembrana mitocondrial hasta el proceso MOMP.

El proceso de muerte celular tras MOMP puede seguir un camino independiente de caspasas en el que, en la mayoría de los casos, hay un déficit genético de caspasas o bien están inhibidas farmacológicamente (Chipuk JE y Green DR, 2005). Se liberan factores letales como por ejemplo el factor inductor de apoptosis (AIF, del inglés, *apoptotic inducing factor*) o la endonucleasa G (Chipuk JE y Green DR, 2005). AIF es una flavoproteína que se transloca al núcleo durante la muerte celular (Susin SA, *et al.*, 1999), donde inicialmente se creía que participaba en la marginalización y fragmentación de la cromatina. Sin embargo, estudios más recientes, utilizando estaurosporina como inductor de muerte, demuestran que AIF participa en la marginalización, pero no es un mediador de la fragmentación de la cromatina (Yuste VJ,

et al., 2005). La endonucleasa G es la principal endonucleasa del espacio intermembrana mitocondrial que se cree participa en la biogénesis de la mitocondria así como en la síntesis y reparación del DNA mitocondrial (Tiranti V, et al., 1995). Tras MOMP se transloca al núcleo donde inducirá la degradación del DNA.

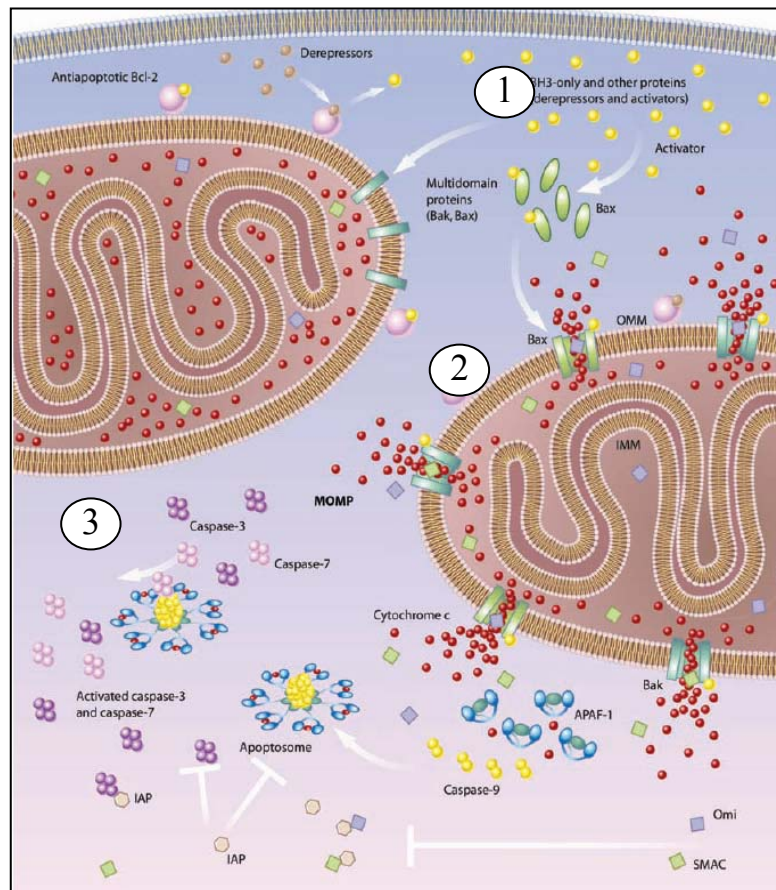


Figura 7. En la fase indicada con el número 1, las proteínas proapoptóticas BH3-only activan las proteínas Bax y Bak o bien inhiben la función de proteínas antiapoptóticas. El resultado de esta acción da lugar a la fase 2 donde tiene lugar la permeabilización de la membrana mitocondrial externa. En esta etapa se liberan las proteínas confinadas en el espacio intermembrana mitocondrial. Citocromo c desencadenará la activación de APAF-1 con la consiguiente activación de la cascada de caspasas. Finalmente, en la etapa 3, se activan las caspasas ejecutoras como la Caspasa-3 o la -7 que procesarán sustratos vitales para la célula. Adaptado de (Spierings D, et al., 2005).

1.3.2 Vía Extrínseca

La integridad de una célula está constantemente regulada por sensores internos y señales de supervivencia provenientes del entorno. En el momento en que la célula pierde el contacto con su entorno o bien detecta daños internos irreparables, entra en apoptosis. Una célula que reciba señales contradictorias entre la promoción o la detención del ciclo celular también entrará en apoptosis (Evan G y Littlewood T, 1998). Los mamíferos han desarrollado otro mecanismo que permite al organismo conducir activamente a células individuales a la autodestrucción. Este tipo de apoptosis “instructiva” es especialmente importante en el sistema inmune y es donde ha sido mejor caracterizada. Sin embargo, y como se explicará más adelante, va adquiriendo una importancia muy relevante en otros sistemas, como el sistema nervioso, durante el desarrollo y ante situaciones patológicas. Los receptores de muerte son los encargados de transmitir las señales apoptóticas iniciadas por los “ligandos de muerte” (Ashkenazi A y Dixit VM, 1998). Aunque en algunos sistemas celulares concretos la vía extrínseca e intrínseca puedan actuar independientemente, en la mayoría de células hay una delicada coordinación e interacción entre ambas vías (Khosravi-Far R y Esposti MD, 2004).

1.3.2.1 Receptores de muerte. Familia del TNF

Los DRs pertenecen a una superfamilia de receptores relacionados con fenómenos de proliferación, diferenciación y apoptosis llamada la Superfamilia del Factor de Necrosis Tumoral (TNF, del inglés, *Tumor Necrosis Factor*). Estas proteínas son receptores integrales de membrana, la mayoría de tipo I, es decir, con un solo paso transmembrana, con el extremo N-terminal extracelular y el extremo C-terminal es intracelular.

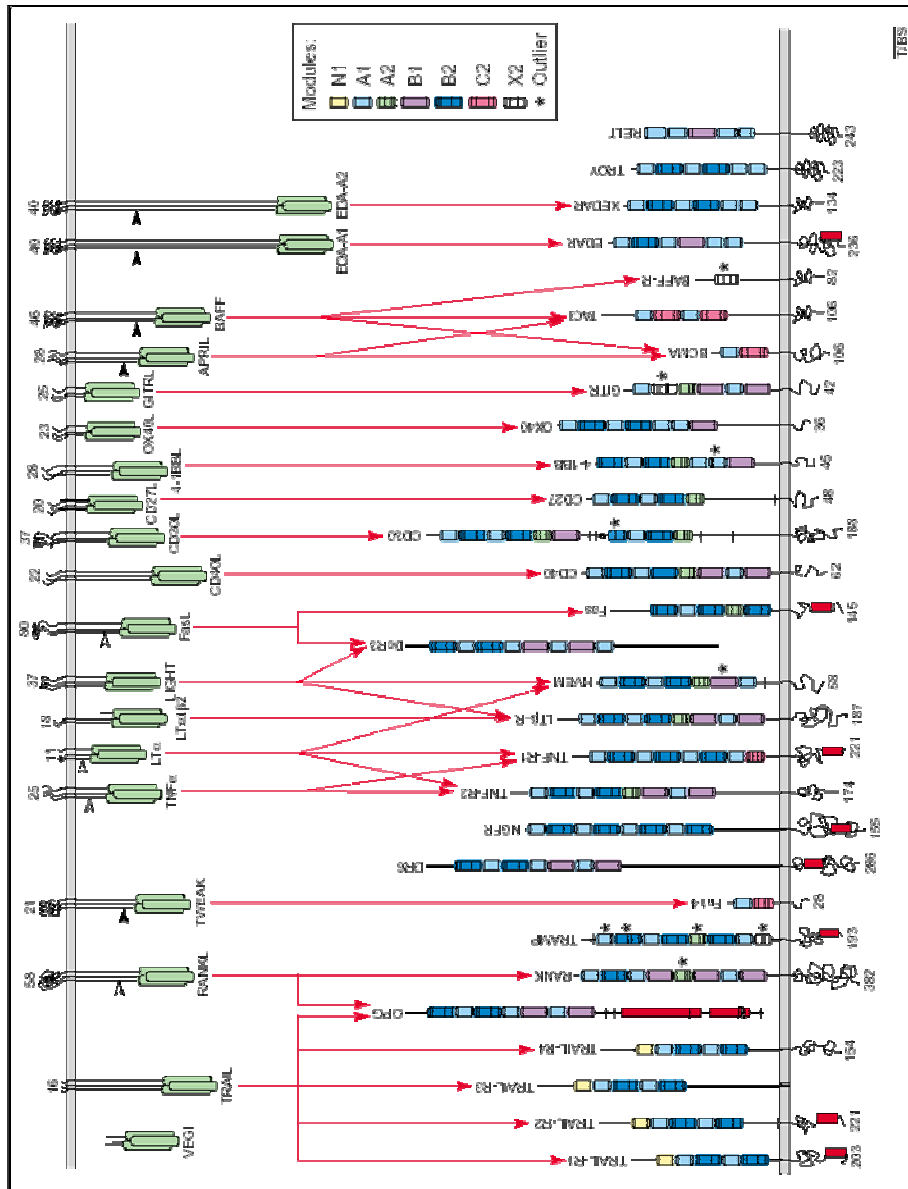


Figura 8. Representación esquemática de los miembros de la familia del TNF, incluyendo DRs, DcRs y sus ligandos. Los DcRs 1 y 2 de TRAIL carecen de dominio intracelular o tienen un DD truncado no funcional. DcR3 parece no tener dominio transmembrana. DcR3 y OPG son secretados.

Poseen un dominio extracelular conservado compuesto de 2 a 6 pseudorepeticiones de cisteínas (CRDs, del inglés, *cysteine-rich domains*), una región transmembrana y una región intracelular conservada de unos 80 aminoácidos llamado dominio de muerte (DD, del inglés, *Death Domain*). A través del DD se podrán reclutar proteínas adaptadoras para el inicio de la señalización apoptótica (Curtin JF y Cotter TG, 2003).

A día de hoy se han caracterizado hasta 8 DRs pertenecientes a la gran familia del TNF con DD en su porción intracelular: TNF receptor 1 (TNFR1; también conocido como DR1, CD120a, p55 y p60), CD95 (también llamado DR2, APO-1 y Fas), DR3 (conocido como APO-3, LARD, TRAMP y WSLT), receptor de inducción de apoptosis por ligando relacionado con TNF (TRAILR1; llamado también DR4 o APO-2), TRAILR2 (conocido también por DR5, KILLER y TRICK2), DR6, receptor de la ectodisplasina A y el receptor del factor de crecimiento nervioso p75 (p75^{NTR}). Todos tienen en común la presencia del DD, lo que les permitirá, tras su activación por sus correspondientes ligandos, reclutar moléculas adaptadoras e iniciar la activación de la cascada de señalización celular (Lavrik I, *et al.*, 2005).

Los ligandos que activan estos receptores, a excepción del factor de crecimiento nervioso (NGF), son moléculas relacionadas estructuralmente que pertenecen a la superfamilia génica del TNF (Smith CA, *et al.*, 1994). El ligando de CD95 (CD95L) se une a CD95; TNF α y linfotoxina α se unen a TNFR1; El ligando TL1A (también llamado VEGI, del inglés, *Vascular endothelial cell growth inhibitor*) se une a DR3; y TRAIL se une a DR4 y a DR5 (Ashkenazi A y Dixit VM, 1998). Los ligandos de los DRs también pueden interactuar con los receptores “señuelo” (DcRS, del inglés, *Decoy Receptors*) que no tienen DD y por

tanto no forman complejos de señalización de muerte. Hasta la fecha se conocen 4 DcRs: TRAILR3 (llamado también DcR1), TRAILR4 (conocido como DcR2), DcR3 y osteoprotegrina (OPG).

1.3.2.2 Vías de señalización mediadas por DRs

Tras la unión de los ligandos a sus receptores pueden formarse dos tipos diferentes de complejos de señalización. El primer tipo de complejo de señalización es el llamado complejo de señalización inductor de muerte (DISC, del inglés, *Death Inducing Signaling Complex*) que se forma tras la activación de los receptores CD95, TRAILR1 y TRAILR2. Estos tres receptores forman un DISC con composición muy similar, que tiene como consecuencia la activación de caspasa-8 y la transducción de la señal apoptótica. El segundo tipo de complejo es el que tiene lugar tras la activación de receptores como por ejemplo TNFR1, DR3 y DR6. Su activación dará lugar al reclutamiento de todo un conjunto de proteínas adaptadoras que puedan dar lugar a la transducción de señales apoptóticas o de supervivencia.

En este trabajo se ha analizado más concretamente la señalización de CD95 y de TNFR1, por lo que a continuación se explican con más detalle los mecanismos y proteínas implicadas en sus vías de transducción de señal.

1.3.2.2.1 Señalización por CD95/Fas

CD95/Fas/Apo-1 apareció por primera vez en la literatura en el año 1989, cuando fue descrito a la vez por dos grupos independientes, M Yonehara en Japón (Yonehara S, *et al.*, 1989), y Peter H Krammer en Alemania (Trauth BC, *et al.*, 1989). En ambos, se describía como una molécula de superficie expresada en linfocitos humanos que desencadenaba muerte celular tras su activación por anticuerpos.

Posteriormente, se identificó el ligando natural al que se le denomina CD95L (Itoh N, *et al.*, 1991). La parte extracelular de CD95 contiene 3 de los dominios CRD característicos de la familia del TNF, unidos por puentes disulfuro.

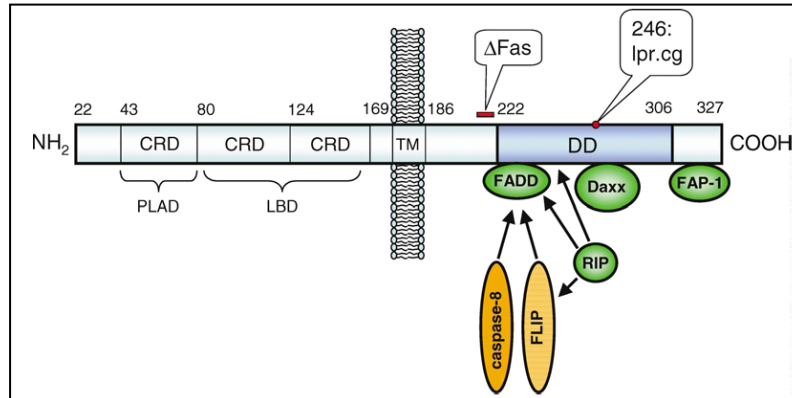


Figura 9. Representación lineal del receptor CD95/Fas junto con alguna de las proteínas que interaccionan. La mutación puntual *lpr.cg* desestabiliza el DD impidiendo la unión de FADD y una disminución de la unión de Daxx. La otra mutación (Δ Fas) previene la unión de FADD pero no de Daxx (Lambert C, *et al.*, 2003).

La unión con CD95L ocurre entre el segundo y tercer CRD, contando desde el extremo N-terminal (Golstein P, 2000) indicado en la figura 9 como LBD (del inglés, *ligand binding domain*). El receptor CD95 interacciona consigo mismo a través de un segmento en el extremo N-terminal llamado dominio de asociación preligando (PLAD, del inglés, *preligand association domain*). Esta asociación previa se requiere para una transmisión eficiente de la señalización, cosa que no ocurre en los casos de pacientes con el síndrome linfoproliferativo autoinmune, donde una forma dominante negativa del receptor impide esta preasociación (Siegel RM, *et al.*, 2000). En modelos de linfocitos T citotóxicos, CD95L se inactiva por proteólisis dando lugar a una forma soluble de CD95L. Esta forma soluble puede unirse al receptor, pero no desencadenar los mecanismos de señalización apoptótica. Los experimentos de Holler y

colaboradores demuestran que trímeros y hexámeros de CD95L son capaces de unirse a CD95, pero es sólo en el caso de la unión con los hexámeros cuando se obtiene el desencadenamiento de la señales apoptóticas. Trímeros de CD95L podrían interaccionar unos con otros, a través de sus dominios intracelulares o bien a través de la región que une su dominio transmembrana al dominio homólogo a TNF (Holler N, *et al.*, 2003). La unión de formas multiméricas de CD95L a trímeros preasociados de CD95 da lugar a pequeñas estructuras llamadas SPOTS (del inglés, *signaling protein oligomerization transduction structures*) en un proceso independiente de caspasas (Siegel RM, *et al.*, 2004).

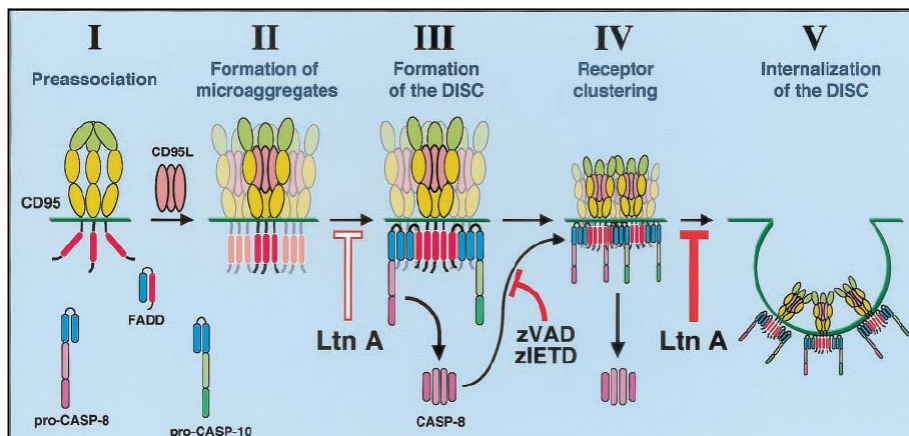


Figura 10. Esquema de la señalización por CD95. En la primera fase (I) se aprecia la preexistencia de la asociación de receptores independiente de ligando. Tras la unión del ligando (II) se forman los microagregados o SPOTs, y posteriormente, al mismo tiempo que tiene lugar la colocalización en estructuras mayores, ocurre la formación del DISC (III y IV). Esta fase es inhibible por la toxina LtnA, que impide la correcta organización de los microfilamentos de actina y por inhibidores de caspasas. Por último tiene lugar la internalización del DISC en un proceso también dependiente de actina (V). Adaptado de (Algeciras-Schimmich A, *et al.*, 2002).

Seguidamente se induce la segregación lateral de los receptores en la membrana plasmática y la co-localización en regiones o “clusters”

llamadas “cap” en un polo de la célula, en un proceso dependiente de formación de ceramida (Cremesti A, *et al.*, 2001) y también de caspasas. De hecho, mientras estos eventos ocurren en la parte externa de la membrana plasmática, en la parte interna se va formando el DISC. En la formación del DISC, la molécula adaptadora FADD (*Fas Associated Death Domain*), dos isoformas de procaspasa-8 (procaspasa-8a y procaspasa-8b), procaspasa-10 y la proteína FLIP (FLICE-inhibitory protein) interaccionan con el receptor CD95 gracias a contactos homotípicos. El DD del receptor interacciona con el DD del adaptador FADD, mientras que el dominio DED de FADD permite la interacción de procaspasa-8, procaspasa-10 y FLIP a través, precisamente, de sus repeticiones en tandem de DED. La activación de procaspasa-8 parece seguir un modelo de activación por proximidad inducida, por el cual, altas concentraciones locales de procaspasa-8 permiten una activación autoproteolítica, un proceso de corte múltiple que da como resultado la formación de un heterotetrámero formado por dos subunidades largas (p18) y dos subunidades más pequeñas (p10), que se liberan al citosol y propagan la señal apoptótica.

La procaspasa-10 también se procesa en el DISC, dando lugar a la formación de un heterotetrámero activo. Sin embargo, la caspasa-10 no es necesaria para la transmisión de la señal apoptótica y no puede realizar la misma función que la caspasa-8 (Sprick MR, *et al.*, 2002).

FLIP es una proteína que contiene dos DED en tandem, altamente homólogos al extremo N-terminal de caspasa-8. Existen diferentes isoformas, aunque FLIP_L y FLIP_S son las mejor caracterizadas. FLIP_S contiene tan solo el tandem DED, pero FLIP_L contiene además un dominio parecido a un dominio proteasa, muy homólogo al de caspasa-8. FLIP_L y FLIP_S pueden evitar el

procesamiento de la procaspasa-8 en el DISC, inhibiendo así su función. El mecanismo parece ser a través del reclutamiento oligomerizando con caspasa-8 y su procesamiento en el DISC. Al no tener actividad proteolítica, el procesamiento no sigue, y por tanto se generan dos subunidades de 10 kDa (una de la caspasa-8 y otra de FLIP_L) dando lugar a moléculas de caspasa-8 inactivas (Peter ME y Krammer PH, 2003).

Se han descrito otras muchas moléculas que parecen ser reclutadas al DISC por interacción directa con alguno de sus componentes, aunque la función de todas ellas todavía no está clara. Entre ellas destacan las proteínas Daxx, FAP-1 (*Fas Associated Protein-1*), FLASH (*FLICE-Associated huge protein*), RIP (*Receptor-interacting protein*), FAF1 (*Fas associated factor-1*) y Dap3 (Peter ME y Krammer PH, 2003).

El ensamblaje del DISC puede diferir entre tipos celulares y variar la eficiencia de la inducción de muerte. Se pueden distinguir dos tipos de señalización mediados por CD95. Las llamadas células tipo I se caracterizan por tener un alto nivel de formación del DISC y por consiguiente una elevada cantidad de caspasa-8 activa. La cantidad de caspasa-8 activa formada es suficiente para la activación directa de caspasas efectoras. En cambio, las células tipo II poseen menor expresión de CD95 y por lo tanto niveles de caspasa-8 activa más bajos (Scaffidi C, *et al.*, 1998). En estas células, la señalización apoptótica requiere de un *loop* de amplificación mitocondrial. Las pocas moléculas de caspasa-8 activas procesan a la proteína soluble Bid, miembro BH3-*only* de la familia de Bcl-2, cuya forma truncada (tBid) es capaz de interaccionar con miembros proapoptóticos de la familia de Bcl-2, como Bax e inducir la liberación de citocromo c. Esta conexión con la vía

mitocondrial cursa con los acontecimientos previamente descritos para la vía intrínseca, incluyendo la formación del apoptosoma, activación de la procaspasa-9, activación de las caspasas ejecutoras -3 y -7 y la degradación de sustratos vitales para la célula -revisado en (Lavrik I, *et al.*, 2005) -.

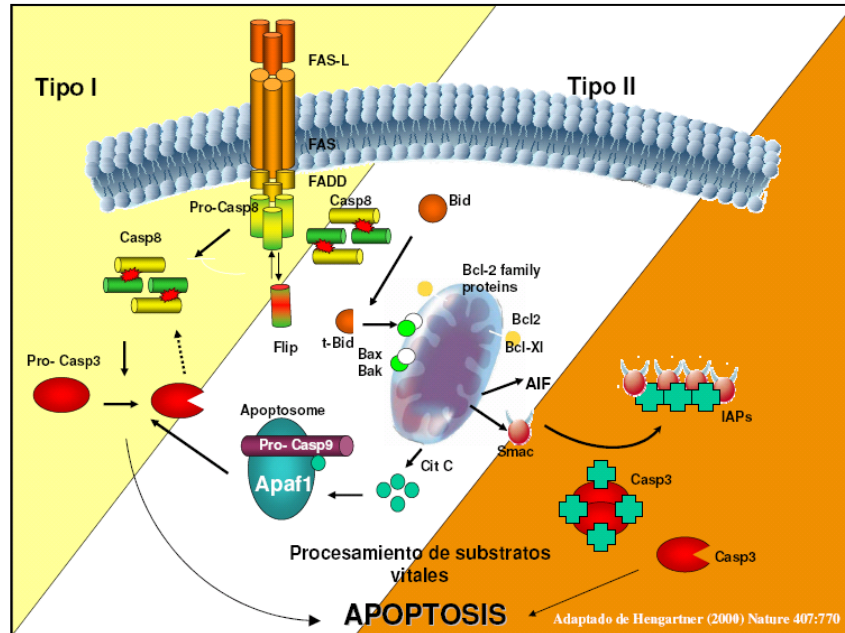


Figura 11. Esquema de la señalización mediada por CD95/Fas. En las células tipo I se producen suficientes moléculas de caspasa-8 activas capaces de procesar a caspasas ejecutoras y desencadenar la muerte celular independientemente de la vía mitocondrial. En las células tipo II, la activación de la caspasa-8 no es suficiente para producir la muerte celular y precisa de la activación del loop mitocondrial a través del procesamiento de Bid.

Todas las interacciones descritas anteriormente de los receptores en la membrana no serían posibles en cualquier región de membrana, sino que tal región debe poseer características de fluidez y composición de proteínas que la hagan idónea para el correcto tráfico de receptores y otras proteínas asociadas. Estas regiones de membrana reciben el nombre de balsas lipídicas o *Lipid Rafts*. Los *lipid rafts* son microdominios de membrana enriquecidos con colesterol y esfingolípidos

(Simons K y Toomre D, 2000). Son zonas más ordenadas y menos fluidas que las membranas enriquecidas con fosfolípidos. Como consecuencia de ello, al solubilizarlas con detergentes no iónicos a bajas temperaturas, los *rafts* permanecen insolubles y flotan a baja densidad tras una centrifugación en gradiente (London E y Brown DA, 2000). Aunque existe cierta controversia en torno a la señalización de CD95 en los *rafts*, los experimentos de Eramo y colaboradores presentan evidencias a favor de que CD95 se localiza preferentemente en los *lipid rafts* en células tipo I, mientras que en las células tipo II CD95 se distribuye en las fracciones *raft* y no *raft* de la membrana plasmática.

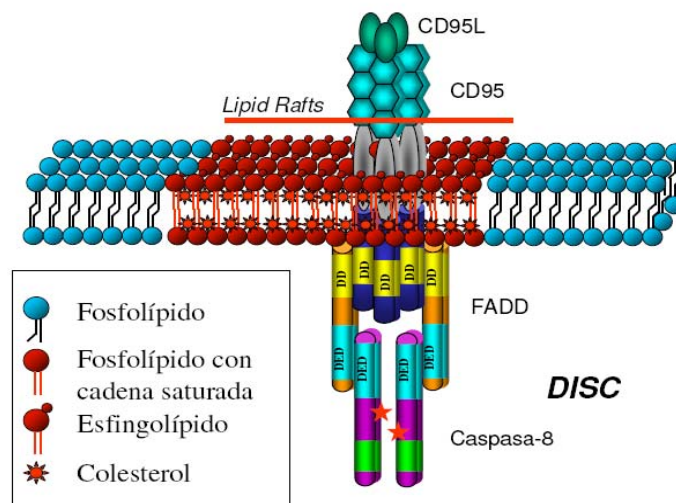


Figura 12. La formación del DISC tiene lugar en los *lipid raft*, regiones de membrana enriquecidas en fosfolípidos de cadena saturada, esfingolípidos y colesterol.

Tras la estimulación, CD95 se concentra en los *lipid rafts* en ambos tipos celulares, así como también FADD y caspasa-8. Finalmente, los *rafts* se pueden agregar en estructuras superiores que serán internalizadas en vesículas endosomales donde tiene lugar el procesamiento masivo de la caspasa-8 (Eramo A, *et al.*, 2004).

En cierta contraposición a los modelos de señalización de células tipo I y tipo II, hay estudios en linfocitos T que demuestran que componentes críticos para la señalización de CD95 se encuentran previamente ensamblados en la membrana plasmática, concretamente en los *lipid rafts*. Tras la activación de CD95, hay un incremento de la asociación de FADD, caspasa-8 y caspasa-3 en el DISC, dando lugar al procesamiento de caspasa-3 en sus subunidades de 20 y 12 kDa. Caspasa-3 parcialmente procesada es secuestrada por XIAP, hasta que factores liberados de la mitocondria como Smac, deshacen la interacción inhibitoria. Entonces, se posibilita la activación completa de caspasa-3, cuya actividad resultará en un completo procesamiento de la caspasa-8 y la amplificación de la salida de Smac y citocromo-c de la mitocondria (Aouad SM, *et al.*, 2004).

A parte de los componentes del DISC mencionados arriba, se han descrito un gran número de moléculas que son reclutadas al DISC por medio de interacciones directas con proteínas del DISC, como por ejemplo Daxx, FAP-1, FLASH, RIP, FAF-1 entre otras.

Alternativamente, hay evidencias experimentales que demuestran que tras la activación de CD95 por su ligando puede desencadenarse una muerte necrótica, independiente de la activación de caspasas (Holler N, *et al.*, 2000, Matsumura H, *et al.*, 2000). Sin embargo, los resultados obtenidos hasta el momento no indican que la muerte necrótica desencadenada por CD95 pueda tener relevancia fisiológica, sino que más bien pueda ser resultado de forzar al máximo las condiciones experimentales o en situaciones patológicas descontroladas.

Aunque el papel de CD95 se ha relacionado clásicamente con la inducción de muerte, hay crecientes evidencias de que puede dar lugar a la inducción de proliferación en células T y fibroblastos, regeneración hepática, producción de citoquinas e incluso, crecimiento neurítico (Desbarats J, *et al.*, 2003, Imamura R, *et al.*, 2004). Una de las vías responsables de estos efectos es la vía del factor nuclear κ B (NF- κ B). En este caso, parece ser que la activación de NF- κ B por CD95 tiene lugar por la formación de un complejo macromolecular que incluye FADD, procaspasa-8 y RIP. Mientras que para la señalización apoptótica, la actividad de caspasa-8 es imprescindible, para la señalización a NF κ B no es necesaria, implicando la existencia de otras funciones para la caspasa-8 (Kreuz S, *et al.*, 2004).

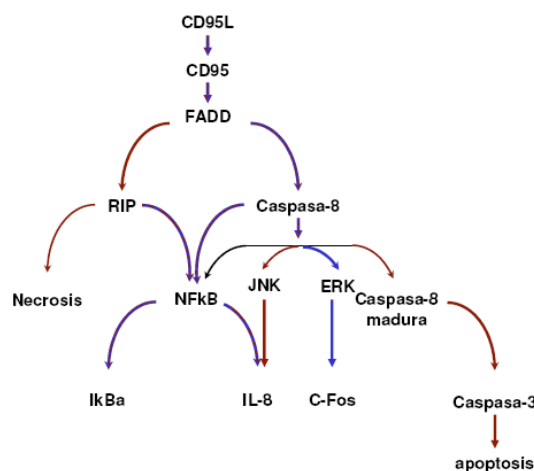


Figura 13. Esquema de las principales vías de señalización mediadas por CD95. Las líneas rojas indican las vías que claramente inducen la muerte de la célula. En azul, las vías de señalización pro-supervivencia/diferenciación. En entramado rojo-azul las vías que pueden tener diferentes funciones según el tipo celular y contexto fisiológico. Adaptado de (Kreuz S, *et al.*, 2004).

Miembros de la familia MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) también han sido involucrados en la señalización por CD95, concretamente ERK1/2, relacionada con crecimiento, diferenciación y supervivencia celular. Los efectos antiapoptóticos parecen tener lugar al

nivel o por encima de la activación de caspasa-8, puesto que su inhibición no afecta a los efectos debidos a la activación de ERK (Tran SE, *et al.*, 2001). Aunque los mecanismos exactos de señalización no se conocen, se ha propuesto que la rápida activación de ERK 1/2 podría ser debida al reclutamiento de Raf-1 al DISC gracias a su interacción con FLIP (Kataoka T, *et al.*, 2000).

Además de los modelos generales propuestos para la señalización de CD95, parecen existir mecanismos de señalización específicos como el que ocurre en el caso de las motoneuronas. El elemento clave es la regulación transcripcional de la Óxido Nítrico Sintasa neuronal (nNOS, del inglés, *neural Nitric oxide synthase*) a través de la activación de la proteína p38 quinasa. La activación de la vía CD95-FADD-caspasa-8 no es suficiente para causar la muerte de las motoneuronas por lo que debe intervenir una segunda cascada de señalización. En ésta, participa la proteína Daxx, que no contiene DD pero que se puede unir al extremo C-terminal de CD95. Daxx interacciona con la proteína quinasa reguladora de la señal apoptótica ASK-1 (*Apoptosis signal-regulating kinase-1*), la cual a su vez activa a la proteína quinasa p38. La activación de ésta última está implicada en el incremento de expresión de nNOS, lo que dará lugar a una producción de Óxido Nítrico (NO), provocando directa e indirectamente la disfunción mitocondrial, con la consiguiente liberación de citocromo c y activación de caspasa-3 (Raoul C, *et al.*, 2002).

1.3.2.2 Señalización por TNFR1

La señalización por TNF α puede tener lugar a través de dos receptores, TNFR1 y TNFR2, aunque la mayoría de los efectos biológicos son a través de TNFR1 (Grell M, *et al.*, 1999). Desde hace más de una década se conoce que la interacción ligando-receptor provoca la trimerización (Smith CA, *et al.*, 1994) del receptor y la

liberación de la proteína inhibidora SODD (del inglés, *Silencer of Death Domains*) del dominio intracelular de TNFR1. Esto, a su vez, permite el reclutamiento de la proteína adaptadora TRADD (*TNFR-associated death domain protein*), que sirve de plataforma común a diferentes moléculas de señalización, que mediarán las distintas funciones de TNF α , tanto para la señalización de la supervivencia como para la señalización apoptótica. No fue hasta el año 2003 cuando por medio de una serie de completos y elegantes experimentos, Micheau y Tschopp propusieron un modelo que explicaba los mecanismos detallados de la señalización de TNFR1 (Micheau O y Tschopp J, 2003). Proponen que, para el desencadenamiento de la señalización apoptótica, se requiera la formación de 2 complejos macromoleculares. El primer complejo se forma rápidamente en la membrana plasmática, concretamente en los *lipid rafts* (Legler DF, *et al.*, 2003), y está compuesto de TNFR1, TRADD, RIP, TRAF2 (*TNFR-associated factor*) y cIAP1. Este complejo activa la señalización por NF- κ B, pero no apoptosis. La unión de RIP permite la activación de vías de supervivencia a través de la activación de NF- κ B. RIP es crucial para el reclutamiento del complejo IKK, que está compuesto de dos subunidades catalíticas IKK α y IKK β y la subunidad reguladora IKK γ (NEMO). En este macrocomplejo se marca a IKK α por ubiquitinización para su posterior degradación por la vía proteasomal. Entonces, NF- κ B queda libre para bloquear señales apoptóticas, induciendo el incremento de expresión de proteínas antiapoptóticas como cIAP1, cIAP2, TRAF1, TRAF2 o FLIP (Fulda S y Debatin KM, 2004). Por otro lado, NF- κ B puede ejercer actividad antiapoptótica suprimiendo la actividad constitutiva de la vía Jun-quinasa (JNK) (Tang G, *et al.*, 2001).

Un segundo complejo, que no contiene TNFR1, pero que incluye FADD, procaspasa-8 y procaspasa-10, se forma en el citoplasma. Este

complejo II es el encargado de señalizar apoptosis, dado que el complejo I no ha sido capaz de promover eficientemente la expresión de genes antiapoptóticos como FLIP. Durante el curso de la señalización se observa que hay una moderada reducción de la interacción ligando-receptor, probablemente debido a la internalización del receptor. Tanto TNFR1 como TRADD sufren modificaciones postraduccionales, seguramente por ubiquitinización (Legler DF, *et al.*, 2003), que a la postre coinciden con la pérdida de interacción de TRADD y RIP con TNFR1, y con la formación de otro complejo más estable en el que se incorporan caspasa-8, FADD y TRAF2. La interacción de FADD con TRADD tiene lugar a través de los dominios DD que le quedan libres a TRADD tras la pérdida de interacción con TNFR1.

De sus experimentos, se concluye también que los componentes del complejo II difieren en las células que, por naturaleza, son sensibles o resistentes a la muerte por TNF α . Por ejemplo, c-IAP1 y TRAF1 están presentes sólo en el complejo II de células resistentes, en concordancia con experimentos previos de otros autores donde se les asigna un papel antiapoptótico (Wang CY, *et al.*, 1998). Altos niveles de FLIP también son detectables en el complejo II de células resistentes y además en su forma no procesada, mientras que FLIP presente en las células sensibles se encuentra procesado en sus formas de 43/41 kDa. Caspasa-8 puede interaccionar con ella misma y con caspasa-10, pero la interacción preferente es con FLIP. Además, en el complejo II de células sensibles hay bajos niveles de TRAF1 o FLIP y una gran cantidad de caspasa-10. Si artificialmente se aumentaba la cantidad de FLIP por sobreexpresión, había una disminución de caspasa-10 en el complejo II de células sensibles, además de protegerlas de la apoptosis. Estos resultados indican que FLIP y caspasa-10 compiten por su unión a caspasa-8. La cantidad de FLIP presente en el complejo II dependerá de

la señalización desencadenada por el complejo I, es decir, si se activa correctamente NF- κ B y da lugar al aumento de expresión de FLIP, la actividad proapoptótica de caspasa-8 quedará inhibida. En cambio, si la señalización del complejo I no ha sido suficientemente productiva, la activación de caspasa-8 seguirá su curso apoptótico. Otra de las consecuencias de la pérdida de actividad de NF- κ B es que la vía JNK deja de estar inhibida. Esta disfunción de NF- κ B permite el procesamiento del miembro BH3-*only*, Bid, por una proteasa, aun por determinar, dependiente de JNK en un lugar diferente al que normalmente actúa caspasa-8.

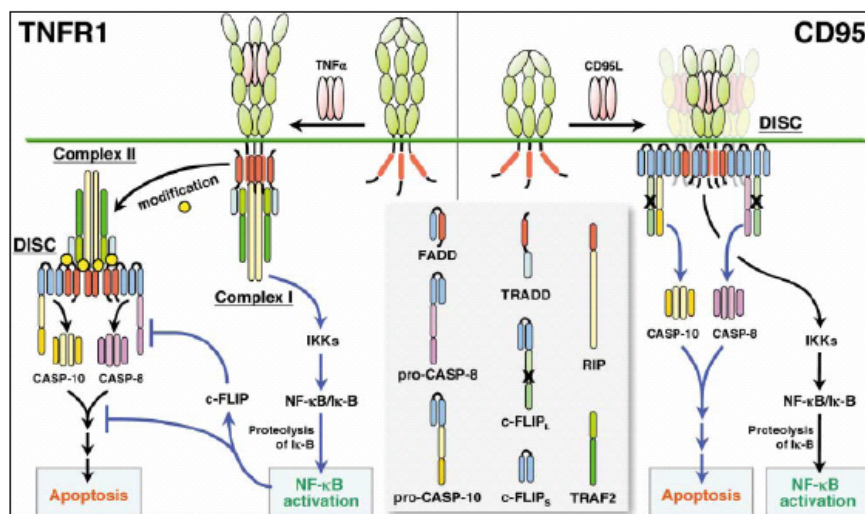


Figura 14. Comparación de la señalización por CD95 y TNFR1. En la parte derecha del cuadro, la señalización por CD95. Tras la activación del ligando, hay una concentración de receptores a la vez que ocurre la formación del DISC, que incluye el reclutamiento de FADD y caspasa-8. Por autoactivación se desencadenará la activación de otras caspasas. En células resistentes a CD95 se puede inducir la activación de NF- κ B. En la parte izquierda del cuadro vemos los eventos que ocurren en la señalización por TNF α . La interacción ligando-receptor desencadena la formación del complejo I que es el responsable de activación de vías pro-supervivencia. Tras modificaciones postraduccionales, componentes del complejo I se separan de TNFR1 e incorporan moléculas de señalización apoptótica que dependiendo de los niveles de c-IAP1 o FLIP acabarán o no por inducir la muerte de la célula (Barnhart BC y Peter ME, 2003).

Al nuevo producto generado por la actividad de JNK se le llamó jBid, que al igual que tBid se transloca a la mitocondria, donde induce la salida selectiva de *Smac*, pero no de citocromo c. *Smac* entonces puede provocar la disociación del complejo TRAF2-cIAP1 dentro del complejo TRADD-FADD-caspasa-8. La pérdida de TRAF2 impedirá la presencia de c-IAP1 en el complejo II y caspasa-8 tendrá vía libre para la señalización apoptótica (Deng Y, *et al.*, 2003).

La formación del complejo II también daría explicación a las distintas cinéticas de inducción de muerte entre diferentes receptores como CD95 y TNFR1. Como se ha explicado en el apartado 1.3.2.2.1, FADD interacciona rápida y directamente con CD95 en la membrana plasmática, permitiendo la inmediata activación de caspasas. Por el contrario, en el caso de TNFR1 no hay interacción directa con FADD, sino que FADD se unirá a proteínas adaptadoras de TNFR1 una vez que éstas se hayan disociado del receptor (final del complejo I).

En la figura 14 podemos ver una comparación de la señalización de los receptores de muerte CD95 y TNFR1. En el modelo propuesto para la acción de $TNF\alpha$, la elección de la célula entre supervivencia y muerte dependerá de la eficiencia de la formación del complejo II, la activación de caspasa-8 y de la cantidad de FLIP que haya para bloquear la señalización por caspasa-8.

1.4 RECEPTORES DE MUERTE EN EL SISTEMA NERVIOSO

Aún hoy día poco se conoce sobre el papel de la vía extrínseca en el sistema nervioso central (SNC), pero van aumentando las evidencias que demuestran que la señalización por receptores de muerte tiene un papel relevante durante el normal desarrollo y también

en toda una gran variedad de situaciones patológicas (Choi C y Benveniste EN, 2004).

1.4.1 Papel en el desarrollo embrionario

La PCD juega un papel muy importante en el desarrollo del SNC. Casi todos los tipos neuronales que se generan durante la neurogénesis serán posteriormente eliminados de forma ordenada en tiempo y espacio, con el fin de conseguir un equilibrio funcional entre las neuronas y sus tejidos diana. Según la teoría neurotrófica, la muerte celular en una determinada población neuronal durante el desarrollo es debida a que la moléculas tróficas se encuentran sólo en cantidades muy limitadas durante los períodos en los que ocurre esta muerte natural (Oppenheim RW, 1989). Ahora bien, parece claro que la mortalidad neuronal difiere bastante entre regiones del Sistema Nervioso (White LD y Barone S, Jr., 2001), por lo que generalizar sobre el papel de los receptores de muerte a partir de estudios realizados en poblaciones neuronales concretas durante el desarrollo puede llevar a conclusiones erróneas. Por tanto, se intentará a continuación, ofrecer una visión de los casos más caracterizados donde los receptores de muerte juegan un papel relevante.

Un paradigma de la muerte neuronal durante el desarrollo es la que ocurre en la población de motoneuronas. El sistema CD95L/CD95 fue claramente implicado en la muerte por retirada de factor trófico en motoneuronas *in vitro* (Raoul C, *et al.*, 1999), pero no se ha podido demostrar su implicación *in vivo*. Ratones transgénicos expresando un dominante negativo de la proteína Daxx (imprescindible para la muerte de motoneuronas por CD95) no muestran ninguna alteración del desarrollo de la médula espinal indicando que ni Daxx ni ninguna de sus moléculas asociadas (como CD95, ASK-1, etc.) tienen un papel clave en la muerte celular durante el desarrollo de la médula espinal (Raoul C, *et*

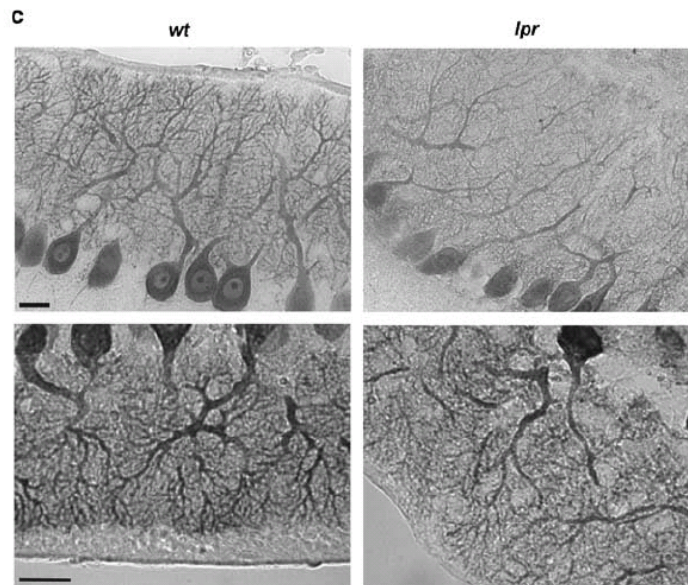
al., 2005). A la misma conclusión se llega con los experimentos anteriores de Kovac y colaboradores, donde en condiciones no patológicas CD95 no parece ser importante para la apoptosis neuronal (Kovac AD, *et al.*, 2002). Los experimentos están basados en el recuento de neuronas de distintas subregiones del hipocampo comparando animales *wild type* (del inglés, salvajes) con animales deficientes para CD95 (ratones *lpr*) y para CD95L (ratones *gld*). Estos ratones presentan mutaciones espontáneas en los genes CD95 y CD95L cuyo producto resulta ser en una proteína no funcional, al menos, para la señalización de apoptosis (Cohen PL y Eisenberg RA, 1992). Pues bien, de sus resultados se deduce que no hay diferencias en el recuento de neuronas en las distintas regiones estudiadas. Curiosamente, en ratones deficientes en genes de otros componentes de la vía apoptótica por debajo de CD95, como es el caso de caspasa-9 o de caspasa-3, hay un exceso de neuronas y los ratones no son viables. Se concluye que CD95 no es importante en la muerte que ocurre durante el desarrollo del sistema nervioso, salvo que lo sea en alguna población neuronal muy concreta, sin descartar que la función de CD95 pueda ser reemplazada por otro receptor de muerte como TNFR1 (Kovac AD, *et al.*, 2002).

Sí parece claro que el receptor de neurotrofinas p75^{NTR} está implicado en la PCD que ocurre en estadios tempranos del desarrollo. p75^{NTR} forma parte de la superfamilia del receptor de TNF que puede unir todas las neurotrofinas, aunque el factor de crecimiento nervioso (NGF), y formas inmaduras de los factores neurotróficos como proBDNF y proNGF parece ser los únicos capaces de activarlo (Dechant G y Barde YA, 1997, Lee R, *et al.*, 2001, Teng HK, *et al.*, 2005). En su parte intracelular contiene una región parecida al dominio DD, a través del cual se mediarán las interacciones proteína-proteína para su señalización.

NGF es uno de los ejemplos más documentados de molécula capaz de prevenir la muerte celular durante el desarrollo embrionario. El experimento clave de la demostración de su función fue que, al tratar crías de roedores recién nacidas con un suero anti-NGF, había una pérdida selectiva de neuronas de los ganglios simpáticos (Levi-Montalcini R y Cohen S, 1960). El papel fisiológico del NGF en la mayoría de los sistemas es promover la supervivencia neuronal a través del receptor tirosina-quinasa TrkA en asociación con el receptor de baja afinidad p75^{NTR}. En etapas tempranas del desarrollo de la retina de pollo ya se detecta expresión de NGF y en ciertas poblaciones p75^{NTR}, pero no TrkA. Al aplicar anticuerpos bloqueantes de TrkA junto con la administración de NGF *in vivo* se producía una disminución de las neuronas que expresaban p75^{NTR}, sugiriendo que NGF juega un papel proapoptótico. Esta muerte neuronal observada era disminuida por un anticuerpo bloqueante anti-p75^{NTR} (Frade JM, *et al.*, 1996). NGF a través de p75^{NTR} también puede regular el tamaño y número de neuronas colinérgicas de la parte frontal del cerebro, tal y como se observa en ratones nulos para p75^{NTR} o bien, en ratones salvajes a los cuales se les ha inyectado un péptido bloqueante de p75^{NTR} (Pettmann B y Henderson CE, 1998).

Aunque los datos presentados hasta el momento indiquen que los receptores de muerte, a excepción de p75^{NTR}, no tengan un papel claro en la apoptosis que ocurre durante el desarrollo embrionario, no excluye que puedan realizar otras funciones moduladoras. Recientes resultados apuntan a que el sistema de CD95 está implicado en la arborización neurítica (Zuliani C, *et al.*, 2005). Zuliani y colaboradores demuestran en sus resultados que tanto CD95L exógeno como el producido endógenamente es capaz de incrementar el número de puntos de arborización *in vitro* en neuronas embrionales primarias

corticales y de hipocampo. Estos resultados coinciden en que durante el desarrollo del cerebro se ha visto expresión tanto de CD95 como de CD95L en neuronas, al tiempo y localización donde tiene lugar el modelado del árbol neurítico y axonal. Estos resultados *in vitro* se ven reforzados por el análisis *in vivo* de los ratones mutantes deficientes en CD95 (*lpr*) y CD95L (*gld*). Ya se había observado que en neuronas piramidales de ratones *lpr* de 5 semanas de edad había una retracción de la arborización dendrítica y una pérdida de espinas dendríticas (Sakic B, *et al.*, 1998), aunque se atribuyó a déficits secundarios que podía tener el ratón debido a la autoinmunidad que se genera. Pero a día postnatal 5, cuando todavía no hay procesos de autoinmunidad, ya se puede observar un reducido número de puntos de arborización. Efectos similares se observan en células de Purkinje de ratones de 10 días de



edad (Ver figura 15).

Figura 15. Imágenes representativas de la tinción con Calbindina de células de Purkinje de animales salvajes (*wt*) comparados con los deficientes en CD95 (*lpr*). Las imágenes inferiores resultan de la magnificación de las superiores. Claramente se observa como las células de Purkinje de los ratones *lpr* muestran una arborización neurítica menor (Zuliani C, *et al.*, 2005).

En este caso, los efectos de CD95 podrían ser regulados por cambios en el estado de fosforilación de proteínas del citoesqueleto como la proteína asociada a microtúbulos Tau.

CD95 también puede afectar al crecimiento neurítico de neuronas ganglionares de la raíz dorsal a través de la vía MEK1/ERK/p35. El proceso de crecimiento neurítico parece ser independiente de caspasa-8 y del DD funcional de CD95 (Desbarats J, *et al.*, 2003).

1.4.2 Implicación de los DRs en patologías

En el caso del papel de los receptores de muerte en el desarrollo del Sistema Nervioso hay pocas evidencias experimentales y todavía está en fases de caracterización. No ocurre así en el caso de la implicación de situaciones patológicas que se dan en el sistema nervioso, aunque cabe mencionar que los estudios más detallados no se dan por igual en todos los DRs, siendo CD95 y TNFR1 los más caracterizados.

Se ha detectado un aumento del sistema CD95/CD95L y de otras citoquinas citotóxicas como el TNF α en una gran cantidad de situaciones donde la integridad del sistema nervioso se ha visto comprometida, como en caso de procesos inflamatorios, degenerativos, traumáticos, isquémicos o neoplásicos, sugiriendo que este sistema puede jugar un papel relevante en la patogénesis de estas enfermedades. En la mayoría de los casos, su papel en la fisiopatología de la enfermedad *in vivo* está por determinar.

1.4.2.1. Isquemia

La isquemia cerebral es una patología debida al déficit de irrigación sanguínea, y por lo tanto, de oxígeno en un área del cerebro. Puede ser debida a la oclusión total *in situ* de una arteria de forma espontánea, tras un accidente cerebrovascular, por reducción del diámetro arterial de origen hereditario, o por embolia, generalmente de origen cardíaco. La magnitud del daño ocasionado dependerá de la duración y severidad del insulto. Aunque la mayoría de las células más afectadas mueren por necrosis, se ha definido una muerte neuronal más lenta asociada dentro de la llamada área de penumbra (Li Y, *et al.*, 1995). Durante la respuesta al estrés celular ocasionado por la isquemia, tiene lugar la activación de las JNK/SAPKs (del inglés, *c-Jun N-terminal kinases/stress-activated protein kinases*). Al translocarse al núcleo, las JNK/SAPKs activan el factor de transcripción *c-jun*, con la consiguiente inducción de la expresión de sus genes diana, entre los que se encuentran CD95L y TNF α (Rosenbaum DM, *et al.*, 2000). También se ha demostrado que las células gliales pueden contribuir a la progresión de la muerte celular en el período posterior a la isquemia, a través de la producción de óxido nítrico o citoquinas (Kim JS, 1996). La hipoxia o la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) inducen a la microglía a la expresión de CD95L (Vogt M, *et al.*, 1998). En consonancia con estos resultados, se ha demostrado que en cerebros post-isquémicos hay niveles elevados de CD95L y TNF α , con la capacidad de inducir muerte en cultivos primarios de neuronas. La implicación de estos ligandos de muerte se ve reforzada por la resistencia al daño neuronal post-isquemia en ratones deficientes en CD95 (Martin-Villalba A, *et al.*, 1999). Sin embargo, el papel del TNFR1 *in vivo* es en cierta manera controvertido, pues en algunos casos se ha visto que el bloqueo de su señalización reduce el área afectada, mientras que ratones deficientes en TNFR1, en TNFR2 o en ambos, tienen un daño isquémico mayor. Con el fin de esclarecer la función de

estos receptores, Martin-Villalba y colaboradores evaluaron la resistencia de ratones deficientes en $TNF\alpha$ y CD95L al daño isquémico primario y a la reacción inflamatoria posterior en un modelo de oclusión de la arteria cerebral media. Sus resultados demostraron que ratones híbridos deficientes en $TNF\alpha$ y CD95L eran resistentes al daño inducido por la oclusión arterial. Estos resultados se vieron reforzados al observar que, en ratones control a los que se les inyectaba una combinación de anticuerpos para neutralizar CD95L y $TNF\alpha$, había una reducción de hasta el 70% del volumen de infarto. También se observó que había una respuesta inflamatoria más pequeña, detectándose una menor invasión de granulocitos. La combinación de la protección del daño isquémico primario junto con una respuesta inflamatoria menor hizo que los animales con la señalización por $TNF\alpha$ / CD95L tuvieran una mayor supervivencia y recuperaran la función locomotora prácticamente indistinguible de los animales operados sin oclusión arterial (Martin-Villalba A, *et al.*, 2001).

1.4.2.2 Enfermedades Inflamatorias

Un conjunto de patologías donde se ha visto implicación de CD95 es en las enfermedades inflamatorias del sistema nervioso como la Esclerosis Múltiple (MS, del inglés *Multiple sclerosis*). La MS es una patología autoinmune que afecta al cerebro y médula espinal y que está mediada por linfocitos T. Se forman una serie de puntos de inflamación que acaban con la desmielinización por la muerte específica de oligodendrocitos. Esta progresiva desmielinización interrumpe la transmisión del impulso nervioso y afecta a diferentes áreas del SNC alterando funciones de motilidad, habla o conciencia (Ethell DW y Buhler LA, 2003). Un modelo experimental ampliamente utilizado para el estudio de la MS es la alergia experimental encefalomiélica (EAE, del inglés *experimental allergic encephalomyelitis*). Se induce por inyección

de péptidos mielin-específicos y al cabo de entre 10 y 14 días, los animales empiezan a desarrollar pérdida del tono muscular en la cola y deterioro en la coordinación en los movimientos musculares (Swanborg RH, 1995) . En este modelo experimental, el sistema CD95/CD95L puede inducir dos tipos de respuestas diferentes. Por una parte, puede actuar como inductor de muerte, puesto que las células T expresan CD95L en su superficie y pueden tener como células diana aquellas que expresan CD95 como por ejemplo neuronas y oligodendrocitos. La inyección de anticuerpos específicos anti CD95L justo después de la fase aguda de EAE desestabiliza el sistema CD95/CD95L y se observa una mejora clínica de los síntomas, apoyando la hipótesis de que CD95 actúa como promotor de la muerte de los oligodendrocitos y la consiguiente desmielinización (Wildbaum G, *et al.*, 2000). Pero por otra parte, el sistema inmune puede ejercer funciones protectoras en fases más avanzadas de la enfermedad, regulando complicaciones autoinmunes que pueden aparecer tras la exposición a autoantígenos (Choi C y Benveniste EN, 2004). Así pues, también se ha visto mejora de los síntomas clínicos de EAE tras la administración de CD95L (Ciusani E, *et al.*, 2001).

1.4.2.3 Patologías con daño traumático

Los traumatismos craneoencefálicos (TBI, del inglés, *traumatic brain injury*) constituyen una de las principales causas de muerte en la población por debajo de 45 años. La muerte celular que se desencadena está mediada, en parte, por estímulos excitotóxicos como el glutamato y una desregulación en la homeostasis del calcio (Faden AI, *et al.*, 1989). Por otra parte, hay evidencias experimentales que demuestran que los DRs también participan en la muerte neuronal desencadenada. Usando modelos animales así como muestras de pacientes con traumatismos muy severos, se observó que el TBI induce la formación del DISC y

promueve la activación de la cascada de caspasas. Estudios de expresión de CD95 y CD95L muestran colocalización en neuronas y se propone, por tanto, que es en este tipo celular donde tiene lugar la formación del DISC, indicando un posible mecanismo autocrino de inducción de muerte. Aunque la formación del DISC en los linfocitos infiltrados podrían suponer un enmascaramiento de los resultados, no parece que sea el caso ya que no se observan neutrófilos al mismo tiempo que ocurre la formación del DISC, de 3 a 6 h post-trauma (Qiu J, *et al.*, 2002).

En extractos de traumatismos de corteza cerebral y en líquido cefaloraquídeo de pacientes con traumatismo craneoencefálico (Ross SA, *et al.*, 1994) también se han encontrado niveles altos de $TNF\alpha$. En modelos experimentales, se observa un incremento de mRNA y proteína de TNFR1 ya a 1 h post-trauma (Vitarbo EA, *et al.*, 2004). Para demostrar la implicación de estos aumentos de expresión en la muerte celular tras el traumatismo, se procedió a analizar con detalle las proteínas implicadas en la señalización por TNFR1. Transcurridos tan sólo cinco minutos de la inducción del trauma se observa la concentración del receptor TNFR1 en los *lipid rafts*, y esos *lipid rafts* constituyen la plataforma ideal para la señalización por TNFR1 y el reclutamiento de moléculas adaptadoras como TRADD, TRAF1, TRAF2, FADD, RIP, cIAP1 y cIAP2 y posteriormente caspasa-8. La regulación dinámica de TNFR1 en los *rafts* puede constituir un sistema por el cual las células se vuelven más sensibles a la muerte inducida por $TNF\alpha$ y por tanto la modificación de la posición de TNFR1 en los *rafts* puede considerarse como diana terapéutica (Lotocki G, *et al.*, 2004).

Otra de las patologías asociadas a un proceso traumático es el que tiene como consecuencia daño en la médula espinal (SCI, del

inglés, *spinal cord injury*). Una de las metas que se busca es la recuperación tras la lesión, consiguiendo reestablecer las conexiones nerviosas. Para este proceso, se ha visto que el bloqueo de CD95L con anticuerpos específicos promueve una recuperación funcional tras la lesión. El mecanismo podría ser a través una capacidad regenerativa mayor de los axones o el bloqueo de la apoptosis de neuronas y oligodendrocitos, éstos últimos responsables del mantenimiento de la mielinización axonal. Pese a lo esperanzador de los resultados, su aplicación clínica requiere todavía mayor conocimiento de lo que ocurre tras SCI. El bloqueo de la apoptosis puede conllevar otros riesgos, como por ejemplo que las células afectadas no sean eliminadas y por tanto no realicen correctamente su función y también el riesgo de aparición de enfermedades proliferativas (Demjen D, *et al.*, 2004).

1.4.2.4 Enfermedades Neurodegenerativas

La enfermedad de Alzheimer (AD, del inglés, *Alzheimer's disease*) se caracteriza por la deposición de fibras de β -amiloide y una extensiva pérdida de neuronas. Muchos de los esfuerzos en investigación se han centrado en el mecanismo de deposición de las fibras, pero lo que no está claro del todo es cómo la formación de las placas seniles desemboca en la muerte neuronal. Curiosamente, parece que la pérdida de neuronas es selectiva de determinadas áreas del cerebro, observándose que frecuentemente ocurre una pérdida de neuronas de la corteza frontal e hipocampo, mientras que otras áreas subcorticales o cerebelo no están afectadas (Bamberger ME y Landreth GE, 2002). En la muerte de las neuronas afectadas se observan características definitorias de apoptosis (Cotman CW y Su JH, 1996). Se ha observado que en cerebros de pacientes con AD hay una desregulación de los niveles de las proteínas de la familia de Bcl-2, encontrándose elevados los de los miembros proapoptóticos y en niveles más bajos de lo

habitual, los antiapoptóticos, así como la presencia de caspasa-3 activa (Shimohama S, 2000).

De entre los diferentes estímulos que pueden inducir la muerte de las neuronas en AD, la activación de la microglía sería la que mediaría sus efectos neurotóxicos a través de los receptores de muerte. Las fibras de β -amiloide pueden inducir la producción de citoquinas a través de un mecanismo dependiente de la señalización por tirosina-quinasas (Combs CK, *et al.*, 2001). De entre ellas, $\text{TNF}\alpha$ sería una de las principales para ejercer los efectos neurotóxicos.

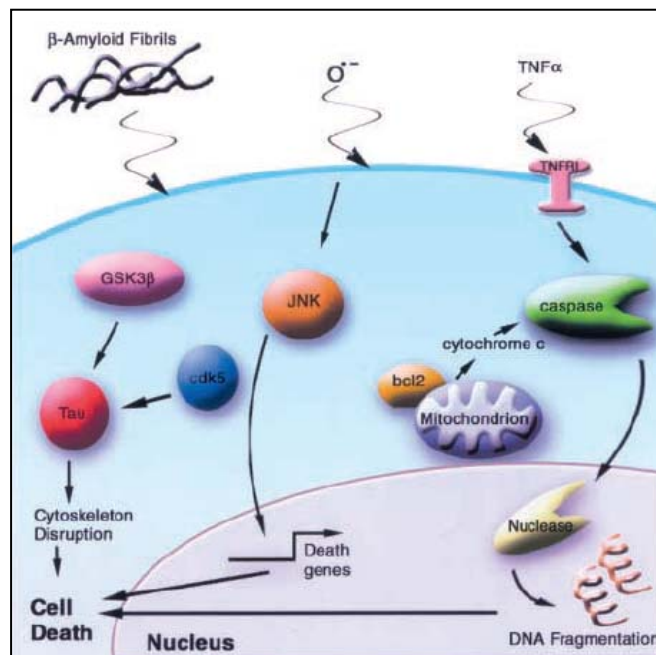


Figura 16. Inducción de la muerte neuronal apoptótica en la enfermedad de Alzheimer. $\text{TNF}\alpha$ liberado por la microglía reactiva ejerce directamente la inducción de apoptosis. Por otra parte, especies reactivas de oxígeno pueden inducir la transcripción de genes apoptóticos entre los que se incluyen CD95 (Bamberger ME y Landreth GE, 2002).

Junto con la producción de citoquinas, se ha propuesto que la formación de especies reactivas de oxígeno contribuye al mecanismo neurotóxico (Smith MA, *et al.*, 1998). En ratones que sobreexpresan la

proteína precursora amiloide humana se ha detectado un aumento de la expresión de CD95, que puede resultar en un incremento de la muerte neuronal. El aumento de la expresión de CD95 se ve reducido en ratones híbridos que expresan la proteína Superóxido Dismutasa, un enzima capaz de procesar las especies reactivas de oxígeno a productos menos tóxicos (Chen Z, *et al.*, 2005). De estos resultados se deduce que una terapia antioxidante podría considerarse como alternativa, mitigándose los efectos neurotóxicos, entre otras cosas, por la reducción en la expresión de CD95.

En contraposición al papel que pueden jugar los DRs en la neurotoxicidad en enfermedades neurodegenerativas, está el papel que desempeñan como neuroprotectores, concretamente en la enfermedad de Parkinson (PD, del inglés, *Parkinson Disease*). Esta enfermedad se caracteriza por la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra pars compacta*, dando lugar a los síntomas característicos como son temblor, bradiquinesia, rigidez e inestabilidad postural. La exposición a la toxina dopaminérgica 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) constituye un modelo bien caracterizado en roedores y primates e incluso puede inducir PD en humanos (Dauer W y Przedborski S, 2003). La toxina MPTP es capaz de traspasar la barrera hematoencefálica dónde se metaboliza a su forma activa, el ión 1-metil-4-fenilpiridiminio (MPP⁺), el cual se concentra selectivamente en las neuronas dopaminérgicas gracias al transportador de dopamina, causando su muerte. Se había observado que, en pacientes con PD, la expresión de CD95 y la forma anclada a membrana de CD95L están disminuidos (Ferrer I, *et al.*, 2000), y que la forma soluble de CD95L estaba aumentada (Mogi M, *et al.*, 1996). CD95L soluble puede bloquear la señalización por CD95. Así pues, con estas evidencias parece que en PD la señalización por CD95 puede estar afectada. Landau y

colaboradores han demostrado que al tratar ratones deficientes en CD95 (*lpr*) con dosis subóptimas de MPTP había una dramática pérdida de neuronas dopaminérgicas mientras que estas dosis no causaban alteraciones en los ratones salvajes. Esta pérdida de neuronas iba acompañada de una marcada hipoquinesia y aparición de temblores y descoordinación. *In vitro*, también se ha demostrado que la activación de CD95 es capaz de proteger frente a la muerte inducida por MPTP, en un mecanismo independiente de caspasa-8. Estos resultados se ven reforzados por los experimentos realizados en ratones con déficit en el DD de CD95. Tanto el ratón deficiente en el exon 9 (que codifica para parte del DD) de CD95, como la cepa *lpr.cg* que tiene un plegamiento incorrecto del DD, son resistentes a MPTP (Landau AM, *et al.*, 2005). Estos resultados excluyen que sea necesario el DD de CD95 para realizar su función protectora en este modelo, y por consiguiente todas las moléculas que a este dominio se asocian.

Por el contrario, experimentos llevados a cabo en modelos animales de Parkinson, demostraron un aumento de TNF α muy poco después de la inducción de Parkinson por MPTP. Ratones deficientes en TNFR1 y TNFR2 eran completamente resistentes a la muerte inducida por MPTP implicando al TNF α como molécula efectora del proceso neurodegenerativo (Sriram K, *et al.*, 2002).

1.4.3 Otras funciones

Una de las funciones que clásicamente se le ha atribuido a CD95 en el sistema nervioso es la de prevenir la infiltración de linfocitos en lugares que gozan de “privilegio inmune” (Nagata S, 1997). Se consideran órganos con “privilegio inmune” los que no podrían soportar los efectos de una respuesta inmune y su proceso inflamatorio asociado, como por ejemplo el cerebro, ojo y órganos reproductores. En un

principio se pensaba que este “privilegio” se mantenía evitando la entrada de células activadas, pero se ha detectado que en condiciones normales del cerebro hay presencia de células del sistema inmune, especialmente linfocitos T. Junto con otros mecanismos que incluyen la secreción de moléculas inmunosupresoras como puedan ser neurotransmisores, neurotrofinas, glucocorticoides y TGF β , las células residentes en el cerebro, y sobretodo las células endoteliales (Choi C y Benveniste EN, 2004) y gliales (Saas P, *et al.*, 1997) expresan constitutivamente CD95L, lo que permite mantener y limitar cualquier respuesta inmune adversa (Green DR y Ferguson TA, 2001).

1.5 ANTAGONISTAS DE LOS RECEPTORES DE MUERTE

La función de los receptores de muerte puede ser alterada por modificaciones postraduccionales del receptor, como por ejemplo glicosilación (Keppler OT, *et al.*, 1999), o bien interfiriendo en la cascada apoptótica. A continuación, se presenta una tabla en la que aparecen proteínas asociadas al antagonismo de la función de los receptores de muerte. Es de particular interés para este trabajo su presencia en el Sistema Nervioso. No están incluidas en esta descripción aquellas moléculas que, aunque también sean capaces de antagonizar los efectos de los receptores de muerte, lo hacen indirectamente, es decir, que interfieran en la vía mitocondrial, como por ejemplo, los miembros antiapoptóticos de la familia de Bcl-2, IAPs y otros.

<i>Molécula</i>	<i>Nombre completo</i>	<i>Presencia en SN</i>
A20	<i>Zinc finger protein A20</i>	Sí
BAR	<i>Bifunctional Apoptosis Regulator</i>	Sí
FAIM	<i>Fas apoptosis inhibitory molecule</i>	Sí
FAP-1	<i>FAS associated phosphatase-1</i>	Sí
FLIP	<i>FLICE inhibitory protein</i>	Sí
LFG	<i>Lifeguard</i>	Sí

PEA-15	<i>Phosphoprotein Enriched in Astrocytes</i>	Sí
SODD	<i>Silencer of Death Domains</i>	Sí
SUMO-1	<i>Small ubiquitin-related modifier 1</i>	Sí
BTK	<i>Bruton's tyrosine kinase</i>	No
TOSO		No
E6		Proteína vírica
E3 RID		Proteína adenoviral
HPV E7		Proteína adenoviral

Tabla 2. Principales antagonistas de los DRs. La presencia en el Sistema Nervioso está estimada de acuerdo con GeneCards (<http://www.genecards.org/>)

1.5.1 Lifeguard (LFG)

LFG fue clonada en 1999 como una proteína capaz de proteger de la muerte mediada por CD95 y no por otros DRs como TNFR1 (Somia NV, *et al.*, 1999). La línea celular fibroblástica de pulmón humano MRC-5 es resistente a CD95L, pero como otras muchas líneas celulares, se vuelve sensible en presencia de inhibidores de la síntesis proteica como la cicloheximida, sugiriendo la existencia de proteínas lábiles que son necesarias para la resistencia a CD95L. Así pues, Somia y colaboradores decidieron generar una librería de cDNA en un vector retroviral a partir de la línea MRC-5, suponiendo que estarían representados aquellos genes responsables del mantenimiento de la resistencia a CD95L. Posteriormente infectaron la línea celular HeLa, que sí es sensible a CD95L, y procedieron a la selección de clones resistentes al tratamiento con el anticuerpo CH11 (actúa como agonista de CD95L). El DNA genómico de los clones supervivientes fue aislado y amplificado por PCR con cebadores o *primers* específicos del vector retroviral en el que se había construido la librería. Se analizó el producto de PCR más abundante y dio lugar a una pauta abierta de lectura (ORF, del inglés, *Open Reading Frame*) de 316 aminoácidos con un peso molecular teórico de aproximadamente 35 kDa, a la que se designó con

el nombre de *Lifeguard*. Al comparar por homología de secuencia con las bases de datos existentes, se vio que era el homólogo humano de la proteína de rata NMP35 (*Neural Membrane Protein 35*)(Schweitzer B, *et al.*, 1998). La proteína de rata NMP35 fue obtenida por técnicas de expresión diferencial (*Differential Display*) para hallar genes regulados durante el desarrollo del nervio ciático de rata. NMP35 parecía ser una proteína predominantemente expresada en sistema nervioso, tanto en cerebro como en médula espinal, y cuya expresión se veía aumentada durante el desarrollo para alcanzar los máximos niveles en el adulto. Las regiones con mayor expresión se sitúan en neuronas piramidales de la corteza, motoneuronas, en el giro dentado y regiones CA1 y CA3 del hipocampo y en la capa de neuronas granulares del cerebelo. Estudios más detallados indican que se localiza tanto en el soma como en las dendritas apicales de las neuronas (Schweitzer B, *et al.*, 2002). Estructuralmente consta de un extremo N-terminal de unos 106 aminoácidos seguidos de siete pasos transmembrana. Estudios de homología con otras proteínas descritas revelaron un 42% de homología con la proteína de unión a glutamato (*rGBP*, del inglés, *rat Glutamate Binding Protein*), aunque cabe mencionar que la mayor identidad reside en las secuencias de los pasos transmembrana, donde la composición de aminoácidos es más restringida.

Las primeras aproximaciones sobre su función se llevaron a cabo por experimentos de expresión forzada en las líneas celulares HeLa y Jurkat, ambas sensibles a CD95L. Las células HeLa transfectadas con la construcción LTR-LFG eran completamente resistentes a la muerte inducida por CD95L, mientras que aquellas transfectadas con la secuencia antisentido, LTR-GFL, presentaban un 60% de muerte celular a las 48h tras tratamiento con el agonista de CD95 CH11. Sin embargo, las mismas células con la construcción LTR-LFG eran completamente

sensibles a la muerte mediada por $TNF\alpha$. Protecciones del 50% sobre viabilidad celular fueron obtenidas en la línea linfocitaria Jurkat, una línea celular ampliamente utilizada para el estudio de CD95. En un primer intento para el abordaje del mecanismo por el cual LFG realizaba su función, se hicieron experimentos de co-expresión de LFG y CD95 en células HEK293. Se demostró que LFG coimmunoprecipitaba con CD95 pero no con TNFR1 y que cantidades crecientes de LFG no eran capaces de desplazar la unión de FADD con CD95. Los mecanismos establecidos por aquel entonces sobre el funcionamiento de CD95 pasaban por el previo reclutamiento de FADD y posteriormente de caspasa-8, mientras que para TNFR1 era preciso reclutar TRADD, y posteriormente FADD y caspasa-8. La proteína adaptadora TRADD y la incapacidad de LFG de proteger frente a la muerte por $TNF\alpha$, ubicaban la función de LFG por encima de FADD o al menos en el complejo FADD/CD95.

No ha sido hasta el año 2005 cuando se ha relacionado a LFG como antagonista de CD95 en sistema nervioso. Resultados en concordancia con el presente trabajo demuestran que LFG es uno de los componentes encargados de mantener la resistencia de las neuronas a CD95 (Beier CP, *et al.*, 2005). Sus resultados sobre su localización se muestran en consonancia con los anteriores resultados publicados y se aporta el dato nuevo sobre la colocalización de CD95 con LFG tanto en citoplasma como en la membrana plasmática y neuritas. Sin embargo, los experimentos claves de Beier y colaboradores se centran en que la disminución de la expresión de LFG en neuronas granulares de cerebelo, por la técnica del RNA de interferencia, sensibiliza a dichas neuronas a la muerte mediada por CD95, en un mecanismo dependiente de activación de caspasa-8. De manera interesante profundizan en la regulación de la expresión de LFG, demostrando que la vía implicada es

la vía de los Fosfatidilinositoles 3-fosfato-quinasa (PI3-K), una de las vías centrales para la supervivencia en la mayoría de sistemas celulares. En resumen, sus resultados posicionan a LFG como mecanismo para el mantenimiento del estado de resistencia a CD95 en neuronas granulares de cerebelo, contexto celular donde otros antagonistas como FLIP no están o están pobremente expresados.

1.5.2 Fas Apoptosis Inhibitory Molecule (FAIM)

La activación del receptor CD40, miembro de la familia de receptores de TNFR1, aumenta la expresión de CD95 y sensibiliza a los linfocitos B a la muerte mediada por CD95, mientras que la activación del receptor de antígeno de células B indica un estado de resistencia. Esta resistencia se desarrolla durante un período que dura horas y es dependiente de la síntesis de macromoléculas, indicando que la protección frente al estímulo apoptótico de CD95 requiere de la acumulación de una o más proteínas. Uno de estos productos génicos es la proteína antiapoptótica Bcl_{X_L} (Schneider TJ, *et al.*, 1997) aunque sus efectos no explicaban totalmente resistencia de las células B. Entonces, en un análisis de expresión diferencial entre células B sensibles y células B resistentes a CD95, se aisló un gen aumentado en células B resistentes y que era capaz de inhibir la muerte por CD95 en células sensibles (Schneider TJ, *et al.*, 1999). Se le llamó *Fas apoptosis inhibitory molecule* (FAIM). FAIM está altamente conservada en la evolución desde *Caenorhabditis elegans* hasta humanos y se expresa en una gran variedad de tejidos (Rothstein TL, *et al.*, 2000). Aunque no se ha descrito el mecanismo exacto, se observó que en células B con expresión forzada de FAIM había una reducción del procesamiento del sustrato de caspasas PARP (*Poly-ADP-ribose polymerase*) indicando que FAIM interfiere en un punto anterior a la actividad caspasa terminal. Además, su mecanismo parece específico de la señalización por CD95,

puesto que las mismas células sobreexpresoras de FAIM no eran diferencialmente resistentes a la muerte inducida por otros estímulos como radiación ultravioleta o estaurosporina.

FAIM fue clonado a partir de dos fuentes de DNA diferentes, una procedía de una librería génica de timo y otra de cerebro. Se encontraron dos secuencias que diferían en 66 nucleótidos en el extremo 5'. La secuencia derivada de cerebro contenía 22 aminoácidos extra y se le llamó FAIM_L.

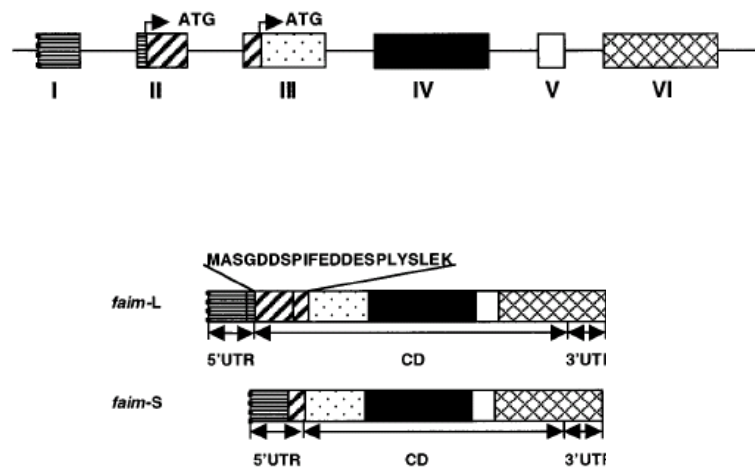


Figura 17. Estructura genómica del locus génico FAIM, compuesto por 6 exones. El splicing diferencial da lugar a 2 RNA mensajeros de FAIM, FAIM_L y FAIM_S, que comparten la misma región 5' UTR en el exón I. Parte de la región codificante de FAIM_L sirve de región UTR de FAIM_S. Adaptado de (Zhong X, et al., 2001).

En el estudio de la organización genómica del locus FAIM se identificaron 2 putativos inicios de transcripción en exones adyacentes, lo que apuntaba a que FAIM_L y FAIM_S se generan por *splicing* alternativo a partir de un único gen. El análisis de expresión en múltiples tejidos evidenció que FAIM_L se expresa principalmente en el sistema nervioso (Zhong X, et al., 2001).

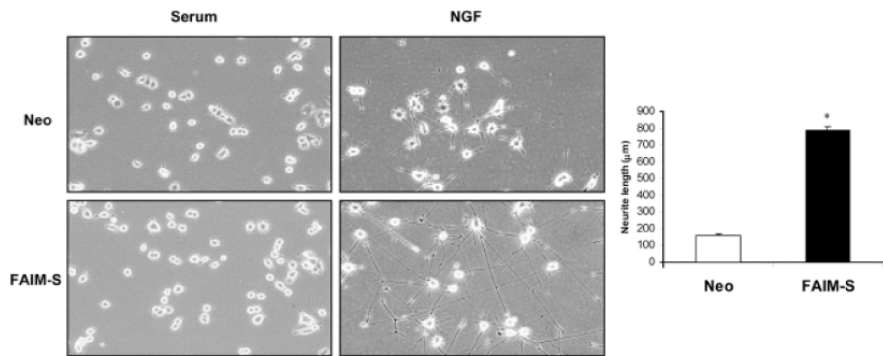


Figura 18. La expresión forzada de FAIM_S induce crecimiento neurítico en células PC12 tras estimulación con NGF. Adaptado de (Sole C, et al., 2004).

Resultados de nuestro laboratorio han demostrado que la expresión forzada de FAIM_S incrementa claramente el crecimiento neurítico promovido por NGF en diversos modelos neuronales y que la reducción de los niveles de expresión endógenos de FAIM_S, reduce substancialmente la neuritogénesis estimulada por NGF en células PC12 y en neuronas del ganglio cervical superior (SCG).

Una de las vías de señalización intracelular más comúnmente asociadas con el crecimiento neurítico inducido por neurotrofinas es la vía ERK/MAPK (Davies AM, 2000), y por tanto se investigó el papel de esta vía en los efectos sobre el crecimiento neurítico mediados por FAIM. La adición de inhibidores farmacológicos de la vía ERK/MAPK como PD98059 claramente redujo la extensión de las neuritas en las células transfectadas con FAIM sugiriendo que la activación de la vía ERK es necesaria para el crecimiento neurítico inducido por la sobreexpresión de FAIM. Sin embargo, al comprobar si la expresión forzada de FAIM o bien su eliminación por RNA de interferencia, modulaban el estado de fosforilación de las ERK (indicativo de su

actividad) se vio que no había alteraciones significativas ni en intensidad ni duración del estímulo. La ausencia de diferencias claras en los niveles y en la duración de la activación de ERK indica que deben existir otras vías de transducción de señales sobre las que FAIM ejerza sus efectos para aumentar el crecimiento neurítico.

Otra de las vías de transducción de señal activadas por NGF implicadas en el crecimiento neurítico es la vía del factor de transcripción NF- κ B (Foehr ED, *et al.*, 2000). La sobreexpresión de FAIM_S promueve translocación nuclear de NF κ B e incrementa su actividad transcripcional. Por otra parte, bloqueando la activación de NF κ B en células PC12 y en neuronas SCG con el super-represor, SR-I κ B α , o bien realizando los experimentos en neuronas corticales de ratones deficientes de la subunidad p65, se ha demostrado que el crecimiento neurítico promovido por FAIM_S es dependiente de la activación de NF κ B. Al usar la estrategia de RNA de interferencia para disminuir la expresión endógena de FAIM_S, la activación de NF κ B por NGF se vio completamente abolida. Además, con el RNAi se ha reducido sustancialmente el crecimiento neurítico inducido por NGF tanto en células PC12 como en neuronas SCG (Sole C, *et al.*, 2004).

En contraposición al trabajo donde se muestra la función antiapoptótica de FAIM_S en linfocitos B, nosotros hemos encontrado que la modulación de la expresión de FAIM_S no tiene ningún efecto en la supervivencia neuronal tras retirada de soporte trófico. Como ya se ha explicado anteriormente, CD95 se ha visto implicado en regeneración neuronal y regulación del crecimiento neurítico. Los resultados obtenidos con FAIM_S podrían estar en desacuerdo con estos resultados si FAIM_S estuviera actuando exclusivamente como un inhibidor de la señalización de CD95. Sin embargo, el crecimiento neurítico no requiere de la

estimulación de CD95 y por lo tanto, es improbable que FAIM_S afecte la neuritogénesis modulando la señalización de CD95. Se demostró también que FAIM_S interacciona con los dos receptores de NGF, Trk y p75^{NTR}, de una manera dependiente de ligando ya que FAIM_S promueve el crecimiento neurítico solamente cuando hay NGF en el medio de cultivo. Estos resultados argumentan a favor de que FAIM_S modula la neuritogénesis regulando la señalización del receptor de NGF. El hecho de que FAIM_S se una a los dos receptores TrkA y p75^{NTR} sugiere que FAIM_S puede influir en la activación de NF-κB al nivel del receptor. En resumen, FAIM_S constituye la primera evidencia de que una molécula previamente identificada como inhibidora de la apoptosis mediada por Fas tiene una implicación en la regulación del crecimiento neurítico.

1.5.3 FLICE inhibitory Protein (FLIP)

En la búsqueda de proteínas capaces de atenuar la muerte inducida por CD95/CD95L se identificaron toda una familia de proteínas que tenían dominios DED.

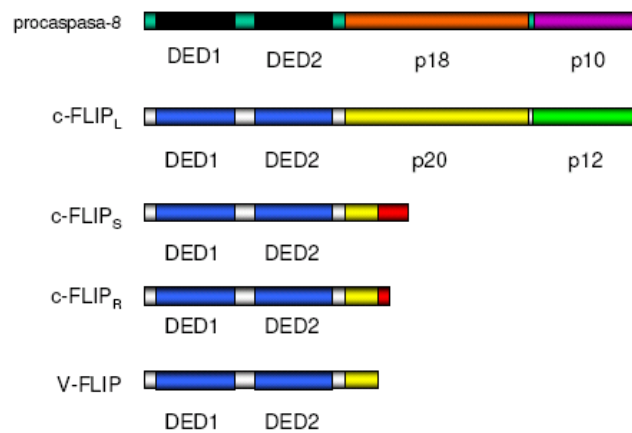


Figura 19. Similitudes estructurales entre caspasa-8 y FLIP. Las 3 isoformas de FLIP contienen 2 DED y FLIP_L contiene 2 dominios parecidos a caspasa (p20 y p12) sin actividad catalítica. Modificado de (Krueger A, et al., 2001).

Algunas de estas proteínas eran componentes de virus como el herpesvirus Saimiri, herpesvirus humano 8, herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi, etc. Estas proteínas fueron llamadas inhibidores virales de FLICE (vFLIPs, del inglés *viral FLICE inhibitory proteins*). Estas proteínas pueden unirse al DISC de CD95 e inactivar a caspasa-8. Se encontró el homólogo humano de v-FLIP y se le llamó la proteína inhibidora de FLICE celular (c-FLIP, del inglés, *cellular FLICE-inhibitory Protein*). Se han descrito hasta 13 múltiples variantes de *splicing*, pero sólo se ha demostrado la existencia de 3 a nivel de proteína.

Estructuralmente, todas las isoformas constan de dos dominios DED similares al extremo N-terminal de caspasa-8. El extremo C-terminal de FLIP_L consta de dos dominios parecidos a caspasas (p20 y p12), aunque no tienen los residuos aminoacídicos críticos para la actividad caspasa, más concretamente tienen una tirosina en vez de una cisteína en el centro catalítico. FLIP_S y FLIP_R (Golks A, *et al.*, 2005) tan solo contienen los dos dominios DED y su extremo C-terminal, más corto en FLIP_R que en FLIP_S, y que es diferente a FLIP_L, caspasa-8 o caspasa-10 (Krueger A, *et al.*, 2001).

Por lo general, la función atribuida a FLIP es antiapoptótica, al menos en cuanto a las isoformas FLIP_S y FLIP_R, habiéndose atribuido a FLIP_L tanto funciones antiapoptóticas como proapoptóticas. FLIP_R y FLIP_S son estructuralmente muy parecidos por lo que también comparten su mecanismo de acción. Ambas isoformas son capaces de unirse al DISC con afinidades similares (Golks A, *et al.*, 2005), dónde a través sus dominios DED pueden interaccionar con FADD. Una vez allí, pueden formar heterodímeros con procaspasa-8 impidiendo su posterior procesamiento.

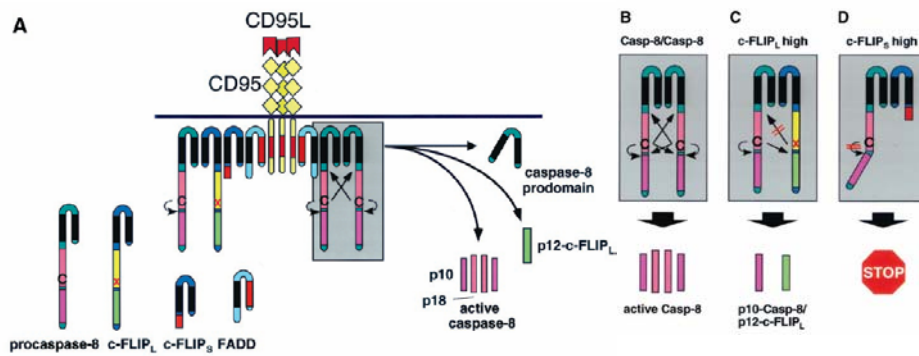


Figura 20. Modelo propuesto para la inhibición de caspasa-8 por FLIP. **A**, dependiendo de la relación entre niveles de caspasa-8 y FLIP se generan distintos productos tras la formación de DISC. **B**, cuando hay bajos niveles de FLIP hay un procesamiento completo de procaspasa-8 dando lugar a la formación del heterotetrámero activo formado por las subunidades p18 y p10. **C**, al haber niveles altos de FLIP_L, el procesamiento de caspasa-8 se bloquea al formarse los fragmento p43 tanto de caspasa-8 como de FLIP_L. **D**, Con niveles altos de FLIP_S o FLIP_R, procaspasa-8 se recluta al DISC pero permanece sin procesar. Modificado de (Krueger A, et al., 2001).

En el caso de FLIP_L, el mecanismo antiapoptótico propuesto inicialmente era que podría estar actuando como un inhibidor competitivo con procaspasa-8 para su unión a FADD (Rasper DM, et al., 1998) puesto que éste era uno de los mecanismos descritos para las isoformas virales de FLIP (Thome M, et al., 1997). Posteriormente, se observó que FLIP no impedía la unión de caspasa-8 al DISC (Scaffidi C, et al., 1999). Una vez que FLIP_L es reclutado al DISC, se procesa en dos subunidades, p43 que permanece en el DISC y p12 que se libera.

En presencia de FLIP_L, caspasa-8 también se procesa generando dos fragmentos de p43 y p41 kDa, mientras que una subunidad p10 se libera. Según el modelo de corte autocatalítico inducido por proximidad propuesto para caspasa-8 (Muzio M, et al., 1998), primero tiene lugar la activación autocatalítica, que junto con la presencia de un dominio caspasa adyacente se produce un corte “transcatalítico” que da lugar a

la activación completa, formándose el heterotetrámero activo compuesto por las subunidades p18 y p10. En el caso que la molécula adyacente en este modelo sea FLIP_L, cuyo dominio caspasa no es funcional, tendría lugar el primer corte autocatalítico de caspasa-8 quedando en el DISC la subunidad p43 y liberándose la p10. Sin embargo, el corte “transcatalítico” no tendría lugar impidiéndose así el procesamiento y activación total de la caspasa-8 (Krueger A, *et al.*, 2001).

Las evidencias de que FLIP_L puede tener un papel proapoptótico parten de los experimentos de Irmeler y colaboradores, en los que observaron que la expresión de grandes cantidades de FLIP_L pero no de FLIP_S inducían la muerte espontánea de las células HEK293 (Irmeler M, *et al.*, 1997). Estos resultados sugerían que los niveles de FLIP_L podían determinar la vida o muerte de una célula. Experimentos posteriores en condiciones de expresión forzada de c-FLIP_L pero con niveles de comparables a los endógenos en la línea celular HeLa, demostraron la inducción del procesamiento de caspasa-8 y apoptosis (Chang DW, *et al.*, 2002).

En cambio, los resultados obtenidos a partir de experimentos de pérdida de función tanto de FLIP_S como de FLIP_L conjuntamente (Yeh WC, *et al.*, 2000) o por separado (Sharp DA, *et al.*, 2005) apuntan a que, fisiológicamente, la modulación del procesamiento de caspasa-8 por FLIP tiene consecuencias inhibitorias. Además, en fibroblastos embrionarios extraídos de los ratones nulos para FLIP muestran una alta sensibilidad a ligandos de los DRs como CD95L y TNF α (Yeh WC, *et al.*, 2000).

De forma curiosa, el fenotipo de los ratones nulos para FLIP invita a una reflexión. Estos ratones mueren a día 10,5 de embriogénesis

por un fallo en el desarrollo cardíaco no relacionado con un defecto de apoptosis, como ocurre también en los ratones nulos para FADD o caspasa-8, lo que implica que pueda tener otras funciones a partir de la antiapoptótica. Es más, FLIP se expresa en distintos tipos celulares independientemente de su sensibilidad a CD95 (Peter ME, 2004). Micheau y colaboradores demostraron que en células establemente transfectadas con c-FLIP, FLIP_L promovía el procesamiento inicial de caspasa-8 en el DISC, impidiendo el subsiguiente procesamiento y la liberación de las subunidades activas. Este procesamiento implicaba que caspasa-8 tan solo era capaz de procesar substratos próximos al DISC, como por ejemplo, RIP (Micheau O, *et al.*, 2002). Se ha estimado que la concentración de FLIP_L en una célula representa tan solo el 1% de total de caspasa-8, mientras que en el DISC hay aproximadamente una ratio de 1 molécula de FLIP_L por cada 5 de caspasa-8 (Chang DW, *et al.*, 2002). Este enriquecimiento puede ser debido a la preferencia por formarse heterodímeros FLIP_L-caspasa-8 más que homodímeros de caspasa-8 (Boatright KM, *et al.*, 2004). Hay evidencias experimentales demostrando que el procesamiento de FLIP_L por caspasa-8 es necesario para la propagación de señales prosupervivencia a través de la activación del factor de transcripción NF- κ B (Kataoka T y Tschopp J, 2004).

Poco o casi nada se conoce de la función fisiológica de FLIP en el sistema nervioso. Se ha detectado su expresión en neuronas corticales durante el desarrollo (Cheema ZF, *et al.*, 1999) aunque no se ha correlacionado con la resistencia o sensibilidad a CD95 de las diferentes poblaciones neuronales. En neuronas granulares de cerebelo, resistentes a CD95, se ha observado que su expresión disminuye durante los días de maduración del cultivo, aumentándose la de otro antagonista, LFG (Beier CP, *et al.*, 2005). Así pues, su expresión podría

estar regulando las actividades de los DRs durante el desarrollo en tipos celulares y períodos concretos.

1.5.4 Otros antagonistas de DRs

Zinc finger protein A20

El gen de respuesta primaria a $\text{TNF}\alpha$ A20 codifica para una proteína de 80 kDa, con un extremo C-terminal que contiene siete dominios $\text{Cys}_2/\text{Cys}_2$ *zinc finger* -del inglés, dedos de Zinc- (Opipari AW, Jr., *et al.*, 1990). Esta proteína es capaz de inhibir la apoptosis inducida por $\text{TNF}\alpha$ y por Interleukina 1β (IL- 1β). Se expresa muy rápidamente y de forma abundante tras la estimulación por $\text{TNF}\alpha$ o por IL- 1β . Su habilidad para bloquear la señalización inducida por estas citoquinas puede constituir un mecanismo de regulación negativa en el bloqueo de la respuesta inflamatoria (Lademann U, *et al.*, 2001). Su función es relevante para el organismo, puesto que ratones deficientes en A20 mueren prematuramente por una severa inflamación y caquexia, y muestran una alta hipersensibilidad a TNF debido a la imposibilidad de frenar las acciones desencadenadas por $\text{TNF}\alpha$ (Lee EG, *et al.*, 2000). Hay diferentes propuestas para determinar su mecanismo molecular de acción, muchas de ellas no compatibles unas con otras. Lo que sí parece claro es que el dominio *zinc finger* es indispensable para su función. En determinados casos, podría actuar interfiriendo en el reclutamiento de TRADD y RIP al complejo del receptor TNFR1 (He KL y Ting AT, 2002). Se ha demostrado también su capacidad de proteger a neuronas hipocampales *in vitro* de la muerte inducida por $\text{TNF}\alpha$ y en la zona de penumbra tras la muerte inducida por isquemia focal *in vivo* (Miao HS, *et al.*, 2005, Yu L, *et al.*, 2006).

Bifunctional Apoptosis Regulator (BAR)

La proteína BAR es de los pocos casos en que una proteína de unos 450 kDa, localizada en su mayor parte en el retículo endoplasmático de neuronas (Roth W, *et al.*, 2003), es capaz de antagonizar estímulos apoptóticos provenientes tanto de la vía extrínseca como de la vía intrínseca. La proteína BAR fue identificada en un ensayo de doble híbrido en levadura, buscando antagonistas de la muerte inducida por Bax. En la parte media de su estructura (ver figura 21), se halla un dominio SAM (*sterile alpha motif*), que le permite interactuar con miembros antiapoptóticos de la familia de Bcl-2 como el propio Bcl-2 y Bcl_{xL}, pero no con Bax o Bak (Zhang H, *et al.*, 2000).

Además del dominio SAM, BAR contiene un dominio con alta similitud a los DED, por el cual se puede unir a caspasa-8 e inhibir la vía extrínseca. Se ha propuesto un mecanismo por el cual BAR podría secuestrar fragmentos procesados de caspasa-8 en membranas intracelulares, neutralizando su efecto e impidiendo el procesamiento de sus substratos (Stegh AH, *et al.*, 2002).

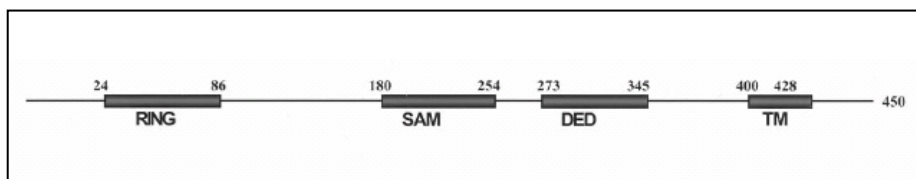


Figura 21. Dominios de la proteína BAR humana. Desde el extremo N-terminal al C-terminal encontramos un dominio de unión a zinc RING entre los residuos 24 a 86, dominio SAM (*sterile alpha motif*) entre los residuos 180 a 254, dominio parecido a DED en los residuos 273-345 y un dominio hidrofóbico transmembrana (TM) en los residuos 400-428.

Fas Associated phosphatase-1 (FAP-1)

En un ensayo de doble híbrido buscando proteínas asociadas con CD95 se halló un cDNA que codificaba para una proteína tirosina fosfatasa. La interacción con CD95 es a nivel de los 15 últimos

aminoácidos del extremo C-terminal de CD95 y a través del dominio PDZ3 de FAP-1. Su sobreexpresión reduce la muerte inducida por CD95L en linfocitos T (Sato T, *et al.*, 1995) y otras líneas tumorales humanas. Uno de los mecanismos que se había propuesto para su función estaba basado en su capacidad para defosforilar residuos de tirosina, que podrían ser importantes para el reclutamiento de proteínas adaptadoras como FADD, al dominio de transducción de señal de CD95 (Foehr ED, *et al.*, 2005, Li Y, *et al.*, 2000). Estudios posteriores apuntan a que podría haber un mecanismo de acción alternativo basado en el control que ejerce FAP-1 sobre la expresión en superficie de CD95. La expresión forzada de FAP-1 disminuye la presencia de CD95 en la superficie, mientras que hay un aumento en los reservorios intracelulares. Experimentos con dominantes negativos de FAP-1 o por la reducción de sus niveles por RNA de interferencia hace que haya un mayor transporte de CD95 a la superficie (Ivanov VN, *et al.*, 2003). FAP-1 se ha perfilado como uno de los genes responsables de la resistencia a la muerte por CD95 de ciertos tipos de tumores. Concretamente, en melanomas se ha descrito que una actividad basal elevada del factor NF κ B (lo que ocurre en muchos tumores metastáticos) promueve la síntesis de FAP-1 afectando negativamente a la función de CD95 (Ivanov VN, *et al.*, 2006). Este efecto potencia la supervivencia de las células cancerosas, lo que contribuye a su resistencia a las estrategias terapéuticas y aumenta su agresividad, como por ejemplo en astrocitomas (Foehr ED, *et al.*, 2005) o en carcinomas de colon (Yao H, *et al.*, 2004).

Phosphoprotein Enriched in Astrocytes-1 (PEA-15)

En experimentos encaminados al estudio de las interacciones neurona-glia se descubrió PEA-15, como una proteína pequeña de 15 kDa, con expresión ubicua, aunque enriquecida en astrocitos y que

podía coexistir en distintos grados de fosforilación (Araujo H, *et al.*, 1993). Posteriormente, se vio que en su estructura contenía un DED que le permite unirse a CD95 (Boldin MP, *et al.*, 1995) y también a TNFR1 realizando funciones antagónicas, inhibiendo la muerte por CD95 y potenciando la mediada por TNF α , en un mecanismo dependiente de la interacción con caspasa-8. De los experimentos realizados con mutaciones en los sitios de fosforilación se deduce que pueden regular su función. Una substitución de una alanina por una serina en un lugar consenso para la fosforilación de PEA-15 y CaMKII hacía que PEA-15 perdiera su función como antagonista de CD95 y no afectara a la muerte mediada por TNF α (Estelles A, *et al.*, 1999). Sin embargo, resultados realizados en ratones deficientes en PEA-15 atribuyen un papel antiapoptótico en astrocitos y apunta como una de las proteínas responsables del mantenimiento del estado de resistencia a TNF α de los astrocitos (Kitsberg D, *et al.*, 1999). Recientes evidencias proponen su participación en la regulación del ciclo celular a través de su interacción con la vía de las ERK/MAPK (Krueger J, *et al.*, 2005). La fosforilación en el residuo Ser-104 bloquea la interacción entre PEA-15 y ERK, mientras que la fosforilación en la Ser-116 es necesaria para su interacción con FADD y su capacidad para inhibir apoptosis (Renganathan H, *et al.*, 2005).

Silencer of Death Domains (SODD)

Está demostrado que el aumento de receptores, que contengan DD, en puntos concretos de la membrana plasmática puede provocar su agregación e activación de la cascada de caspasas independientemente de la unión con su ligando. El hecho de que los DRs están comúnmente expresados y presentes en la superficie de la célula preasociados formando oligómeros (Chan FK, *et al.*, 2000), sugiere la existencia de moléculas que los mantengan en su estado inactivo. Así fue como Jiang

y colaboradores buscando proteínas asociadas a DR3 encontraron en un ensayo de doble híbrido un cDNA que codificaba para una proteína de 457 aminoácidos a la que llamaron SODD (del inglés, *Silencer of Death Domains*). Esta proteína era capaz de unirse a DR3, TNFR1 y TNFR2 pero no a CD95, DR4 o DR5 y además era capaz de bloquear la señalización apoptótica, de activación de NF κ B, o de JNK, por TNFR1 (Jiang Y, *et al.*, 1999).

Sin embargo, estudios *in vivo*, en ratones nulos para SODD arrojan resultados contradictorios. Por una parte, SODD no parece indispensable para la vida y correcto desarrollo de los ratones. Sin embargo, la ausencia de SODD disminuye la cantidad de TNF α necesario para inducir respuesta o activación de vías, sobretodo de la vía NF κ B. Su ausencia tampoco implica una completa desregulación de la vía, lo que induce a pensar en la existencia de mecanismos compensatorios que regulen la actividad de TNFR1, como por ejemplo, el aumento de expresión de las proteínas A20 o TRAF2 (Takada H, *et al.*, 2003). Por otra parte, hay resultados que evidencian que SODD no juega un papel determinante en la señalización por TNFR1 o DR3, puesto que fibroblastos extraídos de ratones nulos para SODD no muestran alteraciones en la señalización por TNFR1 o DR3, en comparación a las cepas salvajes. Una posible explicación sería que la función de SODD fuera funcionalmente redundante, es decir, que pudiera ser llevada a cabo por otras proteínas con dominios funcionales similares. Tales conjeturas están fundadas en la presencia de un dominio BAG (del inglés, *Bcl-2-associated athanogene*) en la estructura de SODD. Este dominio permite la unión con Bcl-2. Otros miembros de la familia de proteínas con dominios BAG también tienen actividades antiapoptóticas, como es el caso de BAG-1 o BAG-3, y por tanto podrían

suplantar la función antiapoptótica de SODD en células donde no esté presente (Endres R, *et al.*, 2003).

Small ubiquitin-related modifier 1 (SUMO-1)

SUMO1 fue otra de las moléculas halladas al buscar proteínas que interaccionaran con el dominio intracelular de CD95 por la técnica del doble híbrido. En este caso, el cDNA hallado codificaba para una proteína de 101 aminoácidos con alta homología a la ubiquitina (Okura T, *et al.*, 1996). Su sobreexpresión es capaz de proteger ante la muerte mediada por CD95 o TNFR1 aunque no se conoce exactamente su mecanismo. SUMO1 es capaz de inducir modificaciones postraduccionales que afecten a la estabilidad o la localización celular de una gran variedad de proteínas, entre ellas las que participan en las vías apoptóticas como puedan ser las caspasa-2, caspasa-7 (Hayashi N, *et al.*, 2006), caspasa-8 (Besnault-Mascard L, *et al.*, 2005), la proteína ASK-1 (Lee YS, *et al.*, 2005) y el complejo NEMO/IKK γ que afecta a la actividad del factor NF κ B (Huang TT, *et al.*, 2003), entre otras.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Los descubrimientos relacionados con la muerte celular apoptótica en los últimos años y, concretamente, con la desencadenada por los receptores de muerte han dejado patente su relevancia funcional durante el desarrollo embrionario y en determinadas patologías. Si bien hay numerosos estudios encaminados al bloqueo de su función como terapia ante determinadas enfermedades, es preciso conocer de antemano y de la forma más precisa posible su funcionamiento y mecanismos moleculares de regulación. Esta información será clave para saber qué señales son determinantes para la decisión de vivir o morir en las neuronas. Este conocimiento contribuirá a un mejor diseño de terapias farmacológicas y/o moleculares con los mínimos efectos secundarios no deseados.

Entre todos los antagonistas de la función de los receptores de muerte descritos a finales de la década de los 90, nos llamaron en especial la atención dos de ellos, FAIM y *Lifeguard*. La ausencia de información sobre los mismos, y el hecho de que se expresen únicamente en el sistema nervioso, fueron circunstancias determinantes de la elección del tema de estudio y, en consecuencia, de los objetivos siguientes:

- 1.- Clonar y caracterizar el ortólogo de ratón del antagonista del receptor de muerte Fas/CD95, *Lifeguard*.
- 2.- Conocer la función de *Lifeguard* en el Sistema Nervioso y establecer los mecanismos moleculares implicados en su función.
- 3.- Caracterizar la expresión y funcionalidad de FAIM_L, isoforma larga del antagonista de Fas/CD95, FAIM.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 ANTICUERPOS Y REACTIVOS

Los anticuerpos utilizados para este estudio se detallan en la Tabla 3. Todos los reactivos, excepto si se indica lo contrario, fueron comprados a SIGMA (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).

<i>Anticuerpo</i>	<i>Tipo</i>	<i>Origen</i>	<i>Dilución</i>	<i>Proveedor</i>
AIF	policlonal	conejo	1:40000	SIGMA
Bcl-X _L	policlonal	conejo	1:2000	BD Transduction Laboratories
Caspasa 8	monoclonal	ratón	1:500	Calbiochem
Caveolina	policlonal	conejo	1:1000	BD Transduction Laboratories
c-FLIP	monoclonal	rata	1:1000	Alexis
FAIM _L	policlonal	conejo	1:500	SCiA
Fas (C-20)	policlonal	conejo	1:500	Santa Cruz
Fas/CD95	monoclonal	ratón	1:500	BD Transduction Laboratories
Flag-M2	monoclonal	ratón	1:5000	SIGMA
Fosfo-ERK 1/2	policlonal	conejo	1:5000	Cell Signaling
Pan ERK	monoclonal	ratón	1:5000	BD Transduction Laboratories
Histone H1	monoclonal	ratón	1:1000	Stressgen
Lifeguard	policlonal	conejo	1:1000	SCiA
Receptor Transferrina	monoclonal	ratón	1:500	Zymed labs
α-Tubulina	monoclonal	ratón	1:40000	SIGMA
Ig Conejo	policlonal	cabra	1:10000	SIGMA
IgG Ratón	policlonal	cabra	1:10000	SIGMA
Ig Rata	policlonal	conejo	1:10000	SIGMA
Ig-Ratón-FITC	policlonal	conejo	1:500	Molecular Probes

Tabla 3. Anticuerpos utilizados

3.1.1 Generación de anticuerpos policlonales

Al ser las proteínas FAIM_L y LFG poco conocidas y sin caracterizar, no hay disponibilidad comercial de anticuerpos que nos permitan su detección por técnicas bioquímicas. Fue preciso por tanto desarrollar en nuestro laboratorio sueros policlonales de conejo, que nos

han permitido un mejor abordaje técnico para la caracterización de estas proteínas.

3.1.1.1 Diseño y síntesis de péptidos

La proteína LFG es una proteína de 7 pasos transmembrana que contiene una región N-terminal de aproximadamente 100 aminoácidos con una conformación laxa y que no forma ningún dominio conocido. Dos razones prácticas determinaron que se decidiese utilizar como región antigénica el extremo N-terminal de la proteína. La primera es que para la detección posterior de la proteína, al menos en condiciones no desnaturalizantes, sería mucho más eficaz la reacción antígeno-anticuerpo en una zona expuesta de la proteína, y no en regiones insertas en la membrana. La segunda es que, al tener que inmunizar con proteína de fusión a GST, y por tanto tener que producirla en bacterias, las proteínas que requieren síntesis complejas y modificaciones postraduccionales suelen presentar mayores complicaciones. De hecho, al intentar producir la proteína de fusión completa GST-LFG *full length* no fue posible obtener un rendimiento de producción adecuado para la posterior inmunización. Sin embargo, al utilizar la construcción pGEX-KG mLFG- Δ C, que abarcaba los primeros 188 aminoácidos con estructura lineal, para producir la proteína GST-LFG Δ C se obtuvo mejor rendimiento y fue posible la inmunización.

En el caso de FAIM se pretendía obtener un suero inmune que fuera específico de la isoforma larga y por tanto, el péptido inmune debería estar en la región diferencial de ambas isoformas. Esta región diferencial está comprendida por 22 aminoácidos, de los cuales 16 forman el péptido sintetizado químicamente por la Unidad de síntesis de péptidos de los Servicios Científicotécnicos de la Universidad de Barcelona. La secuencia peptídica concreta es: H-SGDDSPIFEDDESPLC-NH₂ con la composición aminoacídica siguiente:

1 Cisteína, 4 Aspárticos, 2 Glutámicos, 1 Fenilalanina, 1 Glicina, 1 Isoleucina, 1 Leucina, 2 Prolinas y 3 Serinas.

3.1.1.2 Inmunización

Para la producción del suero inmune anti LFG fue preciso la producción de la proteína de fusión GST-LFG Δ C. Se inoculó un cultivo bacteriano de *Escherichia coli* (*E.coli*) que contenía el plásmido pGEX-KG mLFG-L Δ C y se dejó en crecimiento en condiciones anaerobias a 37 °C y en agitación durante toda la noche. Posteriormente se diluyó diez veces en medio de cultivo nuevo y se indujo la expresión de la proteína añadiendo IPTG a una concentración final de 1mM durante toda la noche a temperatura ambiente y en agitación. Finalmente, se precipitaron las bacterias, resuspendieron en PBS, se cargó un gel de Poliacrilamida y se tiñó con el colorante Azul de *Comassie* para comprobar la expresión de la proteína (ver figura 22A).

Una vez establecidas las condiciones adecuadas para la expresión, se repitió el proceso a mayor escala para obtener la máxima cantidad de proteína posible. Una vez se tienen resuspendidas las bacterias en PBS se lavan en tampón STE (40 mM Tris pH 8, 25 mM EDTA, 150mM NaCl) y se le añade un suplemento con inhibidores de proteasas junto con Lisozima. Tras 20 min en hielo, se suplementa el tampón STE con 1mM DTT y 10% Sarcosil y se sonica durante 3 ciclos de 10 seg. Finalmente se añade el detergente Tritón X-100 al 1% y se deja actuar durante 30 min a temperatura ambiente. Una vez descartados los restos celulares por centrifugación, se incubaba el sobrenadante con bolas de Glutation-Sefarosa (Amersham) previamente equilibradas con tampón STE suplementado con inhibidores de proteasas y 0,1% Tritón, durante un mínimo de 30 min a 4 °C. Por último, se lavan las bolas con tampón STE con 2% Tritón y 1mM DTT, y

se les añade tampón de carga (50 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 5% β -Mercaptoetanol, 0,001% Azul de Bromofenol y 10% glicerol). En la figura 22B se aprecia una cuantificación aproximada para adecuar la cantidad de antígeno a inyectar.

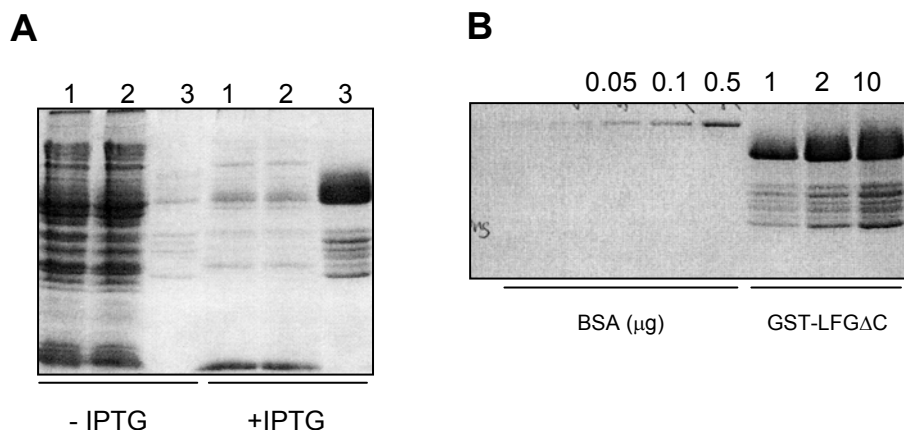


Figura 22. A, Gel de verificación de la inducción de GST-LFG Δ C. 1, Lisado total de las bacterias. 2, Lisado clarificado. 3, Bolas de Glutation-Sefarosa. En la parte izquierda un cultivo sin inducción con IPTG, y en la derecha la inducción con IPTG. **B,** Gel de semi-cuantificación de la inducción de GST-LFG Δ C. Considerando que en el carril de 10 μ l de GST-LFG Δ C hay aproximadamente 20 μ g de proteína, estimamos una concentración de 2 μ g / μ l.

Se inyectaron aproximadamente 500 μ g de proteína de fusión (complejo bolas- GST-LFG Δ C) con Adyuvante de Freund completo (AFC) al 50% y se realizaron punciones seriadas intradérmicas en el dorsal de los conejos albinos New Zealand (Charles River Laboratories International, Wilmington, MA, USA) con referencia asignada 150620 y 150400. Un mes después se llevó a cabo la inmunización secundaria con 250 μ g de proteína de fusión con Adyuvante de Freund incompleto (AFI). A las 6 semanas se repitió el proceso y a las 9 semanas se hizo una extracción sanguínea de aproximadamente 50 ml de sangre. Seis semanas más tarde se inyectó una dosis de recuerdo y se obtuvieron 50 ml más de sangre y sacrificio final de los animales.

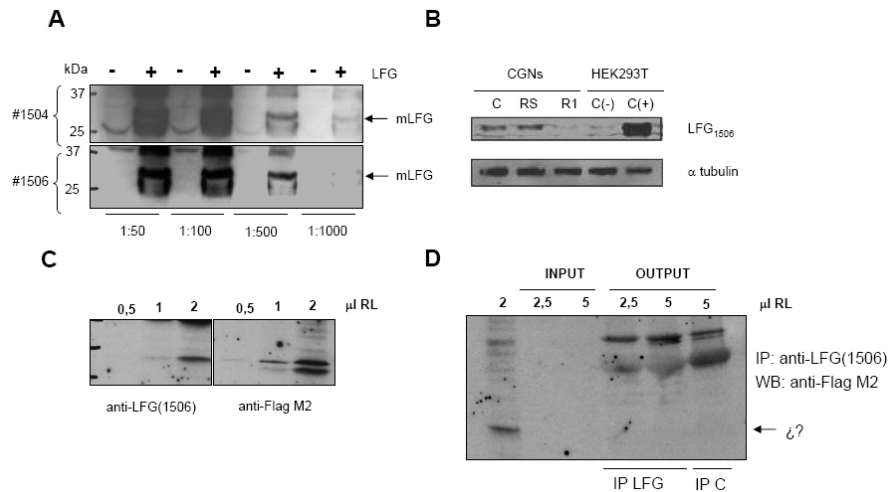


Figura 22bis. El suero policlonal anti-LFG detecta la expresión forzada de LFG pero no la proteína endógena. **A**, Inmunoblot en el que se prueban diferentes diluciones de los sueros procedentes de los conejos #1504 y #1506 en células HEK293T sobreexpresoras de LFG. **B**, Análisis de expresión de LFG en células granulares de cerebelo, (CGNs),. Células sobreexpresoras de LFG fueron usadas como control positivo (C+). **C**, Síntesis *in vitro* de Flag-LFG y análisis por Western Blot con diferentes cantidades de lisado de reticulocitos (RL), comparando la detección con el suero anti-LFG junto con anti-Flag. **D**, test de inmunoprecipitación.

Para verificar la detección de los sueros policlonales se realizó un ensayo *Western Blot* con muestras obtenidas a partir de células HEK293T sobreexpresoras de LFG. En la figura 22bis A se puede observar como ambos antisueros (#1504 y #1506) detectan una banda prominente del tamaño esperado, aproximadamente 35 kDa. En la figura 22bis B, observamos la aparición de una banda abundante con un peso molecular esperado en neuronas granulares de cerebelo y que desaparece al tratar el cultivo con RNA de interferencia específico de LFG. Para acabar de demostrar que la banda detectada corresponde a LFG se sintetizó *in vitro* la proteína LFG con la etiqueta Flag en su extremo 3' y se pudo comprobar que tanto el suero anti-LFG como el anticuerpo anti-Flag detectan la misma banda del tamaño molecular

esperado. Por contra, los ensayos de síntesis *in vitro* también nos permiten afirmar que el suero anti-LFG no es capaz de reconocer la forma nativa de la proteína, puesto que no es capaz de inmunoprecipitarla (Figura 22bis D). Teniendo en cuenta estos resultados concluimos que los sueros anti-LFG son específicos para LFG.

Para la producción del suero inmune anti FAIM_L, se conjugó el péptido con KLH consiguiendo un grado de conjugación del 73.6%. Se realizó una inmunización primaria en 2 Conejos Albinos New Zealand con referencia 337704 y 337686, por inyección subcutánea de 400 µg de péptido en un volumen final de 1 ml con 50% con AFC en punciones seriadas. Tres semanas después se procedió a la inmunización secundaria con 200 µg de péptido con Adyuvante de Freund incompleto (AFI) al 50% inyectada tal y como se ha descrito anteriormente. Se repitió el proceso a las 6 y a las 9 semanas. Entre la 7^a y 8^a semana, se extrajo una pequeña cantidad de suero para evaluar el evolución del proceso. A las 11 semanas de haber iniciado la inmunización se llevó a cabo la exanguinación y sacrificio de los conejos, recogándose un volumen final de aproximadamente 100 ml de sangre total. Se procedió a lavados sucesivos con centrifugaciones suaves (3500 rpm 15 min) para clarificar el suero. Finalmente, añadimos azida sódica al 0.02% final para su posterior conservación a -20 °C. La caracterización de este anticuerpo se detalla con más precisión en el apartado 4.2.1

3.2 CONSTRUCCIONES PLASMÍDICAS

3.2.1 Construcciones en vector de expresión para células de mamífero

La proteína Bcl-X_L (Yuste VJ, *et al.*, 2001) y la proteína de ratón LFG fueron expresadas bajo el control del promotor de Citomegalovirus (CMV) en el vector pcDNA3 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA; USA). EL cDNA para la isoforma corta de LFG fue obtenido a partir de los fragmentos genéticos contenidos en EST n° 603357509F1 que figura en la base de datos GenBank con número de acceso BI735418 (para el extremo 5' del gen) y a partir de la EST número 603281732F1 con acceso número BI654708 de la base GenBank (para el extremo 3'). La secuencia para la isoforma larga de LFG se obtuvo de la EST número 603360147F1 con número de acceso GenBank BI736499 (extremo 5') y de la EST 603281732F1 con acceso GenBank BI654708 (extremo 3'). Las secuencias codificantes de las dos isoformas de LFG fueron amplificadas por PCR con los *primers* (*Forward* 5'-GGGGTACCATGACCCAGGGAAAGCTCTC-3' y *Reverse* 5'-GGAATTCTCATCAGGATCCCTTGTCATCGTCGTCCTTGTAGTCTCCG GATCCTTCCCGGTTGGTGCCAAAAAGC que incluyen secuencia codificante para la "etiqueta" Flag.

La generación de las construcciones de expresión codificantes para FAIM_S I FAIM_L fueron descritas en (Sole C, *et al.*, 2004).

Para los experimentos de RNA de interferencia (RNAi), Secuencias oligonucleotídicas específicas (indicadas en mayúsculas) para LFG i FAIM_L se introdujeron primero en el vector pSUPER.retro.puro (OligoENGINE, Seattle, WA;USA) siguiendo el protocolo de ligación y transformación recomendado por el fabricante. Las secuencias para cada gen se detallan a continuación:

Gen	Secuencia
LFG R1	<i>Fw</i> gatccccGGAGAGAAGGATGCTCttcaagagaGAGCATCCTTCTTCTCTCCtttt <i>Rv</i> agctaaaaaGGAGAGAAGAAGGATGCTctcttgaaGAGCATCCTTCTTCTCTCCggg
LFG R2	<i>Fw</i> gatccccGAAAGTTCGTGGCTTCTTcaagagaGAAGAGCCGACGAACTTTCtttt <i>Rv</i> agctaaaaaGAAAGTTCGTGGCTTctcttgaaGAAGAGCCGACGAACTTTCggg
LFG RS	<i>Fw</i> gatccccGAGCTAGAGAGAGAAGGTCttcaagagagaCCTTCTTCTCTAGCTCtttt <i>Rv</i> agctaaaaaGAGCTAGAGAGAGAAGGtctcttgaaGACCTTCTTCTCTAGCTCggg
FAIM _L R1	<i>Fw</i> gatccccGGAGATGACAGTCCTATCTTcaagagaagaTAGGACTGTCATCTCCtttt <i>Rv</i> agctaaaaaGGAGATGACAGTCCTATCTtctctgaaaGATAGGACTGTCATCTCCggg
FAIM _L R2	<i>Fw</i> gatccccGGGACGTAGCATTAAAGTAttcaagagaTCACTTAATGCTACGTCCCtttt <i>Rv</i> agctaaaaaGGGACGTAGCATTAAAGTAtctcttgaaTCACTTAATGCTACGTCCCggg
FAIM _L RS	<i>Fw</i> gatccccGAAACTGGGGCTTGGTACCTcaagagagaGGTACCAAGCCCCAGTTTCtttt <i>Rv</i> agctaaaaaGAAACTGGGGCTTGGTACCTctcttgaaGGTACCAAGCCCCAGTTTCggg

Tabla 4. Secuencias de los RNA de interferencia.

3.2.2 Construcciones Lentivirales

Los vectores pWPI, pLVTHM, pSPAX2 y pM2G fueron generosamente donados por D. Trono del *Laboratory of Virology and Genetics* en la *School of Life Sciences* del *Swiss Institute of Technology Lausanne* en *Lausanne* (Suiza).

Para poder infectar las proteínas FAIM_L y LFG_L se subclonaron del vector en pcDNA3 al vector pWPI dando lugar a las construcciones pWPI-mLFG_L y pWPI-FAIM_L. En el caso de los vectores con RNAi de interferencia fue posible la subclonación directa de todo el promotor H1, flanqueado por las dianas de restricción *EcoRI* y *ClaI*, del vector pSUPER al vector pLVTHM.

3.2.3 Construcciones para el ensayo luciferasa

El vector base para los ensayos luciferasa es el pGL3-basic (Promega). Este vector proporciona una base para el análisis cuantitativo de factores que potencialmente afectan a la expresión génica. El vector contiene en su esqueleto una región modificada de la

proteína luciferasa de la luciérnaga, optimizado para monitorizar la actividad transcripcional en células eucariotas transfectadas. En este trabajo, el ensayo luciferasa ha sido utilizado para el estudio de la actividad del promotor de FAIM en respuesta al factor neurotrófico NGF. Se amplificaron dos regiones del promotor de FAIM por PCR a partir de DNA genómico de células PC12 para dar lugar a las construcciones pGL3-2200bp y pGL3-1500bp. La primera construcción corresponde a prácticamente todo el promotor de FAIM mientras que la segunda comprende una región menor más proxima al inicio de transcripción. La secuencia del *primer* utilizados para generar el vector con el promotor completo es: *Forward* 5'-AACCAACTCTGCCAACACCCTGATTTG-3' y *Reverse* 5'-GGAAGGCAGTAGGAGGCTGGGCGCCT-3'. En el caso del vector con el promotor incompleto se utilizó el mismo primer *Reverse* pero con el primer *Forward* : 5'-GTATTTGTGCATAGCGATTCTTCGA-3'.

3.2.4 Construcciones para el sistema de doble híbrido

Los vectores pGBKT7 DNA-BD y pGADT7 AD utilizados en el sistema del doble híbrido para la detección de interacciones directas entre proteínas fueron los provistos en el producto *BD Matchmaker Two-Hybrid System 3* (BD Biosciences, San José, CA; USA). El extremo amino terminal de LFG fue amplificado por PCR utilizando los *primers* Fw 5'-CGGGAATTCACCCAGGGAAAGCTCTCTG-3' y Rv 5'-CCGGATCCTCAGATGAAGAGCCGACGAAC-3' dando lugar a la construcción pGBKT7-mLFG Δ C DNA-BD que será el que actuará como *bait* (del inglés, anzuelo) para la detección de interacciones directas con otras proteínas. La librería que se utilizó para el análisis de interacciones estaba en el vector pACT2 (BD Biosciences).

3.3 CULTIVOS CELULARES

3.3.1 Cultivo de líneas celulares

La línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y y la línea de feocromocitoma de rata PC12 fueron obtenidas de la *American Tissue Culture Collection*. Las células SH-SY5Y se cultivaron en medio *Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)* (Gibco Invitrogen Corp., Paisley, UK), suplementado con 2 mM de L-glutamina, penicilina (20 unidades/ml), estreptomina (15 µg/ml) y 10% de suero bovino fetal (Fetal Bovine Serum, FBS). La línea de feocromocitoma de rata PC12 fue mantenida con medio DMEM suplementado con 6% FBS, 6% de suero de caballo (Horse Serum, HS), 10 mM HEPES, penicilina y 15 µg/ml de estreptomina. La línea celular HEK293T (*Human embryonic kidney*) fue generosamente donada por el grupo de Neurobiología del desarrollo y regeneración neuronal dirigido por el Dr. Eduardo Soriano. Se cultivaron en medio DMEM con 10% HS, 10% de aminoácidos no esenciales y 2 mM de L-glutamina. Todas las líneas celulares fueron mantenidas a 37 °C y con un 5% CO₂.

3.3.2 Cultivo primario de neuronas

En este trabajo de tesis doctoral se han realizado principalmente dos tipos de cultivos primarios neuronales. Uno es el aislamiento de neuronas corticales embrionales de ratón y el otro es el de neuronas granulares postnatales de cerebelo de ratón. Para las neuronas corticales, hembras de ratón ICR CD-1 (Harlan Interfauna Iberica S.A., Barcelona, España), de entre 14 y 16 días de gestación, fueron sacrificadas por dislocación cervical. Se extrajeron los embriones y se procedió a la disección de la corteza cerebral. Las cortezas fueron primero digeridas enzimáticamente con Tripsina (Gibco) al 0.05% durante 15 min a 37 °C y posteriormente disociadas físicamente con la

ayuda de pipetas Pasteur pulidas a la llama. Las células fueron cultivadas inicialmente con *Minimum Essential Medium* (MEM) (Gibco) suplementado con 10%HS y al cabo de 4 horas transferidas a medio MEM suplementado con N2 y B27 (Gibco). Todos los experimentos, a excepción de aquellos en los que se estudiaba la maduración *in vitro*, fueron llevados a cabo después de 7 días en cultivo.

En el caso de las neuronas granulares de cerebelo, crías de ratón ICR CD-1 (Harlan) a día postnatal 7 fueron decapitadas y sus cerebelos extraídos y disociados tal y como se explica para el cultivo de neuronas corticales. En este caso el medio de cultivo consta de medio BME suplementado con 10% FBS, 2 mM L-glutamina, Gentamicina y 30 mM de KCl.

3.4 MÉTODOS DE TRANSFECCIÓN

A continuación se detallan los métodos de transfección que se han utilizado en este estudio dependiendo en cada caso de la posible aplicación.

3.4.1 Fosfato cálcico

Este método es quizás de los más económicos y a la vez más efectivos para ciertos tipos celulares. Se basa en la formación de precipitados insolubles que atrapan el DNA en su interior y/o superficie y al precipitarse sobre las células en monocapa consiguen la introducción del material genético. Su toxicidad hace que no sea posible su aplicación en cultivos primarios, pero es de los que muestra unos porcentajes más elevados de transfección en líneas celulares resistentes como las células HEK293T. Este sencillo método consta de 4 reactivos principales: El tampón HBS2X (280 mM NaCl, 50 mM HEPES y Na_2HPO_4), 250 mM CaCl_2 , agua destilada y el DNA a transfectar, que se mezclarán de la forma siguiente:

Solución 1:

- 250 mM CaCl₂
- H₂O
- DNA

Solución 2:

- HBS2x

El proceso de formación de los precipitados se consigue vertiendo gota a gota la solución 1 sobre la solución 2 en constante agitación (vortex).

Uno de los puntos más delicados es el ajuste del pH del tampón HBS2X. Debe ajustarse en un rango de pH de entre 6,95 y 7,05. Por debajo de 6,95 apenas hay formación de precipitados, mientras que, por encima de 7,05, éstos pueden ser demasiado grandes y por tanto más tóxicos. El ajuste exacto del pH se determinará empíricamente observando el tamaño del precipitado en cada caso y su eficiencia de transfección.

El punto débil de este sistema es su reproducibilidad, ya que la eficiencia de transfección dependerá en gran medida de la formación de los precipitados y eso es precisamente lo que aumenta la variabilidad ya que depende de el pH de las soluciones, concentración de DNA usados, etc. Podemos ayudar a reducir la variabilidad ajustando también el pH del agua destilada que utilizamos para la mezcla del DNA y el CaCl₂, añadiendo 2.5 mM HEPES a pH 7,3. Otro punto a tener en cuenta es la calidad y concentración del DNA que usaremos en la transfección. Es conveniente que sea de alta pureza, obtenido a partir de *kits* de extracción de DNA y con una concentración mínima recomendada de 1µg/µl.

3.4.2 Agentes liposolubles catiónicos

Uno de los reactivos más usados extensivamente para la transfección celular es la *LipofectamineTM 2000* (Invitrogen/GibcoBRL). Esta técnica está basada en la formación de liposomas catiónicos que

atrapan el DNA y pueden introducirlo en la célula diana. La Lipofectamina puede transfectar gran variedad de líneas celulares e incluso cultivos primarios de neuronas, si bien la diferencia en la eficiencia de transfección varía mucho de un tipo celular a otro. Así pues, podemos conseguir eficiencias cercanas al 80% en una línea celular como la HEK293T y de menores al 1% en cultivos primarios de neuronas. En general, para las transfecciones de este estudio no fue preciso alterar significativamente las recomendaciones del fabricante, utilizando normalmente una relación de DNA respecto a *Lipofectamine 2000* 1µg:1µl. Su elevado coste hace que se aplique en condiciones experimentales de pequeña escala. Las mayores eficiencias de transfección se obtienen en cultivos de alta confluencia.

El PEI (polyethylenimine), desconocido hasta hace relativamente poco, ha surgido como un gran competidor a la *Lipofectamine 2000*. Presenta una simplicidad de protocolo equiparable a los métodos de formación de liposomas, así como también la pleiotropía de variedad de células a transfectar, sin mencionar un coste de unas 5 veces inferior. El PEI es un polímero capaz de condensar DNA y protegerlo de la degradación por DNAsas, así como liberarlo *in vitro* e *in vivo*. Este polímero forma complejos poliiónicos con el DNA al establecer interacciones electrostáticas cooperativas entre sus grupos amonio con los grupos fosfato del DNA. No requiere de alta confluencia del cultivo y al ser más económico puede utilizarse en experimentos a mayor escala. El principio básico puede obtenerse en SIGMA, si bien cabe mencionar que requiere un protocolo de disolución un tanto tedioso. Hoy día existen numerosas compañías que comercializan agentes de transfección basados en el PEI.

Estos agentes descritos son compatibles con la presencia de suero en el medio de cultivo, aunque hay que admitir que puede causar una leve toxicidad. Además, la eficiencia de transfección no aumenta pasadas las 6 horas de incubación, tiempo compatible con la ausencia de suero. Así que siempre que fue posible se transfectó en ausencia de suero y antibiótico en el medio.

3.4.3 Producción de Lentivirus

La introducción de material genético en una célula huésped tanto *in vivo* como *in vitro* ha sido materia de estudio desde hace muchos años. Los virólogos se dieron cuenta ya hace mucho tiempo que con los retrovirus poseían una gran estrategia para la transferencia de material genético. En primer lugar, los vectores retrovirales derivados del virus de la Leucemia murina de Moloney tienen una gran capacidad de clonaje, cerca de 10 Kb. En segundo lugar, pueden integrar su carga genética en los cromosomas de las células diana, consiguiendo así expresión a largo plazo. Por último, no se transfieren a la célula diana secuencias codificantes derivadas del virus, evitando así el reconocimiento y la destrucción por el sistema inmune. El único y gran obstáculo insalvable es que no pueden transferir genes en células que no se vayan a dividir en pocas horas próximas a la infección (Trono D, 2000). Los vectores lentivirales basados en el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) representan una forma más compleja de retrovirus que pueden infectar células que se están dividiendo activamente así como también las terminalmente diferenciadas (Naldini L, *et al.*, 1996, Naldini L, *et al.*, 1996). El Dr. Trono y colaboradores han desarrollado 3 generaciones de vectores para la formación de Lentivirus. En cada generación se ha mejorado la bioseguridad, dividiendo los elementos necesarios para la formación del virus en más plásmidos. En este estudio se ha trabajado

con los vectores lentivirales de segunda generación, con un nivel de bioseguridad suficiente para la transferencia genética *in vitro*.

El protocolo de producción de Lentivirus ha sido adaptado del descrito por Naldini y colaboradores en 1996 (Naldini L, *et al.*, 1996). Los plásmidos para la producción de Lentivirus de 2ª generación son los siguientes:

- pEWGI / pLVTHM: Dependiendo de si se trata de sobreexpresar o inhibir la expresión de un gen. Este vector contiene tan solo el material genético que va a ser transferido a la célula diana. El “cassette” del transgen está flanqueado por elementos en Cis necesarios para la encapsidación. Como en otros vectores retrovirales, se aprovecha la particularidad de la transcripción reversa para conseguir vectores autoinactivantes derivados del HIV-1, los cuales pierden la capacidad transcripcional de las secuencias LTR (long terminal repeat) una vez que se ha transferido a las células. Esta particularidad minimiza el riesgo de la aparición de nuevas partículas recombinantes competentes y de interferencias entre promotores.

- psPAX2: Es el vector que contiene todas las proteínas necesarias para el empaquetamiento del virus. Tiene un promotor (CAG) muy potente que dará lugar a una alta transcripción de los genes de empaquetamiento, entre las que destacan la proteína TAT, una DNA polimerasa y la Transcriptasa Reversa.

- pM2G: Es el vector que codifica para la cápside del virus. La proteína vírica es del virus estomatitis vesicular (VSV), permitiendo la infección de una amplia variedad de tejidos y líneas celulares.

El protocolo de generación de lentivirus se describe a continuación:

El primer día se plaquea $2,5 \cdot 10^6$ células HEK293T por placa de 10 cm de diámetro. Al día siguiente se procede a la transfección con las siguientes proporciones:

Vector pWPI/pLVTHM	20 μ g
psPAX2	13 μ g
pM2G	7 μ g

Los 40 μ g totales se diluirán en la mezcla de agua y CaCl_2 descrita para la transfección con fosfato cálcico. Una vez formados los precipitados, se vierten a la placa de cultivo y permanecerán hasta el día siguiente (entre 8 y 12h), cuando se realiza un cambio de medio. Es recomendable dejar a las células producir los Lentivirus entre 2 y 3 días. Finalmente, el medio se recoge y es centrifugado a 2500 rpm durante 5 min con el fin de eliminar células o fragmentos que pueda haber en el sobrenadante. Seguidamente pasamos el sobrenadante por un filtro de 0,45 μ m. En la mayoría de los casos es útil concentrar los virus, sobretodo si los componentes del medio pueden afectar a futuros experimentos. Para ello se ultracentrifugan a 50.000 G durante 1,5 h. Para obtener un buen rendimiento de infección se recomienda concentrar 500 veces, así que dependiendo del volumen inicial de partida calcularemos el volumen de resuspensión. Conviene resuspender los virus en una solución que contenga una proteína “carrier” que asegure la preservación del virus. En este caso se ha utilizado una solución de PBS con BSA al 2%, que permite su preservación a -80 °C sin aparente pérdida de infectividad.

Finalmente podemos calcular aproximadamente el título de virus que hemos producido realizando infecciones a diferentes diluciones del virus en células HEK293T y calcular al cabo de 1-2 días el porcentaje de infección.

3.5 RT-PCR

El análisis de la expresión de las dos isoformas de LFG y de FAIM se determinó por Retrotranscripción-PCR (RT-PCR). El cDNA fue retrotranscrito a partir de RNA extraído de los múltiples tejidos, células SH-SY5Y y PC12, neuronas granulares y corticales. Se realizó una reacción de PCR con amplificación múltiple, amplificándose a la vez los genes LFG o FAIM junto con el gen ribosomal L27 como control.

Los *primers* utilizados en el caso de LFG amplifican fragmentos específicos de 261 pb y 300 pb correspondientes a LFG_S y LFG_L respectivamente y cuya secuencia es 5'-AGAAGACATCATGACCCAGGG-3' (*Forward*) y 5'-CTTTCTGGTCATCCCAGCTG-3' (*Reverse*). En el caso de FAIM, los primers amplifican fragmentos específicos de 189 y 246 pb para FAIM_S y FAIM_L respectivamente. La secuencias son 5'-GACAGCTGCTGACTACGTCG-3' (*Forward*) y 5'-TCCTTCCCATCCACGTACAC -3' (*Reverse*). La secuencia para el gen ribosomal L27 es la siguiente: 5'- AGCTGTCATCGTGAAGAA-3' (*Forward*) y 5'- CTTGGCGATCTTCTTCTTGCC-3' (*Reverse*).

3.6 VALORACIÓN DE LA MUERTE CELULAR

El estudio de la muerte celular no puede ser abordado por una técnica en concreto, puesto que a día de hoy no hay ninguna que satisfaga y de respuestas a todos los requerimientos del investigador. Así pues, se describen a continuación las técnicas que se han utilizado en este estudio y se explicará el uso de ellas para cada condición experimental particular.

3.6.1 Tinción con bis-benzimida de Hoechst 33258

Enmarcada como técnicas de microscopía óptica para el estudio de la apoptosis, este agente nos permite valorar el estado de la célula dependiendo de la condensación y fragmentación de la cromatina. Utilizamos Hoechst 33258 (SIGMA) como método para la cuantificación de apoptosis en los modelos de inducción de muerte por los ligandos TNF α y FasL soluble (Alexis Biochemicals/AXXORA, San Diego, CA;USA).

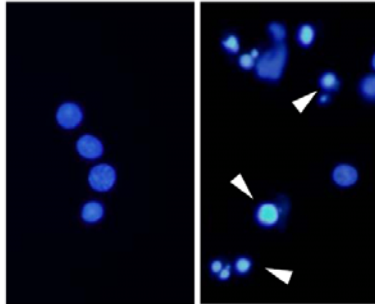


Figura 23. En el panel de la izquierda se aprecian núcleos de células Jurkat con la cromatina uniformemente teñida. En el de la derecha, células Jurkat tratadas con FasL, dónde se observan (flechas blancas) núcleos con la cromatina condensada o fragmentada.

La membrana celular es permeable a este compuesto, que presenta fluorescencia en el espectro del azul al unirse al surco pequeño del DNA tras excitarse con luz ultravioleta (UV). Generalmente se añade al medio de cultivo a una concentración de 2 μ g/ml, bien a las células vivas o previamente fijadas con Paraformaldehído (PFA) al 4%. El porcentaje de células viables se calcula a partir del recuento de las células con la cromatina condensada respecto aquellas que presentan la cromatina homogéneamente teñida.

3.6.2 Reducción del MTT

Uno de los métodos más comúnmente usados para valorar la viabilidad celular es el basado en la reducción del bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT). El ensayo de reducción de MTT es un método colorimétrico cuantitativo que se basa en la apertura del anillo de la sal de tetrazolio, MTT, en el interior de las mitocondrias de las células vivas. El formazán es el producto resultante y es insoluble en medio acuoso, formando cristales de azul oscuro que son disueltos mediante el uso de disolventes orgánicos como el dimetil-sulfóxido (DMSO).

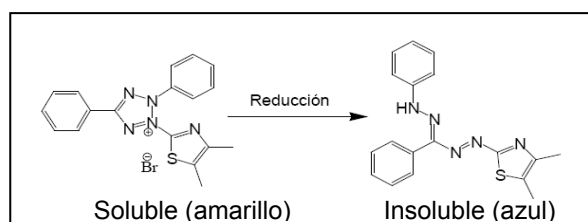


Figura 24. Esquema de la reacción de reducción del MTT

El MTT es entonces capaz de detectar una disminución de la actividad mitocondrial, que en buena parte de los casos irá acompañada de la muerte celular. Sin embargo, deben establecerse con sumo cuidado las condiciones experimentales para realizar el estudio en una fase lineal de reducción del MTT. Al ser la apoptosis una muerte asincrónica, puede darse el caso de enmascaramiento de la realidad por excesiva reducción del MTT por parte de las células que quedan vivas y por tanto no apreciarse diferencias entre tratamientos.

Para los estudios de viabilidad celular en la línea PC12 tras los estímulos de retirada de factores tróficos así como también de la Estaurosporina, se plaquearon 25.000 células por pocillo de placa de 96. Al día siguiente se efectuaron los tratamientos y a los tiempos indicados

se realizó el ensayo. Se añadió MTT a una concentración final de 0,5 mg/ml y se incubó durante 30 min. Posteriormente se aspiró el medio y se disolvieron los cristales con DMSO. La lectura colorimétrica fue tomada en un espectrofotómetro *Anthos labtec HT2* a una longitud de onda de 570 nm (con filtro de referencia a 620 nm).

3.6.3 Liberación de lactato deshidrogenasa

La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) se libera al medio de cultivo cuando la membrana celular se encuentra comprometida, cosa que ocurre en fenómenos de muerte celular tanto necróticos como en los estadios más avanzados de la apoptosis. Esta técnica nos ha sido particularmente útil en la detección de la aparición de muerte celular en experimentos realizados en los modelos de neuroblastoma y de cultivos primarios de neuronas, debido a que los porcentajes de muerte eran relativamente bajos y más difíciles de detectar y cuantificar con otras técnicas. Se ha utilizado el *kit* comercial *CytoTox96 Non-Radioactive Cytotoxicity* (Promega, Madison, WI; USA). La base del *kit* consiste en que la LDH liberada en el sobrenadante del medio de cultivo se acopla a una reacción enzimática que resultará en una conversión de la sal de tetrazolio INT en Formazán, de color rojo (ver figura 25).

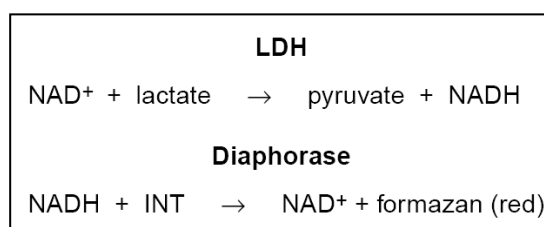


Figura 25. Esquema de las reacciones químicas del ensayo *Citotox 96*. El Lactato es convertido a piruvato + NADH, que en presencia de INT, da lugar a la formación de formazán.

Para este conjunto de experimentos las células se plaquearon en placas de 24 pocillos a una densidad de $5 \cdot 10^4$ células por pocillo. En los cultivos de SH-SY5Y se añadió Interferón gamma ($IFN\gamma$) durante 48 horas y se realizaron los tratamientos con FasL a los tiempos y dosis indicados. El procesamiento de las muestras fue llevado a cabo siguiendo las recomendaciones del fabricante.

3.6.4 Actividad Caspasa

Durante el proceso de muerte celular apoptótica tienen lugar la activación de caspasas, lo que nos permitirá tener un marcador bioquímico del estado de la célula. Además, el estudio la activación de caspasas iniciadoras (como la caspasa 8) o de las ejecutoras (caspasa 3) nos permitirá conocer con mayor precisión el desarrollo temporal de la muerte así como la ubicación en alguna de las principales vías apoptóticas.

Tras los tratamientos indicados, las células SH-SY5Y fueron lavadas con PBS y lisadas en hielo con el tampón A (25 mM Hepes pH 7,5, 5 mM DTT, 5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 5 mM $MgCl_2$ y 1 mM PMSF) para los ensayos de actividad caspasa 3, o el tampón B (150 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7.2, 5 mM DTT, 1% Triton X-100 y 1mM PMSF) para los ensayos de actividad caspasa 8. Tras 20 min los lisados fueron clarificados por centrifugación a $16.000xg$ durante 10 min a $4\text{ }^\circ\text{C}$. Se cuantificó la proteína del sobrenadante con el kit *Bio-Rad DC protein assay* (Bio-Rad, Hercules, CA; USA). En el caso de la actividad caspasa 3, 30 μg de proteína fueron incubados en el tampón de reacción (25 mM Hepes pH 7,5, 10% sacarosa, 0.1% CHAPS y 10 mM DTT) con el substrato fluorogénico Z-DEVD-AFC a 50 μM (Calbiochem) a $37\text{ }^\circ\text{C}$ durante 60 min. El mismo protocolo fue aplicado para la determinación de la actividad caspasa 8 pero con ligeras modificaciones en el tampón de reacción (20 mM KCl, 20 mM Pipes pH 7.4, 4 mM $MgCl_2$ Y 10 mM

DTT) con el substrato Ac-IETD-AFC a 50 μ M, (BD Biosciences). El procesamiento de los substratos emite una señal fluorescente que fue cuantificada con un fluorímetro (VICTOR³, Perkin Elmer, Boston, MA;USA) con filtro de excitación a 400 nm, y de emisión a 505 nm. La actividad enzimática se ha expresado como unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF).

3.7 INMUNODETECCIÓN

3.7.1 Obtención de los extractos proteicos

Generalmente, una vez finalizados los tratamientos las células, fueron lavadas con PBS y lisadas con tampón de lisis total (2% SDS, 125mM Hepes pH 6,8). Seguidamente se incubaron a 95 °C entre 5 y 15 min dependiendo de la cantidad de células y finalmente se procedió a la cuantificación del lisado con el kit *Bio-Rad DC protein assay* (Bio-Rad).

En cierto grupo de experimentos en los que fue conveniente un enriquecimiento de la fracción citosólica se utilizó tampón de lisis (25 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM Hepes, 100 mM Fluoruro de Sodio, 2 mM EDTA, 2 mM Na₃VO₄, 20 mM NaCl, 1% Triton, 10% glicerol, 2 mM PMSF, y el *cocktail* de inhibidores de proteasas *Complete* (Roche) previamente enfriado. En este caso todo el proceso se mantuvo a 4 °C. Tras 20 min de lisis, las muestras se centrifugaron a 16.000xg durante 15 min y el sobrenadante pasó a ser cuantificado con el kit *Bio-Rad DC protein assay* (Bio-Rad).

Para los ensayos de subfraccionamiento celular, las células se lavaron en PBS y posteriormente resuspendidas en 20 volúmenes de tampón de lisis citosólico hipotónico (10 mM Hepes-KOH pH 7.2, 1 mM EDTA, 10 mM KCl, 250 mM Sacarosa, 0.1% digitonina, 1 mM PMSF, y el *cocktail* de inhibidores de proteasas *Complete* (Roche Molecular

Diagnostics, Pleasanton, CA; USA) durante 1 min en hielo. Seguidamente se centrifuga a 16.000xg durante 2 min. El sobrenadante resultante corresponde a la fracción citosólica. El pellet obtenido, compuesto por el resto de material celular, que viene representado en su mayoría por la fracción membranaria pesada (mitocondrias y núcleo) y ligera (algunas mitocondrias, lisosomas y membranas lipídicas intracelulares) se disgregó utilizando el tampón de lisis total descrito previamente.

3.7.2 Ensayo de Western-Blot

Entre 10-50 µg de proteína fueron cargados en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) según el sistema de Laemmli (Laemmli UK, 1970) con gel concentrador del 5% y separador del 12%. Los geles fueron electrotransferidos (1 mA / cm², 1h) a membranas *Inmobilon-P* (Millipore, Bedford, MA, USA) usando transferencia *semidry* (Hoeffer, Pharmacia Corporation, Peapack, NJ, USA). Las membranas fueron bloqueadas 1 h a temperatura ambiente con 5 % de leche descremada en TBS-T (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl y 0.05% Tween 20). Las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios indicados durante toda la noche y tras varios lavados, incubadas seguidamente con los correspondientes anticuerpos secundarios. Finalmente, todas las membranas fueron lavadas con TBS-T un mínimo de 5 veces y reveladas por quimioluminiscencia usando *Super-Signal chemiluminescence Western blotting detection system* (Pierce, Rockford, IL, USA) y expuestas a *films SuperRX* (Fujifilm, FUJI PHOTO FILM CO.,LTD, TOKYO).

3.7.3 Inmunocitoquímica

Se transfectó la construcción pcDNA3-Flag-FAIM_L en un cultivo primario de neuronas corticales con Lipofectamina 2000 (Gibco) siguiendo recomendaciones de Crespo y colaboradores (Guerra-Crespo

M, *et al.*, 2003). Después de 48 h de expresión, las células fueron fijadas con PFA al 4%, bloqueadas durante 30 min con PBS y 3% de FCS, e incubadas toda la noche con anti-Flag M2 (dilución 1:500). Tras 3 lavados con PBS-Tritón se incubó con un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a FITC (Invitrogen / Molecular Probes). Las imágenes de microscopía confocal fueron adquiridas con el Microscopio Confocal Olympus XT FV500.

3.7.4 Inmunohistoquímica

Ratones OF-1 (Charles River Laboratories, Wilmington, MA;USA) a día de gestación E16, E18, y a día postnatal P0, P5, P10 y adulto fueron anestesiados con una mezcla de Ketolar (Parke-Davis / Pfizer, New York, NY; USA) y Rompun (Bayer AG, Leverkusen, Germany) y posteriormente profundidos con PFA al 4%. Posteriormente se procedió a la disección de los cerebros, criopreservación y final congelación. Se obtuvieron secciones coronales de cerebro de entre 30-50 μm , que fueron bloqueadas y posteriormente incubadas con anti-FAIM_L a una dilución de 1:600 durante toda la noche. La señal de expresión se detectó por incubación con anticuerpos secundarios biotinilados a 1:200 (Vector Labs, Burlingame, CA; USA) junto con el complejo estreptavidina-peroxidasa a 1:400 (Amersham Biosciences, Pittsburgh, PA; USA). La reacción con peroxidasa se reveló con diaminobencidina y peróxido de hidrógeno. Las secciones fueron finalmente montadas en portaobjetos cubiertos con gelatina, deshidratadas y montadas en presencia de DPX.

3.8 AISLAMIENTO DE LIPID RAFTS

Todo el procedimiento debe realizarse en frío para estabilizar las fracciones lipídicas. Tras los tratamientos indicados entre 5 y $10 \cdot 10^6$ células son lavadas y resuspendidas en tampón de homogenización (50

mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 0,5% Triton X-100 e inhibidores de proteasas y fostafasas). El lisado se deja 30 min en hielo y se procede a la formación del gradiente con Optiprep™ (AXIS-SHIELD, Oslo; Norway). Se mezcla 300 µl de homogenizado celular con 420 µl de Optiprep™ (35% iodixanol) y se deposita en el fondo de un tubo de ultracentrífuga Beckman de 5 ml. Se crea la siguiente fase con 3,2 ml de Optiprep™ (iodixanol al 30 %) y finalmente añadimos tampón de homogenización hasta 2mm del borde de tubo. Las diferentes concentraciones de Optiprep™ se realizan con TH y se añaden con cuidado para no romper la interfase de las diferentes capas. Los tubos se centrifugan durante 6 h a 30,000 rpm a 4 °C en el rotor Beckman SW 55 Ti. Se recogieron fracciones de 0.5 ml e inmediatamente se procesaron o congelaron a -20 °C hasta su análisis final por Western-Blot. Se utilizó como marcador de fracción *raft* a la Caveolina y el receptor de Transferrina como marcador de exclusión.

3.9 ENSAYO LUCIFERASA

Para el estudio de la actividad del promotor de FAIM en respuesta a NGF utilizamos el *Luciferase Assay System Kit* (Promega). Esta técnica se basa en la cuantificación del producto de un gen *reporter* (del inglés, reportero) situado en este caso bajo el promotor de FAIM. Concretamente, la actividad del promotor tiene como consecuencia la transcripción de la proteína luciferasa de la luciérnaga, que es capaz de catalizar la reacción que oxida a la luciferina en oxiluciferina, emitiendo quimioluminiscencia. La luz emitida se cuantifica con un luminómetro ofreciendo así la posibilidad de tener un análisis cuantitativo de la actividad del promotor.

Los vectores pGL3, pGL3-2200bp y pGL3-1500bp fueron transfectados (0,5 µg DNA:1 µl Lipofectamina) en células PC12

proliferantes. Un día después fueron lavadas dos veces con medio sin suero y dejadas sin factor trófico durante 12 h. A continuación, fueron tratadas con 100 ng/ml de NGF durante 24 h y se procedió al ensayo siguiendo las recomendaciones del fabricante.

3.10 DOBLE HÍBRIDO

La técnica del doble híbrido en levadura proporciona un método sensible para detectar interacciones entre proteínas *in vivo* relativamente débiles y transitorias. Estas interacciones puede que no sean bioquímicamente detectables, pero puede que sean críticas para el funcionamiento de sistemas biológicos complejos (Estojak J, *et al.*, 1995, Guarente L, 1993). Esta tecnología puede ser utilizada para identificar nuevas interacciones entre proteínas, confirmar interacciones sospechadas y definir dominios de interacción.

En el sistema que hemos utilizado, el *MATCHMAKER GAL4 Two-hybrid System 3*, un gen *bait* se expresa fusionado al dominio de unión al DNA del gen GAL4 (GAL4-BD), mientras que otro gen o bien como en este caso una librería de cDNA se expresan en fusión al dominio de activación de GAL4 (GAL4-AD). Cuando hay una interacción entre el *bait* y alguna de las proteínas de la librería de cDNA, los dominios GAL4-BD y GAL4-AD se encuentran muy próximos y dan lugar a la transcripción de cuatro genes *reporter* (del inglés, *reportero*), los cuales fenotípicamente se traducen por crecimiento de las levaduras en medios auxotróficos, es decir, deficientes en determinados aminoácidos como por ejemplo la histidina (gen HIS3), adenina (gen ADE2) y triptófano (gen TRP1) o cambiar la coloración de las colonias a azul en presencia de X-gal (gen lacZ o MEL1).

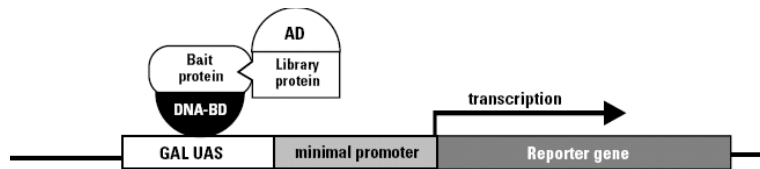


Figura 26. Principio básico del doble híbrido. El dominio DNA-BD consiste en los aminoácidos del 1 al 147 de la proteína GAL4, que tiene capacidad de unión a las secuencias promotor GAL UAS upstream (del inglés, corriente arriba) de los genes reporter. El dominio AD consta de los aminoácidos 768-881 de la proteína GAL4 y funciona como activador transcripcional.

La parte N-terminal de *Lifeguard* se clonó el vector pGBKT7-mLFGΔC DNA-BD que proporciona resistencia a la auxotrofia del Triptófano y el dominio DNA-BD del GAL4. Se transformó utilizando el método de Acetato de Litio en la cepa de levaduras Y187 (ade⁻,Met⁻,Trp⁻,Leu⁻,His⁻,Ura⁺). La librería de cDNA de cerebro de ratón fue adquirida comercialmente (Clontech, Mountain View, CA; USA) en el vector pACT2, que además de proporcionar del dominio GAL4-AD, confiere resistencia a la auxotrofia por Leucina. La librería de cDNAs fue transformada en la cepa de levadura AH109 (ade⁻,Met⁺,Trp⁻,Leu⁻,His⁻,Ura⁺). Antes de iniciar los experimentos de doble híbrido se analizó si la construcción pGBKT7-mLFGΔC DNA-BD producía transactivación espontánea del gen *reporter* HIS3.

Se realizó la conjugación de las dos cepas de levadura por *mating* (del inglés, apareamiento) y las colonias positivas fueron aisladas por crecimiento en medios deficientes en His, Leu y Trp, realizándose una réplica de las placas en un medio más restrictivo, sin adenina y con 2mM de 3-Aminotriazol. Se aislaron aproximadamente 400 colonias, de las cuales a 250 se extrajo el DNA. Se transformó el DNA extraído en *E.coli* para poder amplificarlo y extraerlo con mayor facilidad. Finalmente se secuenciaron utilizando el secuenciador

automático 3100 Avant Genetic Analyzer (HITACHI Applied Biosystems, Foster City, CA; USA).

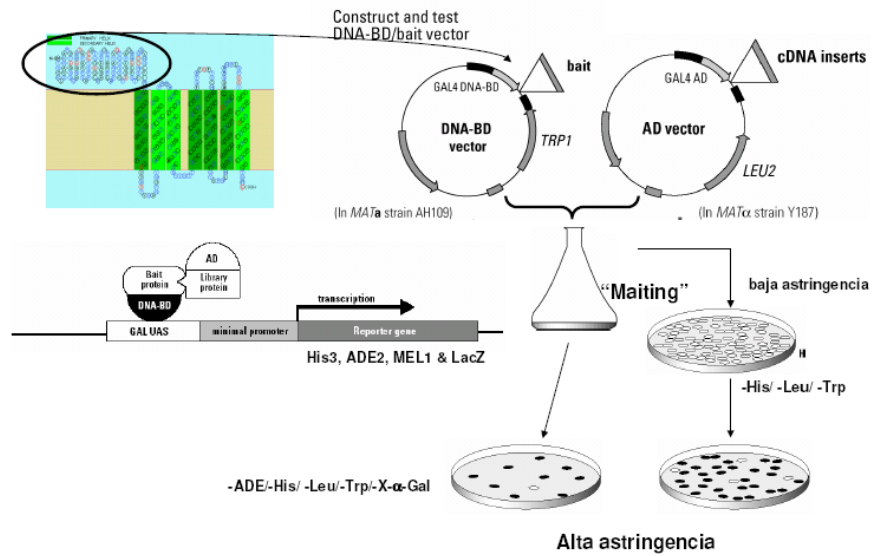


Figura 27. Resumen general del doble híbrido. En la parte izquierda superior se muestra la zona N-terminal de LFG elegida y su clonaje como proteína de fusión con GAL4 DNA-BD en la cepa MATa de levadura. Seguidamente tiene lugar la conjugación con la cepa MATα que contiene toda la librería de cDNAs de cerebro de ratón. Finalmente, la selección de las colonias resistentes, primero con baja astringencia y posteriormente con astringencia más elevada. Las colonias resultantes son las que fueron analizadas por secuenciación.

RESULTADOS

4. RESULTS

4.1 LIFEGUARD IS ABLE TO PROTECT NEURONS AGAINST CD95 INDUCED CELL DEATH THROUGH A LIPID RAFT DEPENDENT MECHANISM

4.1.1 Mouse Lifeguard cloning and expression

Human LFG was isolated in 1999 by Somia *et al.* from a human lung fibroblast cell line, MRC5, which was not sensitive to CD95L (Somia NV, *et al.*, 1999). Homology search through the existing databases revealed that LFG was the human homologue of a previously reported rat protein, neural membrane protein 35, NMP35 (Schweitzer B, *et al.*, 1998).

<i>M. musculus</i>	1	-----MTQGKLSVAN[K]APGTEGQQHQANGEKKDAPAVP[S]APP[S]---YEE[AT]SGEGL
<i>R. norvegicus</i>	1	-----MTQGKLSVAN[K]APGTEGQ-QQANGEKKDAPAVP[S]APP[S]---YEE[AT]SGEGL
<i>H. sapiens</i>	1	-----MTQGKLSVAN[K]APGTEGQ-QQVHGEKKEAPAVP[S]APP[S]---YEE[AT]SGEGL
<i>D. melanogaster</i>	1	MSWQSV[P]QYPQYQDFNQQY[Y]YGGGNPPQ-QGGYGGYPPQGGYPPQ[P]P[P]GGYPPY[A]QGGAP
<i>C. elegans</i>	1	-----MSYV[Q]QPYNPAY-----QNPYPNQ[P]P[P]PGFNT[CG]QGNQ
<i>M. musculus</i>	49	KACT[P]QGP[FAV]PLHP[SWAY]VDP--RGS[SGYE]GGFPA[CH]HEHFTT[S]D[D]DK[RR]L[FR]K
<i>R. norvegicus</i>	48	KAGAP[QGP]FAVPLHP[SWAY]VDP--SSSSG[YE]GGFPA[CH]HELFST[S]D[D]DK[RR]L[FR]K
<i>H. sapiens</i>	48	KAGAP[PA]FAVPLHP[SWAY]VDPNTGS[SSSYD]NGFPTGDHELFTT[S]D[D]DK[RR]L[FR]K
<i>D. melanogaster</i>	60	YPPQ[P]GQGP[PP]GGYAP[Q]PGFI[QP]---P[PS]AGGYGAYD[PE]SQPKNF[S]D[D]D[SR]R[RG]L[FR]K
<i>C. elegans</i>	36	QGGAF[SP]P[PP]MHGAM[FN]QMENG----QHGG[GD]NPD[GKYS]----P[PS]D[KT]V[RAA]F[FR]K
<i>M. musculus</i>	107	V[IT]L[L]VQ[L]L[TL]VVA[FT]FC[DP]VKDYVQA[PGW]WASYA[VFFA]Y[L]L[A]C[SGP]RRHF
<i>R. norvegicus</i>	106	V[IT]L[L]VQ[L]L[TL]VVA[FT]FC[DP]VKDYVQA[PGW]WASYA[VFFA]Y[L]L[A]C[SGP]RRHF
<i>H. sapiens</i>	108	V[IT]L[L]IQ[L]L[TL]VVA[FT]FC[DP]VKDYVQA[PGW]WASYA[VFFA]Y[L]L[A]C[SGP]RRHF
<i>D. melanogaster</i>	117	V[IT]L[L]MGQ[L]L[TF]AVA[V]FVYH[GT]KTFARN[W]L[F]VVALG[V]MLV[TL]SMA[CESV]RRDT
<i>C. elegans</i>	87	V[ES]V[FIM]C[L]VA[L]VTV[P]UVH[DT]MRM[VRR]S[ALY]LGSYV[IF]FV[FL]S[V]C[EGV]RRKF
<i>M. musculus</i>	167	P[MM]L[L]T[F]T[LS]MAY[ITG]L[SS]YNTT[S]V[L]C[IG]I[TAL]VCL[S]T[F]S[F]N[TK]FD[ITS]C[CG]
<i>R. norvegicus</i>	166	P[MM]L[L]T[F]T[LS]MAY[ITG]L[SS]YNTT[S]V[L]C[IG]I[TAL]VCL[S]T[F]S[F]N[TK]FD[ITS]C[CG]
<i>H. sapiens</i>	168	P[MM]L[L]T[F]T[LS]MAY[ITG]L[SS]YNTT[S]V[L]C[IG]I[TAL]VCL[S]T[F]S[F]N[TK]FD[ITS]C[CG]
<i>D. melanogaster</i>	177	P[MM]L[FL]G[FT]AAQS[F]LMG[SAT]KYAPKEV[L]MA[GL]TAAVCL[A]T[F]AL[N]K[YD]F[MM]G[C]
<i>C. elegans</i>	147	P[MM]L[VT]G[HT]LATS[V]L[M]I[SA]H[D]ANW[L]L[A]L[C]IGCT[FS]V[VA]S[TK]FD[TA]H[M]
<i>M. musculus</i>	227	V[IF]V[L]L[TL]FFS[F]L[L]A[L]L[P]QYV[P]W[HA]Y[A]L[FA]P[FT]L[EL]A[FD]T[L]L[M]G-N[R]H[S]L
<i>R. norvegicus</i>	226	V[IF]V[L]L[TL]FFS[F]L[L]A[L]L[P]QYV[P]W[HA]Y[A]L[FA]P[FT]L[EL]A[FD]T[L]L[M]G-N[R]H[S]L
<i>H. sapiens</i>	228	V[IF]V[L]L[TL]FFS[F]L[L]A[L]L[P]QYV[P]W[HA]Y[A]L[FA]P[FT]L[EL]A[FD]T[L]L[M]G-N[R]H[S]L
<i>D. melanogaster</i>	237	I[L]IAC[M]VFLIF[----]V[AI]L[V]KGI[L]L[Y]A[S]I[A]P[FS]Y[L]EYD[T]L[M]M[G]E[H]Y[S]I
<i>C. elegans</i>	207	Y[L]L[I]S[C]F[M]F[F]L[V]V[V]C[S]M[F]KIK[F]M[Y]A[L]G[A]L[M]L[F]L[V]M[M]G-C[K]Y[E]I
<i>M. musculus</i>	286	SPEEYI[CA]NLYID[IL]Y[ET]PLQ[FF]NRE
<i>R. norvegicus</i>	285	SPEEYI[CA]NLYID[IL]Y[ET]PLQ[FF]NRE
<i>H. sapiens</i>	287	SPEEYI[CA]NLYID[IL]Y[ET]PLQ[FF]NRE
<i>D. melanogaster</i>	293	SPEEYI[CA]NLYID[IL]N[F]M[L]T[L]I[AS]RD
<i>C. elegans</i>	266	SPEEYI[AS]YQIF[FD]I[Q]M[F]D[L]S[FF]S[D]-

Figure 28. Protein alignments of LFG. Comparison of LFG protein sequences from mouse, rat, human, drosophila and worm. Identical aminoacids are shaded in black, and those with conservative changes in grey. The additional 13 aminoacids in the long form are underlined. Protein sequences are available from GenBank/EMBL/DDBJ under accession n° NP_082500 (mouse LFG_L), [NP_653357](#) (rat LFG-L), [NP_036438](#) (human LFG_L), NP_523722.1 (D. melanogaster) and NP_505500.2 (C. elegans).

The mouse homologue had not been described. By searching on public available EST databases (GenBank, NCBI, ENSEMBL) we found clones encoding mouse LFG (mLFG or long form, LFG_L) and also a short form we named LFG_S. The cloned mouse LFG_L sequence is available from GenBank/EMBL/DDBJ under accession number [AF468028](#).

Figure 28A compares the *Mus musculus* LFG sequence with the ones from *C. elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Rattus norvegicus* and *Homo sapiens*. The alignment of LFG from vertebrates shows more than 84% of homology. The percentage of homology was reduced to 43 and 36% when vertebrate sequences were aligned with *D. melanogaster* and *C. elegans* LFG sequences, respectively (See Table 5).

	<i>M. musculus</i>	<i>R. norvegicus</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>C. elegans</i>
<i>M. musculus</i>	-	96	90	43	36
<i>R. norvegicus</i>	96	-	91	42	39
<i>H. sapiens</i>	90	91	-	44	39
<i>D. melanogaster</i>	43	42	44	-	35
<i>C. elegans</i>	36	39	39	35	-

Table 5. Percentage of identity in a pairwise alignment between different species.

The distribution of mLFG transcripts in several tissues and cell lines was examined by RT-PCR. Although it has been reported that LFG is expressed in most tissues (Somia NV, *et al.*, 1999) by Northern Blot, we were able to detect mLFG transcripts only in nervous system related tissues. RT-PCR products were electrophoresed on 3% agarose gels in order to enhance migration of transcripts. Two transcripts corresponding to the long (300 bp) and short (260 bp) form appear in cortex, cerebellum, hippocampus, hindbrain and spinal cord, whereas no transcripts appear among other examined tissues such as lungs, large and small intestine, spleen, liver, kidney, heart, skeletal muscle, thymus and ovaries (see Figure 29A). LFG expression was also detected in the cellular models included in this study: neuroblastoma cell line SH-SY5Y, cerebellar granule neurons and cortical neurons (Fig. 29B).

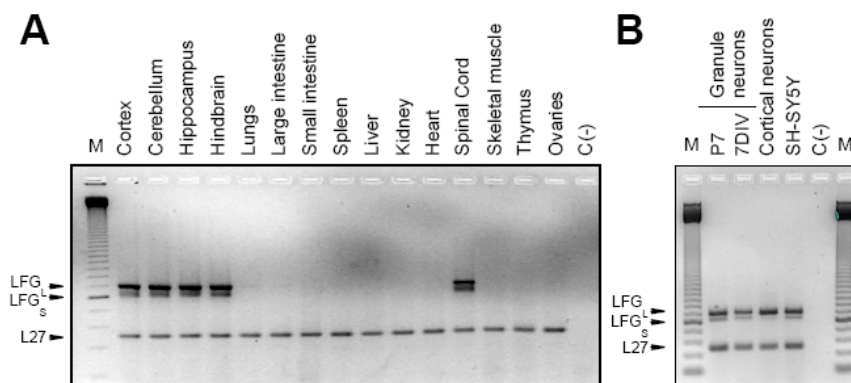


Figure 29. A, Semiquantitative RT-PCR of mLFG_s and mLFG_L in different mouse tissues and B, in cultured cortical and cerebellar granule neurons and in SH-SY5Y cells. As a control for amplification, the L27 housekeeping gene was used. C(-) control PCR reactions without reverse transcriptase. M, 50-bp DNA ladder marker.

4.1.2 Structural analysis of mLFG

In silico studies reveal that the coding region of the identified mLFG consists of 317 amino acids with a theoretical molecular weight of 35,327 kDa and an isoelectric point of 6,70 (Swiss-Prot/TrEMBL). mLFG contains one consensus site for N-glycosylation, several putative phosphorylation sites, and a PEST sequence at the N-terminus of the protein (see fig. 30).

```

MTQ GKLSVANKAPGTEGQQHQANGE KKDAPAVPSAPP SYEEA TSGEGLKAG
TFPQGP TAVPLHP SWAY VVDPRGS SGYEGGF P AGHHEHFTTF SWDDQKVRRL
FIRK VYTI LLVQLLVTLAVVALFTFC VVKDYVQANPGWY WASYAVFFATY
LTLACCSG PRRHFPWNLI LLTIFTL SMAYLTGMLS SYNYNTT SVLLCLVITA
LVCLSVTIF SFQTKFDFT SCQGVLFVLLMTLFFSGLLLAVLLPF OYVPWLH
AVYAVLGAGVFTLFLAFDTQLL MGNRRH SLSP EEYIF GALNIYLDI IYIFT
FFLQLF GTNRE
    
```

Figure 30. Amino acid sequence of mLFG_L. PEST sequence is underlined with a thick green line. Differential aminoacids between long and short isoform are underlined. Transmembrane domains are framed and high score (at least 0.95) predicted phosphorylation residues are in bold and blue (for serine), red (threonine) and green (tyrosin).

According to published results for human and rat sequences, mLFG hidropathy prediction analysis of the inferred amino acid sequence shows that the protein contains a disordered N-terminus from residues 1 to 106 followed by an hydrophobic core region between residues 107 and 313. This part contains seven segments of relatively high hydrophobicity and long enough to be potential transmembrana-spanning regions (TM).

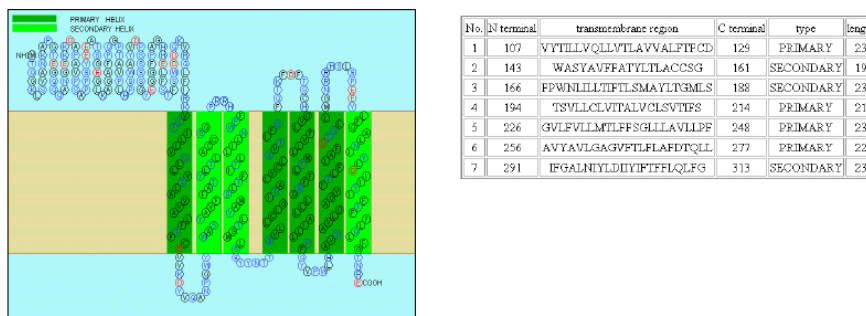


Figure 31. The SOUSI blot suggests that the hydrophobic domains are membrane-associated segments. (http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/cgi-bin/adv_sosui.cgi)

Schweitzer *et al.* suggested that NMP35 (rat homologue of LFG) presented a high degree of homology with a glutamate binding protein (GBP). GBP was originally

purified from synaptic membranes as a part of a four-protein complex that showed NMDA-displaceable glutamate binding (Kumar KN, *et al.*, 1991). Due to the proposed function of NMP35-related protein GBP as a part of a glutamate ion channel, it was conceivable that LFG might also play a role in neurotransmission (Schweitzer B, *et al.*, 2002). When distribution of aminoacids along the membrane spanning domains is analyzed, it is clear that charged aminoacids are randomly distributed. Then, it is unlikely that LFG forms a channel (see fig. 32).

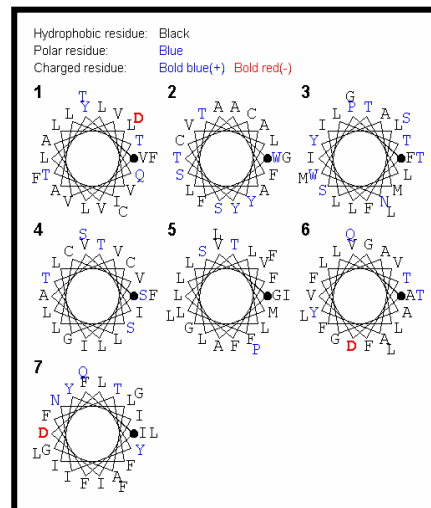
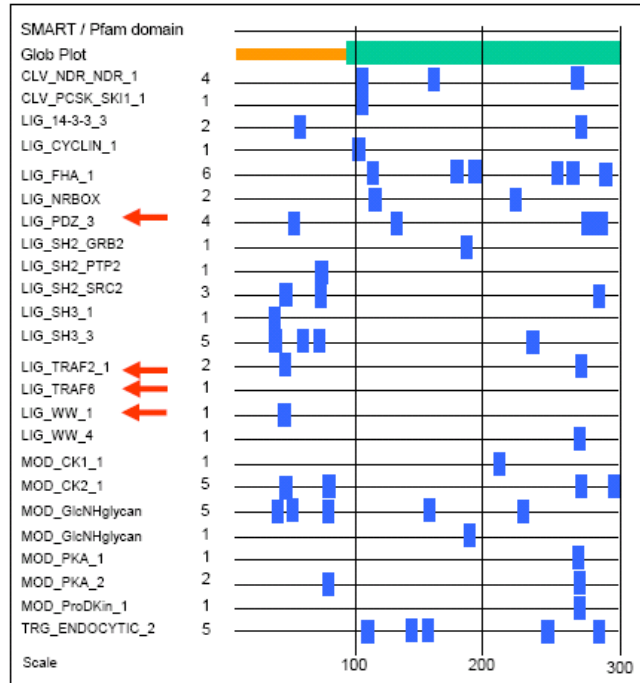


Figure 32. Aminoacid distribution of the seven transmembrane domains. Black dots indicate the direction. Hydrophobic residues are in black, polar residues in blue and charged residues are in bold blue and bold red.

Searching for structural homologues of mLFG showed that LFG has no domain homologies with any other protein and that it lacks a described domain that could suggest an already known function. Moreover LFG is assigned by PFAM to an uncharacterized protein family UPF005. Members of this family are predicted to contain seven-membrane spanning domains and they share a signature in the region beginning at the third spanning domain and ending in the middle of the fourth. Apart from bacterial and yeast proteins, the only eukaryotic protein with a known function was Bax inhibitor one (BI-1). BI-1 is an antiapoptotic protein, conserved through evolution and it contains several transmembrane domains, and it localizes to endoplasmic reticulum. BI-1 overexpression provides protection against apoptosis induced by some types of stimuli in mammalian cells (such as Bax induced apoptosis, etoposide, staurosporine and growth factor deprivation), whereas BI-1 antisense can promote apoptosis in some tumor cell lines (Xu Q y Reed JC, 1998).

In order to ascertain the molecular function of LFG, we searched through a resource for prediction of functional motifs which provides putative functional sites identified by patterns, that is, by finding regular position of aminoacids.

Figure 33. Summary of reported by ELM. First table represents mLFG. orange part is the disordered sequence of terminus, while green represents global transmembrana. Blue bars indicate motif. Red arrows point to the interesting domains death receptor



features line of the The the N-bar domain. position. most related to signaling.

The results for Eukaryotic Linear

the Motif

(Puntervoll P, *et al.*, 2003) are displayed in figure 33. Among several putative motif sites, we found interesting those related to death receptors signaling. The first functional motif is the class III PDZ. PDZ domains have an important role in mediating interactions for the assembly of large multi protein complexes at specific subcellular locations. LFG contains five putative PDZ motifs, one at the N-terminus of the protein, two in the first intracellular loop of the transmembrane region and the last two next to the C-terminus of the protein. The main feature of PDZ-ligand interaction is that the C-terminal region of targets is specifically recognized. PDZ3 motif has been reported to be the responsible for this interaction in some of the CD95 associated proteins such as FAP-1(Sato T, *et al.*, 1995).

Another interesting domain is the TRAF2-binding consensus motif. Members of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) superfamily initiate intracellular signaling by recruiting the c-domain of the TNFR-associated factors (TRAFs) through their cytoplasmic tails. TRAF2 is mainly related to TNF α receptors signalling but recent evidences demonstrate that it could be also implicated in CD95 effects (Trauzold A, *et al.*, 2005).

Next functional site is the TRAF6 binding site, located in the last external loop of LFG. The aminoacids that are forming part of this loop are totally conserved in all species tested. It has been described that TRAF6 protein acts as intracellular adaptor that is recruited to different receptors through its C-terminal TRAF domain and it is necessary to initiate intracellular signalling.

Finally, the last functional class is the WW ligand. This motif has been implicated in protein-protein interactions mediated by WW domains, involved in many cellular processes such as ubiquitin mediated protein degradation.

In addition to the motifs obtained by ELM software, we also detected an IAP-binding motif. It consists of a short stretch of hydrophobic aminoacids, AVPS, that can be found at the N-terminal part of mLFG. This sequence could be responsible for an hypothetical interaction between IAPs and LFG.

4.1.3 *IFN γ* renders neuroblastoma cell line SH-SY5Y to a type II CD95L induced cell death

Most neural cell types are resistant to CD95 due to different reasons that include high expression of antagonists or deficits in signaling cascade. In a high percentage of neuroblastomas, the expression of caspasa-8 is absent and it has been associated to a resistance to death receptor induced cell death (Kim S, *et al.*, 2004). It has been proposed that the silencing of caspasa-8 depends on methylation of a regulatory region at the boundary between caspasa-8 exon-3 and intron-3 (Teitz T, *et al.*, 2000). Interferon gamma ($IFN\gamma$) has been shown to sensitize several malignant cells to apoptosis through upregulation of caspasa-8 expression. There are evidences that demonstrate that induction of caspasa-8 expression could be independent of demethylation and dependent on the presence of an interferon-sensitive response element located at upstream to the first exon of caspasa-8 gene (Casciano I, *et al.*, 2004).