

**DEPARTAMENT DE CIÈNCIES MÈDIQUES BÀSIQUES  
FACULTAT DE MEDICINA  
UNIVERSITAT DE LLEIDA**

**REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DE c-JUN DURANT  
EL DESENVOLUPAMENT DE LES MOTONEURONES ESPINALS**



Tesi presentada per M<sup>a</sup>. Victòria Ayala Jové per tal d'accedir  
al grau de Doctora en Biologia  
Febrer de l'any 2001

## **VII. DISCUSSIÓ**

## **1.- L'ANTICÒS MONOCLONAL c-JUN/mAB ÉS ESPECÍFIC PER A LA DETECCIÓ DE c-JUN EN L'EMBRIÓ DE POLLASTRE.**

La caracterització de l'anticòs c-Jun/mAB per tècniques de western blot va permetre comprovar que aquest anticòs reconeix una única banda de 39kD en mostres procedents de medul·la espinal de pollastre, la qual està present en la fracció nuclear i no en la fracció citoplasmàtica. Això ens indica que aquest anticòs reconeix específicament una proteïna que té la mateixa mobilitat electroforètica que c-Jun de pollastre, un dels principals components de la família de factors de transcripció AP-1 (Bohmann et al., 1987; Halzonetis et al., 1988; Abate et al., 1990; Kerppola and Curren, 1991; Freeman i Rose, 1999).

En la majoria d'estudis que han estat realitzats amb anticossos específics contra c-Jun, s'ha posat de manifest que c-Jun, generalment, està concentrat en el nucli de diferents tipus cel·lulars (De Felipe i Hunt, 1994; Haas et al., 1996, Jaarsma et al., 1996; Pena, 2000). S'ha observat el mateix patró nuclear d'immunoreactivitat en la medul·la espinal de pollastre amb l'anticòs c-Jun/mAB. A més, s'ha constatat que aquest anticòs no marca tots els nuclis de les cèl·lules de la medul·la si no que s'associa a determinades poblacions neuronals.

Per altra banda, els anticossos policlonals c-Jun/sc45 i c-Jun/AB2 reconeixen un ampli ventall de bandes electroforètiques la majoria de les quals es detecten en la fracció citoplasmàtica, i en alguns casos, també es detecten bandes molt dèbilment marcades en la fracció nuclear. S'ha comprovat que la banda de 39kD, corresponent a c-Jun, només es visualitza quan els anticossos c-Jun/sc45 o c-Jun/AB2 s'utilitzen molt concentrats. Per tant, almenys en teixits de pollastre, aquests anticossos no són tant específics per a detectar c-Jun com l'anticòs c-Jun/mAB, ja que presenten reacció creuada amb altres antígens. El patró immunohistoquímic revelat per l'anticòs c-Jun/sc45 difereix de l'observat amb c-Jun/mAB, ja que a diferència d'aquest, tant c-Jun/sc45 com c-Jun/AB2 marquen de manera molt significativa el citoplasma neuronal, tant a nivell del soma com de les seves prolongacions axonals i dendrítiques. A més, les cèl·lules marcades amb c-Jun/sc45 o c-Jun/AB2 gairebé sempre tenen els nuclis picnòtics i són TUNEL positives.

Aquests resultats coincideixen amb altres estudis realitzats amb els mateixos anticossos policlonals i on també s'ha observat una intensa immunoreactivitat citoplasmàtica de c-Jun/sc45 o c-Jun/AB2 associada a cèl·lules apoptòtiques, com per exemple en cervell de rata (Ferrer et al., 1996a; Guégan et al., 1997), tumors cerebrals (Ferrer et al., 1996b), en la mort cel·lular patològica associada a la malaltia d'Alzheimer (Anderson et al., 1994), en l'apoptosi induïda experimentalment (Ferrer et al., 1997b-d; Pozas et al., 1997) i en la PCD de les neurones simpàtiques durant el seu desenvolupament (Messina et al., 1996).

Quan comparem els resultats obtinguts en els estudis d'immunohistoquímica i western blot amb els d'hibridacions "in situ" es pot apreciar una estreta correlació entre l'immunomarcatge detectat amb c-Jun/mAB i els nivells de mRNA de c-jun, mentre que no hi ha cap relació amb la immunoreactivitat evidenciada amb c-Jun/sc45 o c-Jun/AB2.

Inicialment es va interpretar que aquest senyal detectat amb c-Jun/sc45 o c-Jun/AB2 es corresponia a c-Jun, però posteriorment, quan es van realitzar estudis més acurats i dirigits a identificar els antígens que reconeixen aquests anticossos policlonals s'ha demostrat que aquests anticossos reconeixen moltes proteïnes del citoplasma que tenen una mobilitat que no correspon a c-Jun.

Per tant, com l'anticòs monoclonal c-Jun/mAB reconeix més específicament c-Jun tant en els extractes cel·lulars com en els talls histològics, ha estat utilitzat per estudiar la regulació de c-Jun durant el període de la PCD natural i induïda.

## **2.- EXPRESSIÓ DE c-JUN EN LES MOTONEURONES ESPINALS DE POLLASTRE DURANT EL DESENVOLUPAMENT EMBRIONARI.**

Les cèl·lules marcades amb l'anticòs c-Jun/mAB, a nivell de la LMC contenen nuclis grans amb la cromatina molt laxa que es tenyeixen dèbilment amb iodur de propidi; en canvi, les cèl·lules que presenten nuclis més petits i densos no presenten aquest marcatge. Les característiques morfològiques nuclears de les cèl·lules c-Jun/mAB positives corresponen a una morfologia pròpia dels nuclis de les MNs, això indica que a nivell de la LMC, c-Jun/mAB marca fonamentalment les motoneurons

de l'embrió de pollastre. Es va utilitzar aquest anticòs a l'hora d'estudiar la relació de c-Jun amb la PCD de les motoneurons lumbars, que té lloc entre E6 i E9, període en el qual s'estableixen els primers contactes amb les cèl·lules musculars (Hamburger, 1975). Es va observar que a nivell de la LMC es produïen canvis significatius de l'expressió de c-Jun que coincidien amb canvis de la taxa de mortalitat de les motoneurons. Els canvis d'expressió de c-Jun seguien una corba de dos pics entre E5 i E10 amb l'aparició d'un primer pic a E6, una profunda davallada a E7,5 i un segon pic a E8; a partir d'E10 els nivells de c-Jun eren molt baixos i resultaven molt poc significatius.

El fet que el primer pic de c-Jun es detecti abans del pic de picnòsis i la davallada de c-Jun en el moment que hi ha el nombre màxim de cèl·lules picnòtiques, ens indica que els canvis d'expressió de c-Jun podrien estar relacionats amb els esdeveniments que tenen lloc abans de la PCD de les motoneurons. A més, la manca d'immunoreactivitat nuclear positiva per c-Jun/mAB en cèl·lules amb morfologia nuclear picnòtica fa pensar que c-Jun podria estar relacionat amb la fase inductora i no amb l'executora de l'apoptosi. Existeixen estudis realitzats en diferents models cel·lulars en què s'ha induït l'apoptosi experimentalment, i en els quals, també s'ha observat un increment de c-Jun unes hores abans de produir-se el procés de mort (Estus et al., 1994; Ham et al., 1995; Mesner et al., 1995, Miller i Johnson, 1996, Anderson et al., 1996; Ferrer et al., 1996c; Ferrer et al., 1996b). Per això vam utilitzar un model experimental en què es provoca una mort massiva de les MNs lumbars ( $\beta$ -Bgtx) amb la finalitat d'induir l'activació de c-Jun en un període de temps més curt entre l'estímul rebut i la mort de les cèl·lules, i així, estudiar si c-Jun resulta modificat en la fase inductora o executora de l'apoptosi, i comparar aquests resultats amb els que s'han obtingut durant el desenvolupament, on la PCD es produeix de forma més solapada en un llarg període de temps (entre E6-E9).

### 3.- L'ACTIVACIÓ DE c-JUN EN LA PCD INDUÏDA PER $\beta$ -BGTX.

La injecció intramuscular de  $\beta$ -Bgtx provoca la mort massiva de les MNs entre les 12 i 36 h amb un pic màxim de cèl·lules picnòtiques a les 24h. A nivell ultraestructural, s'observa que, durant aquest període, la dosi de  $\beta$ -Bgtx utilitzada produeix una mort del tipus apoptòtic tal com es va descriure en els treballs realitzats per Pittman et al., (1978). L'estudi del perfil temporal de l'expressió de c-Jun es va realitzar fins a les 36 h i es va veure l'aparició d'un pic a les 12 h, una davallada a les 24 h i un altre pic a les 36 h. La inducció de c-Jun a les 12 hores i la seva davallada a les 24 hores coincideix amb un increment inicial de la síntesi de mRNA de c-Jun i la posterior disminució, la qual cosa és una prova de què la inducció de c-Jun en aquesta situació està vinculada a un increment de la seva transcripció. Això, dóna consistència a la hipòtesi que c-Jun es podria induir abans de la mort, coincidint amb la fase inductora de l'apoptosi, en canvi, durant la fase executora hi hauria una davallada tant de l'expressió de c-Jun com de la seva presència en el nucli de les cèl·lules amb morfologia picnòtica

Per tant, en aquest model, c-Jun presenta canvis d'expressió tant a nivell de mRNA com de proteïna, comparables als que es produeixen durant el desenvolupament amb l'única diferència que, tant l'activació de c-Jun com el pic de mort no coincideixen en el temps, perquè en el model de la  $\beta$ -bgtx la intensitat de l'estímul és molt més acusada i provoca un increment substancial del nombre de cèl·lules apoptòtiques durant un període de temps més curt.

És sabut que modificacions posttranscripcionals de c-Jun contribueixen a la seva funció ja que la fosforilació en diferents residus de c-Jun pot afectar la seva capacitat d'unió al DNA. La fosforilació de les serines 63 i 73 ubicades en el domini d'activació N-terminal incrementen la capacitat de transactivar de c-Jun (Pulverer et al., 1991; Smeal et al., 1992). Ha estat provat que JNK1 interactua amb c-Jun i fosforila el seu domini d'activació, i que posteriorment, s'activa la transcripció (Hibi et al., 1993; Dérijard et al., 1994). Recentment, s'ha descrit que la inhibició de la l'activitat JNK1 evita la mort apoptòtica de diferents tipus cel·lulars tant "in vivo" com "in vitro" (Glicksman et al., 1998; Maroney et al., 1998; Harding et al., 2000).

Així, s'observa una correlació entre l'expressió de c-Jun i l'increment dels nivells de la JNK1 en el nucli de les MNs a les 12h després del tractament amb  $\beta$ -Bgtx, la qual cosa ens indica que l'activació funcional de c-Jun, abans que es produeixi el pic de mort cel·lular, podria estar regulada per aquesta cinasa. Tot i que els nivells de JNK1 s'incrementen a les 12h, no totes les cèl·lules c-Jun positives són JNK1 positives, però s'ha pogut observar que les cèl·lules marcades amb l'anticòs JNK1 són aquelles que presenten una intensa immunoreactivitat per c-Jun/mAB.

En aquest model també vam observar que la JNK1 ja es detectava a les 6h, però que la seva localització era citoplasmàtica, cosa que ens indica que podria existir una translocació de JNK1 del citoplasma al nucli entre les 6 i les 12h. Cal destacar, que passat aquest temps, els nivells de JNK1 decreixien, de manera que a les 36h la presència de JNK1 en les MNs era nul·la. Per tant, aquests resultats han permès veure que el primer pic de c-Jun (a les 12 h) està associat a l'activació de la JNK1, però en canvi, el segon pic de c-Jun (a les 36h) no sembla estar regulat per JNK1. Aquests resultats coincideixen amb els d'altres estudis realitzats "in vitro" en què s'ha descrit que l'activació de JNKs associada a un increment de l'expressió de c-Jun està relacionada amb la inducció de l'apoptosi neuronal (Xia et al., 1995; Eilers et al., 1998; Watson et al., 1998).

#### **4.- REGULACIÓ DE L'ACTIVACIÓ DE c-JUN DESPRÉS DE L'ABLACIÓ PERIFÈRICA DE LES DIANES.**

Un altra situació experimental en què es pot induir la mort natural de les MNs és l'LBR, amb el qual més d'un 90% de les MNs privades de la seva diana moren per apoptosi durant el mateix període del desenvolupament en què té lloc la mort neuronal programada (Oppenheim et al., 1978). Després de practicar l'LBR s'ha observat un increment dels nivells de c-Jun a E6,5; aquest increment està associat a l'activació de la JNK1, i esdevé anterior al pic màxim de cèl·lules picnòtiques que té lloc a E7,5. Paral·lelament, s'ha vist que l'increment de c-Jun i JNK1 coincideixen amb la detecció de la forma de c-Jun fosforilada a la serina 63, al costat en què s'ha practicat l'LBR. Posteriorment, es va observar tant una disminució dels nivells de c-

Jun i de la seva forma fosforilada com dels de la JNK1, coincidint amb el pic màxim de mort de les MNs. Aquests resultats suggereixen que es produeix la fosforilació de la serina 63 per la JNK1 abans de la PCD de les MNs, la qual cosa podria comportar la seva transactivació.

En el nostre paradigma, la fosforilació de c-Jun està relacionada amb l'increment de la immunoreactivitat nuclear per c-Jun/mAB detectada en les MNs abans del procés de mort. El fet que un gran nombre de MNs del costat operat expressin c-Jun fosforilat i JNK1 indica que l'activació de c-Jun precedeix els canvis morfològics de l'apoptosi de manera que podria estar relacionada amb les fases prèvies a l'execució de l'apoptosi.

Aquests resultats estan en concordança amb els esdeveniments descrits durant la PCD de les neurones simpàtiques quan se les priva de l'NGF en què s'observa un increment de c-Jun, de la seva fosforilació a la serina 63 i de JNK1 abans que entrin en la fase de compromís de l'apoptosi (Estus et al., 1994; Ham et al., 1995; Easton et al., 1997; Deckwerth et al., 1998; Harding et al., 2000) i que c-Jun podria ser un dels elements necessaris perquè les cèl·lules adquireixin, fenotípicament, la competència o capacitat de poder morir (Putchá et al., 2000).

## **5.- REGULACIÓ A LA BAIXA DE c-JUN A E6 DURANT EL TRACTAMENT CRÒNIC AMB MUSCIMOL O NMDA.**

El tractament crònic amb NMDA o amb muscimol disminueixen la PCD de les MNs entre E5 i E10. Els efectes de l'NMDA han estat prèviament descrits per altres membres del laboratori (Lladó et al., 1999) mentre que l'efecte del muscimol sobre la regulació de la PCD en les MNs és novedós i els resultats preliminars han estat ja presentats en forma de resum (al 30th Annual Meeting of Society for Neuroscience). El tractament crònic amb aquests dos fàrmacs evita la mort, d' un 26% amb l'NMDA i un 30% amb el muscimol, de les MNs lumbars que han de morir durant el període de la PCD en la medul·la espinal de l'embrió de pollastre. Tant el tractament crònic amb NMDA com el tractament amb Muscimol disminueixen la inducció de c-Jun a E6. S'ha comprovat que aquesta regulació a la baixa de c-Jun a E6 mitjançada pels



efectes de l'NMDA evita l'activació nuclear de JNK1 i la fosforilació de c-Jun. Aquest resultat aporta nous elements a la hipòtesi que l'activació de c-Jun fosforilat per JNK1 en la serina 63 podria estar relacionada amb els esdeveniments que condueixen a la mort de les MNs durant la PCD. A més, els efectes tant de l'NMDA com del muscimol sobre la supervivència de les MNs eviten que es produeixi una disminució dels nivells de c-Jun en el moment que hi ha el màxim pic de mort, cosa que està en relació amb el fet que les MNs que es moren és menor.

## **6.- LA INDUCCIÓ DE c-JUN DESPRÉS DEL PIC DE MORT PODRIA ESTAR RELACIONADA AMB UN INCREMENT DE L'ACTIVITAT NEURONAL.**

El factor de transcripció c-Jun s'ha implicat en diversos processos cel·lulars com són proliferació, diferenciació, activitat i apoptosi, entre d'altres. Els canvis d'expressió de c-jun observats entre E5-E8 coincideixen amb diferents fenòmens que tenen lloc en les MNs, com per exemple, l'aparició de projeccions aferents sensorials (Davis et al., 1989), l'inici de l'activitat sinàptica (Lee et al., 1988) i de l'activitat reflexa (Windle i Orr, 1934), l'increment de la motilitat de l'embrió i l'inici del període de mort cel·lular programada de les MNs lumbars (Hamburger et al., 1965; Hamburger, 1975) en els quals c-Jun també podria estar-hi implicat en major o menor grau.

Atenent els nostres resultats, després de produir-se el pic de mort, el qual va associat a una caiguda dels nivells de c-Jun, es detecta un nou pic d'inducció de c-Jun que no està relacionat amb la mort. Aquesta inducció de c-Jun té unes peculiaritats diferents a les que es produeixen abans de la mort ja que no va associada a l'activació de la JNK1 i no comporta la fosforilació de la serina 63. Recentment s'ha descrit una nova via d'activació de c-Jun, independent de la via JNKs, que no requereix la fosforilació de les serines 63 i 73 de c-Jun. En aquesta via s'ha vist que el  $Ca^{++}$  podria tenir un paper important en la regulació de l'activació de c-Jun associada a l'activitat elèctrica (Cruzalegui et al., 1999). És per aquest motiu que considerem que en aquesta fase la inducció de c-Jun podria tenir un altre significat funcional que podria

estar relacionat amb l'activitat neuronal.

El muscimol és un agonista dels receptors GABA<sub>A</sub> que bloqueja indirectment l'activitat neuromuscular i els moviments espontanis de les MNs (Usiak and Landmesser, 1999). L'activació dels receptors GABA comporta la hiperpolarització de les neurones i, en conseqüència, queda afectada l'estimulació glutamàrgica, que es redueix. Per tant, el muscimol es considera un bon fàrmac per estudiar si existeix alguna relació entre l'activitat neuronal i la inducció de c-Jun que es produeix després de la mort i és independent de la via JNK1. Els nostres resultats indiquen que el tractament amb muscimol disminueix la inducció de c-Jun a E8, just després del pic de mort, cosa que ens suggereix que el segon pic de c-Jun podria estar relacionat amb l'activitat elèctrica de les motoneurons i no amb l'activació de mecanismes de mort.

L'expressió d'IEGs resulta alterada en relació amb l'activitat neuronal. Això s'ha vist, per exemple, en diferents tipus d'epilèpsia. En la majoria d'estudis experimentals en què s'ha induït l'activitat epilèptica es produeix un increment generalitzat d'IEGs entre els quals es troba c-jun (revisat per Hughes et al., 1999). L'expressió d'aquests IEGs s'ha demostrat que és mitjançada, principalment, a través de receptors NMDA. El fet que l'activitat del sistema motor sigui tan important per modular la innervació amb les dianes i que tant el procés inicial de sinaptogènesi (Ding et al., 1983; Dahm i Landmesser, 1991) com el refinament final de les connexions estan regulats per l'activitat (O'Brien et al., 1978; Thompson, 1985; Greensmith i Vrbova, 1991) ens va suggerir que l'increment de c-Jun a E8 podria estar associat a l'activitat elèctrica de les MNs. Cal dir que la motilitat de l'embrió de pollastre s'incrementa notablement entre E8 i E10 (Oppenheim, 1987).

## **7.- ASSOCIACIÓ ENTRE LA PCD I LA IMMUNOREACTIVITAT CITOPLASMÀTICA DE c-JUN/SC-45.**

L'anticòs policlonal c-Jun/sc-45 ens mostra una intensa immunoreactivitat citoplasmàtica associada a cèl·lules picnòtiques/TUNEL positives durant el desenvolupament embrionari del pollastre. Aquest marcatge s'ha observat que està associat a la mort apoptòtica tant en neurones com en cèl·lules no neuronals (ex:

cèl·lules de Schwann, musculars i mesenquimàtiques). Les cèl·lules c-Jun/sc45 positives presenten un patró d'immunoreactivitat que s'estén per tot el citoplasma i les prolongacions axonals i dendrítiques. Aquest marcatge coincideix amb l'observat en la mort neuronal de rosegadors quan s'ha utilitzat el mateix anticòs (per exemple: Ferrer et al., 1996a; Messina et al., 1996).

Els estudis per microscòpia electrònica ens demostren que la immunoreactivitat citoplasmàtica no està associada a cap orgànul cel·lular, encara que en algunes cèl·lules s'han vist cossos més densos similars a lisosomes secundaris o cossos residuals. També, s'ha detectat un marcatge molt dèbil en el nucli d'algunes cèl·lules picnòtiques però que respecta les esferes de cromatina condensada.

Hi ha estudis realitzats amb diferents tipus de cèl·lules en què s'ha descrit una relació entre l'increment de la immunoreactivitat de c-Jun/sc45 i el nombre de cèl·lules picnòtiques durant el desenvolupament o després de la inducció d'apoptosi per diferents agents o lesions (Grand et al., 1995; Messina et al., 1996; Soriano et al., 1996; Ferrer et al., 1996 a,b; 1997 a,b,c; Pozas et al., 1997; Garrah et al., 1998; Ayala et al., 1999). Així resta demostrat que l'increment del nombre de cèl·lules c-Jun/sc45 positives en la regió cervical, lumbar i en el DGR durant el desenvolupament o després d'axotomia, LBR i tractament amb  $\beta$ -Bgtx sempre va associat a un increment del nombre de cèl·lules picnòtiques, però no totes les partícules picnòtiques/TUNEL positives s'han vist associades a una immunoreactivitat positiva per c-Jun/sc45. Probablement, això és degut a què aquestes partícules són restes cel·lulars ja fagocitades o cossos apoptòtics que es troben en la fase final de l'apoptosi.

El fet que l'anticòs c-Jun/sc45 estigui dirigit contra el pèptid TPTPQFLCPKNVTD del domini amino-terminal de c-Jun, condueix a qüestionar si la immunoreactivitat associada a cèl·lules apoptòtiques és una conseqüència de l'acumulació de c-Jun en el citoplasma. Un cop comparat el patró d'immunoreactivitat per c-Jun/sc45 amb els resultats per c-Jun/mAB o amb els d'altres estudis en què es mostra la distribució cel·lular de c-Jun, s'ha observat diferències entre els dos marcatges. Per exemple, s'ha descrit que c-Jun, normalment es localitza al nucli (De Felipe i Hunt, 1994; Haas et al., 1996; Jaarsma et al., 1996), fins i tot quan es detecta en cèl·lules apoptòtiques ( Ham et al., 1995) o en cèl·lules

en fases molt inicials de l'apoptosi (Miller et al., 1997). En canvi, l'anticòs c-Jun/sc45 reconeix moltes bandes del citoplasma que degut a la seva mobilitat cap d'elles no correspon a c-Jun. Per tant, sembla que la immunoreactivitat per c-Jun/sc45 no representa una acumulació de c-Jun en el citoplasma sinó que aquest anticòs reconeix altres antigens diferents de c-Jun i que aquests podrien estar relacionats amb la mort apoptòtica.

Els experiments realitzats amb l'anticòs policlonal c-Jun/AB2, dirigit contra la mateixa seqüència aminoacídica que c-Jun/sc45, mostraven el mateix patró d'immunoreactivitat. La preincubació de c-Jun/sc45 i c-Jun/AB2 amb el pèptid immunògen eliminava completament el marcatge cosa que ens demostra que la immunoreactivitat citoplasmàtica no és deguda a una inespecificitat o contaminació dels anticossos.

En conclusió, l'expressió de determinants antigènics citoplasmàtics detectats per c-Jun/sc45 sembla ser un fenomen molt estés, ja que en tots els models estudiats en què es produeix mort apoptòtica, tant natural com induïda, s'ha observat el mateix patró d'immunoreactivitat citoplasmàtica associada a cèl·lules neuronals o no-neuronals amb característiques nuclears pròpies de la fase d'execució de l'apoptosi.

## **8.- LA IMMUNOREACTIVITAT PER c-JUN/SC45 I CASPASA-3 ACTIVADA MOSTRA UNA ESTRETA CORRELACIÓ.**

L'activació de la caspasa-3 s'ha relacionat amb canvis nuclears associats a la fase d'execució de l'apoptosi i s'ha vist que és essencial durant la mort cel·lular morfogenètica en el cervell de mamífers (Kuida et al., 1996), en l'apoptosi del sistema immunitari (Fernandez-Alnmeri et al., 1994) i en l'apoptosi de molts tipus cel·lulars induïda per diferents estímuls (Martins et al., 1997). Els estudis immunohistoquímics realitzats amb anticossos dirigits contra la caspasa-3 activada mostren un patró d'immunoreactivitat citoplasmàtic, "Golgi-like", associat a cèl·lules picnòtiques/TUNEL positives localitzades a nivell de la LMC, cosa que demostra que la caspasa-3 està implicada en la PCD de les MNs espinals. Aquests resultats estan d'acord amb els estudis de Li et al., (1998) que demostren que DEVD-CHO, un

inhibidor de la caspasa-3, protegeix les MNs de la seva PCD tant “in vitro” com “in vivo”. Els estudis immunohistoquímics ens demostren que els antígens detectats per c-Jun/sc45 i caspasa-3 activada es localitzen en el citoplasma de les MNs apoptòtiques. Aquests resultats coincideixen amb els d'altres estudis en què s'ha utilitzat un anticòs contra l'heptapèptid CKGDEVD, el qual es correspon amb un domini de la poly-ADP-ribosa que es troba ubicat a continuació del lloc de trencament per la caspasa-3 (Siman et al., 1999). Aquest anticòs mostra un patró d'immunoreactivitat, en quant a la seva distribució, freqüència i morfologia, idèntic al de l'anticòs c-Jun/sc45, cosa que ens demostra que c-Jun/sc45 detecta antígens que s'expressen en les MNs durant la fase d'execució de l'apoptosi.

## **9.- EFICIÈNCIA DE L'ANTICÒS c-JUN/SC45 PER A LA DETECCIÓ DE CÈL·LULES APOPTÒTIQUES EN SECCIONS HISTOLÒGIQUES.**

Una de les tècniques histoquímiques més utilitzades per la detecció de cèl·lules apoptòtiques en talls histològics és la tècnica TUNEL, però cal tenir en compte, que la identificació de cèl·lules apoptòtiques gràcies a aquesta tècnica en seccions histològiques ha estat molt qüestionada, ja que diversos estudis demostren que en molts casos, la mort per necrosi també mostra el DNA fragmentat en escala (ladder) i positivitat a la tècnica TUNEL. Això ens indica que no sempre hi ha una correlació directa entre cèl·lules TUNEL positives i apoptosi (Charriaut-Marlangue i Ben-Ari, 1995; Van Lookeren Campagne et al., 1995; Dong et al., 1997; Gwag et al., 1997; Sohn et al., 1998, Fujikawa et al., 1999; Ishimaru et al., 1999; Fujikawa et al., 2000).

En els experiments realitzats amb embrions de pollastre en els quals s'ha induït la mort necròtica (amb NMDA) o apoptòtica (amb  $\beta$ -Bgtx), s'ha observat un increment del nombre de cèl·lules TUNEL positives en els dos tipus de mort. Mentre que la immunoreactivitat de c-Jun/sc45 o de caspasa-3 activada només s'ha observat en aquelles cèl·lules que moren per apoptosi, i no per necrosi.

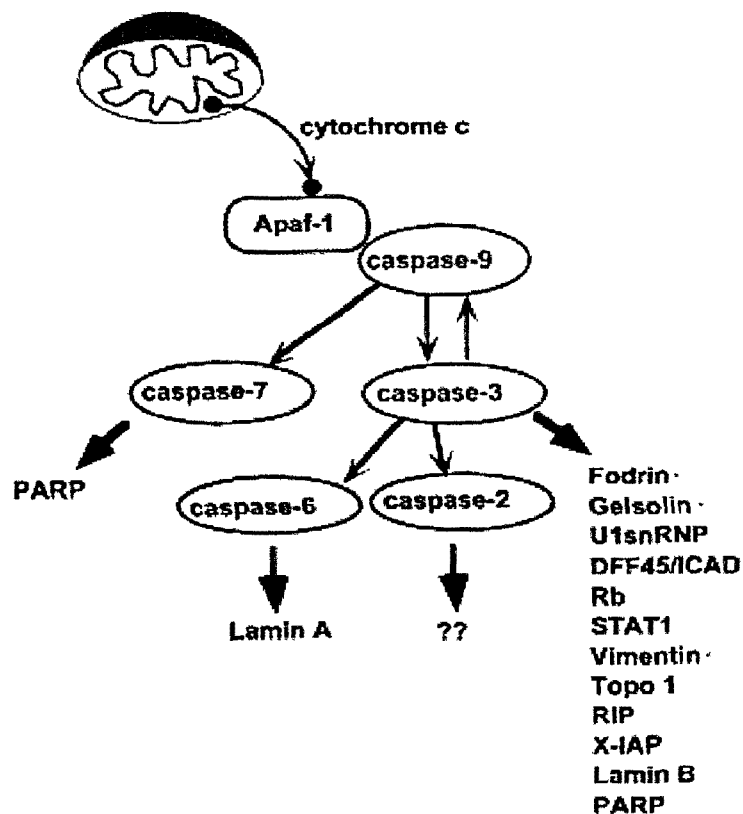
El tractament amb 1mg d'NMDA provoca una lesió excitotòxica en la medul·la espinal de l'embrió de pollastre on moltes neurones moren per necrosi (Calderó et al., 1997). Després de 12h de l'administració aguda d'NMDA fou detectat un gran

nombre de cèl·lules TUNEL positives distribuïdes per tota la medul·la espinal. A nivell ultraestructural aquestes cèl·lules tenen característiques necròtiques. Només, a nivell de la banya ventral, es va veure un petit nombre de cèl·lules aïllades que eren c-Jun/sc45 o caspasa-3 positives i que també eren TUNEL positives. Així doncs, després del tractament amb NMDA, la majoria de cèl·lules TUNEL positives presenten característiques morfològiques pròpies de les cèl·lules necròtiques, la qual cosa indica que la tècnica TUNEL és poc específica per identificar cèl·lules apoptòtiques, ja que també detecta cèl·lules amb morfologia necròtica.

Per altra banda, els embrions tractats amb  $\beta$ -Bgtx ens mostren un increment de cèl·lules TUNEL positives associat a un increment de la immunoreactivitat c-Jun/sc45 i caspasa-3. El fet que la mort de les MNs en aquest model sigui apoptòtica, i que es produeixi l'activació de la caspasa-3 en les mateixes cèl·lules que són immunoreactives per c-Jun/sc-45 ens demostra que els anticossos c-Jun/sc45 són més apropiats que la tècnica TUNEL per a distingir les cèl·lules apoptòtiques de les necròtiques en seccions histològiques.

## **10.- ELS ANTÍGENS DETECTATS PER c-JUN/SC45 SÓN PRODUCTE DE L'ACTIVITAT CASPASA-3.**

S'ha descrit, a partir d'experiments realitzats amb sistemes "cell-free", que els principals executors que formen part de la maquinària bàsica de mort és localitzen a nivell del citosol. La caspasa-3 pertany a la família de proteases citoplasmàtiques, anomenades caspases, que es caracteritzen per tenir un residu de cisteïna en el seu lloc actiu i per tallar les proteïnes després de restes d'aspartat (Alnemri et al., 1996). La caspasa-3 es considerada un dels executors clau de l'apoptosi, ja que és la responsable de la proteolisi de moltes proteïnes durant aquest procés (Cohen, 1997). La detecció "in situ" de l'activitat caspasa-3 representa un excel·lent marcador de cèl·lules apoptòtiques quan estan en la fase executora (veure Esquema 1, adaptat de Slee et al., 2000).



**Esquema 1.** Esquema representatiu de les caspases que s'activen per via mitocondrial i alguns dels substrats que trenquen les caspases efectores. La caspasa-3 és la principal executora d'aquesta via essencial per l'apoptosi de la majoria de tipus cel·lulars. (adaptat de Slee et al., 2000).

Els resultats obtinguts "in situ" després de la digestió amb la caspasa-3 activa en seccions de medul·la espinal, demostren que la immunoreactivitat citoplasmàtica de c-Jun/sc45 augmenta significativament en el soma de les MNs que tenen una morfologia nuclear normal, i per tant, es detecta la immunoreactivitat per c-Jun/sc45 en cèl·lules que no presenten nuclis picnòtics. Aquestes MNs mostren un marcatge idèntic a l'observat en cèl·lules apoptòtiques amb l'anticòs c-Jun/sc45. Aquest marcatge emergeix com a resultat de l'activitat de la caspasa-3, ja que en incubar les mostres simultàniament amb caspasa-3 i Z-VAD, un inhibidor específic de caspasa-3, el marcatge de c-Jun/sc45 en les MNs desapareix.

En les anàlisis de dot i western blot amb extractes de medul·la espinal a E10 tractats amb la caspasa-3 activa s'ha observat un increment de la diversitat i de la

quantitat de substrats que són immunoreactius per c-Jun/sc45. L'aparició d'aquests nous antígens és una conseqüència de l'activitat caspasa-3; ja que la immunoreactivitat per c-Jun/sc45 no apareix quan les mostres han estat tractades simultàniament amb caspasa-3 i Z-VAD.

L'anàlisi per western blot amb l'anticòs c-Jun/sc45 d'extractes citosòlics tractats amb caspasa-3, mostra diverses bandes amb diferents pesos moleculars que molt probablement, sorgeixen com a conseqüència de l'activitat caspasa, ja que Z-VAD també és capaç de bloquejar l'aparició d'aquestes bandes. Per tant, el tractament amb caspasa-3 activa, en mostres de medul·la espinal, és capaç de reproduir el mateix patró d'immunoreactivitat que mostren les cèl·lules apoptòtiques amb l'anticòs c-Jun/sc45, però en cèl·lules completament normals. Aquests resultats estan en concordança amb altres estudis que indiquen que la caspasa-3, durant la fase d'execució de l'apoptosi, trenca un gran nombre de substrats citoplasmàtics, com per exemple, la fodrina, gelsolina i vimentina (Janicke et al., 1998; Kothakota et al., 1997; Hashimoto et al., 1998) generant un ampli ventall de nous antígens, alguns dels quals podrien ser reconeguts per c-Jun/sc45.

Recentment, estudis realitzats en el nostre laboratori amb cèl·lules de neuroblastoma humà han permès identificar, amb l'anticòs c-Jun/sc45, un nou antígen que es detecta en cèl·lules apoptòtiques i que sorgeix del trencament de la seryl-tRNA sintetasa mitjançat per l'activitat proteolítica de la caspasa-3 (Casas et al., 2001).

En conjunt, aquests resultats suggereixen que l'anticòs c-Jun/sc45 sembla reconèixer diversos fragments de diferents proteïnes que es generen en ser tallats per la caspasa-3 durant la fase executora de l'apoptosi i, en conseqüència, es pot considerar que c-Jun/sc45 en realitat detecta neoepítops apareguts com a resultat de l'activitat caspasa-3. Per tant, és evident que pot representar una eina útil a l'hora d'identificar noves proteïnes substrats de caspasa-3; essent un marcador excel·lent i fiable per a l'estudi immunohistoquímic de cèl·lules apoptòtiques en seccions histològiques.



## **VIII. CONCLUSIONS**

- 1.- c-Jun es detecta específicament en el nucli de les motoneurons espinals de la columna motora lateral de l'embrió de pollastre durant el desenvolupament.
- 2.- Els nivells de c-Jun i la seva expressió s'incrementen abans i després del pic màxim de mort cel·lular programada natural o induïda de les motoneurons espinals lumbars.
- 3.- La inducció de c-Jun abans de la mort cel·lular programada està associada a la seva fosforilació en la serina 63 i a un increment dels nivells de la JNK1 en el nucli de les motoneurons.
- 4.- La inducció de c-Jun es produïx en una fase prèvia a la fase executora de l'apoptosi en les motoneurons espinals de l'embrió de pollastre.
- 5.- La inducció de c-Jun després del procés de mort no està relacionada amb un increment de la seva fosforilació i no està associada a un increment dels nivells de JNK1.
- 6.- El muscimol, agonista dels receptors GABA<sub>A</sub>, té un efecte neuroprotector sobre les motoneurons durant la PCD i rebaixa els nivells de c-Jun en les motoneurons abans i després del pic màxim de mort.
- 7.- L'increment dels nivells de c-Jun després del pic de mort és independent de la seva fosforilació en la serina 63 i sembla estar relacionat amb l'activitat.

8.- Els anticossos policlonals c-Jun/sc45 reconeixen antígens citoplasmàtics que apareixen durant la fase d'execució de l'apoptosi i no estan associats a cèl·lules normals ni a cèl·lules necròtiques.

9.- Els anticossos c-Jun/sc45 reconeixen antígens propis de cèl·lules apoptòtiques tant en cèl·lules neuronals com no neuronals.

10.- Els antígens que reconeixen els anticossos c-Jun/sc45 sorgeixen per acció proteolítica de la caspasa -3 sobre diferents substrats.

11.- El anticossos c-Jun/sc45 permeten detectar l'activitat caspasa-3 en talls histològics.

12.- Els anticossos c-Jun/sc45 permeten discriminar millor entre cèl·lules apoptòtiques i necròtiques que la tècnica TUNEL.

## **IX. BIBLIOGRAFIA**

- Abate, C., Luk, D., Gentz, R., Rauscher, F.J.III., Curran, T. (1990) Expression and purification of the leucine zipper and DNA-binding domains of Fos and Jun: both Fos and Jun contact DNA directly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1032-1036.
- Adams, J.M., Cory, S. (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-1326.
- Almendral, J.M., Sommer, D., Macdonald-Bravo, H., Burckhardt, D., Perera, J., Bravo, R. (1988) Complexity of the early genetic response to growth factors in mouse fibroblast. *Mol. Cell. Biol.* 8, 2140-2148.
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.S., Wong, W.W., Yuan, J. (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell (Cambridge, Mass.)* 87, 171.
- Ameisen, J. C. (1996) The origin of programmed cell death. *Science* 272, 1278-1279.
- An, B., Dou, Q.P. (1996) Cleavage of retinoblastoma protein during apoptosis: an interleukin 1 beta-converting enzyme-like protease as candidate. *Cancer Res.* 56, 438-442.
- Anderson, A.J., Cummings, B.J., Cotman, C.W. (1994) Increased immunoreactivity for Jun- and Fos-related proteins in Alzheimer's disease: association with pathology. *Exp. Neurol.* 125, 286-295.
- Anderson, A.J., Su, J.H., Cotman, C.W. (1996) DNA damage and apoptosis in Alzheimer's disease: colocalization with c-Jun immunoreactivity, relationship to brain area, and effect of postmortem delay. *J. Neurosci. Res.* 16, 1710-1719.
- Angel, P., Hattori, K., Smeal, T., Karin, M. (1988) The jun protooncogene is positively autoregulated by its product: Jun/AP-1. *Cell* 55, 875-885.
- Angel, P., Karin, M. (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1072, 129-57.
- Ankarcrona, M., Dypbukt, J.M., Bonfoco, E., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Lipton, S.A., Nicotera, P. (1995) Glutamate-induced neural death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 15, 961-973.
- Apel, I., Yu, C.L., Wang, T., Dobry, C., Van Antwerp, M.E., Jove, R., Prochownik, E.V. (1992) Regulation of the junB gene by v-src. *Mol. Cell Biol.* 12, 3356-3364.

- Armstrong, R. C., Clarke, P.G.H. (1979) Neuronal death and the development of the pontine nuclei and inferior olive in the chick. *Neuroscience* 4, 1635-1647.
- Auwerx, J., Sassone-Corsi, P. (1991) IP-1: a dominant inhibitor of Fos/Jun whose activity is modulated by phosphorylation. *Cell* 64, 983-993.
- Ayala, V., Casas, C., Ribera, J., Calderó, J., Oppenheim, R.W., Esquerda, J. (1999) Specific association of c-Jun-like immunoreactivity but not c-Jun p39 with normal and induced programmed cell death in the chick embryo. *J. Neurobiol.* 38, 171-190.
- Bakhshi, A., Jensen, J.P., Goldman, P., Wright, J.J., McBride, O.W., Epstein, A.L. Korsmeyer, S.J. (1985) Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 41, 899-906.
- Balazs, R., Hack, N., Jorgensen, O.S. (1988) N-methyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells in culture. *Neuroscience* 27, 437-451.
- Bannister, A.J., Brown, H.J., Sutherland, J.A., Kouzarides, T. (1994) Phosphorylation of the c-fos and c-jun HOB1 motif stimulates its activation capacity. *Nucleic Acids Res.* 22, 5173-5176.
- Barger, S.W., Mattson, M.P. (1995) Excitatory amino acids and growth factors: biological and molecular interactions regulating neuronal survival and plasticity. En *CNS neurotransmitters and neuromodulators: glutamate*, ed. Stone, T.W. (CRC Press, Boca Raton), 273-294.
- Barres, B.A., Hurt, I.K., Coles, H.S.R., Burne, J., Voyvodic, J.T., Richardson, W.D., Raff, M.C. (1992) Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell (Cambridge, Mass.)* 70, 31-46.
- Bartel, D.P., Sheng, M., Lau, L.F., Greenberg, M.E. (1989) Growth factors and membrane depolarization activate distinct programs of early response gene expression: dissociation of fos and jun induction. *Genes Dev.* 3, 304-313.
- Beard, J. (1896) The history of a transient nervous apparatus in certain Ichthyopsida. An account of the development and degeneration of ganglion-cells and nerve fibers. *Zool. Jahrbücher ABT Morphol.* 9, 1-106.
- Behrens, A., Sibilio, M., Wagner, E.F. (1999) Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. *Nat. Genet.* 21, 326-329.
- Bengzon, J., Soderstrom, S., Kokaia, Z., Kokaia, M., Ernfors, P., Persson, H., Ebendal, T., Lindvall, O. (1992) Widespread increase of nerve growth factor

- protein in the rat forebrain after kindling-induced seizures. *Brain Res.* 587,338-342.
- Blaschke, A. J., Staley, K., Chun, J. (1996) Widespread programmed cell death in proliferative and postmitotic regions of the fetal cerebral cortex. *Development* (Cambridge, U.K.) 122, 1165-1174.
- Bohmann, D., Bos, T.J., Admon, A., Nishimura, T., Vogt, P.K., Tjian, R. (1987) Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. *Science Rev.* 238, 1386-1392.
- Bonfoco, E., Krainc, D., Ankarcona, M., Nicotera, P., Lipton, S.A. (1995) Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7162-7166.
- Bos, T.J., Monteclaro, F.S., Mitsunobu, F., Ball, A.R. Jr., Chang, C.H., Nishimura, T., Vogt, P.K. (1990) Efficient transformation of chicken embryo fibroblasts by c-Jun requires structural modification in coding and noncoding sequences. *Genes Dev.* 4, 1677-1687.
- Brecht, S., Martin-Villalba, M., Zuschratter, W., Bravo, R., Herdegen, T. (1995) Transection of fimbria-fornix induces lasting expression of c-Jun protein in axotomized septal neurons immunonegative for choline acetyltransferase and nitric oxide synthase. *Exp. Neurol.* 134, 112-125.
- Brenner, D.A., O'Hara, M., Angel, P., Chojkier, M., Karin, M. (1989) Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumour necrosis factor. *Nature* 337, 661-663.
- Brockstedt, E., Rickers, A., Kostka, S., Laubersheimer, A., Dorken, B., Wittmann-Liebold, B., Bommert, K., Otto, A. (1998) Identification of apoptosis-associated proteins in a human Burkitt lymphoma cell line. Cleavage of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 by caspase 3. *J. Biol. Chem.* 273, 28057-28064.
- Brown, H.J., Sutherland, J.A., Cook, A., Bannister, A.J., Kouzarides, T. (1995) An inhibitor domain in c-Fos regulates activation domains containing the HOB 1 motif. *EMBO J.* 14, 124-131.
- Burek, M.J., Oppenheim, R.W. (1999) Cellular interactions in the developing vertebrate nervous system. In *Cell Death in Diseases of the Nervous system* (V. Koliatsos and R. Ratan, eds.) pp. 145-180. Humana Press., NJ.
- Buttayan, R., Zakeri, Z., Lockshin, R., Wolgemuth, D. (1988) Cascade induction of c-fos, c-myc, and heat shock 70K transcripts during regression of the rat

ventral prostate gland. *Mol. Endocrinol.* 2, 650-657.

- Calderó, J., Ciutat, D., Lladó, J., Castán, E., Oppenheim, R. W., Esquerda, J. E. (1997) Effects of excitatory amino acids on neuromuscular development in the chick embryo. *J. Comp. Neurol.* 387, 73-95.
- Calderó, J., Prevet, D., Mei, X., Oakley, R.A., Li, L., Milligan, C., Houenou, L., Burek, M., Oppenheim, R.W. (1998) Peripheral target regulation of the development and survival of spinal sensory and motoneurons in the chick embryo. *J. Neurosci.* 18, 356-370.
- Carriedo, S.G., Yin, H.Z., Weis, J.H. (1996) Motor neurons are selectively vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated injury in vitro. *J. Neurosci.* 16, 4069-4079.
- Casas, C., Ribera, J., Esquerda, J. (2001) Antibodies against c-Jun N-terminal peptide cross-react with neo-epitopes emerging after caspase-mediated proteolysis during apoptosis. (*J. Neurochem.* In Press).
- Casanovas, A., Ribera, J., Hager, G., Kreutzberg, G.W., Esquerda, J. (2001). c-Jun regulation in rat neonatal motoneurons postaxotomy (*JNR*, In Press)
- Castellazi, M., Spyrou, G., La Vista, N., Dangy, J.P., Piu, F., Yaniv, Mand Brun, G. (1991) Overexpression of c-jun, junB, or junD affects cell growth differently. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8890-8894.
- Cavigelli, M., Dolfi, F., Claret, F.X., Karin, M. (1995) Induction of c-fos expression through JNK-mediated TCF/Elk-1 phosphorylation. *EMBO J.* 14, 5957-5964.
- Chang, C.C., Chen, T.F., Lee, C.Y. (1973) Studies of the presynaptic effect of bungarotoxin on neuromuscular transmission. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 184, 339-345.
- Charriaut-Marlangue, C., Ben-Ari, Y. (1995) A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. *Neuroreport.* 7, 61-64.
- Chawla, S., Hardingham, G.E., Quinn, D.R., Bading, H. (1998) CBP: a signal-regulated transcriptional coactivator controlled by nuclear calcium and CaM kinase IV. *Science* 281, 1505-1509.
- Chen, C.Y.A., Shyu, A.B. (1994) Selective degradation of early-response-gene mRNAs: functional analyses of sequence features of AU-rich element. *Mol. Cell. Biol.* 14, 8471-8482.
- Chinnaiyan, A.M., Dixit, V.M. (1996) The cell-death machine. *Curr Biol. Rev.* 6, 555-562.



- Chiu, R., Angel, P., Karin, M. (1989) JUN B differs in its biological properties from, and is a negative regulator of c-JUN. *Cell* 59, 979-986.
- Choi, D.W. (1987) Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J. Neurosci.* 7, 369-379.
- Choi, D.W. (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1, 623-634.
- Choi, D.W. (1992) Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol.* 23, 1261-1276.
- Chu-Wang, I-W., Oppenheim, R.W. (1978) Cell death of motoneurons in the chick embryo spinal cord I. A light and electron microscopic study of naturally occurring and induced cell loss during development. *J. Comp. Neurol.* 177, 33-58.
- Ciutat, D., Esquerda, J.E., Calderó, J. (1995) Evidence for calcium regulation of spinal cord motoneuron death in the chick embryo in vivo. *Dev. Brain Res.* 86, 167-179.
- Ciutat, D., Calderó, J., Oppenheim, R. W. and Esquerda, J. E. (1996) Schwann cell apoptosis during normal development and after axonal degeneration induced by neurotoxins in the chick embryo. *J. Neurosci.* 16, 3979-3990.
- Clarke, P.G.H. (1990) Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat. Embryol.* 181, 195-213.
- Clarke, P.G.H. Oppenheim, R.W. (1995) Neuron death in vertebrate development: in vivo methods. En L.M. Schwartz, and B.A. Osborne (eds) : *Methods in cell biology: Cell death* . Vol. 46. New York: Academic Press, 277-321.
- Clarke, P.G.H. (1999) Apoptosis versus necrosis: how valid a dichotomy for neurons. In *Cell Death in Diseases of the Nervous system* (V. Koliatsos and R. Ratan, eds.) pp. 3-28. Humana Press., NJ.
- Cohen, G.M., Sun, X.M., Snowden, R.T., Dinsdale, D., Skilleter, D.N. (1992) Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. *Biochem. J.* 286, 331-334.
- Cohen, G.M. (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J. Rev.* 326, 1-16.
- Collin, R. (1906) Recherches cytologique sur le developpement de la cellule nerveuse. *Nevraxe* 8, 181-308.
- Collins, F., Lile, J.D. (1989) The role of dihydropyridine-sensitive voltage-gated calcium channels in potassium-mediated neuronal survival. *Brain Res.* 502,

99-108.

- Collins, F., Schmidt, M.F., Guthrie, P.B., Kater, S.B. (1991) Sustained increase in intracellular calcium promotes neuronal survival. *J. Neurosci.* 11, 2582-2587.
- Colotta, F., Polentarutti, N., Sironi, M., Mantovani, A. (1992) Expression and involvement of c-fos and c-jun protooncogenes in programmed cell death induced by growth factor deprivation in lymphoid cell lines. *J. Biol. Chem.* 267, 18278-18283.
- Cotman, C.W., Monaghan, D.T., Ottersen, O.P., Storm-Mathisen, J. (1987) Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their pathways. *Trends Neurosci.* 10, 273-280.
- Cowan, W.M., Fawcett, J.W., O'Leary, D.D.M., Stanfield, B.B. (1984) Regressive events in neurogenesis. *Science* 225, 1258-1265.
- Cruzalegui, F.H., Hardingham, G.E., Bading, H. (1999) C-Jun functions as a calcium-regulated transcriptional activator in the absence of JNK/SAPK1 activation. *EMBO J.* 18, 1335-1344.
- Cryns, V., Yuan, J. (1998) Proteases to die for. *Gene. Dev.* 12, 1551-1570.
- Curran, T., Miller, A.D., Zokas, L., Verma, L.I. (1984) Viral and cellular for proteins: a comparative analysis. *Cell* 36, 259-268.
- Dahm, L.M., Landmesser, L.T. (1991) The regulation of synaptogenesis during normal development and following activity blockade. *J. Neurosci.* 11, 238-255.
- Davies, A. M. (1994) Role of neurotrophins in the developing nervous system. *J. Neurobiol.* 25, 1334-1348.
- Davis, B.M., Frank, E., Johnson, F.A., Scott, S.A. (1989) Development of central projections of lumbosacral sensory neurons in the chick. *J Comp Neurol.* 1989 Jan 22;279(4):556-66.
- De Felipe, C., Hunt, S.P. (1994) The differential control of c-jun expression in regenerating sensory neurons and their associated glia cells. *J. Neurosci.* 14, 2911-2923.
- de Groot, R.P., Karperien, M., Pals, C., Kruijer, W. (1991a) Characterization of the mouse junD promoter high basal level activity due to an octamer motif. *EMBO J.* 10, 2523-2532.
- de Groot, R.P., Meijer, I., van den Brink, S., Mummery, C., Kruijer, W. (1991b) Differential regulation of JunB and JunD by adenovirus type 5 and 12 E1A

proteins. *Oncogene*. 6, 2357-2361.

- Deas O, Dumont C, MacFarlane M, Rouleau M, Hebib C, Harper F, Hirsch F, Charpentier B, Cohen GM, Senik A. (1998) Caspase-independent cell death induced by anti-CD2 or staurosporine in activated human peripheral T lymphocytes. *J. Immunol.* 161, 3375-3383.
- Deckwerth, T.L., Easton, R.M., Knudson, C.M., Korsmeyer, S.J., Johnson, E.M. (1998) Related Placement of the BCL2 family member BAX in the death pathway of sympathetic neurons activated by trophic factor deprivation. *Exp. Neurol.* 152, 150-162.
- Deng, T., Karin, M. (1994) C-Fos transcriptional activity stimulated by H-Ras activated protein kinase distinct from JNK and ERK. *Nature* 371, 171-174.
- Derijard, B., Hibi, M., Wu, I.H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M., Davis, R.J. (1994) JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 76, 1025-1037.
- Deshmukh, M., Johnson, E.M. Jr. (1998) Evidence of a novel event during neuronal death: development of competence-to-die in response to cytoplasmic cytochrome c. *Neuron*. 21, 695-705.
- Ding, R., Jansen, J.K., Laing, N.G., Tonnesen, H.(1983) The innervation of skeletal muscles in chickens curarized during early development. *J. Neurocytol.* 12, 887-919.
- D'Mello, S.R., Galli, C., Ciotti, T., Calissano, P. (1993) Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 10989-10993.
- Dong, Z., Saikumar, P., Weinberg, J.M., Venkatachalam, M.A. (1997) Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine proteases. *Am. J. Path.* 151, 1205-1213.
- Dong, C., Yang, D.D., Wysk, M., Whitmarsh, A.J., Davis, R.J., Flavell, R.A. (1998) Defective T cell differentiation in the absence of Jnk1. *Science* 282, 2092-2095
- Dragunow, M., Yamada, N., Bilkey, D.K., Lawlor, P. (1992) Induction of immediate-early gene proteins in dentate granule cells and somatostatin interneurons after hippocampal seizures. *Brain Res. Mol.* 13, 119-126.
- Easton, R.M., Deckwerth, T.L., Parsadanian, A.S., Johnson, E.M. (1997) Analysis of the mechanism of loss of trophic factor dependence associated with neuronal maturation: a phenotype indistinguishable from Bax deletion. *J.*

Neurosci. 17, 9656-9666.

- Edwards, D.R. (1994) Cell signalling and the control of gene transcription. *Trends Pharmacol. Sci.* 15, 239-244.
- Eggen, B.J., Nielander, H.B., Rensen-de Leeuw, M.G., Schotman, P., Gispen, W.H., Schrama, L.H. (1994) Identification of two promoter regions in the rat B-50/GAP-43 gene. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 23, 221-234.
- Eilers, A., Whitfield, J., Babij, C., Rubin, LL., Ham, J. (1998) Role of the Jun kinase pathway in the regulation of c-Jun expression and apoptosis in sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 18, 1713-1724.
- Eilers, A., Whitfield, J., Vekrellis, K., Neame, S.J., Shah, B., Ham, J. (1999) C-Jun and Bax: regulators of programmed cell death in developing neurons. *Biochem. Soc. Trans.* 27, 790-797.
- Ellis R.E., Yuan, J., Horvitz, H.R. (1991) Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 7, 663-698.
- Enfors, P., Bengzon, J., Persson, H., Lindvall, O. (1991) Increased levels of messenger RNAs for neurotrophic factors in the brain during kindling epileptogenesis. *Neuron* 7, 165-176.
- Ernst, M. (1926) Über Untergang von Zellen während der normalen Entwicklung bei Wilbeltieren. *Z. Anat. Entwicklungsgesch.* 79, 228-262.
- Estus, S., Zaks, Wj., Freeman, R.S., Gruda, M., Bravo, R., Johnson, E.M. jr. (1994) Altered gene expression in neurons during programmed cell death: identification of c-jun as necessary for neuronal apoptosis. *J. Cell Biol.* 127, 1717-1727.
- Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., Alnemri, E.S. (1994) CPP-32 a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 269, 30761-30764.
- Fernandes-Alnemri, T., Takahashi, A., Armstrong, R., Krebs, J., Fritz, L., Tomaselli, K.J., Wang, L., Yu, Z., Croce, C.M., Salveson, G. (1995) Mch3, a novel human apoptotic cysteine protease highly related to CPP32. *Cancer Res.* 15, 6045-6052.
- Ferrer, I. (1996a) Cell death in the normal developing brain, and following ionizing radiation, methyl-azoxymethanol acetate, and hypoxia-ischaemia in the rat. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 22, 489-494.
- Ferrer, I., Martin, F., Serrano, T., Reiriz, J., Perez-Navarro, E., Alberch, J., Macaya,

- A., Planas, A.M. (1995) Both apoptosis and necrosis occurring following intrastriatal administration of excitotoxins. *Acta Neuropathol.* 90, 504- 510.
- Ferrer, I., Olivé, M., Ribera, J., Planas, A.M. (1996b) Naturally occurring (programmed) and radiation-induced apoptosis are associated with selective c-Jun expression in the developing rat brain. *Eur. J. Neurosci.* 8, 1286-1298.
- Ferrer, I., Olivé, M., Blanco, R., Cinos, C., Planas, A.M. (1996c) Selective c-Jun overexpression is associated with ionizing radiation-induced apoptosis in the developing cerebellum of the rat. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 38, 91-100.
- Ferrer, I., Seguí, J., Olivé, M. (1996d) Strong c-Jun immunoreactivity is associated with apoptotic cell death in human tumors of the central nervous system. *Neurosci Lett.* 1996 Aug 16;214(1):49-52.
- Ferrer, I., Ballabriga, J., Pozas, E. (1997a) Transient forebrain ischemia in the adult gerbil is associated with a complex c-Jun response. *Neuroreport* 8, 2483-2487.
- Ferrer, I., Planas, A.M., Pozas, E. (1997b) Radiation-induced apoptosis in developing rats and kainic acid-induced excitotoxicity in adult rats are associated with distinctive morphological and biochemical c-Jun/AP-1 (N) expression. *Neuroscience* 80, 449-458.
- Ferrer, I., Pozas, E., Ballabriga, J., Planas, A.M. (1997c) Strong c-Jun/AP-1 immunoreactivity is restricted to apoptotic cells following intracerebral ibotenic acid injection in developing rats. *Neurosci. Res.* 28, 21-31.
- Ferrer, I., Pozas, E., Marti, M., Blanco, R., Planas, A.M. (1997d) Methylazoxymethanol acetate-induced apoptosis in the external granule cell layer of the developing cerebellum of the rat is associated with strong c-Jun expression and formation of high molecular weight c-Jun complexes. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56, 1-9. febrero
- Franklin, J.L., Johnson, E.M. (1992) Suppression of programmed neural death by sustained elevation of cytoplasmic calcium. *Trends Neurosci.* 15, 501-508.
- Franklin, J.L., Sanz-Rodriguez, C., Juhasz, A., Deckwerth, T.L., Johnson, E.M. (1995) Chronic depolarization prevents programmed cell death of sympathetic neurons in vitro but does not support growth: requirement for Ca<sup>++</sup> influx but not Trk activation. *J. Neurosci.* 15, 643-664.
- Fraser, A., Evan, G. (1996) A license to kill. *Cell Review* 85, 781-784.
- Freeman, F.M., Rose, S.P. (1999) Expression of Fos and Jun proteins following passive avoidance training in the day-old chick. *Learn Mem.* 6, 389-397.

- Fuchs, S.Y., Dolan, L., Davis, R.J., Ronai, Z. (1996) Phosphorylation-dependent targeting of c-Jun ubiquitination by Jun N-kinase. *Oncogene*. 13, 1531-1535.
- Fujikawa, D.G., Shinmei, S.S., Cai, B. (1999) Lithium-pilocarpine-induced status epilepticus necrotic neurons with internucleosomal DNA fragmentation in adult rats. *Eur. J. Neurosci*. 11, 1605-1614.
- Fujikawa, D.G., Shinmei, S.S., Cai, B. (2000) Kainic acid-induced seizures produce necrotic, not apoptotic, neurons with internucleosomal DNA cleavage: implications for programmed cell death mechanisms. *Neuroscience* 98, 41-53.
- Garrah, J.M., Bisby, M.A., Rossiter, J.P.(1998) Immunolabelling of the cytoplasm and processes of apoptotic facial motoneurons following axotomy in the neonatal rat. *Acta Neuropathol (Berl)*. 95, 223-228.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S.A. (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol*. 119, 493-501.
- Gillardon, F., Eschenfelder, C., Uhlmann, E., Hartschuh, W., Zimmermann, M. (1994) Differential regulation of c-fos, fosB, c-jun, junB, bcl-2 and bax expression in rat skin following single or chronic ultraviolet irradiation and in vivo modulation by antisense oligodeoxynucleotide superfusion. *Oncogene*. 9, 3219-3225.
- Ginty, D.D., Bonni, A., Greenberg, M.E. (1994) Nerve growth factor activates a Ras-dependent protein kinase that stimulates c-fos transcription via phosphorylation of CREB. *Cell* 77, 713-725.
- Glicksman, M.A., Chiu, A.Y., Dionne, C.A., Harty, M., Kaneko, M., Murakata, C., Oppenheim, R.W., Prevette, D., Sengelaub, D.R., Vaught, J.L., Neff, N.T. (1998) CEP-1347/KT7515 prevents motor neuronal programmed cell death and injury-induced dedifferentiation in vivo. *J. Neurobiol*. 35, 361-370.
- Glover, J.N., Harrison, S.C. (1995) Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature* 373, 257-261
- Gluksmann, A. (1951) Cell death in normal vertebrate ontogeny. *Biol. Rev.* 26, 59-86.
- Gluksmann, A. (1965) Cell death in normal development. *Arch Biol (Liege)*76, 419-437
- Golberg, Y.P., Nicholson, D.W., Rasper, D.M., Kalchman, M.A., Koide, H.B., Graham, R.K., Bromm, M., Kazemi-Esfarjani, P., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Hayden, M.R. (1996) Cleavage of huntingtin by apopain,

a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract. *Nat. Genet.* 13, 442-449.

- Gold, B.G., Storm-Dickerson, T., Austin D.R. (1993) Regulation of the transcription factor c-JUN by nerve growth factor in adult sensory neurons. *Neurosci. Lett.* 14, 882
- Gonzalez-Martin, C., de Diego, I., Crespo, D., Fairen, A. (1992) Transient c-fos expression accompanies naturally occurring cell death in the developing interhemispheric cortex of the rat. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 68, 83-95.
- Grand, R.J., Milner, A.E., Mustoe, T., Johnson, G.D., Owen, D., Grant, M.L., Gregory, C.D. (1995) A novel protein expressed in mammalian cells undergoing apoptosis. *Exp. Cell Res.* 218, 439-451.
- Greenberg, J. T. (1996) Programmed cell death: a way of live for plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 12094-12097.
- Greensmith, L., Vrbova, G. (1991) Neuromuscular contacts in the developing rat soleus depend on muscle activity. *Brain Res. Dev.* 62, 121-129.
- Guegan, C., Levy, V., David, J.P., Ajchenbaum-Cymbalista, F., Sola, B. (1997) c-Jun and cyclin D1 proteins as mediators of neuronal death after a focal ischaemic insult. *Neuroreport.* 8, 1003-1007.
- Gupta, S., Campbell, D., Derijard, B., Davis, R.J. (1995) Transcription factor ATF-2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science* 267, 389-393.
- Gwag, B.J., Koh, J.Y., Demaro, J.A., Ying, H.S., Jacquin, M., Choi, D.W. (1997) Slowly triggered excitotoxicity occurs by necrosis in cortical cultures. *Neuroscience* 77, 393-401.
- Haas, C.A., Donath, C., Kreutzberg, G.W. (1993) Differential expression of immediate early genes after transection of the facial nerve. *Neuroscience.* 53, 91-99.
- Haas, C.A., Deller, T., Naumann, T., Frotscher, M. (1996) Selective expression of the immediate early gene c-jun in axotomized rat medial septal neurons is not related to neuronal degeneration. *J. Neurosci.* 16, 1894-1903.
- Hagmeier, B.M., Konig, H., Herr, I., Offringa, R., Zantema, A., van der Eb, A., Herrlich, P., Angel, P. (1993) Adenovirus E1A negatively and positively modulates transcription of AP-1 dependent genes by dimer-specific regulation of the DNA binding and transactivation activities of Jun. *EMBO J.* 12, 3559-3572.
- Halazonetis, T.D., Georgeopoulos, K., Greenberg, M.E., Leder, P. (1988) -c-Jun

dimerizes with itself and with c-fos forming complexes of different DNA binding abilities. *Cell* 55, 917-924.

- Ham, J., Babij, C., Witfield, J., Pfarr, C.M., Lallemand, D., Yaniv, M., Rubin, LL. (1995) A c-jun dominant negative mutant protects sympathetic neurons against programmed cell death. *Neuron* 14, 927-939.
- Hamburger, V. (1958) Regression versus peripheral control of differentiation in motor hypoplasia. *Am. J. Anat.* 102, 365-409.
- Hamburger, V., Levi-Montalcini, R. (1949) Proliferation differentiation and degeneration in the spinal ganglia of the chick embryo under normal and experimental conditions. *J. Exp. Zool.* 111, 457-502.
- Hamburger, V., Hamilton, R.H. (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* 88, 49-92.
- Hamburger, V., Balaban, M., Oppenheim, R., Wenger, E. (1965) Periodic motility of normal and spinal chick embryos between 8 and 17 days of incubation. *J. Exp. Zool.* 159, 1-13.
- Hamburger, V. (1975) Cell death in the development of the lateral motor column of the chick embryo. *J. Comp. Neurol.* 160, 535-546.
- Hamburger, V., Brunso-Bechtold, J.K., Yip, J.W. (1981) Neuronal death in the spinal ganglia of the chick embryo and its reduction by nerve growth factor. *J. Neurosci.* 1, 60-71
- Hamburger, V., Oppenheim, R. W. (1982) Naturally-occurring neural death in vertebrates. *Neurosci. Comment.* 1, 38-55.
- Han, T.H., Lamph, W.W., Prywes, R. (1992) Mapping of epidermal growth factor-, serum-, and phorbol ester-responsive sequence elements in the c-jun promoter. *Mol. Cell Biol.* 12, 4472-4477.
- Harding, T.C., Xue, L., Bienemann, A., Haywood, D., Dickens, M., Tolkovsky, A.M., Uney, J.B. (2000) Inhibition of c-Jun N-terminal kinase by overexpression of the JNK binding domain of JIP-1 prevents apoptosis in sympathetic neurons. *J Biol Chem.* [epub ahead of print]
- Hardingham, G.E., Chawla, S., Johnson, C.M., Bading, H. (1997) Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature* 385, 260-265.
- Hardingham, G.E., Chawla, S., Cruzalegui, F.H., Bading, H. (1999) Control of recruitment and transcription-activating function of CBP determines gene regulation by NMDA receptors and L-type calcium channels. *Neuron* 22,



- Harlan, R.E., Garcia, M.M. (1995) Charting of Jun family members proteins in the rat forebrain and midbrain: immunocytochemical evidence for a new Jun-related antigen. *Brain res.* 692, 1-22.
- Harrington, E.A., Fanidi, A., Evan, G.I. (1994) Oncogenes and cell death. *Curr. Opin. Genes Dev.* 4, 120-129.
- Hashimoto, M., Inoue, S., Ogawa, S., Conrad, C., Muramatsu, M., Shackelford, D., Masliah, E. (1998) Rapid fragmentation of vimentin in human skin fibroblasts exposed to tamoxifen: a possible involvement of caspase-3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247, 401-406.
- Henderson, C.E. (1996) Role of neurotrophic factors in neural development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 160, 535-546.
- Herdegen, T., Bastmeyer, M., Bahr, M., Stuermer, C., Bravo, R., Zimmermann, M. (1993a) Expression of JUN, KROX, and CREB transcription factors in goldfish and rat retinal ganglion cells following optic nerve lesion is related to axonal sprouting. *J. Neurobiol.* 24,528-543.
- Herdegen, T., Brecht, S., Mayer, B., Leah, J., Kummer, W., Bravo, R., Zimmermann, M. (1993b) Long-lasting expression of JUN and KROX transcription factors and nitric oxide synthase in intrinsic neurons of the rat brain following axotomy. *J. Neurosci.* 13, 4130-4145.
- Herdegen, T., Fiallos-Estrada, C.E., Bravo, R., Zimmermann, M.(1993c) Colocalisation and covariation of c-JUN transcription factor with galanin in primary afferent neurons and with CGRP in spinal motoneurons following transection of rat sciatic nerve. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 17, 147-154.
- Herdegen, T., Skene, P., Bähr, M. (1997) The c-jun transcription factor-bipotential mediator of neuronal death, survival and regeneration. *TINS* 20, 227-231.
- Herdegen, T., Leah, J.D. (1998) Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Research Reviews* 28, 370-490.
- Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A., Karin, M. (1993) Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev.* 7, 2135-2148.
- Hilberg, F., Wagner, E.F. (1992) Embryonic stem (ES) cells lacking functional c-jun: consequences for growth and differentiation, AP-1 activity and tumorigenicity. *Oncogene* 7, 2371-2380.

- Hilberg, F., Aguzzi, A., Howells, N., Wagner, E.F. (1993) C-jun is essential for normal mouse development and hepatogenesis. *Nature* 365, 179-181.
- Hollman, M., Heineman, S. (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 17, 31-108.
- Hollyday, M., Hamburger, V. (1976) Reduction of the naturally occurring motor neuron loss by enlargement of the periphery. *J. Comp. Neurol.* 170, 311-320.
- Homma, S., Yaginuma, H., and Oppenheim, R. W. (1994) Programmed cell death during the earliest stages of spinal cord development in the chick embryo: A possible means of early phenotypic selection. *J. Comp. Neurol.* 345, 377-395.
- Houenou. L.J., Li, L., Lo, A.C., Yan, Q., Oppenheim, R.W. (1994) Naturally occurring and axotomy-induced motoneuron death and its prevention by neurotrophic agents: a comparison between chick and mouse. *Prog. Brain Res. Review* 102, 217-226.
- Houenou, L.J., Oppenheim, R.W., Li, L., Lo, A.C., Prevet, D.(1996) Regulation of spinal motoneuron survival by GDNF during development and following injury. *Cell Tissue. Res.* 286, 219-223.
- Hughes, P., Lawlor, P., Dragunow, M. (1992) Basal expression of Fos, Fos-related, Jun, and Krox 24 proteins in rat hippocampus. *Mol. Brain Res.* 13, 355-357.
- Hughes, P., Dragunow, M. (1995) Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. *Pharmacol. Rev.* 47, 133-178.
- Hughes, P.E., Young, D., Preston, K.M., Qiao, Y., Dragunow, M. (1998) Differential regulation by MK801 of immediate-early genes, brain-derived neurotrophic factor and trk receptor mRNA induced by a kindling afterdischarge. *Mol. Brain Res.* 53, 138-151.
- Hughes, P.E., Alexi, T., Walton, M., Williams C.E., Dragunow, M., Clark, R.G. (1999) Activity and injury-dependent expression of inducible transcription factors, growth factors and apoptosis-related genes within the central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 57, 421-450.
- Ip, Y.T., Davis, R.J. (1998) Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr. Opin. Cell Biol. Review* 10, 205-219.
- Ishimaru, M.J., Ikonomidou, C., Tenkenova, T.I., Der, T.C., Dikranian, K., Sesma, M.A., Olney, J.W. (1999) Distinguishing excitotoxicity from apoptotic neurodegeneration in the developing rat brain. *J. Comp. Neurol.* 408, 461-476.

- Jaarsma, D., Holstege, J.C., Troost, D., Davis, M., Kennis, J., Haasdijk, E.D., de Jong, V.J. (1996) Induction of c-Jun immunoreactivity in spinal cord and brainstem neurons in a transgenic mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Lett.* 219, 179-182.
- Jacobson, M.D., Burne, J.F., Raff, M.C. (1994) Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus. *EMBO J.* 13, 1899-1910.
- Janicke, R.U., Ng, P., Sprengart, M.L., Porter, A.G. (1998) Caspase-3 is required for alpha-fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273, 15540-1555.
- Jenkins, R., Hunt, S.P. (1991) Long-term increase in the levels of c-jun mRNA and Jun protein-like immunoreactivity in motor and sensory neurons following axon damage. *Neurosci. Lett.* 129, 107-110.
- Johnson Jr, E.M., Koike, T., Franklin, J. (1992) A "calcium set-point" hypothesis of neuronal dependence on neurotrophic factor. *Exp. Neurol.* 115, 163-166.
- Johnson, R., Spiegelman, B., Hanahan, D., Wisdom, R. (1996) Cellular transformation and malignancy induced by ras require c-jun. *Mol. Cell Biol.* 16, 4504-4511.
- Johnson, R.S., van Lingen, B., Papaioannou, V.E., Spiegelman, B.M. (1993) A null mutation at the c-jun locus causes embryonic lethality and retarded cell growth in culture. *Genes Dev.* 7, 1309-1317.
- Jones, V., and Wasterlain, C.G. (1979) Effect of inhibitors of protein synthesis on the development of kindled seizures in rats. *Exp. Neurol.* 66, 524-532.
- Jooss, K.U., Funk, M., Müller, R. (1994) An autonomous N-terminal transactivation domain in fos protein plays a crucial role in transformation. *EMBO J.* 13, 1467-1475.
- Kallunki, T., Su, B., Tsigelny, I., Sluss, H.K., Derijard, B., Moore, G., Davis, R., Karin, M. (1994) JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation. *Genes Dev.* 8, 2996-3007.
- Kallunki, T., Deng, T., Hibi, M., Karin, M. (1996) c-Jun can recruit JNK to phosphorylate dimerization partners via specific docking interactions. *Cell* 87, 929-939.
- Karin, M. (1994) Signal transduction from the cell surface to the nucleus through the phosphorylation of transcription factors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 415-424.

- Karin, M., Liu, Zg., Zandi, E. (1997) AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 240-246.
- Kawahara, A., Ohsawa, Y., Matsumura, H., Uchiyama, Y., Nagata, S. (1998) Caspase-independent cell killing by Fas-associated protein with death domain. *J. Cell Biol.* 143, 4587-4596.
- Kawaski, I., Lochner, K. (1997) Socioeconomic status. *Cancer Causes Control* 8, Suppl 1:39-42.
- Kerppola, T.K., Curran, T. (1991) Transcription factor interactions: basics on zippers. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1, 71-79.
- Kerr, J. F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British J. Cancer.* 26, 239-257.
- Kerr, J.F., Searle, J., Harmon, B.V., Bishop, C.J. (1987) Apoptosi. In: *Perspectives on mammalian cell death.* De C.S. Potten Oxford Uni. Press. pp, 92-128.
- Kitabayashi, I., Saka, F., Gachelin, G., Yokoyama, K. (1990) Nucleotide sequence of rat c-jun protooncogene. *Nucleic Acids Res.* 29, 147-156.
- Koike, T., Tanaka, S. (1991) Evidence that nerve growth factor dependence of sympathetic neurons for survival in vitro may be determined by levels of cytoplasmic free Ca<sup>2+</sup>. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 3892-3896.
- Korsching, S. (1993) The neurotrophic factor concept: a re-examination. *J. Neurosci.* 13, 2739-2748.
- Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T.J., Kirschner, M.W., Kohts, K., Kwiatkowski, D.J., Williams, L.T. (1997) Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector or morphological change in apoptosis. *Science* 278, 294-298.
- Kouroku, Y., Urase, K., Fujita, E., Isahara, K., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y., Momio, M.Y., Momio, T. (1998) Detection of activated caspase-3 by a cleavage site-directed antiserum during naturally occurring DRG neurons apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247, 780-784.
- Kouzarides, T., Ziff, E. (1989) Leucine zippers of fos, jun and GCN4 dictate dimerization specificity and thereby control DNA binding. *Nature* 340, 568-571.
- Kovary, K., Bravo, R. (1991) The Jun and Fos proteins families are both required for cell cycle progression in fibroblasts. *Mol. Cell Biol.* 11, 4466-4472.

- Kovary, K., Bravo, R. (1992) Existence of different Fos/Jun complexes during G0-to-G1 transition and during exponential growth in mouse fibroblasts: differential role of Fos proteins. *Mol. Cell. Biol.* 12, 5015-5023.
- Krueger, B.K., Burne, J.F., Raff, M.C. (1995) Evidence for large-scale astrocyte death in developing cerebellum. *J. Neurosci.* 15, 3366-3374.
- Kuan, C.Y., Yang, D.D., Samanta Roy, D.R., Davis, R.J., Rakic, P., Flavell, R.A. (1999) The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron* 22, 667-676.
- Kuida, K., Zheng, T.S., Na, S., Kuan, C., Yang, D., Karasuyama, H., Rakic, P., Flavell, R.A. (1996) Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP-32 deficient mice. *Nature (London)* 384, 368-372.
- Kuida, K., Haydar, T.F., Kuan, C.Y., Gu, Y., Taya, C. (1998) Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* 94, 325-337.
- Landschultz, W.H., Johnson, P.F., Mcknight, S.L. (1988) The DNA leucine zipper: a potential structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240, 1759-1764.
- Larmet, Y., Dolphin, A.C., Davies, A.M. (1992) Intracellular calcium regulates the survival of early sensory neurons before they become dependent of neurotrophics factors. *Neuron* 9, 563-574.
- Lau, L.F., Nathans, D. (1985) Identification of a set of genes expressed during the G0/G1 transition of cultured mouse cells. *Embo. J.* 4, 3145-3151.
- Leah, J.D., Herdegen, T., Bravo, R. (1991) Selective expression of Jun proteins following axotomy and axonal transport block in peripheral nerves in the rat: evidence for a role in the regeneration process. *Brain. Res.* 566, 198-207.
- Leah, J.D., Herdegen, T., Murashov, A., Dragunow, M., Bravo, R. (1993) Differential expression of immediate-early gene proteins following axotomy and inhibition of axonal transport in the rat CNS. *Neuroscience* 57, 53-66.
- Lee CY, Chang CC. (1966) Modes of actions of purified toxins from elapid venoms on neuromuscular transmission. *Mem. Inst. Butantan.* 33, 555-572
- Lee, M.T., Koebbe, M.J., O'Donovan, M.J. (1988) The development of sensorimotor synaptic connections in the lumbosacral cord of the chick embryo. *J. Neurosci.* 8, 2530-2543.
- Leppa, S., Saffrich, R., Ansorge, W., Bohmann, D. (1998) Differential regulation of c-Jun by ERK and JNK during PC12 cell differentiation. *EMBO J.* 17, 4404-

4413.

- Li, L., Prevette, D., Oppenheim, R.W. (1998) Involvement of specific caspases in motoneurons cell death "in vivo" and "in vitro" following trophic factor deprivation. *Mol. Cell Neuroscience* 12, 157-167.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., Wang, X. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489.
- Lipton, S.A., Rosenberg, P.A. (1994) Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N. Engl. J. Med.* 330, 613-622.
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., Wang, X. (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147-157.
- Lladó, J., Calderó, J., Ribera, J., Tarabal, O., Oppenheim, R.W., Esquerda, J. (1999) Opposing effects of excitatory amino acids on chick embryo spinal cord motoneurons: excitotoxic degeneration or prevention of programmed cell death. *J. Neurosci.* 19, 10803-10812.
- Lloyd, A., Yancheva, N., Wasyluk, B. (1991) Transformation suppressor activity of a Jun transcription factor lacking its activation domain. *Nature* 352, 635-638.
- Lord, K.A., Abdollahi, A., Hoffman-Liebermann, B., Liebermann, D.A. (1993) Proto-oncogenes of the fos/jun family of transcription factors are positive regulators of myeloid differentiation. *Mol. Cell Biol.* 13, 841-845.
- Maki, Y., Bos, T.J., Davis, C., Starbuck, M., Vogt, P.K. (1987) Avian sarcoma virus 17 carries the jun oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 2848-2852.
- Maroney, A.C., Glicksman, M.A., Basma, A.N., Walton, K.M., Knight, E. Jr., Murphy, C.A., Bartlett, B.A., Finn, J.P., Angeles, T., Matsuda, Y., Neff, N.T., Dionne, C.A. (1998) Motoneuron apoptosis is blocked by CEP-1347 (KT 7515), a novel inhibitor of the JNK signaling pathway. *J. Neurosci.* 18, 104-111.
- Marti, A., Jehn, B., Costello, E., Keon, N., Ke, G., Martin, F., Jaggi, R. (1994) Protein kinase A and AP-1 (c-fos/ junD) are induced during apoptosis of mouse mammary epithelial cells. *Oncogene* 9, 1213-1223.
- Martin, D.P., Schmidt, R.E., DiStefano, P.S., Lowry, O.H., Carter, J.G., Johnson, E.M.Jr. (1988) Inhibitors of protein synthesis and RNA synthesis prevent neuronal death caused by nerve growth factor deprivation. *J. Cell. Biol.* 106, 829-844.

- Martin, S.J., Green, D.R., (1995) Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts?. *Cell* 82, 349-352.
- Martin, S.J., O'Brien, G.A., Nishioka, W.K., McGahon, A.J., Mahboubi, A., Saido, T.C., Green, D.R. (1995) Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 270, 6425-6428.
- Martins, L.M., Kottke, T., Mesner, P.W., Basi, G.S., Sinha, S., Frigon, N.Jr., Tatar, E., Tung, J.S., Bryant, K., Takahashi, A., Svingen, P.A., Madden, B.J., McCormick, D.J., Earnshaw, W.C., Kaufmann, S.H. (1997) Activation of multiple interleukin-1 beta converting enzyme homologues in cytosol and nuclei of HL-60 cells during etoposide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272, 7421-7430.
- McKay, S. E., and Oppenheim, R. W. (1991) Lack of evidence for cell deaths among avian spinal cord interneurons during normal development and following removal of targets and afferents. *J. Neurobiol.* 22, 721-733.
- McNamara JO. (1994) Identification of genetic defect of an epilepsy: strategies for therapeutic advances. *Epilepsia* 35, Suppl 1:51-57.
- Means AR. (1988) Molecular mechanisms of action of calmodulin. *Recent. Prog. Horm. Res.* 44, 223-262.
- Means, A.R., VanBerkum, M.F., Bagchi, I., Lu, K.P., Rasmussen, C.D. (1991) Regulatory functions of calmodulin. *Pharmacol. Ther.* 50, 255-270.
- Mellström, B., Achaval, M., Montero, D., Naranjo, J.R., Sassone-Corsi, P. (1991) Differential expression of the jun family members in rat brain. *Oncogene* 6, 1959-1964.
- Mesner, P.W., Winters, T.R., Green, S.H. (1992) Nerve growth factor withdrawal-induced cell death in neuronal PC12 cells resembles that in sympathetic neurons. *J. Cell Biol.* 119, 1669-1680.
- Mesner, P.W., Epting, C.L., Hegarty, J.L., Green, S.H. (1995) A timetable of events during programmed cell death induced by trophic factor withdrawal from neuronal PC12 cells. *J. Neurosci.* 15, 7357-7366
- Messina, A., Jaworowski, A., Bell, C. (1996) Detection of Jun but not Fos protein during developmental cell death in sympathetic neurons. *J. Comp. Neurol.* 372, 544-550.
- Mielke, K., Herdegen, T. (2000) JNK and p38 stresskinases--degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. *Prog. Neurobiol. Review* 61, 45-60.

- Miller, T.M., Johnson, E.M. Jr. (1996) Metabolic and genetic analyses of apoptosis in potassium/serum-deprived rat cerebellar granule cells. *J. Neurosci.* 16, 7487-7495.
- Miller, T.M., Moulder, K.L., Knudson, C.M., Creedon, D.J., Deshmukh, M., Korsmeyer, S.J., Johnson, E.M. (1997) Bax deletion further orders the cell death pathway in cerebellar granule cells and suggests a caspase-independent pathway to cell death. *J. Cell Biol.* 139, 205-217.
- Montecclaro, F.S., Vogt, P.K. (1993) A Jun-binding protein related to a putative tumor suppressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6726-6730.
- Morgan, J.I., Curran, T. (1991) Proto-oncogene transcription factors and epilepsy. *TIPS* 12, 343-349.
- Musti, A.M., Treier, M., Bohmann, D. (1997) Reduced ubiquitin-dependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAP kinases. *Science* 275, 400-402.
- Nagata, S. (1997) Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-365.
- Neame, S.J., Rubin, LL., Philpott, K.L. (1998) Blocking cytochrome c activity within intact neurons inhibits apoptosis. *J. Cell Biol.* 142, 1583-1593.
- Nevidi, E., Hevroni, D., Naot, D., Israeli, D., Citri, Y. (1993) Numerous candidate plasticity-related genes revealed by differential cDNA cloning. *Nature* 363, 718-721.
- Nijhawan, D., Honarpour, N., Wang, X. (2000) Apoptosis in neural development and disease. *Annu. Rev. Neurosci.* 23, 73-87.
- Oakley, R.A., Lefcort, F.B., Clary, D.O., Reichart, L.F., Prevette, D., Oppenheim, R.W., Frank, E. (1997) Neurotrophin-3 promotes the differentiation of muscle spindle afferents in the absence of peripheral targets. *J. Neurosci.* 17, 4262-4274.
- Oberhammer, F., Fritsch, G., Pavelka, M., Froschl, G., Tiefenbacher, R., Purchio, T., Schulte-Hermann, R. (1992) Induction of apoptosis in cultured hepatocytes and in the regressing liver by transforming growth factor-beta 1 occurs without activation of an endonuclease. *Toxicol. Lett. Dec*, 64-65 Spec. No., 701-704.
- Oberhammer, F., Fritsch, G., Schmied, M., Pavelka, M., Printz, D., Purchio, T., Lassmann, H., Schulte-Hermann, R. (1993a) Condensation of the chromatin at the membrane of an apoptotic nucleus is not associated with activation of an endonuclease. *J. Cell Sci.* 104, 317-326.



- Oberhammer, F., Wilson, J.W., Dive, C., Morris, I.D., Hickman, J.A., Wakeling, A.E., Walker, P.R., Sikorska, M.(1993b) Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J.* 12, 3679-3684.
- O'Brien, M.K., Oppenheim, R.W. (1990) Development and survival of thoracic motoneurons and hindlimb musculature following transplantation of the thoracic neural tube to the lumbar region in the chick embryo: anatomical aspects. *J. Neurobiol.* 21, 313-340.
- O'Brien, R.A., Ostberg, A.J., Vrbova, G. (1978) Observations on the elimination of polyneuronal innervation in developing mammalian skeletal muscle. *J. Physiol.* 282, 571-582.
- Okado, N., and Oppenheim, R. W. (1984) Cell death of motoneurons in the chick embryo spinal cord. IX. The loss of motoneurons following removal of afferent inputs. *J. Neurosci.* 4, 1639-1652.
- Olney, J.W. (1986) Inciting excitotoxic cytocide among central neurons. *Adv. Exp. Med. Biol.* 203, 631-645.
- Oo, T.F., Henchcliffe, C., James, D., Burke, R.E. (1999) Expression of c-fos, c-jun, and c-jun N-terminal kinase (JNK) in a developmental model of induced apoptotic death in neurons of the substantia nigra. *J. Neurochem.* 72, 557-564.
- Oppenheim, R.W. (1987) Muscle activity and motoneuron death in the spinal cord of the chick embryo. En *Selective Neuronal Death*, ed. G. Bock, M. O'Connor, 96-112. New York : Wiley.
- Oppenheim, R. W. (1989) The neurotrophic theory of naturally occurring motoneuron death. *Trens Neurosci.* 12, 252-255.
- Oppenheim, R. W. (1991) Cell death during development of the nervous systems. *Annu. Rev. Neurosci.* 14, 453-501.
- Oppenheim, R.W. (1996) Neurotrophic survival molecules for motoneurons: an embarrassment of riches. *Neuron* 17, 195-197.
- Oppenheim, R. W. (1999) Programmed cell death. En "*Fundamental Neuroscience*" Ed.: Zigmond, M.J., Bloom, F.E., Landis, S.C., Roberts, J.L., Squire, L.R. 581-609.
- Oppenheim, R.W., Chu-wang, I. (1977) Spontaneous cell death of spinal motoneurons following peripheral innervation in the chick embryo. *Brain Res.* 125, 154-160.

- Oppenheim, R. W., Chu-Wang, I.-W., Foelix, R. F. (1978) Cell death of motoneurons in the chick embryo spinal cord. III. The differentiation of motoneurons prior to their induced degeneration following limb-bud removal. *J. Comp. Neurol.* 177, 87-112.
- Oppenheim, R.W., Majors-Willard, C. (1978) Neuronal cell death in the brachial spinal cord of the chick is unrelated to the loss of polyneuronal innervation in wing muscle. *Brain Res.* 154, 148-152.
- Oppenheim, R. W., Nuñez, R. (1982) Electrical stimulation of hindlimb increases neuronal cell death in chick embryo. *Nature* 295, 57-59.
- Oppenheim, R.W., Maderdrut, J.L., Wells, D.J. (1982) Cell death of motoneurons in the chick embryo spinal cord. VI. Reduction of naturally occurring cell death in the thoracolumbar column of Terni by nerve growth factor. *J. Comp. Neurol.* 210, 174-189.
- Oppenheim, R.W., Cole, T., Prevet, D. (1989) Early regional variations in motoneuron numbers arise by differential proliferation in the chick embryo spinal cord. *Dev. Biol.* 133, 468-474.
- Oppenheim, R.W., Prevet, D., Tytell, M., Homa, S. (1990) Naturally occurring and induced neuronal death in the chick embryo in vivo requires protein and RNA synthesis: evidence for the role of death genes. *Dev. Biol.* 138, 104-113.
- Oppenheim, R.W., Houenou, L.J., Johnson, J.E., Lin, L.F., Li, L., Lo, A.C., Newsome, A.L., Prevet, D.M., Wang, S. (1995) Developing motor neurons rescued from programmed and axotomy-induced cell death by GDNF. *Nature* 373, 344-346.
- Osborne, B.A., Schwartz, L.M. (1994) Essential genes that regulate apoptosis. *Trends Cell Biol.* 4, 394-398.
- O'Shea, E.K., Rutkowski, R., Kim, P.S. (1989) Evidence that the leucine zipper is a coiled coil. *Science* 243, 538-542.
- Pena, E., Berciano, M.T., Fernandez, R., Crespo, P., Lafarga, M. (2000) Stress-induced activation of c-Jun N-terminal kinase in sensory ganglion neurons: accumulation in nuclear domains enriched in splicing factors and distribution in perichromatin fibrils. *Exp. Cell Res.* 256, 179-191.
- Pennica, D., Arce, V., Swanson, T.A., Vejsada, R., Pollock, R.A., Armanini, M., Dudley, K., Phillips, H.S., Rosenthal, A., Kato, A.C., Henderson, C.E. (1996) Cardiotrophin-1, a cytokine present in embryonic muscle, supports long-term survival of spinal motoneurons. *Neuron* 17, 63-74.

- Phinney, D.G., Keiper, C.L., Francis, M.K., Ryder, K. (1994) Quantitative analysis of the contribution made by 5'-flanking and 3'-flanking sequences to the transcriptional regulation of junB by growth factors. *Oncogene* 9, 2353-2362.
- Pittman, R.H., Oppenheim, R.W. (1978) Neuromuscular blockade increases motoneurone survival during normal cell death in the chick embryo. *Nature* 271, 346-365.
- Pittman, R.H., Oppenheim, R.W. (1979) Cell death of motoneurons in the chick embryo spinal cord. IV. Evidence that a functional neuromuscular interaction is involved in the regulation of naturally occurring cell death and the stabilization of synapses. *J. Comp. Neurol.* 187, 425-446.
- Pittman, R.N., Messam, C.A., Mills, J.C. (1999) Asynchronous death as a characteristic feature of apoptosis. *Cell death and diseases of the nervous system* edited V.E. Koliatsos and R.R. Ratan. Humana Press. Inc. Totowa, Nj. 29-43.
- Portera-Cailliau, C., Hedreen, J.C., Price, D.L., Koliatsos, V. (1995) Evidence for apoptotic cell death in Huntington disease and excitotoxic animal models. *J. Neurosci.* 15, 3775-3787.
- Pozas, E., Ballabriga, J., Planas, A.M., Ferrer, I. (1997) Kainic acid-induced excitotoxicity is associated with a complex c-Fos and c-Jun response which does not preclude either cell death or survival. *J. Neurobiol.* 33, 232-246.
- Pozas, E., Aguado, F., Ferrer, I. (1999) Localization and expression of Jun-like immunoreactivity in apoptotic neurons induced by colchicine administration in vivo and in vitro depends on the antisera used. *Acta. Neuropathol. (Berl).* 98, 119-128.
- Pulverer, B.J., Kyriakis, J.M., Avruch, J., Nikolakaki, E., Woodgett, J.R. (1991) Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* 353, 670-674.
- Putcha, G.V., Deshmukh, M., Johnson, E.M. (2000) Inhibition of apoptotic signaling cascades causes loss of trophic factor dependence during neuronal maturation. *J. Cell Biol.* 149, 1011-1018.
- Raff, M.C., Barres, B.A., Burne, J.F., Coles, H.S., Ishizaki, Y., Jacobson, M.D. (1993) Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science* 262, 695-700.
- Roffler-Tarlov, S., Brown, J.J., Tarlov, E., Staralov, J., Chapman, D.L., Alexiou, M., Papaionnou, V.E. (1996) Programmed cell death in the absence of c-Fos and c-Jun. *Development* 122, 1-9.

- Rothstein, J.D., Jin, L., Dikes-Hoberg, M., Kuncel, R.W. (1993) Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6591-6595.
- Rozek, D., Pfeifer, G.P. (1993) In vivo protein-DNA interactions at the c-jun promoter: preformed complexes mediate the UV response. *Mol. Cell Biol.* 13, 5490-5499.
- Samali, A., Zhivotovsky, B., Jones, D., Nagata, S., Orrenius, S. (1999) Apoptosis: cell death defined by caspase activation. *Cell Death Differ.* 6, 495-496.
- Sassone-Corsi, P., Sisson, J.C., Verma, I.M. (1988) Transcriptional autoregulation of the proto-oncogene fos. *Nature* 334, 314-319.
- Saunders, J. W. (1966) Death in embryonic systems. *Science* 154, 604-612.
- Schligensiepen, K.H., Schligensiepen, R., Kunst, M., Klinger, I., Gerdes, W., Seifert, W., Brysch, W. (1993) Opposite functions of Jun-B and c-Jun in growth regulation and neural differentiations. *Dev. Genet.* 14, 305-312.
- Schreiber, M., Kolbus, A., Piu, F., Szabowski, A., Mohle-Steinlein, U., Tian, J., Karin, M., Angel, P., Wagner, E.F. (1999) Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. *Genes Dev.* 13, 607-619.
- Schulman, H., Hyman, S.E. (1999) Intracellular signaling. *Fundamental neuroscience (Academia Press.)* 10, 269-316.
- Schütte, J., Viallet, J., Nau, M., Segal, S., Fedorko, J., Minna, J. (1989) Jun-B inhibits and c-fos stimulates the transforming and trans-activating activities of c-jun. *Cell* 59, 987-997.
- Schwartz, L.M. (1991) The role of cell death genes during development. *Bioessays.* 13, 389-395.
- Schwarzschild, M.A., Cole, R.L., Hyman, S.E. (1997) Glutamate, but not dopamine, stimulates stress-activated protein kinase and AP-1-mediated transcription in striatal neurons. *J. Neurosci.* 17, 3455-3466.
- Scott, S.A., Davies, A.M. (1990) Inhibition of protein synthesis prevents cell death in sensory and parasympathetic neurons deprived of neurotrophic factor in vitro. *J. Neurobiol.* 21, 630-638.
- Sendtner, M., Kreutzberg, G.W., Thoenen, H. (1990) Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. *Nature* 345, 440-441.
- Sendtner, M., Holtmann, B., Kolbeck, R., Thoenen, H., Barde, Y.A. (1992) Brain-

derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section. *Nature* 360, 757-759.

- Silver, J. (1978) Cell death during development of the nervous system. *Handbook of sensory physiology*, De M. Jacobson. Pp 419-436. Berlin, Alemania: Springer-Verlag.
- Siman, R., Bozyczko-Coyne, D., Meyer, S.L., Bhat, R.V. (1999) Immunolocalization of caspase proteolysis in situ: evidence for widespread caspase-mediated apoptosis of neurons and glia in the postnatal rat brain. *Neuroscience* 92, 1425-1442.
- Slee, E.A., Adrain, C., Martin, S.J. (2000) Executioner caspases-3 and -7 perform distinct, non-redundant, roles during the demolition phase of apoptosis. *JBC* In Press.
- Smeal, T., Binetruy, B., Mercola, D., Grover-Bardwick, A., Heidecker, G., Rapp, U.R., Karin, M. (1992) Oncoprotein-mediated signalling cascade stimulates c-Jun activity by phosphorylation of serines 63 and 73. *Mol. Cell Biol.* 12, 3507-3513.
- Smeyne, R.J., Schilling, K., Robertson, L., Luk, D., Oberdick, J., Curran, T., Morgan, J.I. (1992) Fos-LacZ transgenic mouse: Mapping sites of gene induction in the central nervous system. *Neuron* 8, 13-23.
- Smeyne, R.J., Vendrell, M., Hayward, M., Baker, S.J., Miao, G., Schilling, K., Robertson, L., Curran, T., Morgan, J.I. (1993) Continuous c-fos expression precedes programmed cell death in vivo. *Nature* 363, 166-169.
- Sohn, S., Kim, E.Y., Gwag, B. (1998) Glutamate neurotoxicity in mouse cortical neurons: atypical necrosis with DNA ladders and chromatin condensation. *Neurosci. Lett.* 240, 147-150.
- Soler, R.M., Egea, J., Mintenig, G.M., Sanz-Rodriguez, C., Iglesias, M., Comella, J.X. (1998) Calmodulin is involved in membrane depolarization-mediated survival of motoneurons by phosphatidylinositol-3-kinase- and MAPK-independent mechanisms. *J. Neurosci.* 18, 1230-1239.
- Song, Q., Lees-Miller, S.P., Kumar, S., Zhang, Z., Chan, D.W., Smith, G.C., Jackson, S.P., Alnemri, E.S., Litwack, G., Khanna, K.K., Lavin, M.F. (1996) DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: a target for an ICE-like protease in apoptosis. *EMBO J.* 15, 3238-3246.
- Soriano, M.A., Ferrer, I., Rodriguez-Farré, E., Planas, A.M. (1996) Apoptosis and c-Jun in the thalamus of the rat following cortical infraction. *Neuroreport* 7, 425-428.

- Stennicke, H.R., Salvensen, G.S. (1997) Biochemical characteristics of caspases-3, -6, -7, and -8. *J. Biol. Chem.* 272, 25719-25723.
- Sugiyama, H., Ito, I., Hirono, C. (1987) A new type of glutamate receptor linked to inositol phospholipid metabolism. *Nature.* 325, 531-533.
- Szabo, E., Preis, L.H., Birrer, M.J. (1994) Constitutive c-Jun expression induces partial macrophage differentiation in U-937 cells. *Cell Growth Differ.* 5, 439-446.
- Tanaka, M., Momoi, T., Marunouchi, T. (2000) In situ detection of activated caspase-3 in apoptotic granules neurons in the developing cerebellum in slice cultures and in vivo. *Dev. Brain Res.* 121, 223-228.
- Terro, F., Yardin, C., Esclaire, F., Ayer-Lelievre, C., Hugon, J. (1998) Mild kainate toxicity produces selective motoneuron death with marked activation of Ca<sup>++</sup>-permeable AMPA/kainate receptors. *Brain Res.* 809, 319-324.
- Thompson, W.J. (1985) Activity and synapse elimination at the neuromuscular junction. *Cell Mol Neurobiol.* 5, 167-182.
- Tokuyasu, K.T. (1980) Immunocytochemistry on ultrathin frozen sections. *Histochem. J.* 12, 381-403.
- Tomei, L.D., Shapiro, J.P., Cope, F.O. (1993) Apoptosis in C3H/10T1/2 mouse embryonic cells: evidence for internucleosomal DNA modification in the absence of double-strand cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 853-857.
- Tramu, G., Pillez, A., Leonardelli, J. (1978) An efficient method of antibody elution for the successive or simultaneous localization of two antigens by immunocytochemistry. *J. Histochem Cytochem* 26, 322-324.
- Tsujiimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E., Croce, C.M. (1985) Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science.* 228,1440-1443.
- Usiak, M.F., Landmesser, L.T. (1999) Neuromuscular activity blockade induced by muscimol and d-tubocurarine differentially affect the survival of embryonic chick motoneurons. *J.Neurosci.* 19, 7925-7939.
- Van Dam, H., Duyndam, M., Rottier, R., Bosch, A., De Vries-Smits, L., Herrlich, P., Zanema, A., Angel, P., Van der Eb, A.J. (1993) Heterodimer formation of c-Jun and ATF-2 is responsible for induction of c-jun by the 243 amino acid adenovirus E1A protein. *EMBO J.* 12, 479-487.
- Van Lookeren Campagne, M., Lucassen, P.J., Vermeulen, J.P., Balázs, R. (1995) NMDA and kainate induce internucleosomal DNA cleavage associated with both apoptotic and necrotic cell death in neonatal brain. *Eur. J. Neurosci.* 7,

1627-1640.

- Vaux, D. L., Haecker, G., and Strasser, A. (1994) An evolutionary perspective apoptosis. *Cell* (Cambridge, Mass.) 76, 777-779.
- Vaux, D.L., Korsmeyer, S.J. (1999) Cell death in development. *Cell Review* 96, 245-254.
- Vinson, C.R., Sigler, P.B., Macknight, S.L. (1989) Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science* 246, 911-916.
- Virdee, K., Bannister, A.J., Hunt, S.P., Tolkovsky, A.M. (1997) Comparison between the timing of JNK activation, c-Jun phosphorylation, and onset of death commitment in sympathetic neurones. *J. Neurochem.* 69, 550-561.
- Watanabe, Y., Johnson, R.S., Butler, L.S., Binder, D.K., Speigelman, B.M., Papaioannou, V.E., McNamara, J.O. (1996) Null mutation of c-fos impairs structural and functional plasticities in the kindling model of epilepsy. *J. Neurosci.* 16, 3827-3836.
- Watson, A., Eilers, A., Lallemand, D., Kyriakis, J., Rubin, L.L., Ham, J. (1998) Phosphorylation of c-Jun is necessary for apoptosis induced by survival signal withdrawal in cerebellar granule neurons. *J. Neurosci.* 18, 751-762.
- Wilkinson, D.G., Bhatt, S., Ryseck, R.P., Bravo, R. (1989) Tissue-specific expression of c-jun and Jun B during organogenesis of the mouse. *Development* 106, 465-569.
- Windle, W.F., Orr, D.W. (1934) The development of behavior in chick embryos: spinal cord structure correlated with early somatic motility. *J. Comp. Neurol.* 60, 287-307.
- Wolter, K.G., Hsu, Y.T., Smith, C.L., Nechushtan, A., Xi, X.G., Youle, R.J. (1997) Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J. Cell Biol.* 139, 1281-1292.
- Woo, M., Hakem, R., Soengas, M.S., Duncan, G.S., Shahinian, A., Kagi, D., Hakem, A., McCurrach, M., Khoo, W., Kaufman, S.A., Senaldi, G., Howard, T., Lowe, S.W., Mak, T.W. (1998) Essential contribution of caspases 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev.* 12, 806-819.
- Wright, L.L., Cunningham, T.J., Smolen, A.J. (1983) Developmental neuron death in the rat superior cervical sympathetic ganglion: cell counts and ultrastructure. *J. Neurocytol.* 12, 727-738.
- Wyllie, A.H. (1981) Cell death: a new classification separating apoptosis from

necrosis. En Cell Death in Biology and pathology, ed: I.D.Bowen, R.A. Lockshin, 9-34. New York: Vhapman&Hall.

- Wyllie, A.H., Kerr, J.F.R., Currie, A.R. (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Intl. Rev. Cytol.* 68, 251-306.
- Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J., Greenberg, M.E. (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270, 1326-1331.
- Yaginuma, H., Tomita, M., Takashita, N., Mckay, S. E., Cardwell, C., Yin, Q.-W., Oppenheim, R. W. (1996) A novel type of programmed neuronal death in the cervical spinal cord of the chick embryo. *J. Neurosci.* 16, 3685-3703.
- Yan, Q., Elliott, J., Snider, W.D. (1992) Brain-derived neurotrophic factor rescues spinal motor neurons from axotomy-induced cell death. *Nature* 360, 753-755.
- Yang, D.D., Kuan, C.Y., Whitmarsh, A.J., Rincon, M., Zheng, T.S., Davis, R.J., Rakic, P., Flavell, R.A. (1997) Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the *Jnk3* gene. *Nature* 389, 865-870.
- Yang, D.D., Conze, D., Whitmarsh, A.J., Barrett, T., Davis, R.J., Rincon, M., Flavell, R.A.(1998) Differentiation of CD4+ T cells to Th1 cells requires MAP kinase JNK2. *Immunity* 9, 575-585.
- Yarmolinsky, M. B. (1995) Programmed cell death in bacterial populations. *Science* 267,836-837
- Zinck, R., Cahill, M.A., Kracht, M., Sachsenmaier, C., Hipskind, R.A., Nordheim, A. (1995) Protein-synthesis inhibitors reveal differential regulation of mitogen activated protein kinase pathways that converge on Elk-1. *Mol. Cell. Biol.* 15, 4930-4938.