



Universitat Autònoma de Barcelona

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Unidad de Bioquímica de Medicina

**Caracterización de la MAP kinasa ERK5 en células neuronales:
papel en la isquemia cerebral e identificación de proteínas
asociadas mediante *tandem affinity purification***

Ana Moreno Iglesias

TESIS DOCTORAL

Bellaterra 2009



Universitat Autònoma de Barcelona

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Unidad de Bioquímica de Medicina

**Caracterización de la MAP kinasa ERK5 en células neuronales:
papel en la isquemia cerebral e identificación de proteínas
asociadas mediante *tandem affinity purification***

Memoria de tesis doctoral presentada por Ana Moreno Iglesias para optar al grado de Doctor en Bioquímica y Biología Molecular por la Universidad Autónoma de Barcelona.

Trabajo realizado en la Unidad de Bioquímica de Medicina del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Barcelona, bajo la dirección del Doctor José Miguel Lizcano de Vega

Proyecto subvencionado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología BFU2004-00757/BMC. Con el soporte del Departamento de Universidades, Investigación y Sociedad de la Información de la Generalitat de Catalunya y del Fondo Social Europeo.

Bellaterra, 12 de Enero de 2009

Doctoranda

Director de tesis

Ana Moreno Iglesias

Dr. José Miguel Lizcano de Vega

A mis padres

Agradecimientos

En primer lugar agradecer a mi director de tesis, José Lizcano, por darme la oportunidad de realizar este trabajo. Por toda la ayuda y los consejos que me ha dado durante los últimos cuatro años, y en especial por darme la oportunidad de realizar una estancia en el extranjero.

A mi grupo, empezando por Arantza, que fue la primera con quien compartí poyata, todo ha sido mucho más fácil desde que llegaste. A Greti, por ser una gran compañera. A Walter, Gerard y Tatiana, por enseñarme las ganas del principio, y recordarme por qué empecé este trabajo.

A Néstor i Josep per tot l'ajut amb la Biologia Molecular (finalment ho hem aconseguit!) i en general per tots els consells.

Al Dr. José Rodríguez por la ayuda en la colaboración que hemos mantenido. A la Dra. Anna Planas por el material de la parte *in vivo* de la isquemia y por implicarse tanto en el trabajo.

A la Roser per l'ajut amb el microscopi. A la Mar per la paciència i els consells amb les inmunos i el microscopi. A la Susana per treure ferro als problemes i ser tan eficient solucionant-los. A Cris por los cultivos.

A los Saura's, que también son mi grupo, porque hemos compartido muchas cosas en el mismo laboratorio. En especial a Judit, per la visita a Manchester y les birres amb cotilleos; a Elsa por las charlas animadas de las mañanas y a Jorge por todo lo que me ha enseñado, siempre con una sonrisa (si no fuera por ti aun estaría contando células!!).

To my Mancunian group. To Cathy because she showed me a different way of working in a lab, it was a great experience. To Katie and Eunju because you two are great friends: you made my short stay in Manchester one of the best periods in my life (just because!!!). To Rob because eres la leche!! Y, por supuesto, a Bea por ser mi familia en Manchester y por todo lo que compartimos allí. THANK YOU!!!!

A Nahuai por compartir conmigo la mejor parte de este trabajo: el trabajo en equipo.

A la gente del departamento por todas esas fiestas, cafés, casas rurales, viajecitos, cenas de navidad, partidos de volei y de fútbol...gracias por hacer más fácil el día a día. Mención especial a las Unzeta's por acollir-me al seu laboratori quan nosaltres no en teníem. A la Eli, por enseñar-me tantas cosas (amb tu vaig fer el meu primer WB!!!...no pensava que en faria tants!!). Als Pica's: David, Albert i Miki, per les xerrades al despatx dels nens i els consells científics dels seminaris! David, fas que la ciència sembli més divertida...i per la teva tesi, el musical! Gràcies per haver-te deixat conèixer una mica més a fora del laboratori.

A Gema por arrastrarme al gimnasio y mantenerme en forma estos años!

A Caterina por todo el apoyo moral en esta última parte de experimentos, escritura y búsqueda de trabajo. Y por los donetes a media tarde!!

A la Montse i el Roger, que van començar amb mi aquesta etapa, per ser grans companys i compartir el dia a dia.

A todos, Mireia, Santi, David Moreno, Marta, Nati, Mar, Irene, Mariona, Patricia, Bruna, Alfredo, Nahuai, Laura, Alex, Sandra, Pauli, Tània, Comella's, Xevi, Sergi, Marta badalonina ...Muchísimas gracias!!!

A los de secretaría por facilitarnos tanto las tareas administrativas y estar siempre disponibles. En especial a Carlos, que ha sido uno más de nosotros (parece que también estás haciendo la tesis!!!) y a Santi, por ser tan eficiente y responder siempre con una sonrisa.

A todos a los que veo poco pero significan mucho: a mis amigos del cole, a Jordi (quants sopars, eh?), a Rubén (esas comidas de "empresa"), muchas gracias por seguir ahí!

A l'Alba pels cafès furtius entre incubacions (timer en mà!)

A Silvia y Nico, mis amigos de Monsagro!, por esas visitas fugaces a Barcelona, y por estar tan cerca aunque estéis a 600 km.

A Alberto, por estar siempre a mi lado, apoyarme tanto, y por enviarme grandes ofertas de trabajo!!

A les Bionenes (Neus, Núria, Anna, Roser, Vidi i Ricard) per estar sempre allà, per les birres d'entre setmana, per les teràpies de grup...per tantes coses. I amb el Martí, Ferran, Mateu, Maria i Anna Boix per les innumerables activitats lúdico-festives: les calçotades, paelles, Barraques (amb autos de choque!!), Sète, Salardú, Vilafortuny, Capmany!!! I segur que em deixo coses!! Heu fet aquesta etapa mil cops millor amb la vostra presència!

Un menció molt i molt especial a la Vidi i el Mateu (sortiu per duplicat!). Mateu, només per haver-te conegut millor ja val la pena haver vingut a l'Autònoma. Moltes gràcies per tot el recolzament, per les xerrades als passadissos, per deixar-te convèncer amb un vaaaa! Gràcies per ser un gran amic.

I Vidi, a veure com faig que unes línies facin justícia al que penso...hem compartit tantes coses en els últims anys, no et puc agrair prou tot el que has fet, els post-its, les xerrades a cultius, els esmorzars dels divendres...milions de coses. Només et puc dir que per mi ets com una germana, gràcies per estar sempre tan a prop.

I recordeu: "lo bo es fa esperar, però no en sopes" :)

A Moni, ¿qué te puedo decir!? Muchas gracias por todos los cafés, los mojitos, las charlas, las risas, todas las tardes de domingo por el barrio...Muchas gracias por estar siempre ahí.

A Juanma. Por tu gran apoyo y tu paciencia en estos últimos meses que han sido los más duros. Por responder siempre con una sonrisa y por estar tan cerca.

A mi hermano, por apoyarme siempre, aunque sea desde la otra punta del mundo. Sin ti no habría llegado hasta aquí, lo sabes.

Y finalmente, pero más importante, agradecer a mis padres, a quienes dedico esta tesis. No puedo describir en un párrafo todo lo que os tengo que agradecer. Muchas gracias por apoyarme, por darme siempre vuestro punto de vista, por haberme enseñado a trabajar duro para conseguir lo que quiero, por estar tan cerca, por todos los esfuerzos que habéis hecho para que a nosotros no nos faltase nada...por todo, MUCHAS GRACIAS! Sin vuestro apoyo no estaría escribiendo esta tesis. Os quiero.

I. ABREVIATURAS	5
II. RESUMEN	9
III. INTRODUCCIÓN	13
1. PROTEÍNAS KINASAS	15
2. MAP KINASAS	15
Regulación de la actividad de las MAPK: <i>Docking sites</i>	25
3. ERK5	27
Estructura y distribución tisular	27
Dominios funcionales	29
Activación de ERK5	31
Sustratos de ERK5	33
4. PAPEL FISIOLÓGICO DE ERK5	34
ERK5 en el desarrollo embrionario	34
ERK5 en el sistema inmunitario	35
ERK5 en proliferación y ciclo celular	35
Papel de ERK5 en la regulación de la supervivencia y el fenotipo neuronal	36
5. ERK5 EN DIVERSAS PATOLOGÍAS	39
ERK5 en enfermedades cardiovasculares	39
Papel de ERK5 en carcinogénesis	40
6. TÉCNICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE COMPLEJOS DE PROTEÍNAS	42
7. ISQUEMIA CEREBRAL	46
8. LA CASCADA ISQUÉMICA	49
Respuesta glial a la isquemia cerebral	51
9. MECANISMOS DE MUERTE CELULAR TRAS LA CASCADA ISQUÉMICA	53
Muerte necrótica	53
Muerte apoptótica	54
10. PAPEL DE CALPAÍNA EN LA ISQUEMIA CEREBRAL	56
Características de calpaína	56
11. PAPEL DE LAS MAP KINASAS EN ISQUEMIA CEREBRAL	59
12. PAPEL DE ERK5 EN ISQUEMIA CEREBRAL	60

IV. OBJETIVOS	63
V. MATERIAL Y MÉTODOS	67
1. CULTIVOS CELULARES	69
1.1. LÍNEAS CELULARES	69
Almacenamiento y subcultivo de las líneas celulares	69
Tratamiento de las células	69
Lisis y cálculo de la concentración de proteína	70
Material de cultivos	70
1.2. CULTIVOS PRIMARIOS	71
Cultivos primarios de neuronas corticales mixtas	71
Tratamiento de los cultivos primarios	72
Privación de oxígeno y glucosa (OGD)	72
Hipoxia	72
Hipoglucemia	73
1.3. CÁLCULO DE LA VIABILIDAD CELULAR.....	73
MTT	73
Alamar Blue	74
1.4. FRACCIONAMIENTO CELULAR.....	75
2. ISQUEMIA <i>IN VIVO</i> EN RATAS SPRAGUE-DAWLEY.....	76
3. INMUNOCITOQUÍMICA.....	77
Tinción de Hoechst 33258	77
Tinción con Ioduro de Propidio (PI)	78
Evaluación de necrosis y apoptosis mediante los marcadores fluorescentes	
PI y Hoechst 33258	78
4. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS PARA EL ESTUDIO DE PROTEÍNAS.....	79
Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida	79
Electrotransferencia de proteínas. Western Blot	79
5. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	82
5.1. INMUNOPRECIPITACIÓN (IP)	82
Inmunoprecipitación con FLAG-M2-Agarosa	82
5.2. ENSAYOS DE <i>PULL-DOWN</i>	83
5.3. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MARCADAS CON GST o FLAG.....	83
Purificación de GST-ERK5	83
Purificación de ERK5-FLAG y PKM2-FLAG	84

5.4. PURIFICACIÓN DE ERK1/2 ACTIVA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO EN COLUMNA MONO-Q HR5/5	84
5.5. CROMATOGRAFÍA EN GEL FILTRACIÓN	85
6. TANDEM AFFINITY PURIFICATION (TAP)	86
Vectores utilizados	86
Generación de las líneas celulares estables	87
<i>Tandem Affinity Purification</i> (TAP)	87
Procesamiento de las bandas	89
Digestión en gel de proteínas para su análisis mediante espectrometría de masas	89
7. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	91
Ensayo radiométrico de actividad kinasa utilizando en gel de SDS-PAGE	91
Ensayo de actividad caspasa 8	91
Ensayo de actividad de calpaína	91
Ensayo de actividad piruvato kinasa	92
8. BIOLOGÍA MOLECULAR.....	94
Amplificación de los plásmidos de interés	94
Extracción de RNA de cultivos celulares	95
Transcripción inversa	95
Amplificación del DNA por PCR semicuantitativa	96
Mutagénesis dirigida del DNA que codifica para la piruvato kinasa M2 (PKM2)	97
9. INTRODUCCIÓN DE DNA EN CÉLULAS EN CULTIVO.....	99
9.1. TRANSFECCIONES EN CÉLULAS DE MAMÍFERO	99
Transfección con polietilenamina (PEI)	100
Transfección con lipofectamina	100
Electroporación (protocolo optimizado para su uso en células PC12)	101
9.2. INFECCIONES.....	102
ADENOVIRUS Y ADENOASOCIADOS	102
Infección con adenovirus y adeno-asociados	102
LENTIVIRUS	102
Generación de lentivirus que sobre-expresan ERK5	106
Titulación de los lentivirus obtenidos	110
Infección de cultivos mixtos de neuronas corticales mediante lentivirus	110
10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	111

VI. RESULTADOS	117
1. TANDEM AFFINITY PURIFICATION	119
1.1. PUESTA PUNTO DE LA METODOLOGÍA	121
La activación de ERK5 se traduce en un retraso en la migración electroforética	121
ERK5 se activa en células HeLa frente a EGF, estrés osmótico y oxidativo	122
ERK5 se activa en células SH-SY5Y frente a EGF y estrés osmótico	124
Inmunoprecipitación de ERK5 de lisados celulares	125
ERK5 se localiza en el citosol y el núcleo de células SH-SY5Y no activadas y activadas	126
ERK5 endógena existe como complejo de alto peso molecular	127
1.2. TANDEM AFFINITY PURIFICATION.....	129
Generación de líneas estables de neuroblastoma	129
Purificación TAP	133
1.3. ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES OBTENIDAS MEDIANTE LA PURIFICACIÓN TAP.....	140
1.3.1. HSP90	140
Hsp90 β endógena co-inmunoprecipita con ERK5 recombinante	140
Efecto del uso de inhibidores de Hsp90 sobre los niches de expresión de ERK5	142
Efecto del inhibidor de proteosoma MG-132 en la disminución de ERK5 inducida por geldanamicina y racidicol	143
Ubiquitinación de ERK5	145
1.3.2. PKM2	147
Estudio de la secuencia y estructura de PKM2	147
Estudio del patrón de elución de PKM2 en cromatografía en gel filtración	149
Estudio de la interacción entre PKM2 y ERK5	151
Puesta a punto del ensayo de actividad para PKM2	153
Actividad Piruvato Kinasa M2 de células HeLa en respuesta a EGF y Sorbitol	154
Ensayos de fosforilación de PKM2	155
Efecto de mutaciones de la Ser37 en la actividad de PKM2	157
2. PAPEL DE ERK5 EN LA ISQUEMIA CEREBRAL	161
2.1. PAPEL DE ERK5 EN LA ISQUEMIA CEREBRAL.....	163
La OGD produce una disminución en los niveles de la proteína ERK5	163

La disminución de ERK5 es proporcional a la mortalidad celular tras la OGD	165
La disminución de ERK5 requiere la privación de oxígeno y glucosa simultáneas	166
El antagonista de los receptores de NMDA MK801 revierte la disminución de ERK5 en respuesta a la OGD o al tratamiento con NMDA	167
Los niveles de mRNA de ERK5 no se ven afectados inmediatamente después de la OGD	169
Los inhibidores de caspasas no revierten la disminución en los niveles de proteína ERK5 en respuesta a la OGD	172
Los inhibidores de calpaína revierten la disminución en los niveles de proteína ERK5 en respuesta a la OGD o al tratamiento con NMDA	173
Identificación fragmentos de ERK5 tras su degradación por calpaína	175
Calpaína degrada a ERK5 <i>in vitro</i>	176
Identificación del sitio primario de corte de ERK5 por calpaína	178
La subunidad reguladora de calpaína CSS1 interacciona con ERK5 en células SH-SY5Y	180
2.2. PAPEL DE ERK5 EN LA VIABILIDAD CELULAR TRAS LA OGD	183
Uso de adenovirus y adenoasociados	183
Obtención de lentivirus que codifican para ERK5	185
La infección de cultivos mixtos de corticales con lentivirus que codifican para ERK5 no altera la viabilidad de los cultivos sometidos a OGD	186
Papel de la infección lentiviral de ERK5 en el tipo de muerte de los cultivos sometidos a OGD	187
ERK5 disminuye tras la isquemia <i>in vivo</i> en ratas Sprague-Dawley	191
VII. DISCUSIÓN	197
1. CARACTERIZACIÓN DE ERK5 EN CÉLULAS NEURONALES	199
2. IDENTIFICACIÓN DE COMPLEJOS DE PROTEÍNAS MEDIANTE TAP	201
Hsp90	205
PKM2	209
3. PAPEL DE ERK5 EN ISQUEMIA CEREBRAL	212
VIII. CONCLUSIONES	225
IX. BIBLIOGRAFÍA	229

I. ABREVIATURAS

Por orden alfabético:

- **aa**: amino ácido
- **ADP**: adenosin bifosfato
- **ALLN**: péptido N-Acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO
- **BMK1**: *big MAP kinase 1*
- **BSS**: Balanced Salt Solution
- **cDNA**: DNA complementario
- **Co-IP**: Coinmunoprecipitación
- **CREB**: *cAMP response element binding protein*
- **CSS1**: *Calpain small subunit 1*
- **DIV**: dias *in vitro*
- **DMEM**: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- **DNA**: desoxiribonucleid acid
- **DTT**: ditiotreitól
- **EDTA**: ácido etilendiaminotetraacético
- **EGF**: *epidermal growth factor*
- **EGTA**: etilenglico bis (β -aminoetil éter) N, N'-tetraacetato
- **ERK**: extracellular regulated kinase
- **FBP**: fructosa-1,6-bisfosfato
- **FBS**: foetal bovine serum
- **g**: gramo
- **GAPDH**: *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*
- **GFP**: *green fluorescent protein*
- **GST**: glutation S-transferasa
- **h**: horas
- **IP**: inmunoprecipitación
- **JNK**: *c-jun N-terminal Kinase*
- **kb**: kilobase
- **kDa**: KiloDaltons
- **LC-MS/MS**: *Liquid Chromatography/Mass Spectrometry/Mass Spectrometry*
- **LDH**: lactato deshidrogenasa
- **M**: mol/litro
- **MAPK**: mitogen activated protein kinase
- **MEF**: myocyte enhancer factor
- **MEK**: MAP kinasa kinasa
- **MEK**: MKK, MAP kinasa kinasa
- **MEKK**: MKKK, MAP kinasa kinasa kinasa
- **min**: minutos
- **MKK**: MAP kinasa kinasa
- **MKKK**: MAP kinasa kinasa kinasa
- **ml**: mililitro
- **mM**: milimol/litro
- **MRC**: *Medical Research Council*
- **MSK**: mitogen and stress- activated protein kinase
- **MTT**: Bromuro de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5, difeniltetrazolio
- **NADH**: *Nicotinamide adenine dinucleotide*
- **NES**: señal de exporste nuclear
- **NLS**: señal de localización nuclear
- **nmol**: nano mol
- **NP-40**: Nonidet P-40
- **OGD**: *Oxigen and Glucose deprivation*
- **pb**: pares de bases
- **PBS**: *phosphate buffer saline*
- **PCR**: reacción en cadena de la polimerasa
- **PEI**: polietilenamina
- **PEP**: fosfoenol piruvato
- **PKC α** : proteína kinasa C α
- **PKM2**: piruvato kinasa tipo M
- **RNA**: ribonucleid acid
- **rpm**: revoluciones por minuto
- **SDS**: dodecilsulfato de sodio
- **seg**: segundos
- **SH3**: Src-homology 3
- **TAP**: *tandem affinity purification*
- **TBS**: *tris buffer saline*
- **TBS-T**: *tris buffer saline + 0,2% Tween 20*
- **TEMED**: tetrametiletildiamnida
- **TRIS**: Tris (hidroximetil)-aminometano
- **V**: voltios
- **VEGF**: *vascular endotelial growth factor*
- **WB**: Western blot
- **wt**: *wild type*
- **x g**: gravedades
- **Δ CT**: delección de la cola C Terminal
- **μ g**: microgramo
- **μ l**: microlitro
- **μ M**: micromol/litro

II. RESUMEN

La vía de señalización celular MEK5-ERK5 juega un papel importante en sistema nervioso, dado que se activa frente a neurotrofinas, frente al estrés oxidativo producido por *reactive oxygen species* (ROS), tras la isquemia cerebral y tiene un papel en la especificación de fenotipo neuronal. Sin embargo, poco se conoce sobre los sustratos y proteínas que interaccionan con ERK5.

Uno de los objetivos de este trabajo ha sido la identificación de proteínas que interaccionan con ERK5, así como el estudio de su papel en el control de la actividad de esta kinasa, mediante el método TAP (*Tandem-Affinity Purification*) en células de neuroblastoma SH-SY5Y. Se han generado líneas celulares que sobre-expresan de forma estable las proteínas recombinantes TAP-ERK5wt y ERK5 Δ CT (carece de la cola C-terminal). La aplicación de la metodología TAP en células SH-SY5Y ha permitido identificar diversas proteínas que interaccionan con ERK5, que incluyen proteínas de citoesqueleto, chaperonas y proteínas de metabolismo celular. Entre estas proteínas destacan la proteína chaperona Hsp90 β y la piruvato kinasa PKM2. En este trabajo se establece que HSP90 β endógena co-inmunoprecipita con ERK5 recombinante en dos líneas celulares diferentes. Además, los inhibidores de Hsp90 geldanamicina y radicicol producen una disminución en los niveles de proteína ERK5, que es revertida mediante la inhibición de la actividad proteosomal. No se ha podido establecer la interacción entre PKM2 y ERK5. Sin embargo, PKM2 celular existe como complejo de alto peso molecular donde también se encuentra ERK5, contiene un D-domain de unión a MAP kinasas y su actividad enzimática aumenta en respuesta a EGF y Sorbitol. La mutación de la serina 37 de PKM2 a alanina o aspártico conlleva un aumento en la actividad catalítica de PKM2, lo que indica que este residuo podría jugar un papel importante en la actividad piruvato kinasa.

El segundo objetivo de este trabajo ha sido el estudio del papel que juega ERK5 en la isquemia cerebral. Para ello, se ha utilizado el modelo de privación de oxígeno y glucosa (OGD) en cultivos mixtos de neuronas corticales. Se ha establecido que ERK5 se degrada rápidamente en respuesta a la OGD en cultivos mixtos de neuronas corticales. ERK5 también se degrada rápidamente (4 horas) *in vivo*, en córtex de cerebros de ratas Sprague-Dawley sometidas a isquemia por oclusión de la arteria cerebral media. Dado que esta degradación se previene *in vitro* mediante el uso de inhibidores de calpaína, que m-calpaína degrada a ERK5 *in vitro*, y que ERK5

interacciona con la subunidad pequeña reguladora de calpaína CSS1, se concluye que es la proteasa calpaína la responsable de la degradación de ERK5 observada.

En el presente estudio, se han producido lentivirus que codifican para ERK5, y se han utilizado para la infección de cultivos mixtos de neuronas corticales. Esta herramienta ha permitido evaluar el efecto de la sobre-expresión de ERK5 tras la OGD en la viabilidad celular total y en el tipo de muerte que se produce (apoptótica o necrótica).

En este trabajo se establece que tras la isquemia, la entrada masiva de calcio a través de los receptores de NMDA y la consiguiente activación de calpaína conlleva la degradación de ERK5, produciéndose así una disminución de los niveles totales de esta kinasa.

III. INTRODUCCIÓN

1. PROTEÍNAS KINASAS

Las proteínas kinasas constituyen una superfamilia de enzimas que catalizan la transferencia reversible de fosfato del ATP al grupo hidroxilo de residuos de tirosina, treonina o serina de proteínas sustrato. A su vez, la familia de las proteínas fosfatasas se encarga de la defosforilación reversible de estos sustratos. El equilibrio en la acción de estas dos familias de enzimas es lo que determina en última instancia el grado de fosforilación de las proteínas celulares.

La fosforilación de proteínas puede controlar su actividad enzimática, su interacción con otras proteínas y moléculas, su localización subcelular o su estabilidad, y ya que este es el principal mecanismo por el que las células responden a estímulos externos, se puede considerar que la mayoría de eventos que configuran la vida celular están regulados por la fosforilación reversible de proteínas. La importancia de este mecanismo de control viene reflejado por el dato de que aproximadamente un tercio de las proteínas intracelulares de mamífero contienen fosfato unido covalentemente y que un 5% de los genes humanos codifican proteínas kinasas, fosfatasas y subunidades reguladoras (Johnson y Lapadat, 2002; Manning et al., 2002).

De lo arriba expuesto, se deduce que la identificación de los sustratos de las proteínas kinasas permite la comprensión del control molecular de la fisiología celular. Además, se ha puesto de manifiesto que la fosforilación anómala de determinadas proteínas está directamente asociada a diversos procesos patológicos, tales como diabetes, cáncer o procesos inflamatorios, y que un número importante de enfermedades hereditarias están asociadas a mutaciones de genes que codifican proteínas kinasas. Por todo ello, en los últimos años ha aumentado espectacularmente el interés de la comunidad científica en general, y el de la Industria Farmacéutica en particular, en el uso de proteínas kinasas como dianas en el diseño de nuevos fármacos.

2. MAP KINASAS

Las proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAP Kinasas, MAPK) constituyen una familia de serina/treonina proteínas kinasas estimuladas por factores de crecimiento y diferentes tipos de estrés. Estas proteínas juegan un papel clave en la transducción intracelular de señales, lo que permite a la célula integrar diferentes

estímulos extracelulares. Así, las MAP kinasas regulan procesos como mitosis, expresión génica, movimiento, metabolismo y muerte celular programada, dado que sus sustratos engloban a otras proteínas kinasas, fosfolipasas, factores de transcripción, componentes de la maquinaria apoptótica y proteínas del citoesqueleto (Johnson y Lapadat, 2002; Lee et al., 1995; Manning et al., 2002).

Filogenéticamente, las MAP kinasas pertenecen al grupo CMGC de proteínas kinasas que también incluye las kinasas dependientes de ciclina (CDKs), glicógeno sintasa kinasas y kinasas CDK-like (Coulombe y Meloche, 2006). Cada subfamilia de MAPK está compuesta por un módulo de señalización de tres kinasas evolutivamente conservadas que se activan de forma secuencial (figura 1): una MAP kinasa, una MAP kinasa kinasa (MAPKK o MEK), y una MAP kinasa kinasa kinasa (MAPKKK o MEKK). Las MAPKKK, que son serina/treonina kinasas, son a menudo activadas por fosforilación o como resultado de la interacción con *small GTP-binding protein* de la familia Ras/Rho en respuesta a estímulos extracelulares (Kolch, 2000; Kolch, 2000).

La activación de la MAPKKK conlleva la fosforilación en residuos de serina o treonina de la MAPKK y su activación, que a su vez estimula la fosforilación y activación de la MAPK mediante la fosforilación dual en residuos de treonina y tirosina (motivo Thr-X-Tyr) localizados en el *activation loop* del subdominio kinasa VIII (Roux y Blenis, 2004).

Existen diversas MAPKKK *upstream* para cada MAPKK, de manera que la célula puede responder a distintos estímulos mediante la activación de una vía específica de MAPK (Johnson y Lapadat, 2002). En la célula las MAPK son más abundantes que las MAPKKK, lo cual permite la amplificación de la señal.

Todas las MAPK pertenecen a la familia de proteínas kinasas dirigidas por prolina, es decir, fosforilan residuos de serina y treonina que presentan un residuo de prolina en posición +1/-1.

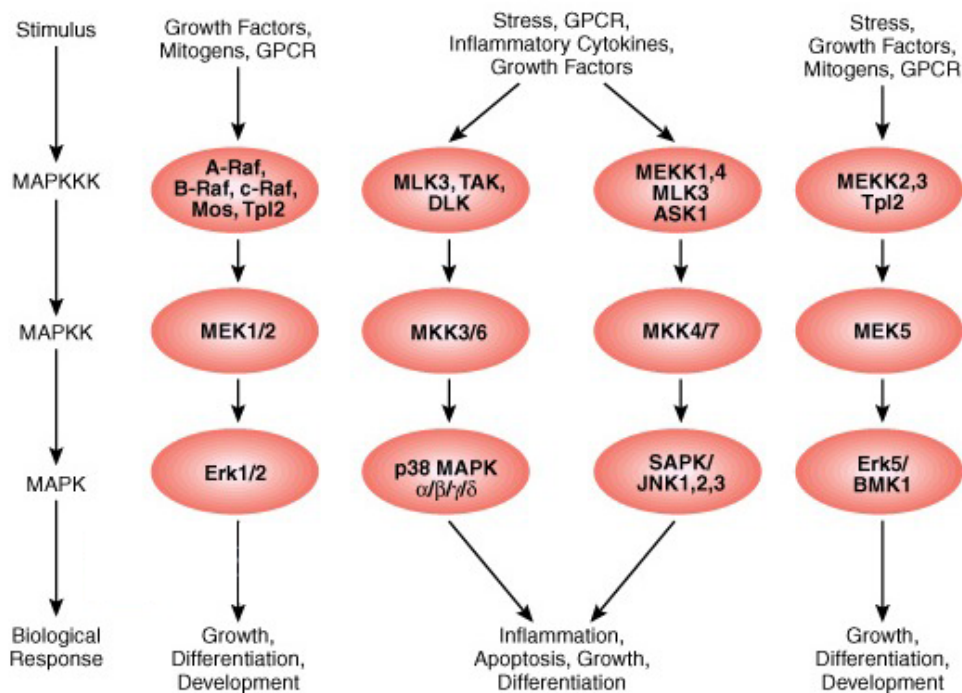


FIGURA 1. Cascadas de señalización de las MAPK. Las flechas representan estimulación directa de unas proteínas a otras. GPCR: *G protein coupled receptor*. Figura obtenida de http://www.cellsignal.com/reference/pathway/MAPK_Cascade.asp

En organismos multicelulares existen cuatro subfamilias de MAP kinasas clásicas:

1. **ERK1 y ERK2:** En 1990, la búsqueda de proteínas kinasas activadas frente a factores de crecimiento llevó a la purificación de una proteína kinasa estimulada por insulina: ERK1 (Boulton et al., 1990). Un año después el mismo grupo clonó y caracterizó una kinasa con un 88% de identidad a ERK1: ERK2 (Boulton et al., 1991). ERK1/2 son activadas fuertemente en respuesta a factores de crecimiento, suero y ésteres de forbol, y en menor medida por ligandos de los receptores acoplados a proteínas G, citoquinas, estrés osmótico y desorganización de microtúbulos. ERK1/2 se expresan en distinta proporción en todos los tejidos y están implicadas en regulación de mitosis, meiosis y en funciones postmitóticas en células diferenciadas (Bogoyevitch y Court NW, 2004; Nishimoto y Nishida, 2006). El motivo de activación del *activation loop* es **Thr-Glu-Tyr**. ERK1/2 tienen una masa molecular de 44 y 42 kDa respectivamente. Ambas kinasas forman parte del módulo de kinasas que incluye a la MKKK c-Raf1, B-Raf o A-Raf, que pueden ser activadas por el proto-oncogen Ras. En tumores humanos son comunes las mutaciones que convierten a Ras en un oncogen activo.

El oncogen Ras activa persistentemente las vías de señalización de ERK1/2, contribuyendo así al aumento de proliferación tumoral. Por este motivo, los inhibidores de la vía ERK están siendo utilizados en ensayos clínicos como potentes agentes antitumorales (Johnson y Lapadat, 2002).

Clásicamente se han utilizado dos inhibidores no competitivos estructuralmente no relacionados para inhibir ERK1/2: U0126 y PD98059. Estos compuestos suprimen la actividad de ERK1/2, uniéndose a MKK1 y previniendo así la activación por Raf y otros activadores *upstream*. Además, existe otro inhibidor, PD184352, que actúa de la misma forma pero es más potente y específico: no inhibe otras vías de MAP kinasas a las concentraciones utilizadas para inhibir ERK1/2 (Davies et al., 2000).

ERK1/2 fosforilan numerosos sustratos en todos los compartimentos celulares, incluyendo varias proteínas de membrana (CD120a, Syk y calnexina), sustratos nucleares (SRC-1, Pax6, NF-AT, Elk-1, MEF2, c-Fos, c-Myc, STAT3 y TCF -factor de transcripción de células T-), proteínas del citoesqueleto (neurofilamentos y paxilina) y diversas kinasas como MSK (mitogen y stress- activated protein kinase) y RSK (Ribosomal S-6 Kinase) (Roux y Blenis, 2004).

MEK1/2 contiene una señal de exporte nuclear (NES) en su región N-terminal y localizan fundamentalmente en el citosol. En células quiescentes MEK1/2 y el citoesqueleto de microtúbulos retienen a ERK1/2 en el citoplasma mediante la interacción directa. Tras la estimulación, ERK1/2 son fosforiladas en residuos de treonina y tirosina y esto produce la disociación de MEK1/2. ERK1/2 se localizan en el citosol de células no estimuladas, pero tras su activación dimerizan y translocan a núcleo mediante transporte activo del dímero o interacción directa con el complejo de poro nuclear. Una vez en el núcleo celular, ERK1/2 activan a los sustratos nucleares mencionados anteriormente (Khokhlatchev et al., 1998; Nishimoto y Nishida, 2006).

Papel de ERK1/2 en el sistema nervioso: ERK1/2 son críticas en la diferenciación y plasticidad neuronal y pueden modular también la supervivencia neuronal. Diversos trabajos afirman que ERK1/2 se activan en respuesta a neurotrofinas, esta activación es necesaria para la actividad neuroprotectora que median diversas neurotrofinas. Además ERK1/2 se activan frente al daño neuronal. Los mecanismos de transcripción que activan pueden inhibir la muerte celular (ver figura 2) (Hetman y Gozdz, 2004).

Los estudios en modelos cerebrales de isquemia, trauma cerebral y enfermedades degenerativas implican a la señalización de ERK1/2 con el daño oxidativo neuronal. En algunas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson, Alzheimer o la demencia de los cuerpos de Lewy, se ha apreciado una localización citoplásmica en gránulos de ERK1/2. Tras la acumulación citoplásmica ERK1/2 podrían ser fosforilados pero no podrían translocar y actuar sobre sus sustratos para promover supervivencia (Chu et al., 2004).

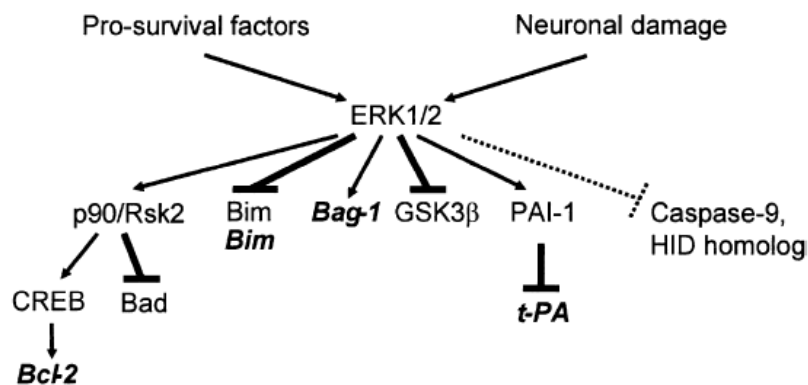


FIGURA 2. Mecanismos neuroprotectores regulados por ERK1/2. En cursiva se muestran los sustratos cuya regulación por ERK1/2 es dependiente de expresión génica. La inhibición de Bim puede producir fosforilación inhibitoria y disminución de la expresión al mismo tiempo. La línea de puntos indica los sustratos relacionados con la supervivencia celular encontrados en sistemas no neuronales. Obtenido de Hetman y Gozdz, 2004.

- Las **p38** (p38 α , p38 β , p38 γ y p38 δ): También son llamadas SAPK (*stress activated protein kinase*) ya que se activan frente a diferentes tipos de estrés. La isoforma α es la mejor estudiada y la que se expresa en la mayoría de tipos celulares. Las p38 se activan en células del sistema inmune en respuesta a citoquinas inflamatorias y juegan un papel importante en la activación de la respuesta inmune. También se activan frente a otros estímulos, incluyendo hormonas, ligandos de receptores acoplados a proteína G y estrés (como estrés osmótico o *heat shock*). El motivo de activación del *activation loop* es **Thr-Gly-Tyr**. Debido al papel de estas MAPKs como reguladoras de la expresión de citoquinas inflamatorias han sido involucradas en diferentes enfermedades humanas como asma y enfermedades autoinmunes (Johnson y Lapadat, 2002).

En 1997 se describió a las p38 como diana de una categoría de compuestos piridinilimidazoles experimentales, fármacos anti-inflamatorios que suprimen las citoquinas (*cytokine-suppressive anti-inflammatory drugs*, CSAIDs) representados por el compuesto SB203580 (Yang et al., 1997). Los inhibidores de las p38 han sido extensamente estudiados como fármacos antiinflamatorios ya que p38 controlan la producción de TNF y IL-1, que juegan un papel importante en la respuesta inflamatoria. SB203580 es el compuesto más utilizado para inhibir a p38 α y p38 β .

Entre los sustratos de p38 destacan los factores de transcripción MEF2A, MEF2C, ATF1, Sap1, NF- κ B, Ets-1 y p53. p38 también activa a las proteínas kinasa: MSK1 y 2, y a las proteínas kinasa activadas por MAPK (MAPKAP kinasa) MAPKAP1 y MAPKAP2. (Roux y Blenis, 2004).

Papel de p38 en el sistema nervioso: Además de su papel en la regulación de la muerte celular y la supervivencia como kinasas activadas por estrés, las MAP kinasas p38 han sido implicadas en funciones fisiológicas como la especificación del tipo celular y el control de funciones celulares en varios tipos de células, entre los que se incluyen las neuronas. Así, la vía de p38 participa en la diferenciación neuronal de células PC12 en respuesta a NGF y *bone morphogenetic protein* (BMP) (Takeda e Ichijo, 2002).

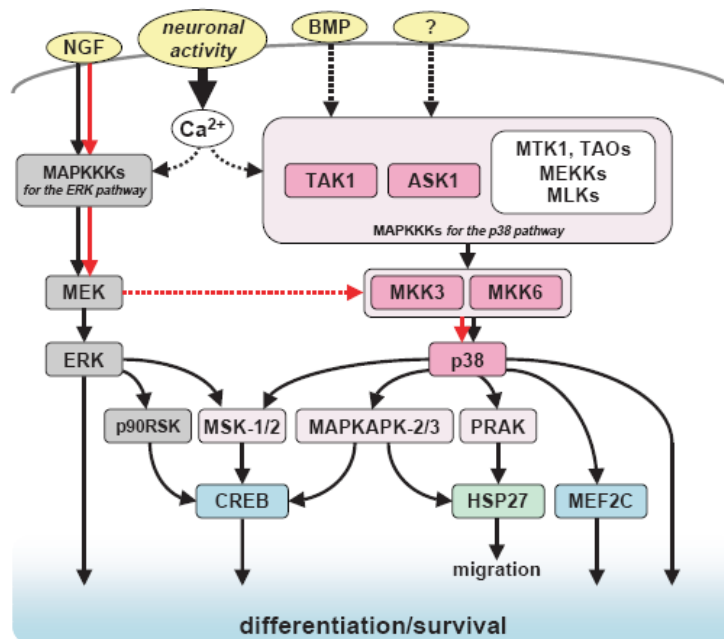


FIGURA 3. Diferenciación y supervivencia dependiente de p38 en cultivos de células de mamífero. Obtenido de Takeda e Ichijo, 2002.

3. Las **c-Jun N-terminal kinase o JNK** (JNK1, JNK2 y JNK3): Las JNK unen y fosforilan la proteína de unión a DNA c-Jun, de ahí su nombre, lo que incrementa su actividad transcripcional. c-Jun es un componente del complejo de transcripción AP-1, un importante regulador de la expresión génica: contribuye al control de diversos genes de citoquinas y se activa en respuesta a estrés ambiental, radiación y factores de crecimiento (todos los estímulos que activan JNK). Además de c-jun, otros factores de transcripción son sustratos de JNKs, como ATF-2, NF-ATc1, HSF-1 y STAT3. No se conocen sustratos citoplasmáticos de las JNK (Roux y Blenis, 2004; Johnson y Lapadat, 2002).

El motivo de activación del *activation loop* es **Thr-Pro-Tyr**. La regulación de la vía JNK es compleja: 13 MKKKs se encargan de regular las proteínas JNKs. Esta diversidad de MKKKs permite un amplio rango de estímulos que activan esta vía de MAPK. Las JNKs también juegan un papel importante en el control de la apoptosis: los inhibidores de JNK aumentan la inhibición inducida por quimioterapia del crecimiento de las células tumorales, lo que sugiere que las JNKs podrían ser una diana molecular para el tratamiento del cáncer (Tournier et al., 2000). Además, los inhibidores de JNK han sido utilizados en modelos animales para el tratamiento de la artritis reumatoide (Han et al., 2001).

Papel de las kinasas JNKs en el sistema nervioso. En 1997 se relacionó a las JNKs con la muerte neuronal apoptótica. Ratones *knockout* para el gen JNK3 presentan una reducción de la apoptosis inducida por excitotoxicidad en neuronas hipocámpales (Yang et al., 1997). JNK1 y JNK2 regulan la apoptosis específica de lugar durante el desarrollo temprano del cerebro (Kuan et al., 1999). La activación de la vía JNK no sólo es crítica para la muerte neuronal natural durante el desarrollo, sino también para la muerte patológica en el cerebro adulto frente a distintos estímulos. En particular, las proteínas JNKs juegan un papel importante en la excitotoxicidad. Repici *et al.* describieron que el uso de inhibidores de JNK prevenía en parte la muerte celular producida tras la excitotoxicidad *in vitro* y tras la isquemia cerebral *in vivo*. (Repici y Borsello, 2006)

4. **ERK5**: activada por mitógenos y por diferentes tipos de estrés. Es la más recientemente descubierta de las MAP kinasas clásicas. El motivo de activación de su *activation loop* es **Thr-Glu-Tyr**.

Además de las MAP kinasas clásicas existe un grupo de MAP kinasas atípicas, compuesto por ERK3, ERK4, NLK y ERK7. En muchos casos, se desconocen los mecanismos regulatorios y sus funciones fisiológicas:

1. **ERK3/4**: ERK3 fue clonada en 1991 por su homología con ERK1 (Boulton et al., 1991). En 1992 fue clonada una segunda kinasa con alta homología a ERK3, originalmente denominada p63^{mapk}: ERK4 (Gonzalez et al., 1992). ERK3/4 poseen un dominio kinasa con un motivo SEG en el *activation loop*, en el que hay un único residuo aceptor de grupos fosfato. Ambas proteínas difieren principalmente en su extremo C-terminal.

ERK3 se expresa en tejidos adultos de mamífero, con una expresión elevada en cerebro, músculo esquelético y tracto gastrointestinal. La expresión de mRNA de ERK4 se limita a cerebro (donde la expresión es más elevada), colon, ojo, corazón, riñón, pulmón, ovario, páncreas, placenta, próstata y piel.

Poco se conoce sobre la regulación de la actividad enzimática de ERK3 y 4. A diferencia de lo establecido para las MAP kinasas clásicas, la fosforilación de ERK3 en el *activation loop* es constitutiva en condiciones de ausencia de factores de crecimiento o estrés químico. No se ha descrito el fenotipo de ratones deficientes en ERK3 o ERK4 y las funciones fisiológicas de ambas kinasas aún no han sido definidas.

2. **NLK**: En 1994 se caracterizó el mutante nemo de *Drosophila melanogaster*, en el que una mutación puntual (nmo^{P1}) reducía la viabilidad y resultaba en un fenotipo de rotación incompleta de los fotoreceptores de las células del ojo (Choi y Benzer, 1994). En 1998 se describió el homólogo en mamífero de nmo, llamado Nlk (Brott et al., 1998). NLK humana es una proteína de 515 aminoácidos con un dominio kinasa central rodeado por extensiones N- y C-terminales de unos 100 residuos. Su región N-terminal contiene una secuencia única rica en residuos de, alanina, glutamina e histidina. Sin embargo la región está poco conservada entre los ortólogos de NLK y se desconoce su función. El dominio kinasa posee homología con las MAP kinasas

(45% de identidad con ERK2) pero también con CDKs (38% indentidad con CDK2). Al igual que ERK3 y ERK4, NLK carece de tirosina en su *activation loop*. El motivo TQE que contiene recuerda a la secuencia THE de CDK2.

En ratón, el mRNA de NLK se expresa en la mayoría de tejidos adultos, presentando los niveles más altos en cerebro y órganos linfoides. La localización subcelular de NLK no ha sido caracterizada.

NLK es activada en respuesta a varios ligandos extracelulares: Wnt-1, interleuquina-6, *granulocyte colony-stimulating factor*, y los miembros de la familia *Transforming growth factor-β* (TGF-β). En algunos tipos celulares, el aumento de la concentración intracelular de calcio es suficiente para estimular la actividad enzimática de NLK. Se ha descrito su interacción con HIPK2 (*homeodomain-interacting protein kinase*), un miembro del grupo CMGC de proteínas kinasas. Los primeros sustratos de NLK identificados fueron miembros de la familia *T-cell factor/lymphoid enhancer factor*, que son mediadores de la vía de señalización Wnt. Por último, los ratones *knockout* para NLK viven 4-6 semanas, presentan retardo en el crecimiento y alteraciones neurológicas.

3. **ERK7:** Fue clonada en 1999 (Abe et al., 1999). Tres años después el mismo grupo publicó el clonaje de una kinasa humana muy similar a ERK7 que denominaron ERK8. ERK7 humana es una proteína de 544 aminoácidos, con un domino N-terminal similar a las MAP kinasas clásicas y un domino C-terminal de 204 residuos. Esta región C-terminal no presenta ninguna similaridad con otras proteínas. Contiene dos regiones ricas en prolina que podrían representar dominios SH3, además de una secuencia de localización nuclear (Coulombe y Meloche, 2006).

El mRNA de ERK7 se expresa ampliamente en tejidos adultos, con expresión predominante en pulmón y riñones. Los últimos 20 aminoácidos de su dominio kinasa son necesarios y suficientes como señal para su degradación.

ERK7 se activa en respuesta a estrés oxidativo y mitógenos, así como por la activación de Src y RET. En cuanto a sus sustratos, tan sólo se ha observado la fosforilación *in vitro* de MBP. Sus funciones fisiológicas son desconocidas, en parte porque aún no se ha descrito el fenotipo de ratones deficientes en esta kinasa. Algunos estudios sugieren que ERK7 está implicada en la regulación de la

proliferación celular (la sobre-expresión de ERK7 inhibe la entrada en fase S en células CV-1).

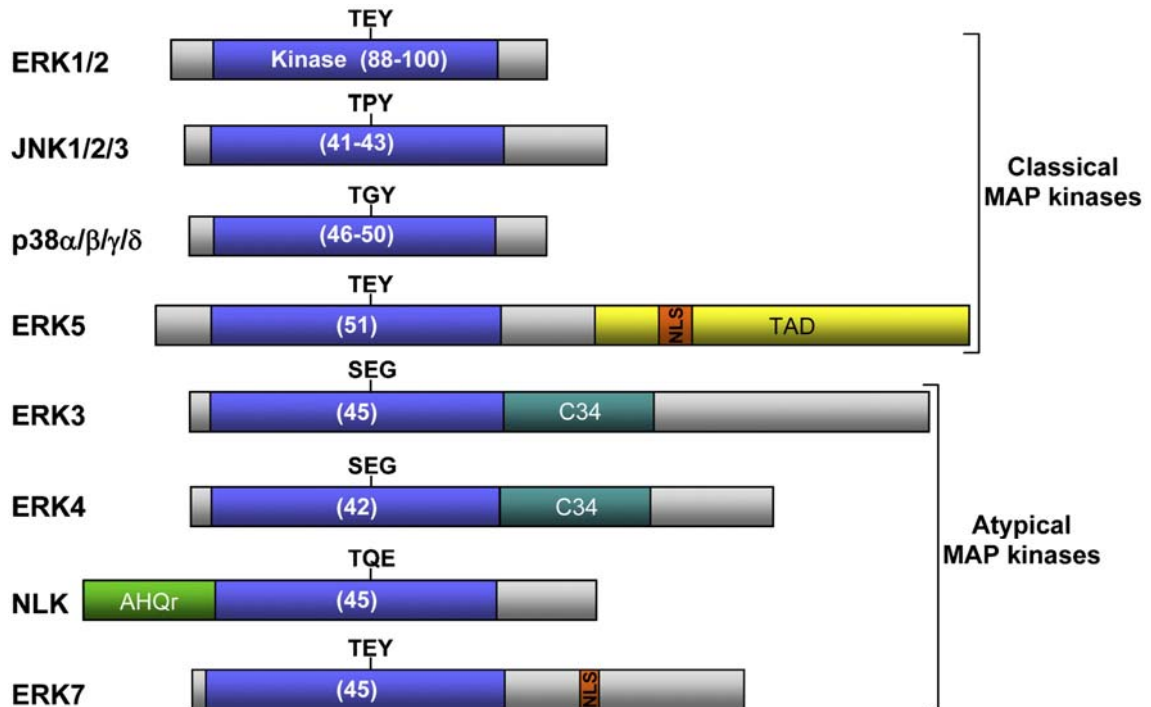


FIGURA 4. Representación esquemática de la estructura de las MAP kinasas humanas. Las MAP kinasas se componen de un dominio kinasa (azul) flanqueado por extensiones N- y C-terminal de diversas longitudes. En cada caso se indica la identidad del dominio kinasa con ERK1. Se muestra el motivo de fosforilación del *activation loop* para cada kinasa. TAD: *transactivation domain*; NLS: *nuclear localization sequence*; C34: región conservada en ERK3/4; AHQr: dominio rico en alanina (A), histidina (H) y glutamina. Las MAP kinasas se muestran a escala. Obtenido de Science Direct (Coulombe y Meloche, 2006).

Regulación de la actividad de las MAPK: *Docking sites*

Se han propuesto dos mecanismos para asegurar la transmisión específica de la señal de la kinasa *upstream* a la MAPK: (i) proteínas adaptadores que unen a los diferentes componentes de la cascada, e (ii) interacción física directa entre los componentes de la cascada (Wang y Tournier, 2006).

Existen mecanismos para prevenir el cruce entre vías de señalización, es decir, para asegurar que las respuestas celulares se corresponden con los estímulos ambientales. Una forma de mantener la especificidad de las vías de MAPKs es la unión física a otras proteínas de las cascada de señalización a través de *docking sites* específicos (Weston et al., 2002).

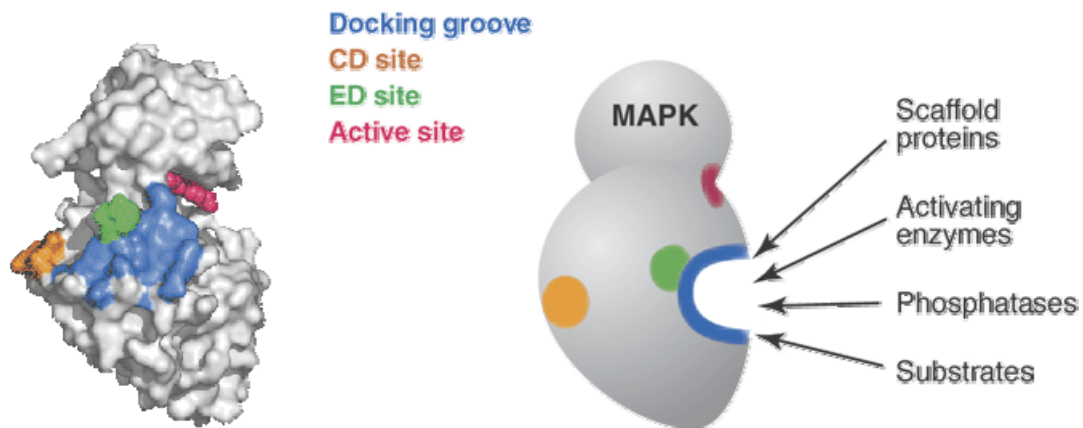


FIGURA 5. Representación de la superficie molecular de la MAPK p38 α , mostrando el docking groove (azul) que une el *D domain* del sustrato MEF2A y del activador MKK3b. Se muestran también el *CD site* (naranja) y el *ED site* (verde). El dominio de activación de p38 está unido al inhibidor SB203580 (rojo). Imagen modificada de Weston *et al.*, 2002.

Las proteínas que interaccionan con los *docking sites* de las MAP kinasas (sustratos, fosfatasa, otras kinasas y proteínas *scaffolding*), por su parte, contienen un ***D domain***, que consiste en una región conservada de aminoácidos cargados positivamente rodeados de aminoácidos hidrofóbicos: $(R/K)_{2-3}-X_{1-6}-\Phi_A-X-\Phi_B$ (donde Φ son aminoácidos hidrofóbicos como leucina, isoleucina o valina y X es cualquier aminoácido) (Liu et al., 2006b). Este dominio es reconocido por el *CD domain* de las MAPKs (Wang y Tournier, 2006). La interacción entre *D domain* y *CD domain* ocurre sólo en proteínas activadas.

La especificidad de las MAPK viene determinada por los *docking domains* de las kinasas y sustratos. Las interacciones de *docking* contribuyen a la eficiencia de la reacción kinasa (Weston et al., 2002; Biondi y Nebreda, 2003). La base estructural de la interacción entre MAPK y sustrato fue descubierta en 2002 Chang *et al.* (Chang et al., 2002) al obtener cristales de p38 α unida a uno de sus sustratos. Diferentes ensayos bioquímicos, junto con los derivados de la cristalografía de proteínas han llevado al descubrimiento de tres dominios implicados en la unión de MAPK a sus sustratos, a sus activadores y a fosfatasa:

- **Common docking (CD) domain:** está situado a continuación del dominio catalítico y está implicado en la interacción con el *D domain* del sustrato. El CD domain contiene residuos ácidos e hidrofóbicos necesarios para establecer la hidrofobicidad y las interacciones electrostáticas con los residuos cargados positivamente e hidrofóbicos del *D domain*. El motivo CD ha sido implicado en la mediación de las interacciones de las MAPK con sus activadores *upstream* y sus sustratos *downstream*, lo que sugiere que los motivos de interacción están fuertemente controlados durante la activación de las cascadas de MAPK.
- **Glu-Asp (ED) domain:** se localiza en la parte opuesta del centro activo de la MAPK, y está implicado en la regulación de la especificidad de unión: el cambio de sólo dos residuos en el *ED domain* de ERK2 le confieren la capacidad de ser activada por el activador de p38 MKK3 (Tanoue et al., 2001). Este dominio recibe su nombre de los aminoácidos que lo forman en p38 humana (Glu160, Asp61). En cambio en ERK2 este dominio está compuesto por treoninas: Thr156 y Thr157
- **Docking groove:** la elucidación de la estructura de p38 α unida a dos péptidos correspondientes al *D-domain* del sustrato MEF2A y del activador MKK3 ha revelado la existencia de una tercera región que interacciona con dos aminoácidos hidrofóbicos del *D-domain* del sustrato. En esta región, denominada *docking groove*, se han identificado los residuos Ile 116 y Gln 120 como determinantes claves en el reconocimiento de los péptidos. Dado que estos péptidos inducen cambios conformacionales en el centro activo, estas interacciones también podrían jugar un papel importante en la activación de la kinasa. Esta región también parece estar implicada en la localización subcelular, permitiendo su translocación al núcleo y posterior activación de numerosos factores de transcripción y enzimas, participando así de la regulación de la expresión génica (Tanoue et al., 2000).

3. ERK5

En 1995 dos grupos clonaron simultáneamente ERK5. Zhou *et al.* (Zhou et al., 1995) identificaron primero el activador, MEK5. Basándose en la asunción de que las MEKs interaccionan con sus sustratos MAPKs, utilizaron a MEK5 como cebo en un ensayo de *yeast two hybrid*, e identificaron a ERK5 como la proteína a la que se unía. Estudios posteriores confirmaron la unión de ERK5 a MEK5, pero no a MEK1 ni MEK2, apoyando la naturaleza altamente específica de la interacción MEK-MAPK. Al mismo tiempo, Lee *et al.* identificaron por PCR una proteína idéntica a ERK5 a la que llamaron *big MAPK 1* (BMK1).

Estructura y distribución tisular

La secuencia de ERK5 humana contiene un marco abierto de lectura de 2445 pares de bases que codifica para 816 amino ácidos, con una masa molecular teórica de 98 kDa. Así pues, ERK5 posee un tamaño mayor que el doble de otras MAPK (de aproximadamente 40-50 kDa), debido a una cola C-terminal característica de 396 amino ácidos. El dominio catalítico MAPK está muy conservado, se encuentra en el extremo N-terminal y comparte una homología del 50% con ERK1/2 (figura 6).

El gen de ERK5 de ratón está codificado por 6 exones y 5 intrones, de aproximadamente 5,6 kb. Se han identificado tres variantes de *splicing* (Yan et al., 2001), llamadas a, b y c, producto del *splicing* alternativo de los intrones 1 y/o 2. Las secuencias de las proteínas que se generan de estos cDNAs son idénticas excepto en su región N-terminal. ERK5b carece de 69 amino ácidos y ERK5c de 139, comparadas con ERK5a. En extracto de embrión de ratón se observó que ERK5a es la isoforma más abundante, seguida de ERK5c y que ERK5b. Las variantes de *splicing* de ERK5 (b y c), que son catalíticamente inactivas, actúan como kinasa dominante negativa (Wang y Tournier, 2006; Nishimoto y Nishida, 2006).

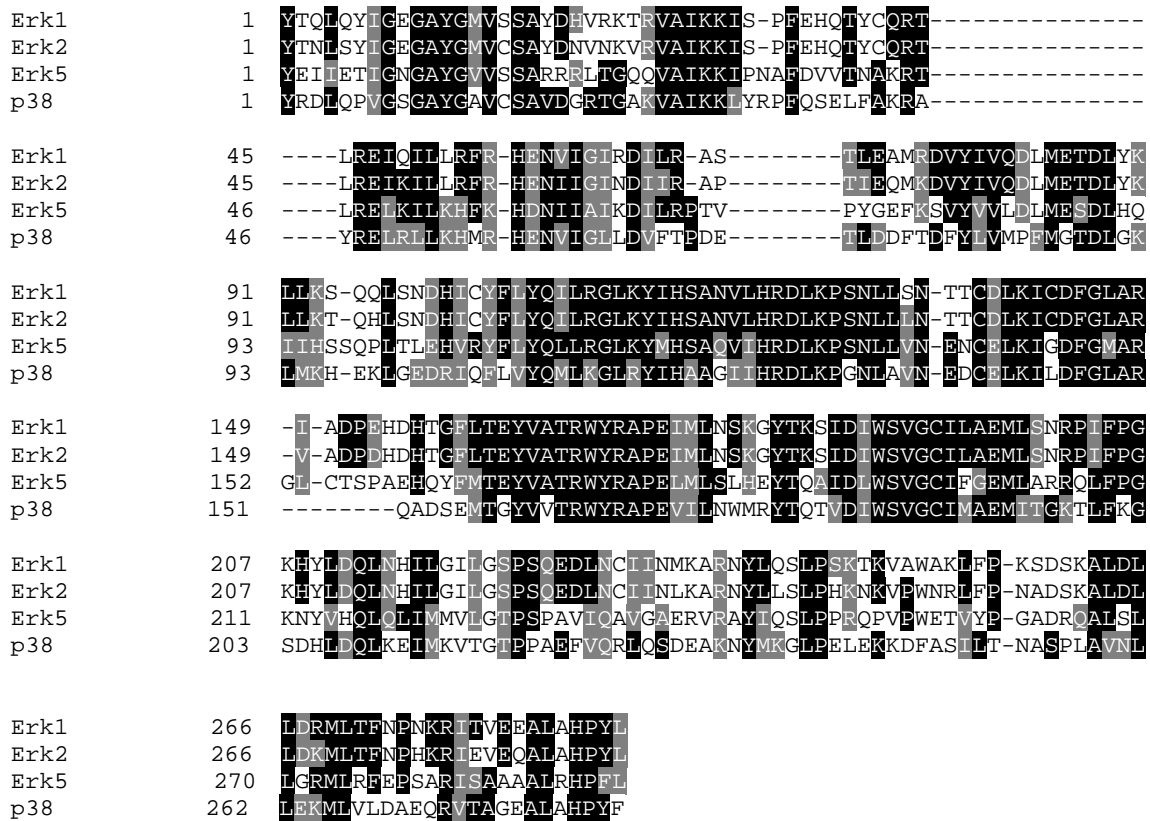


FIGURA 6. Alineamiento de las secuencias del dominio kinasa de diversas MAPK humanas. Los aminoácidos idénticos se muestran enmarcados en negro, los cambios conservativos en gris y los no conservativos en blanco.

La introducción prematura de un codón stop por un fallo en el splicing del intrón 4 genera otra variante de *splicing*, ERK5-T, que codifica para una proteína truncada a la que le falta la señal de localización nuclear y la región rica en prolinas. Esta variante es incapaz de translocar a núcleo tras su activación (McCaw et al., 2005).

El mensajero de ERK5 humana es abundante en placenta, corazón y riñón, y a penas detectable en hígado (Lee et al., 1995) (otros tejidos no fueron ensayados). Ensayos de Northern Blot de varios tejidos adultos de ratón muestran una expresión ubicua del mRNA de ERK5 en corazón, pulmón, testículos, hígado y cerebro (Regan et al., 2002).

Dominios funcionales

El dominio N-terminal de ERK5 es importante para la localización citoplasmática (aa 1-77), para la asociación con la kinasa activadora MEK5 (aa 78-139) y para la oligomerización (aa 140-406) (Yan et al., 2001) (ver figura 7).

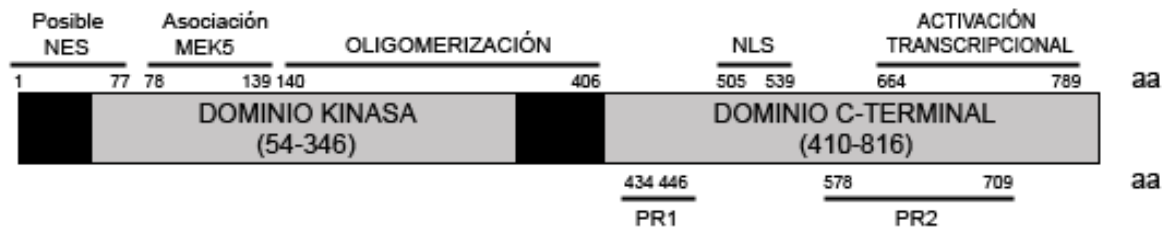


FIGURA 7. Representación esquemática de los dominios funcionales de ERK5. NES: señal de exporte nuclear. NLS: señal de localización nuclear. PR1: región rica en prolinas 1. PR2: región rica en prolinas 2.

El dominio C-terminal es esencial para la actividad de ERK5 *in vivo*, ya que media en la translocación a núcleo, que depende de la señal de localización nuclear (NLS) (Buschbeck y Ullrich, 2005). Esta región C-terminal contiene además dos regiones ricas en prolina (PR1 y PR2), que podrían servir como lugares de unión a proteínas con dominios *Src-homology 3* (SH3). Las regiones PR de humano y ratón difieren significativamente en sus secuencias. La cola C-terminal también contiene un dominio de interacción al factor de transcripción MEF2 (aa 440-501) y un potente dominio de activación transcripcional (aa 664-789). Ambos dominios son necesarios para la activación de MEF2D por ERK5 (Kasler et al., 2000). El dominio de activación transcripcional es activado por autofosforilación de ERK5 (Morimoto et al., 2007).

La cola C-terminal también tiene una función auto inhibitoria. Diferentes deleciones de esta región aumentan la actividad de ERK5 (Buschbeck y Ullrich, 2005). Por ello, se ha propuesto un modelo en el que la cola C-terminal enmascara el putativo CD *domain*, impidiendo la interacción de ERK5 con sus sustratos.

ERK5 localiza en citoplasma, núcleo o pancelularmente, dependiendo del tipo celular (Buschbeck y Ullrich, 2005). Tras su activación, ERK5 fosforila su propia cola C-terminal en dos regiones: T723 y una región que contiene tres serinas (S760, S764 y S766) (Morimoto et al., 2007), lo que provoca un cambio conformacional que

expondría el dominio quinasa y el NLS (amino ácidos 505-539). Esto explicaría la dinámica translocación nuclear de ERK5. Sin embargo, la distribución celular de ERK5 varía en los diferentes tipos de células no estimuladas (Buschbeck y Ullrich, 2005; Kondoh et al., 2006), como ilustra la figura 8.

Subcellular distribution of Erk5 in different human cell lines

Cell line	Subcellular distribution		Origin
	Nuclear	Cytosolic	
BT474	+++	+	Breast, carcinoma
SKBR3	+++	+	Breast, adenocarcinoma
MDA-MB231	++	+	Breast, adenocarcinoma
MCF7	++	+	Breast, adenocarcinoma
A431	+++	+	Skin, epidermoid carcinoma
KB	+	+++	Mouth, epidermoid carcinoma
NP9	+	+++	Pancreas, adenocarcinoma
NP18	+	+++	Pancreas, adenocarcinoma
NP29	++	+++	Pancreas, adenocarcinoma
NP31	+	+++	Pancreas, adenocarcinoma
293	+	+	Kidney, embryonic epithelial cells
MM1S	+	+++	Plasma cells, multiple myeloma
MM144	+	+++	Plasma cells, multiple myeloma
MCF10A	+	+	Breast epithelial cells, immortalized
HeLa	++	+	Uterine cervix, epithelioid carcinoma
HACAT	++	+	Keratinocyte, spontaneously transformed
SKNBE	+	+++	Brain, neuroblastoma
Jurkat	++	+	Precursor T cell acute lymphoblastic leukemia

+, weak; ++, moderate; +++, strong.

FIGURA 8. Distribución subcelular de ERK5 en diversas líneas celulares humanas en reposo. Obtenido de Borges et al., 2007.

ERK5 transloca de núcleo a citosol, sin embargo, el NES no ha sido identificado aún. La figura 9 muestra un posible mecanismo de control de la localización subcelular de ERK5. En células en reposo, la interacción intramolecular entre los dominios amino-terminal y el C-terminal de ERK5 produciría una señal de exporte nuclear o un dominio reconocido por proteínas de anclaje al citoesqueleto (que sí tienen NES), y retendría a ERK5 en el citoplasma. Tras la estimulación, la interacción entre los

dominios C-terminal y N-terminal se rompería y así, la actividad NES quedaría anulada, pudiendo ERK5 entrar a núcleo (Nishimoto y Nishida, 2006).

Recientemente se ha publicado que la localización nuclear de ERK5 es independiente de la fosforilación dual del dominio TEY, a diferencia de lo que ocurre con ERK1/2. Además, la señal de localización nuclear presente en la cola C-Terminal de ERK5 es indispensable para el mantenimiento de ERK5 en el núcleo de células de cáncer de mama que sobre-expresan ErbB2 (Borges et al., 2007).

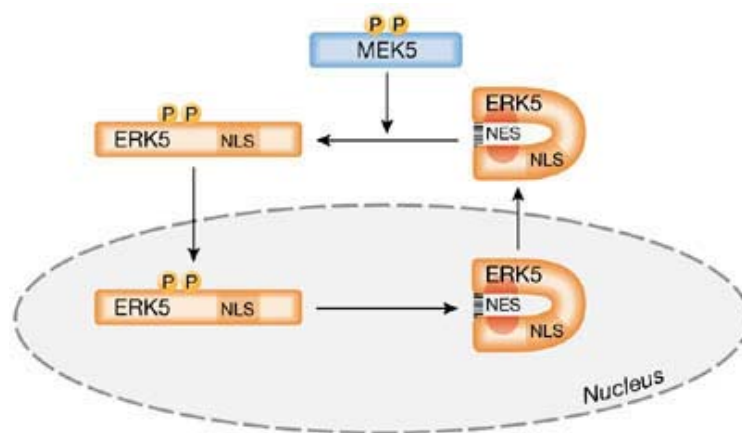


FIGURA 9. Modelo de mecanismo molecular para el control del transporte núcleo-citoplasmático de ERK5. (Nishimoto y Nishida, 2006).

Activación de ERK5

La actividad de ERK5 aumenta en respuesta a factores de crecimiento debido a la fosforilación dual de su motivo TEY por MEK5 (Mody et al., 2003; Kato et al., 1998). Los mitógenos que activan ERK5 incluyen suero, *epithelial growth factor* (EGF), *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), *nerve growth factor* (NGF), *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *fibroblast growth factor-2* (FGF-2) y éster de forbol (Hayashi y Lee, 2004; Kohara et al., 2001). Además, ERK5 se activa frente a choque hiperosmótico, estrés oxidativo (Abe et al., 1996), estrés por cizalladura de fluidos (Yan et al., 1999), y radiación ultravioleta (Suzaki et al., 2002). Algunas citoquinas como LIF y CT-1 también son capaces de activar ERK5 (Wang, 2003).

MEK5, la kinasa activadora de ERK5, fue identificada mediante PCR utilizando como cebadores secuencias de otros miembros de la familia de MAP kinasas (Kato et al.,

1998). Además, MEK5 jugó un papel importante en la identificación de ERK5, al ser utilizados mutantes negativos de MEK5 como cebo en el ensayo de doble híbrido que permitió identificar ERK5 (Zhou et al., 1995). MEK5 parece ser la única kinasa activadora de ERK5 y es específica para esta proteína (Mody et al., 2001). MEK5 humana presenta dos isoformas derivadas de un diferente procesamiento de un único mRNA: la isoforma β , de 40 kDa, presenta una localización citosólica y se encuentra en la mayoría de tejidos estudiados. Por el contrario la isoforma α , de 50 kDa, muestra una distribución tisular mucho más restringida: la expresión de MEK5 β es mayor que la de MEK5 α en tejidos altamente diferenciados, mientras la expresión de MEK5 α es mayor en tejidos mitóticamente activos como el hígado, aunque también es mayor en cerebro (Cameron et al., 2004; English et al., 1995). A su vez, MEK5 es activada por la fosforilación de los residuos Ser311 y Thr315, y la generación de mutantes constitutivamente activos (mediante la mutación de estos aminoácidos a residuos ácidos, como el mutante MEK5-DD, con los dos residuos mutados a ácido aspártico) o dominantes negativos (mediante la mutación de estos residuos a alanina) ha sido ampliamente utilizada a la hora de caracterizar la vía de señalización que configura el módulo MEK5-ERK5.

MEK5 presenta una elevada homología con MEK1, la kinasa responsable de la fosforilación directa y activación de ERK1/2, de tal manera que se ha descrito que los inhibidores clásicos y teóricamente específicos de la MEK1, U0126, PD98059 y PD184352, también inhiben a MEK5, a pesar de que son necesarias concentraciones mayores de inhibidor (Mody et al., 2001). Así, los resultados obtenidos utilizando estos inhibidores deben ser reevaluados utilizando agentes bloqueantes más específicos para estas dos vías, como dominantes negativos de MEK1 o ERK2 (para la vía ERK1/2) y dominantes negativos de MEK5 o ERK5 (para la vía ERK5). De lo arriba expuesto resulta evidente la necesidad de diseñar inhibidores más específicos para cada una de las vías de MAPK. En este sentido, en diciembre de 2008, se han descrito los primeros inhibidores específicos de la kinasa MEK5: BIX02188 y BIX02189 (Tatake et al., 2008). Estos compuestos inhiben la actividad catalítica de MEK5 de forma dosis dependiente, con una IC_{50} de 4,3 y 1,5 nM respectivamente. En células HeLa estimuladas con sorbitol estos inhibidores previenen la fosforilación de ERK5 sin afectar la fosforilación de ERK1/2.

Una prueba de la relevancia en el desarrollo embrionario de MEK5 es que los ratones *knockout* para este gen mueren aproximadamente en el día embrionario 10,5. Su fenotipo incluye desarrollo anómalo del corazón, marcada disminución de la proliferación y aumento de la apoptosis en corazón, cabeza y regiones dorsales. Sin embargo, los ratones heterocigotos presentan un fenotipo normal y son fértiles (Wang et al., 2005). Los ratones *knockout* de MEK5 o ERK5 presentan el mismo fenotipo embrionario.

Por su parte, MEKK2 y MEKK3, pero no MEKK1, activan a MEK5 (English et al., 1995; Chao et al., 1999; Sun et al., 2001). MEKK3 es la kinasa que activa la vía MEK5-ERK5 durante la estimulación celular inducida por factores de crecimiento (Chao et al., 1999). Esta kinasa también activa otras cascadas de señalización como la vía de p38 (Roux y Blenis, 2004). Se ha descrito que tanto MEKK2 como ERK5 interaccionan con el dominio N-terminal de MEK5 α . Así, MEKK2 y MEK5 formarían un complejo que se disociaría tras la activación, de manera que MEK5 quedaría libre para interaccionar con ERK5 (Seyfried et al., 2005).

Sustratos de ERK5

Un paso importante para entender la función de las cascadas de MAPK es la identificación de sus efectores *downstream*. Los sustratos mejor caracterizados de ERK5 *in vivo* e *in vitro* son los factores de transcripción **MEF2A**, **C** y **D** (Kato et al., 2000; Yoon et al., 2005; Sturla et al., 2005). Las proteínas MEF2 (*myocyte enhancer factor-2*) forman parte de una familia de factores de transcripción que regulan la diferenciación celular a través del control de la expresión génica, jugando un papel fundamental en el desarrollo embrionario. En organismos adultos, las proteínas MEF2 median la respuesta a estrés en determinados tejidos (Potthoff y Olson, 2007). La fosforilación de MEF2C por ERK5 aumenta su actividad transcripcional e induce un aumento en la expresión génica de c-jun (un componente del factor de transcripción AP-1). MEF2D es un sustrato específico de ERK5, mientras que la actividad de MEF2A y C también son controladas por las MAPK p38 (Yang et al., 1998).

Otros sustratos de ERK5 *in vitro* son los factores de transcripción **Sap1** y **c-Myc**. El efecto de la fosforilación de c-Myc por ERK5 sigue siendo desconocido, mientras que la fosforilación de Sap1 dependiente de ERK5 activa la transcripción celular a través de un elemento de respuesta que debe ser el responsable de la activación de c-Fos

(Wang y Tournier, 2006; English et al., 1998). La activación *in vitro* de la vía MEK5-ERK5 produce también la fosforilación y activación de los factores de transcripción **c-Fos** y **Fra-1** (Terasawa et al., 2003).

También han sido identificadas como sustratos *in vitro* de ERK5 a **SGK** (*serum y glucocorticoid inducible kinase*), **Cx43** (connexina 43, una proteína *gap junction*), y **Bad** (un miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2) (Hayashi y Lee, 2004). Además, un estudio llevado a cabo con proteínas recombinantes sobre-expresadas en células Cos7 y HeLa reveló que ERK5 se une y activa directamente a **p90RSK**. El dominio C-terminal de ERK5 no es necesario para la unión de ambas proteínas (Ranganathan et al., 2006).

Por último, cabe remarcar que la mayoría de estudios arriba descritos fueron realizados mediante la sobre-expresión de ERK5 o ensayos de fosforilación *in vitro*, y no con la proteína endógena, por lo cual es necesario realizar estudios más detallados con el fin de caracterizar los sustratos de ERK5 *in vivo*.

4. PAPEL FISIOLÓGICO DE ERK5

ERK5 en el desarrollo embrionario

La proteína kinasa ERK5 es esencial para el desarrollo embrionario y necesaria para un desarrollo normal del sistema vascular y la supervivencia celular (Yan et al., 2003; Regan et al., 2002). Los ratones deficientes en ERK5, al igual que ocurre con los *knockout* de MEK5, mueren entre el día 9,5 y 10,5 de gestación, debido a problemas del sistema vascular. Presentan defectos en la formación de la placenta, el saco vitelino y el corazón, así como un aumento de la apoptosis del tejido mesenquimal cefálico y anomalías en el intestino. Sin embargo, los ratones heterocigotos son viables y aparentemente normales. El fenotipo de los embriones ERK5 *-/-* es muy similar al fenotipo de los *knockout* de su kinasa *upstream* MEK5 y MEKK3 y al de su sustrato MEF2C (Regan et al., 2002; Wang et al., 2005).

La letalidad de los embriones *knockout* de ERK5 pone de manifiesto la relevancia de esta vía de señalización en el desarrollo embrionario, además de demostrar que no se trata de una vía redundante.

ERK5 en el sistema inmunitario

ERK5 juega un papel importante en la supervivencia de los timocitos (linfocitos T) periféricos (Garaude et al., 2006). Tanto los linfocitos primarios como los leucémicos expresan ERK5. ERK5 se localiza en el citosol y el núcleo de células T quiescentes y activadas (Garaude et al., 2005).

Recientemente se ha implicado a ERK5 en la regulación de la apoptosis de las células T (Sohn et al., 2008). Mediante la expresión de un dominante negativo de MEK5 se observó que MEK5 regulaba la apoptosis de los timocitos en desarrollo, pero que no tenía efectos en la selección positiva de éstos. La actividad de ERK5 correlacionaba con los niveles de los miembros de la familia de Nur77, pero no de Bim (dos vías efectoras de la apoptosis de timocitos).

Sin embargo, muy recientemente (Ananieva et al., 2008) han descrito que ERK5 no sería esencial para la supervivencia de las células T, aunque sí para su regulación. Utilizando ratones *knockout* de ERK5 condicionales para células T (dirigidos por CD4-CRE o Vav-CRE), estos autores muestran que ERK5 no es necesaria para el desarrollo normal de estas células, además de observar que el número de células T era normal en los nódulos linfáticos y el timo.

ERK5 en proliferación y ciclo celular

El descubrimiento de que el suero inducía fuertemente la transcripción génica de *c-jun* vía la activación transcripcional de MEF2C por ERK5 fue la primera evidencia de que la vía de señalización de ERK5 estaba implicada en la regulación de la proliferación celular (Wang y Tournier, 2006). Por otra parte, diversos mitógenos como EGF o G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*) transmiten sus señales promotoras de crecimiento a través de la vía de ERK5 (Kato et al., 1998; Dong et al., 2001).

La fosforilación de SGK por ERK5 en la serina 78 es necesaria para que SGK medie su activación y promueva la entrada de las células en la fase S del ciclo celular en respuesta a factores de crecimiento (Hayashi et al., 2001). Sin embargo, no se observaron diferencias en fibroblastos *erk5*^{-/-} o *mek5*^{-/-} en su progreso en la fase S respecto a los *wild type* (Wang y Tournier, 2006). Esto indica que la vía de

señalización de ERK5 debe ser importante en promover o regular la proliferación en ciertos tipos celular en ciertas condiciones.

ERK5 también regula la activación transcripcional del gen de la ciclina B1, un *checkpoint* clave en la proliferación celular cuya desregulación está frecuentemente asociada con la transformación neoplásica. La expresión de un mutante kinasa-muerta de ERK5 en diversas líneas celulares de cáncer de mama bloquea la síntesis de proteína ciclina D1 endógena inducida por suero (Mulloy et al., 2003). También se ha descrito la implicación de ERK5-NF κ B en regular la progresión del ciclo celular G2-M (Cude et al., 2007). ERK5 se activa de forma dependiente de ciclo celular, con una activación máxima en G2-M. La expresión de ERK5 constitutivamente activa en células HeLa aumenta significativamente el índice mitótico. Por el contrario, la sobre-expresión de un dominante negativo de ERK5 reducía el número de mitosis (Cude et al., 2007).

Papel de ERK5 en la regulación de la supervivencia y el fenotipo neuronal

Aunque el cerebro expresa niveles elevados de ERK5, su función en el cerebro no ha sido definida (Shalizi et al., 2003), ni se ha investigado su papel en enfermedades neurodegenerativas. La figura 10 muestra la distribución del mRNA de ERK5 en ratón de 56 días, la mayor expresión de ERK5 se encuentra en el hipocampo y cerebelo, aunque el córtex también expresa ERK5.

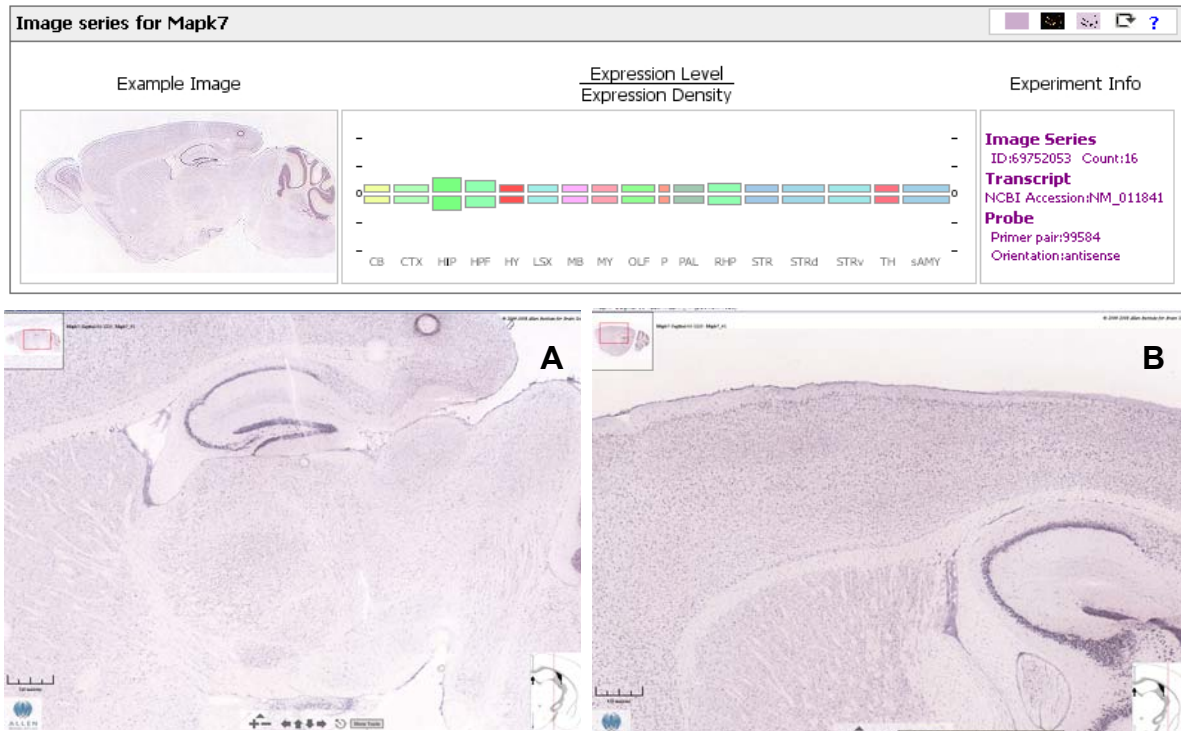


FIGURA 10. Distribución del mRNA de ERK5 en cerebro de ratón de 56 días. Cortes sagitales de cerebro de ratón macho de la cepa C57BL/6J. **A.** Ampliación de la zona hipocámpal. **B.** Detalle del córtex. Obtenido de <http://www.brain-map.org/> (Allen Brain Atlas)

La privación de suero induce apoptosis en neuronas corticales embrionarias y postnatales (Liu et al., 2003). En cerebro de rata, la expresión de ERK5 es elevada durante el desarrollo embrionario, pero decrece hasta niveles indetectables tras el día postnatal 49 (Cavanaugh, 2004; Liu et al., 2006a). A pesar de que los embriones *knockout* de ERK5 y MEK5 muestran severos retardos de crecimiento de la cabeza, los ratones en los que el gen de ERK5 ha sido específicamente deletado del cerebro muestran un desarrollo normal (Wang y Tournier, 2006).

Liu *et al.* relacionaron ERK5 con la especificación de fenotipo neuronal en células corticales de embriones de rata de 13 días (Liu et al., 2006a). ERK5 se expresa y es activa en células progenitoras corticales proliferantes y la activación constitutiva de la proteína aumenta la producción de neuronas. En este estudio se demuestra que ERK5 es necesaria y suficiente para estimular la generación de neuronas a partir de células progenitoras corticales. Estudios posteriores también relacionan a ERK5 con la especificación de fenotipo neuronal (Miloso et al., 2008).

Dada la activación de ERK5 por factores neurotróficos en células neuronales primarias se ha propuesto un papel importante de esta kinasa en la supervivencia neuronal mediada por neurotrofinas (Cavanaugh, 2004). Las neurotrofinas constituyen una familia de factores de crecimiento neuronales que promueven la supervivencia de distintas poblaciones neuronales durante el desarrollo del sistema nervioso de mamíferos (Kohara et al., 2001). Recientemente se ha observado que en respuesta a la neurotrofina BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), la activación de ERK5 a través del factor de transcripción MEF2 promueve la expresión de genes que están directamente implicados en la supervivencia celular de neuronas corticales durante el desarrollo del sistema nervioso (Watson et al., 2001; Liu et al., 2003).

Por su parte, las neurotrofinas liberadas por las neuronas diana inducen una señal que viaja retrógradamente y promueve la supervivencia de las neuronas inervantes (Suzaki et al., 2002). En este sentido, se ha descrito que durante esta señalización retrógrada, la internalización de los receptores de neurotrofinas (Trks) activa específicamente la vía de ERK5, pero no a ERK1/2, lo que conlleva la translocación de esta kinasa al núcleo, donde fosforilaría el factor de transcripción CREB y promovería la supervivencia de la célula (Ginty y Segal, 2002; Heerssen y Segal, 2002). Sin embargo, estos resultados no han podido ser corroborados por otros autores.

ERK5 también está implicada en la respuesta celular frente al estrés oxidativo producido por las *reactive oxygen species* (ROS) en células VSMC (*rat vascular smooth muscle cells*). Las ROS son moléculas que juegan un papel importante en la mediación del daño neuronal producido durante la isquemia cerebral, así como en enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson o el Alzheimer (Touyz et al., 2003).

Por otro lado, el estudio de cerebros post-mortem de 28 individuos suicidas y 21 control reveló una disminución de la actividad MEK5 basal en el hipocampo de los sujetos suicidas, que se traducía en una disminución de la fosforilación de ERK5. Los niveles de mRNA de ERK5 disminuían en el hipocampo de estos sujetos, pero no en el córtex prefrontal (Dwivedi et al., 2007).

De lo arriba expuesto se deduce que ERK5 puede jugar un papel importante en la neuroprotección frente a agentes oxidantes, pero son necesarios más estudios para

elucidarlo. La identificación de sustratos y proteínas que interaccionan específicamente con ERK5 puede esclarecer algunas de las funciones de esta kinasa en el sistema nervioso.

5. ERK5 EN DIVERSAS PATOLOGÍAS

ERK5 no sólo está implicada en funciones fisiológicas como supervivencia celular, proliferación y diferenciación celular, sino también en procesos patológicos como carcinogenesis, hipertrofia cardíaca y arterosclerosis.

ERK5 en enfermedades cardiovasculares

Las deleciones de los genes de ERK5 y MEK5 en ratón han proporcionado evidencias genéticas del papel esencial de la vía de ERK5 durante el desarrollo del corazón. El desarrollo anómalo del corazón en embriones *knockout* para ERK5 se debe a una vasculogénesis y angiogénesis deficientes. Los ratones knockout de ERK5 específicos de cardiomiocitos presentan un desarrollo normal (Hayashi y Lee, 2004), lo que sugiere un papel importante de ERK5 en las células endoteliales.

La angiogénesis anómala podría deberse a un incremento en la expresión de VEGF (*vascular endothelial growth factor*) debido a la desregulación del factor inducible por hipoxia 1 α (HIF1 α) (Sohn et al., 2002). ERK5 promueve la degradación de HIF1 α , y esta degradación ocurre vía un mecanismo dependiente de ubiquitina (Pi et al., 2005).

ERK5 inhibe la apoptosis inducida por privación de factores de crecimiento en células endoteliales (Pi et al., 2004). En estas células, el análisis del mecanismo antiapoptótico muestra que tanto MEK5 constitutivamente activa como el estrés de cizalladura de fluidos estimulan la activación de ERK5 y la consiguiente fosforilación de la proteína pro-apoptótica Bad (miembro de la familia Bcl-2) de forma independiente de Akt, PKA y p90rsk.

Algunos factores estimuladores de hipertrofia como el *leukocyte inhibitory factor* (LIF), además del estrés osmótico y oxidativo, activan a ERK5 en cardiomiocitos. Así, la sobre-expresión de MEK5 en cardiomiocitos induce hipertrofia (Wang y Tournier, 2006). Por último, la vía de señalización de ERK5 ha sido también implicada en desórdenes vasculares como arterosclerosis (Hayashi y Lee, 2004).

Papel de ERK5 en carcinogénesis

La vía de señalización de ERK5 juega un papel importante en la regulación de la proliferación de ciertos tipos celulares frente a determinados estímulos, aunque los mecanismos por los cuales media estos efectos no están claros. Entre otros, la ciclina D1 (un regulador de la progresión del ciclo celular) es una diana de la vía de señalización de ERK5 (Mulloy et al., 2003), lo cual puede tener importantes implicaciones en los cánceres en que esta ciclina se desregula.

La carcinogénesis es un proceso por el cual los mecanismos de control genético de las células son modificados dando lugar a una población de células proliferativamente incontroladas. En ese sentido, la desregulación de la vía de ERK5 ha sido asociada a varias propiedades malignas de cánceres humanos, entre las cuales se encuentran el aumento de potencial metastático de las células de cáncer de próstata; el crecimiento anómalo de los carcinomas mamarios que sobre-expresan ErbB2; y la quimioresistencia de las células de cáncer de mama (Hayashi y Lee, 2004; McCracken et al., 2008; McCracken et al., 2008; Kumamoto y Ooya, 2007; Ostrander et al., 2007; Li et al., 2006). ERK5 participa en la transducción de señal de neuregulinas (familia de factores de crecimiento con funciones críticas en el desarrollo del sistema nervioso, en diferenciación y transformación celular) y posee actividad constitutiva en células de cáncer de mama que sobre-expresan ErbB2 (Esparis-Ogando et al., 2002).

También se ha descrito que la activación de la vía MEK/ERK5 se asocia a un aumento de la proliferación celular en cáncer de próstata (Dudderidge et al., 2007). Además se ha correlacionado una expresión intensa de MEK5 con la presencia de metástasis ósea y menor grado de supervivencia. Se ha propuesto utilizar la sobre-expresión de MEK5 como un valor adicional de pronóstico en la supervivencia, ya que ensayos de transfección de MEK5 confirman su habilidad para inducir proliferación, motilidad e invasión en células de cáncer de próstata. (Mehta et al., 2003). Por otra parte, la activación de ERK5 (pero no de ERK1) ha sido relacionada con metástasis del nodo linfático el carcinoma de células escamosas orales (Sticht et al., 2008).

Por último, English *et al.* observaron en células HEK293 que V12 H-Ras, una forma constitutivamente activa de H-Ras, activaba el dominio catalítico de ERK5 de forma independiente de Raf1 constitutivamente activo, lo que sugiere que ERK5 podría

participar en la señalización mediada por Ras e independiente de Raf1 (English et al., 1998; English et al., 1999). Además de Ras, otros oncogenes son capaces de activar a ERK5. Es el caso de Cot, que estimula la actividad de c-jun via JNK, p38 y ERK5 para inducir transformación neoplásica en células NIH3T3. Además, el oncogen Src está involucrado en la formación del complejo funcional Lad/MEKK2/MEK5 que regula la actividad de MEF2 (Wang y Tournier, 2006). ERK5 es activada por Src oncogénica y esta activación contribuye a la disrupción del citoesqueleto de actina frecuente en la transformación oncogénica (Barros y Marshall, 2005).

6. TÉCNICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE COMPLEJOS DE PROTEÍNAS

Las proteínas llevan a cabo la mayoría de los procesos biológicos que se dan en la célula, y muy a menudo lo hacen formando complejos proteína-proteína. El conocimiento del genoma de los organismos eucariotas superiores sugiere que la complejidad de éstos no se debe a un dramático aumento en el número de genes, sino que más bien se debe a una mayor complejidad en interacciones proteína-proteína (Rubin, 2001). El establecimiento de las interacciones moleculares que forman estos complejos es una de las tareas más relevantes de la era post-genómica, en un proceso que se beneficia de las nuevas técnicas de espectrometría de masas.

Originalmente, la purificación de complejos de proteínas utilizaba los métodos bioquímicos clásicos de técnicas cromatográficas, en un proceso largo y laborioso, que requiere una gran cantidad de material de partida y que debe ser diseñado específicamente para cada caso. Posteriormente, la introducción de técnicas de purificación por afinidad utilizando *tags* redujo el coste y tiempo de este proceso. La proteína utilizada como cebo (a la que se le adiciona un péptido – *tag* – que es reconocido por una resina de afinidad), se sobre-expresa en células y las proteínas asociadas se purifican mediante una resina de afinidad que reconoce dicho péptido (FLAG, myc, HA o poli-histidinas) (Dziembowski y Seraphin, 2004). Sin embargo, el grado de afinidad de estas resinas es pobre, por lo que con mucha frecuencia el grado de recuperación de proteínas poco abundantes es muy bajo, además de aparecer artefactos; las proteínas contaminantes típicas son de citoesqueleto y chaperonas.

En 1991 se describió un nuevo método para la identificación de complejos de proteínas que interaccionan con una proteína conocida, el *yeast two hybrid* (Chien et al., 1991). Este método se basa en el diseño de dos plásmidos que codifican para dos proteínas híbridas. Un híbrido consiste en un dominio de unión a DNA de la proteína de activación transcripcional de levadura GAL4 fusionada a una proteína conocida; el otro híbrido consiste en el dominio de activación de GAL4 unido a una secuencia de proteína codificada en una librería de fragmentos de DNA genómico de levadura. La interacción entre la proteína conocida y la codificada por los plásmidos de la librería llevan a la transcripción del gen “*reporter*”, que es detectado (figura 11). Este método presenta dos problemas principales: un elevado número de falsos positivos y de falsos negativos (Edwards et al., 2002).

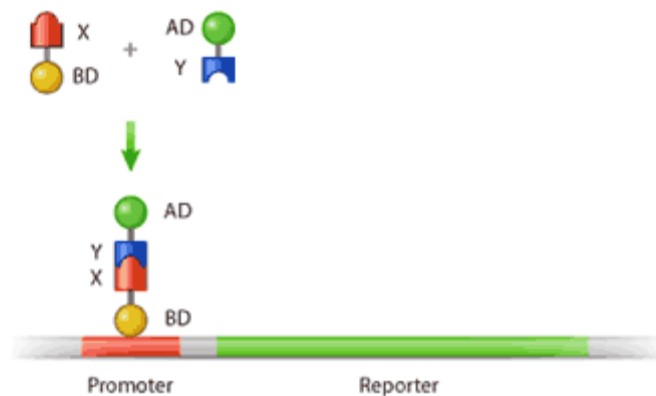


FIGURA 11. Bases del sistema *yeast two hybrid*. La interacción de la proteína cebo X con la proteína Y de una librería acercan los dos dominios del factor de transcripción (AD, *activation domain* y BD, *binding domain*) necesarios del para que se exprese el gen reportero. Obtenido de www.nature.com

En 1999 se describió una nueva técnica para la purificación de complejos de proteínas en condiciones nativas, basada en una purificación de afinidad en tandem (TAP, *tandem affinity purification*) (Rigaut et al., 1999). En este trabajo se utilizará esta técnica para identificar proteínas que interaccionan con la proteína kinasa ERK5.

El procedimiento TAP tiene aplicaciones similares al *yeast two-hybrid* (Fromont-Racine et al., 1997). Sin embargo, el método TAP presenta la ventaja de que en unas condiciones establecidas, todas las interacciones directas e indirectas son identificadas en un único ensayo. Además, el método TAP aporta una información aproximada sobre la estequiometría de las proteínas presentes en el complejo, y permite un análisis bioquímico de las proteínas purificadas. Esta metodología no está limitada a la detección de interacciones proteína-proteína, ya que los ligandos que copurifican también pueden ser caracterizados (Rigaut et al., 1999).

El método TAP fue originalmente puesto a punto para la purificación de complejos de proteínas en levadura (Rigaut et al., 1999; Puig et al., 2001; Shevchenko et al., 2002), pero está siendo utilizado con éxito en células de mamífero (Drakas et al., 2005). Desde su descubrimiento en 1999, se ha producido un gran aumento en el número de publicaciones en las que se utiliza la metodología TAP (ver figura 12).

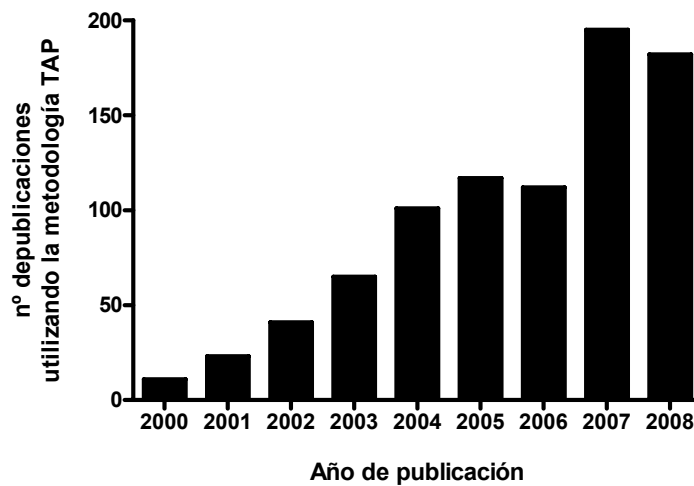


FIGURA 12. Número de publicaciones que utilizan la metodología TAP desde su descubrimiento hasta finales de 2008. Fuente <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

Este método se basa en el uso de dos cromatografías secuenciales. En primer lugar se diseña un vector que codifique la proteína objeto de estudio a la que se le adicionan dos dominios de unión a IgG y un péptido de unión a calmodulina, ambos separados por una secuencia que es específicamente reconocida por la proteasa TEV (ver la representación esquemática de la figura 13). Este vector debe ser sobre-expresado establemente en una línea celular. La purificación de los complejos se realiza mediante dos cromatografías secuenciales. La combinación de dos resinas diferentes logra un gran rendimiento, y la rapidez de la purificación y el uso de tampones que simulan las condiciones intracelulares incrementa el éxito de obtener complejos de proteínas, que son identificadas mediante espectrometría de masas (Dziembowski y Seraphin, 2004).

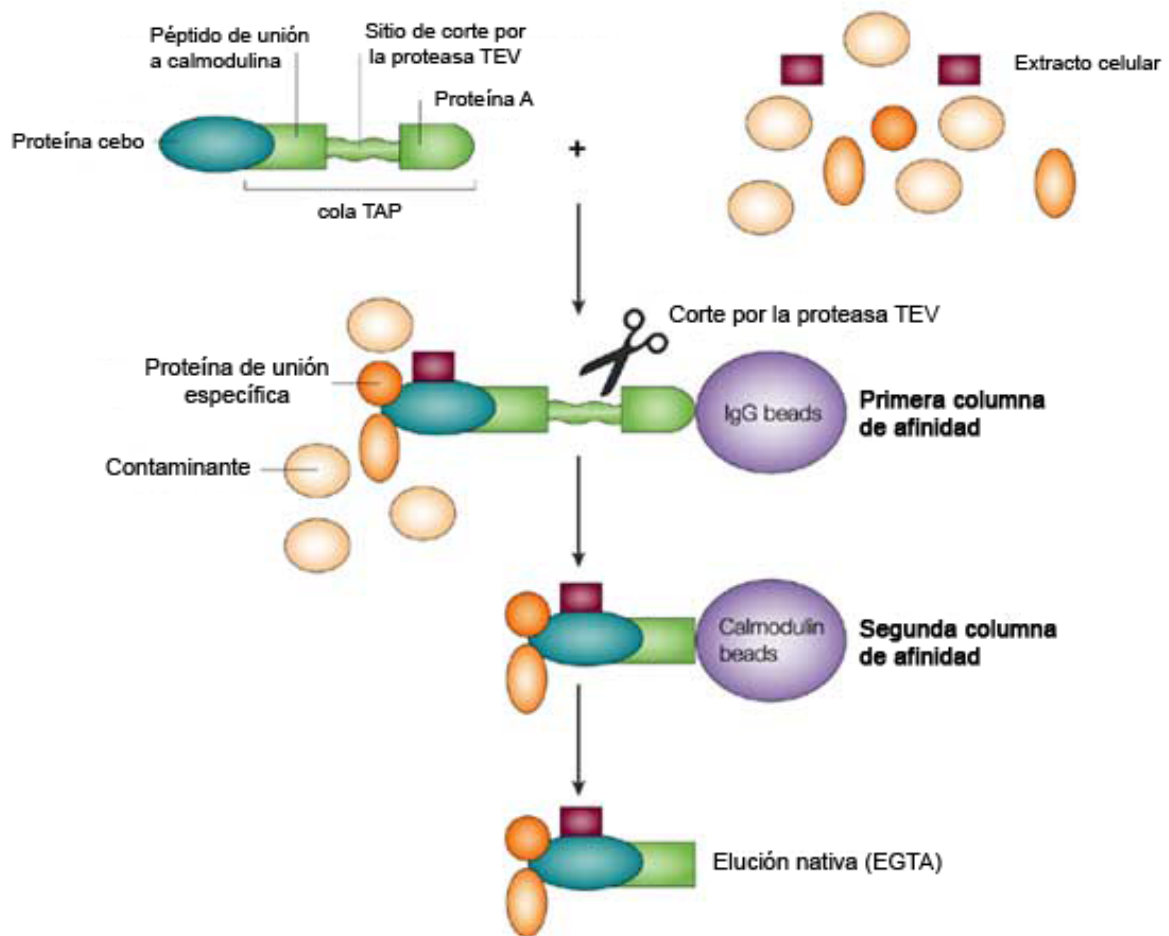


FIGURA 13. Método TAP. Representación esquemática del procedimiento de purificación de complejos de proteínas TAP. Figura modificada de www.nature.com.

7. ISQUEMIA CEREBRAL

El accidente cerebrovascular o ictus (del latín golpe, *stroke* en inglés) consiste en la interrupción repentina del suministro de sangre a una parte del cerebro. En el ictus isquémico la presencia de un coágulo es la que interrumpe el flujo sanguíneo, mientras que el ictus hemorrágico es consecuencia de la rotura de un vaso sanguíneo en el cerebro, de manera que la sangre se derrama en los espacios que rodean a las células cerebrales. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el ictus es, tras las enfermedades cardíacas y el cáncer, la tercera causa de muerte en los países industrializados y constituye la principal causa de discapacidad en el adulto.

Etimológicamente la palabra isquemia procede del griego ἵσχειν (detener) and αἷμα (sangre). Así, la isquemia se define como una disminución transitoria o permanente del riego sanguíneo de una parte del cuerpo, producida por una alteración normal o patológica de la arteria o arterias aferentes a ella (www.rae.es/rae.html).

La isquemia cerebral es el resultado de la disminución, por debajo de un nivel crítico, del flujo sanguíneo cerebral global o del de un determinado territorio arterial cerebral, cuya consecuencia primaria es la falta de oxígeno y glucosa necesarios para el metabolismo cerebral. El tejido cerebral es dependiente del aporte adecuado de oxígeno y glucosa para su funcionamiento normal, por lo que la interrupción del flujo sanguíneo al cerebro resulta en una alteración rápida del metabolismo y las diversas funciones cerebrales, que conducirá finalmente a la muerte cerebral (de Leciñana A, 2008; http://escuela.med.puc.cl/publ/Cuadernos/2000/pub_01_2000.html). Si se obturan los vasos que irrigan todo el cerebro, la lesión recibe el nombre de isquemia global. En cambio, si sólo se produce la oclusión de vasos que irrigan una zona determinada, la lesión se denomina isquemia focal (García, 1975).

En la isquemia focal, la obstrucción de un vaso sanguíneo produce un gradiente de la lesión que se caracteriza por una isquemia intensa en la zona que depende estrictamente de la arteria afectada (core) y una zona isquémica menos severa en su periferia (penumbra), como ilustra la figura 14. En el core, debido a la carencia de oxígeno y glucosa y a la consiguiente depleción energética, se produce la pérdida de función de membrana y de homeostasis iónica que conduce a la muerte celular, con un área necrótica evidente. Se producirá la muerte de todos los tipos celulares de manera prácticamente inmediata

Alrededor de esta zona de infarto puede existir flujo sanguíneo residual suficiente para mantener la viabilidad celular durante un tiempo determinado, que dependerá de la magnitud de dicha perfusión residual (Siesjo, 1992a; Siesjo, 1992b). Esta zona transitoriamente viable es susceptible de recuperación si la hipoperfusión se corrige. Por eso, el área de penumbra es la diana de las medidas terapéuticas dirigidas a reducir la lesión y las secuelas tras la isquemia cerebral focal. De continuar la situación de hipoperfusión, las alteraciones bioquímicas que resultan del trastorno de la función celular, denominadas cascada isquémica, terminarán provocando la pérdida irreversible de la viabilidad celular y causando su muerte (de Leciñana A, 2008).

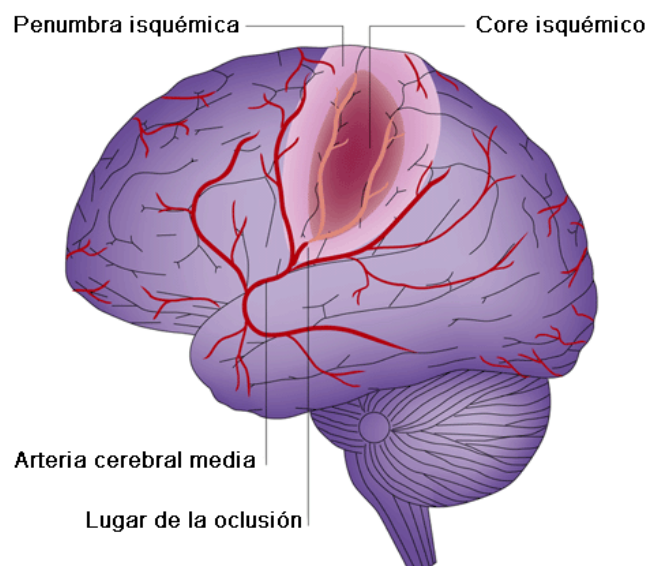


FIGURA 14. Daño producido tras una isquemia focal. La isquemia focal resulta en una muerte rápida en la región del core, que comprende el territorio inmediato a la arteria ocluida. Esto se acompaña de un infarto más retardado (región de penumbra), en el que las neuronas pueden morir horas después del inicio de la lesión. Obtenido de www.nature.com.

Dada la elevada incidencia de la isquemia cerebral, esta enfermedad es objeto de numerosos estudios que intentan describir los mecanismos que producen el daño y disminuir las consecuencias de la lesión. Existen diversas aproximaciones experimentales para simular el daño isquémico. La tabla 1 resume los modelos más utilizados.

MODELO		CARACTERÍSTICAS
<i>in vivo</i>	modelos de isquemia global oclusión de las grandes arterias que irrigan el encéfalo	Oclusión de 4 vasos Oclusión de las arterias vertebrales y las 2 carótidas comunes. Se interrumpe completamente el flujo sanguíneo del encéfalo
		Oclusión de 2 vasos Oclusión de ambas carótidas comunes
	modelos de isquemia focal oclusión permanente o transitoria de una arteria cerebral específica	Oclusión intraluminal de la ACM Permite efectuar una oclusión proximal de la ACM de forma reversible y sin craneotomía.
		Oclusión embólica Generación de un coágulo rico en plaquetas o en fibrina.
		Isquemia-hipoxia neonatal Modelo de hipoxia perinatal
	<i>in vitro</i>	modelo de excitotoxicidad Uso de agonistas de los receptores de NMDA, como NMDA o glutamato.
isquemia química Simulación de una hipoxia mediante el uso de sustancias como la cianidina (inhibe a la citocromo C oxidasa) o la oligomicina (inhibe la ATP sintasa).		
OGD Privación de oxígeno y glucosa. Se retira la glucosa del tampón y se introduce el cultivo en una cámara anaerobia a 37°C. Es el modelo <i>in vitro</i> más utilizado.		

TABLA 1. Modelos de estudio de la isquemia cerebral. ACM: arteria cerebral media. Sintetizado de Badiola, 2008.

8. LA CASCADA ISQUÉMICA

Entre la aparición de la isquemia y la muerte neuronal se desarrolla una cascada de reacciones químicas en las células nerviosas (cascada isquémica) que parece ser la responsable de la muerte neuronal. El conocimiento de estas alteraciones del metabolismo celular es de sumo interés para el desarrollo de fármacos que bloqueen esta cadena de reacciones y lleven a una mejor recuperación funcional de los síndromes isquémicos cerebrales (http://www.infodoctor.org/neuro/cap5_3.htm).

Entre las alteraciones metabólicas producidas en la cascada isquémica destacan las siguientes:

- Fallo en la producción energética: La célula acaba con las reservas energéticas de las que dispone y le resulta imposible mantener el potencial de reposo de la membrana plasmática. En ese momento se produce el fallo de la ATPasa Na^+/K^+ y la despolarización de la membrana. Esta despolarización se transmite en el área de penumbra de tal manera que parte de la energía residual va siendo consumida en la repolarización, lo cual agrava el déficit energético (http://escuela.med.puc.cl/publ/Cuadernos/2000/pub_01_2000.html).
- Excitotoxicidad: la despolarización de la membrana produce la liberación, desde las neuronas del terminal presináptico, de neurotransmisores excitatorios como el glutamato. La liberación de glutamato provoca la sobre-activación tóxica de sus receptores postsinápticos (NMDA y AMPA-kainato). Estos receptores están acoplados a canales iónicos que permiten el ingreso de sodio y calcio a la célula. El efecto tóxico del glutamato y otros neurotransmisores sobre las neuronas se denomina excitotoxicidad (Martin et al., 1998; Hardingham y Bading, 2003). Los mecanismos de excitotoxicidad producen necrosis pero también pueden iniciar algunos procesos moleculares que conducen a la apoptosis (Dirnagl et al., 1999).
- Aumento del calcio citosólico: La despolarización ocasiona la entrada masiva de calcio al interior del citoplasma a través de canales dependientes de voltaje (NMDA y AMPA) y por el funcionamiento reverso del intercambiador $\text{Na}^{2+}\text{-Ca}^{2+}$. El calcio provoca una activación enzimática masiva, ya que numerosas enzimas son dependientes de calcio. De esta forma, se activan enzimas líticas (proteasas, lipasas, endonucleasas) que destruyen componentes celulares (Choi, 1988).

Por otra parte, dependiendo de la concentración intracelular de calcio se activan o inhiben diversos factores de transcripción que favorecen la activación de la cascada de apoptosis. Así, concentraciones fisiológicas de calcio favorecerían la expresión de genes de supervivencia, concentraciones moderadas la expresión de genes de muerte inductores de apoptosis y concentraciones masivas inducirían necrosis (Hardingham y Bading, 2003).

- **Estrés oxidativo:** La autodigestión de componentes celulares facilita la síntesis de óxido nítrico y la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), entre las que destacan el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo ($\cdot OH$), el óxido nítrico (NO) y el peroxinitrito ($ONOO^-$). Esto desacopla la fosforilación oxidativa comprometiendo aun más la disponibilidad energética. Los ROS generados sirven como moléculas de señalización que provocan inflamación y apoptosis (Gursoy-Ozdemir et al., 2000).
- **Inflamación:** La isquemia induce también una respuesta inflamatoria que depende de la activación de factores de transcripción como el factor nuclear kappa-beta (NFB) que da lugar a la expresión de citoquinas proinflamatorias (Factor de Necrosis Tumoral, Interleulina-1) que, junto a la acción quimiotáctica de los leucotrienos producidos por la actividad de fosfolipasas activadas por calcio inducen la infiltración leucocitaria. Los propios leucocitos, que llegan al área dañada y se adhieren a la microvasculatura, segregan posteriormente más citoquinas y moléculas de adhesión para perpetuar el proceso y contribuyen al daño del tejido. La respuesta inflamatoria juega un papel importante en la alteración del flujo, en la microcirculación y en la destrucción tisular (http://escuela.med.puc.cl/publ/Cuadernos/2000/pub_01_2000.html).

Los procesos que ocurren en la cascada isquémica, pueden desembocar en muerte celular. En un principio se suponía que la muerte producida tras la isquemia era de tipo necrótico, pero numerosas evidencias pusieron de relieve que también se da un proceso apoptótico (Majno y Joris, 1995; Graham y Chen, 2001).

Respuesta glial a la isquemia cerebral

Las células gliales también son sensibles a la isquemia, aunque en menor grado que las neuronas. Los astrocitos desempeñan un papel fundamental en el ictus, tanto en el establecimiento de la lesión definitiva, como en la reparación tisular (Castillo, 2001).

La glía no contiene sinapsis, por lo que no es especialmente sensible al daño por mecanismos de excitotoxicidad. Sin embargo, la entrada de Ca^{2+} es una vía común a todas las células del parénquima cerebral afectadas por la isquemia.

La microglia, en colaboración con los astrocitos, contribuye al daño tisular isquémico a través de varios mecanismos, como la producción de citocinas, NO y otros radicales libres (Lees, 1993).

En la oligodendroglía, la disminución energética origina una pérdida de los gradientes iónicos que revierten el funcionamiento de algunas bombas intercambiadoras de Na^+ y Ca^{2+} , con la consiguiente acumulación de ambos iones en el interior de la célula.

Las células gliales que sobreviven al episodio isquémico sufren un proceso conocido con el nombre de gliosis reactiva, caracterizado por la hipertrofia (principalmente de los astrocitos) y proliferación (la microglía, que además migra a la región afectada) (Sonia Solé, 2005). Este proceso de gliosis reactiva se ha relacionado con mecanismos de neuroprotección y reparación de la lesión isquémica. Los astrocitos constituyen una de las fuentes más importantes de factores de crecimiento, principalmente del factor de crecimiento neuronal (NGF), del factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF) y del factor de crecimiento vasculo-endotelial (VEGF). Este último factor es capaz de aumentar la permeabilidad vascular, y todos ellos pueden desempeñar un papel importante en la tolerancia isquémica (Castillo, 2001).

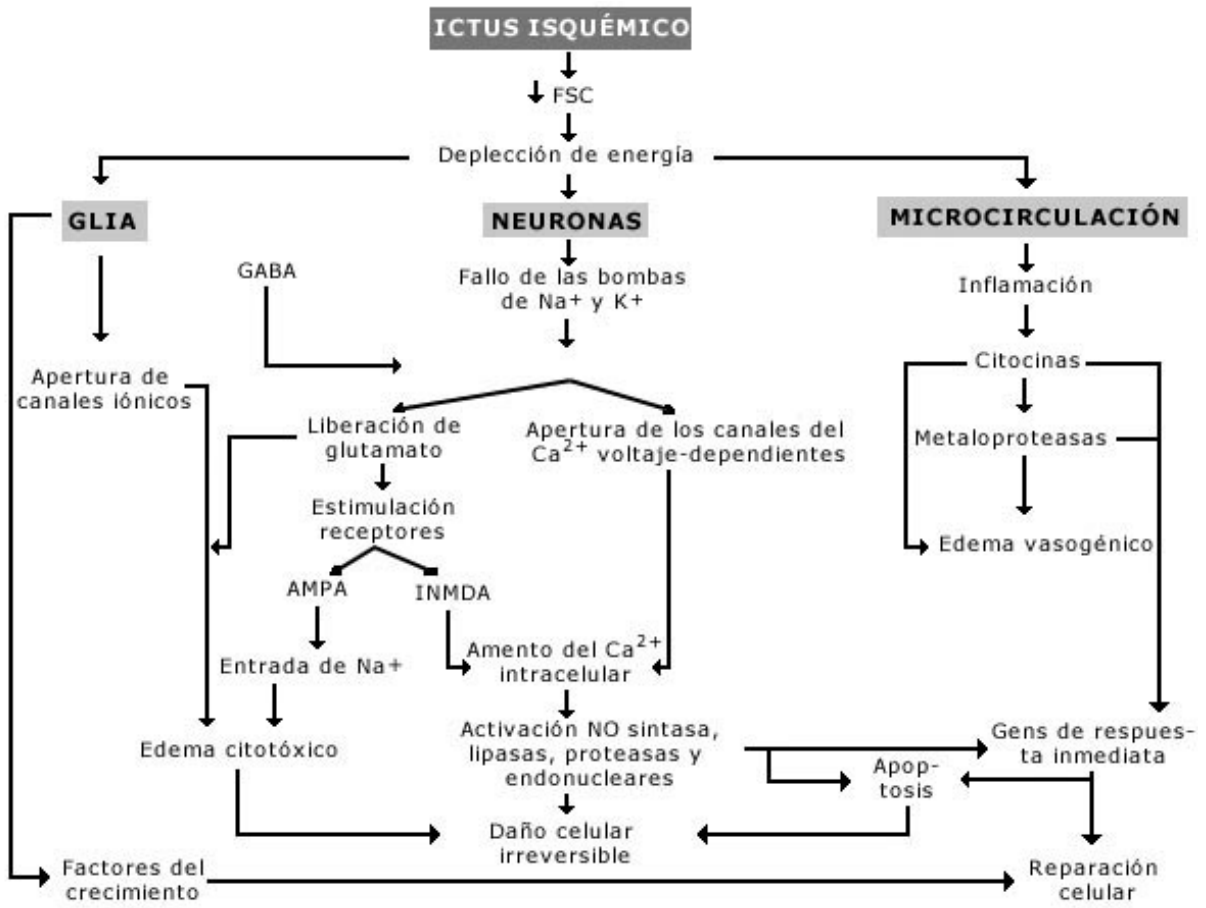


FIGURA 15. Representación esquemática de la cascada isquémica. La cascada isquémica se desencadena en respuesta a la depleción energética y, habitualmente, termina en la destrucción celular inmediata (en el core) o retardada (en la penumbra). En algunas circunstancias también se pueden poner en marcha mecanismos de reparación celular. FSC: Flujo sanguíneo cerebral. Obtenido de Castillo, 2001

9. MECANISMOS DE MUERTE CELULAR TRAS LA CASCADA ISQUÉMICA

Existen dos mecanismos fundamentales de muerte celular tras la isquemia cerebral: necrosis y apoptosis. Los dos tipos de muerte se distinguen por marcadores morfológicos y bioquímicos, ya que los mecanismos que las producen son diferentes (figura 16).

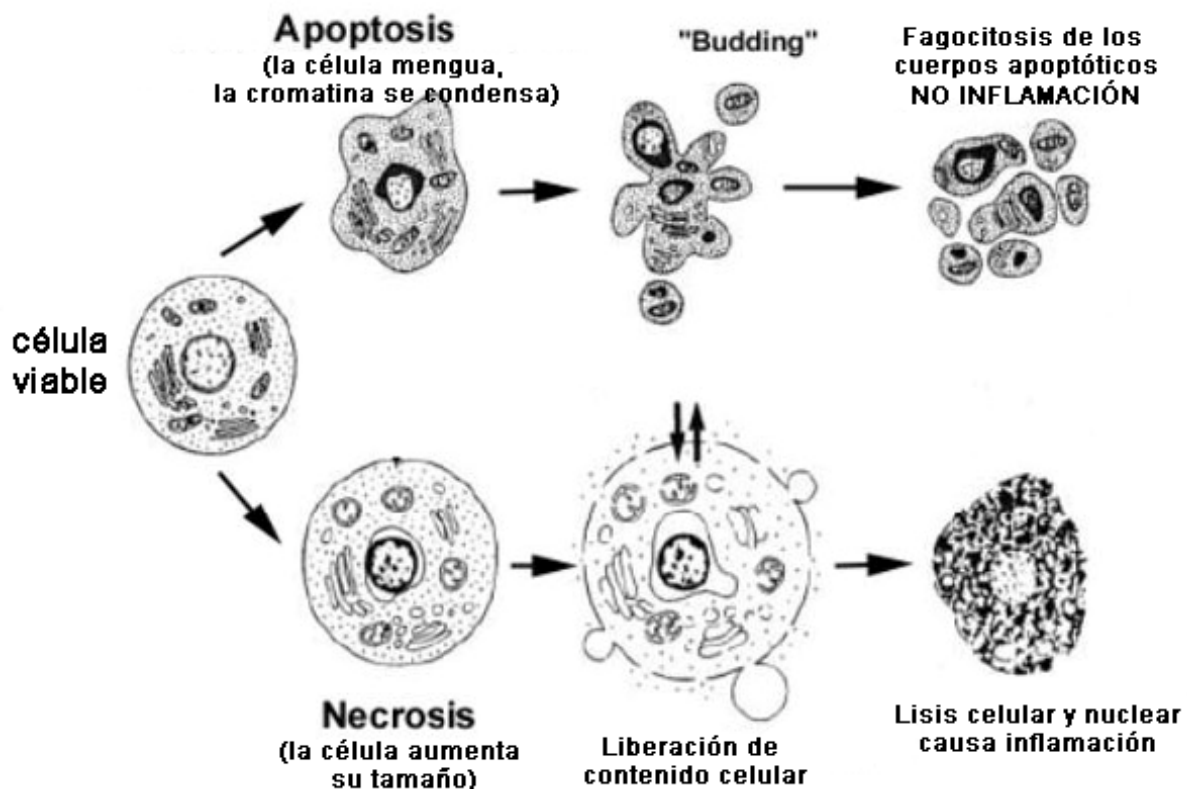


FIGURA 16. Características de la muerte celular apoptótica y necrótica. La apoptosis se caracteriza por la reducción del volumen celular, la condensación de la cromatina, la formación de cuerpos apoptóticos y la ausencia de inflamación. En la muerte necrótica la célula se hincha, presenta aberturas en la membrana y acaba liberando su contenido al exterior, produciendo así inflamación (Modificado de Van Cruchten, 2002).

Muerte necrótica

La necrosis es un fenómeno pasivo que depende de las alteraciones bioquímicas producidas por el déficit energético y por la activación de enzimas líticas que destruyen componentes celulares (Siesjo, 1992a; Siesjo, 1992b). En el proceso

isquémico, la necrosis suele afectar a un gran número de células, especialmente en el núcleo del infarto.

En la isquemia, la disminución de energía produce el fracaso de la función de membrana con pérdida del gradiente iónico, lo que desencadena el paso de agua al interior del citoplasma y de las organelas con el consiguiente edema celular. Finalmente tiene lugar la lisis de las membranas y la liberación del contenido citoplásmico que ocasionan una respuesta inflamatoria. El ADN de las células necróticas se destruye en fragmentos que no siguen ningún patrón definido por la acción de endonucleasas.

Muerte apoptótica

La muerte apoptótica, también llamada muerte celular programada, es un proceso activo en el que señales específicas desencadenan una cascada de eventos que desembocan en la expresión selectiva de determinados genes (Hardingham y Bading, 2003).

Durante la isquemia, la apoptosis se desencadena como respuesta a diferentes estímulos como el aumento de calcio, el glutamato, la presencia de radicales libres o de citoquinas. Esto produce una serie de cambios morfológicos en la célula (diferentes de la necrosis) que se caracterizan por la reducción del citoplasma, la preservación de las membranas, la fragmentación del DNA y la condensación periférica de la cromatina nuclear. No se produce la lisis de membranas, pero la membrana plasmática se divide dando lugar a la fragmentación de la célula en numerosas vesículas características, denominadas cuerpos apoptóticos. Puesto que no se produce lisis de membrana ni liberación del contenido celular, no hay reacción inflamatoria. Los cuerpos apoptóticos son fagocitados por macrófagos u otras células (Graham y Chen, 2001).

La muerte apoptótica es un fenómeno más propio de la penumbra isquémica, ya que se necesita cierta reserva energética disponible para la expresión génica y la síntesis de proteínas de *novo*.

La aparición de muchas de estas características morfológicas es debida a la acción de una familia de cisteína-proteasas, las caspasas. Se han descrito al menos 14 caspasas diferentes, algunas de las cuales se denominan iniciadoras, y tienen

funciones de activación de la cadena, originando la fragmentación de la forma proenzimática inactiva de otras caspasas para su conversión en forma activa.

Las caspasas efectoras, principalmente la caspasa 3, destruyen proteínas citoplásmicas o nucleares necesarias para la supervivencia celular. Asimismo, activan otras enzimas que destruyen componentes celulares o que contribuyen a activar la cascada de procesos promotores de apoptosis. La activación de las caspasas depende del equilibrio estrecho entre la expresión de señales de muerte (genes y proteínas proapoptóticas como Bax, Bad, Bid y Bcl-xs) y las señales de supervivencia (genes y proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y Bcl-xl) y puede iniciarse por estímulos nocivos externos o bien por estímulos intracelulares como el daño del DNA) (de Leciñana A, 2008).

Las caspasas activan la cascada de la apoptosis a través de dos vías fundamentales: la vía extrínseca (o dependiente de receptores como FAS) y la vía intrínseca (o mitocondrial, independiente de receptor). En 1994 se describió una vía alternativa para la activación de caspasas que dependería de la acción de calpaína, una enzima proteolítica activada por calcio y responsable de proteólisis en la muerte por necrosis. En su estudio, Krajewska *et al.* demostraron que caspasa-14 era degradada por calpaína I *in vitro*, lo que supone un mecanismo de interrelación entre mediadores de necrosis y apoptosis (Krajewska et al., 2004).

Existe además una vía de activación de apoptosis independiente de caspasas que implica la liberación mitocondrial de factor inductor de apoptosis (AIF) (Wang, 2001). El daño del DNA de cualquier etiología induce la activación de la enzima reparadora poli-ADP-ribosa polimerasa-1 (PARPP-1). La activación masiva de PARPP-1 consume los depósitos de NAD mitocondrial y ello induce la liberación de AIF que produce la fragmentación del DNA. Esta es otra posible vía de relación entre los mecanismos responsables de la muerte celular por necrosis y por apoptosis, si se tiene en cuenta que el DNA se lesiona tras la activación de la cascada isquémica necrótica por efecto de los radicales libres o de endonucleasas activadas por calcio. Así, a pesar de que clásicamente se ha presentado necrosis y apoptosis como dos procesos con claras diferencias morfológicas y bioquímicas, en los últimos años han aparecido evidencias de que ciertas células presentan morfologías intermedias tras la isquemia. En algunos casos, se aprecia que las caspasas también pueden desencadenar muerte necrótica tras la isquemia. (Schwab et al., 2002), en otros se

afirma que las neuronas isquémicas contienen marcadores bioquímicos apoptóticos pero morfología necrótica (Hou y MacManus, 2002; Hirsch et al., 1997; Fujikawa et al., 2002). En 2003, Jaeschke y Lemasters introdujeron el término necrapoptosis para definir el fenotipo intermedio que encontraron en células hepáticas tras la isquemia. En su trabajo afirmaron que necrosis y apoptosis podían compartir mecanismos (Jaeschke y Lemasters, 2003). Así, la distinción entre muerte apoptótica y necrótica no siempre resulta sencillo tras la isquemia cerebral.

10. PAPEL DE CALPAÍNA EN LA ISQUÉMICA CEREBRAL

El aumento de la concentración de calcio intracelular es un factor clave en los procesos que conducen al daño neuronal irreversible. Tras la entrada de calcio producida por la isquemia se activan diversas enzimas calcio-dependientes, entre las que se encuentran la familia de cisteína-proteasa calpaína. Calpaína ha sido implicada como mediador del daño isquémico, en parte por la proteólisis de proteínas estructurales (Chen et al., 2001). Por otra parte, se ha descrito que calpaína corta a Bax en un fragmento de 18 kDa que media la salida del citocromo c. Calpaína también proteoliza a Bcl-x_L para convertirla en una forma pro-apoptótica. Tras la isquemia, la α -espectrina es degradada de forma específica por calpaína, de tal manera que se puede evaluar la expansión del área de lesión mediante la degradación de espectrina (Goll et al., 2003). Así, el daño en los tejidos del área isquémica se produce por necrosis y apoptosis, y calpaína interviene en ambos procesos (Blomgren et al., 2001).

Características de calpaína

Las calpaínas pertenecen a una familia de cisteína proteasas dependientes de calcio, e incluye un polipéptido (calpastatina) cuya única función conocida es la inhibición de las dos calpaínas (Goll et al., 2003). Las calpaínas se dividen en dos clases: típicas (aquellas que poseen un dominio similar a calmodulina en su cola C-terminal) y atípicas (las que no poseen el dominio IV similar a calmodulina). Las dos isoformas clásicas mayoritarias de calpaína en mamífero son μ -calpaína y m-calpaína. Ambas son heterodímeros que contienen una subunidad reguladora de 28 kDa (CSS1, *calpain small subunit 1*) y una subunidad catalítica grande de 80 kDa que comparte un 55-65% de homología de secuencia entre ambas proteasas (Schad et al., 2002).

La nomenclatura utilizada para describir a la subunidad catalítica μ - o m- hace referencia a la concentración de calcio μ molar o milimolar necesarias para la activación de estas proteasas *in vitro* (Goll et al., 2003). Durante su activación, las subunidad de 28 kDa es cortada para pasar a una forma de 17 kDa, mientras que la subunidad de 80 kDa se convierte en una forma de 76 kDa enzimáticamente activa (Yamashima, 2004). La cristalización de la estructura de m-calpaína revela 6 dominios en la subunidad grande:

- **Dominio I:** consta de una secuencia de 19 aminoácidos N-terminal que es cortada durante la activación inicial de calpaína I y II.
- **Dominio II:** contiene 2 centros activos: IIa y IIb.
- **Dominio III:** no es homólogo a ninguna otra proteína conocida.
- **dominio V:** requerido para la interacción de fosfolípidos de membrana.
- **Dominios IV y VI:** cada uno contiene 5 regiones de estructuras de unión a calcio *EF-hand*, que consisten en dos hélices- α conectadas por un *loop* que une calcio.

Como se ha mencionado, las calpaínas contienen subunidades catalíticas distintas, pero comparten la subunidad reguladora CSS1. La función de esta subunidad no es del todo conocida, pero es necesaria para la actividad y función *in vivo* de calpaína. Ratones *knockout* para el gen *capns1*, que codifica para la subunidad pequeña de calpaína, resultan letales en el desarrollo fetal (Arthur et al., 2000).

Entre las funciones atribuidas a CSS1 destacan su papel en el correcto plegamiento de la subunidad grande para ser catalíticamente competente y un papel autolítico que contribuye a la activación y sensibilidad al calcio de estas proteasas. En un principio se pensó que sólo existía una subunidad reguladora, pero en 2002 Schad et al. clonaron una segunda subunidad reguladora humana, a la que llamaron CSS2 cuyo papel no está definido, pero que podría tratarse de una variante específica de tejido (Schad et al., 2002).

Un gran número de proteínas (más de 100) son degradadas por calpaína *in vitro*. En general, se puede clasificar a sus sustratos en cuatro categorías: proteínas del citoesqueleto; kinasas y fosfatasa; proteínas asociadas a membrana, incluyendo a algunos receptores y canales iónicos; factores de transcripción.

Para el estudio de la acción de calpaína se utilizan diversos inhibidores, aunque algunos de ellos no son específicos de calpaína: calpastatina es el inhibidor natural

de calpaína; inhibidor I o ALLN (N-Acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO) también inhibe el proteosoma; inhibidor II o ALLM (N-acetyl-L-L-methional); inhibidor III o MDL 28170 (carbobenzoxy-valyl-phenylalanyl) inhibe calpaína I y II pero también γ -secretasa; inhibidor IV (Morpholinoreidil-Val-homofenilalanina-FMK); calpeptina; PD150606 (parece ser muy específico de calpaína respecto a otras cisteína proteasas); SJA6017. Algunos autores han observado propiedades neuroprotectoras frente al daño neuronal en el uso de inhibidores de calpaína como MDL28170, PD150606 y SJA6017 (Huang y Wang, 2001; Markgraf et al., 1998; Kupina et al., 2001).

No existe una única secuencia consenso reconocida por calpaína en sus sustratos. Se ha postulado que estructura terciaria puede tener más importancia que la secuencia primaria a la hora de dirigir el corte de la proteasa, y que secuencias entre dominios relativamente desestructuradas, sin hélices- α ni láminas- β podrían ser buenas dianas (Yamashima, 2004). Algunos estudios proponen la regla P2-P1, que afirma que los residuos preferidos para el corte por μ - y m-calpaína son aminoácidos hidrofóbicos pequeños (leucina, valina e isoleucina) en posición P2, y Arg y Lys (a veces Tyr) en posición P1 (Cuerrier et al., 2005). Por otro lado, los sustratos de calpaína a menudo presentan un motivo de unión a calmodulina, y el corte por la proteasa suele ocurrir en una región PEST adyacente: se trata de regiones ricas en prolina (P), ácido glutámico (E), ácido aspártico (D) y serina (S) o treonina (T), flanqueadas por residuos de arginina o lisina (Tompa et al., 2004). En algunos casos la mutación de las secuencias PEST evitaba el corte de calpaína.

Las calpaínas no actúan como proteasas destructoras, sino que cortan fragmentos específicos de proteínas que frecuentemente son componentes de cascadas de señalización, modificando su función irreversiblemente. Por ejemplo, la degradación de p53 por calpaína le priva de su habilidad de regular la expresión génica. La degradación por calpaína de la kinasa dependiente de Calcio/calmodulina (52kDa) genera un fragmento de 35 kDa que contiene el dominio catalítico y sigue siendo activo en ausencia de calmodulina (Hajimohammadreza et al., 1997).

11. PAPEL DE LAS MAP KINASAS EN ISQUEMIA CEREBRAL

Las MAPK han sido relacionadas con el daño producido tras la isquemia cerebral. Diversos estudios han intentado elucidar el papel de la fosforilación de ERK1/2, JNK y p38 tras isquemia y reperfusión (Herdegen et al., 1998; Ozawa et al., 1999; Wang et al., 2004; Lennmyr et al., 2002).

Se ha afirmado que la activación de ERK1/2 protege a las células neuronales del daño isquémico, mientras que la activación de JNK y p38 ayudan a la apoptosis (Xia et al., 1995). En esta línea, se ha asociado la muerte en el core isquémico con la disminución temprana en los niveles de P-CREB (relacionado con supervivencia) y el aumento de SAPK y JNK fosforiladas en el núcleo (Ferrer et al., 2003).

En un estudio comparativo de la activación de MAP kinasas clásicas mediante oclusión de la arteria cerebral media en ratas Sprague-Dawley se apreció activación de ERK en vasos sanguíneos, neuronas y glía del hemisferio ipsilateral, pero también en los vasos del hemisferio contralateral. No se observó activación de JNK en neuronas pero sí en vasos sanguíneos arteriales y glía del hemisferio lesionado. La presencia de ERK y JNK activas en los vasos sanguíneos las implica en la respuesta angiogénica a la isquemia cerebral. En cuanto a p38, es activa en macrófagos, lo que la relacionaría con la reacción inflamatoria (Lennmyr et al., 2002).

Una buena aproximación para conocer el papel de las MAP kinasas en la isquemia es el uso de inhibidores de MEK, p38 y JNK, que han mostrado conferir neuroprotección en diversos modelos de isquemia (Irving y Bamford, 2002). Por ejemplo, el tratamiento con el inhibidor de MEK1 PD98059 30 minutos antes de la isquemia en ratón reduce el volumen de infarto focal tras 22 horas en un 55% (utilizando un modelo de oclusión de la arteria media). La neuroprotección observada con el inhibidor de MEK1/2 es dosis dependiente (Alessandrini et al., 1999).

Por otro lado, Namura *et al.* observaron que tras la reperfusión de una isquemia cerebral global aumentaba drásticamente la fosforilación de ERK2 del hipocampo de ratón. El tratamiento intravenoso con el inhibidor de MEK1/2 U0126 después de la isquemia reducía el volumen infartado tras una isquemia focal de 3h en ratón, acompañado de una disminución en la fosforilación de ERK2. Además, el compuesto U0126 protegía cultivos primarios de neuronas corticales del daño producido por la

privación de oxígeno y glucosa de 9 horas así como de la toxicidad inducida por óxido nítrico (Namura et al., 2001).

Otros estudios ponen de manifiesto la inespecificidad de los inhibidores de MAP kinasas. Pereira *et al.* observaron que PD098059 inhibía la liberación de glutamato y la fosforilación de ERK1/2 en respuesta a KCl en sinaptosomas de hipocampo. Sin embargo, el inhibidor de MEK1/2 U0126 no afectaba a la concentración de glutamato a pesar de inhibir de forma más potente la fosforilación de ERK1/2. Los autores concluyeron que PD98059 inhibía de forma inespecífica la despolarización inducida por el influjo de calcio en terminales nerviosas hipocampales, ya que su acción era independiente de la fosforilación de ERK1/2 (Pereira et al., 2002).

12. PAPEL DE ERK5 EN ISQUEMIA CEREBRAL

Hasta la fecha tan sólo dos publicaciones de un mismo grupo relacionan ERK5 con la isquemia cerebral (Wang et al., 2004) (Wang et al., 2006). Este grupo estudió el hipocampo de ratas Sprague-Dawley tras 15 minutos de isquemia mediante oclusión trasiente de cuatro vasos. El hipocampo es uno de los tejidos más sensibles y más perjudicados tras una isquemia cerebral global, aunque neocórtex y estriado también se pueden ver afectados (Roda et al., 1998).

En primer lugar estudiaron la activación de ERK5 tras la reperfusión, y observaron un aumento en la señal de P-ERK5 mediante inmunoblot, con un pico de activación a los 30 minutos de reperfusión (Wang et al., 2004). Sin embargo, no observan diferencias en los niveles de proteína ERK5. Utilizando inhibidores de la tirosina kinasa Src observaron una disminución en la activación de ERK5 tras la reperfusión, por lo que sugirieron que la kinasa Src participaba de la activación de ERK5 en este modelo. El uso del antioxidante N-acetilcisteína también inhibía la activación de ERK5 de forma dosis-dependiente.

El segundo estudio relacionaba la activación de ERK5 con el preconditionamiento isquémico (Wang et al., 2006). La tolerancia isquémica es un fenómeno que consiste en un corto preconditionamiento que desencadena en protección sustancial frente a una isquemia mayor (Sharp et al., 2004). Así, en este estudio se realizó un preconditionamiento que consistió en 3 minutos de isquemia. Tres días después se realizaron 6 minutos de isquemia y se estudiaron los niveles de ERK5. El

precondicionamiento producía un aumento de la fosforilación de ERK5 en la región hipocampal CA1 respecto a los animales control en los que no se realizaba el precondicionamiento. El aumento en los niveles de P-ERK5 y el efecto neuroprotector del precondicionamiento revertía al pretratar a los animales con MK 801 (antagonista de los receptores de NMDA) o EGTA (quelante de calcio), de lo que deducían que la activación de ERK5 por el precondicionamiento dependía, en parte, del aumento de calcio que conlleva la estimulación de receptores NMDA.

IV. OBJETIVOS

En 1995 fue descubierta una nueva vía de señalización de MAPK, la vía MEK5-ERK5. Esta vía está implicada en enfermedades cardiovasculares, carcinogénesis y supervivencia neuronal. ERK5 juega un papel importante en sistema nervioso, dado que se activa frente a neurotrofinas, frente al estrés oxidativo producido por *reactive oxygen species* (ROS), tras la isquemia cerebral y tiene un papel en la especificación de fenotipo neuronal. Sin embargo, poco se conoce sobre los sustratos y proteínas que interaccionan con ERK5, lo que aportaría información sobre la función que realiza. Así, con el fin de caracterizar el papel de ERK5 en células neuronales se plantean los siguientes objetivos:

1. Identificación de proteínas que interaccionan con MEK5 y ERK5 mediante el método TAP (*Tandem Affinity Purification*) en células de neuroblastoma SH-SY5Y, que permite la purificación de complejos de proteínas en condiciones nativas. Verificar la interacción de ERK5 con las proteínas obtenidas y estudio del papel de estas proteínas en el control de la actividad y función de ERK5.
2. Estudio del papel de ERK5 en la isquemia cerebral mediante la utilización de un modelo *in vitro* de isquemia (OGD) en cultivos mixtos de neuronas corticales.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

1. CULTIVOS CELULARES

1.1. LÍNEAS CELULARES

Almacenamiento y subcultivo de las líneas celulares

Las líneas fueron adquiridas del ECACC (*European Collection of Cell Cultures*). En primer lugar se realizó una expansión y congelación del vial original. Posteriormente se procedió a descongelar uno de los viales expandidos para detectar posibles contaminaciones fúngicas, bacterianas o por micoplasma. Una vez descartadas las contaminaciones del banco principal, se descongeló otro vial y se estableció un banco de trabajo, las células del cual se utilizaron para los experimentos, siempre dentro de un rango de pases para mantener las características de la línea celular.

La preservación de las células se realizó congelando en presencia de un agente crioprotector (DMSO). Éste protege las células del daño físico por la formación de cristales de hielo y de la alteración osmótica provocada por el incremento de la concentración de sales en el medio extracelular. Tras la tripsinización, se introdujeron las células con el medio de congelación en un criotubo, y éste en un contenedor Cryo Freezing (Nalgene) embebido en alcohol isopropílico. Este sistema permite congelar las células con un descenso de temperatura de 1-3°C/min. Después de 24h a -80°C, los criotubos se sacan del contenedor Cryo Freezing y se guardan en un tanque de nitrógeno líquido.

Las células se mantuvieron en crecimiento en medio completo en un incubador en atmósfera húmeda, 5% de CO₂ a 37°C. Se subcultivaron aspirando el medio completo, haciendo dos lavados con PBS (*phosphate buffered saline*) y tripsinizando cuando el flask o la placa alcanzaron un 90% de confluencia. Tras la tripsinización, las células se resuspendieron en medio completo previamente atemperado en un baño a 37°C y se sembraron a la densidad deseada mediante el recuento en una Cámara de Neubauer.

Tratamiento de las células

Para cada experimento se sembraron las células en placas de tamaño adecuado y se dejaron asentar durante 24 horas en medio completo. En algunos casos, las células fueron privadas de suero 12 horas antes del tratamiento (0% de FBS para las células HeLa y 1% para las SH-SY5Y).

Las casas comerciales de los principales reactivos utilizados en el tratamiento de las líneas celulares son las siguientes: R&D (EGF); Sigma (H₂O₂, Sorbitol y Radicol), Serva (Geldanamicina) y Calbiochem (MG132).

Lisis y cálculo de la concentración de proteína

Para recoger los extractos celulares se sembraron placas de 10 cm y se dejaron crecer hasta alcanzar un 70-80%. Se realizaron 2 lavados con 10ml de PBS frío y se añadieron 300 µl de tampón de lisis. Se recogieron los extractos celulares con un *scraper* (Sarstedt). El lisado se centrifugó a 18.000 g 12 minutos a 4°C, recogiendo el sobrenadante (fracción soluble) y descartando el *pellet* (membranas, núcleos y restos celulares).

La concentración de proteína de los extractos se cuantificó por el método de Bradford (Bradford MM., 1976), mediante el kit Bio-Rad Protein Assay.

Tampón	Composición
Tampón de lisis	50 mM Tris-HCl pH 7,4; 0,27 M Sacarosa; 1 mM ortovanadato sódico a pH 10; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 10 mM glicerofosfato sódico; 50 mM NaF; 5 mM pirofosfato sódico; 1% Triton X-100; justo antes de usar añadir: 0,1% β-mercaptoetanol; Cocktail inhibidor de proteasas (SIGMA)

TABLA 2. Composición del tampón de lisis celular.

Material de cultivos

- Líneas celulares:
 - SH-SY5Y: neuroblastoma procedente de médula ósea humana, Caucásiana
 - HeLa: procedente de carcinoma epitelial de cérvix humano.
 - HEK 293: procedentes de riñón embrionario humano.
 - PC12: feocromocitoma de glándula adrenal de rata.
- Medios de cultivo:
 - Medio completo según la línea celular
 - SH-SY5Y: DMEM:F-12 (Sigma); 1% Aminoácidos no esenciales (Sigma); 15% FBS (Gibco); 8 ml Penicilina/Estreptomicina (Sigma)

- HeLa y HEK 293T: DMEM (Sigma, D-5796), 10% FBS (Gibco), Penicilina/Estreptomicina (Gibco); 2 ml Penicilina/Estreptomicina (Sigma)
- PC12: RPMI (Sigma, R-0883), 5% FCS, 10%FHS, 1,25 g glucosa, 146 mg glutamina, 1,19 mg HEPES, 55 mg piruvato, 2 ml Penicilina/Estreptomicina (Sigma)
- Medio de congelación: 50% DMEM sin antibiótico, 40% FBS, 10% DMSO.
- Tripsina-EDTA (Gibco): 0,05% tripsina; 0,53 mM EDTA.
- Polilisina (Sigma): utilizada únicamente para el cultivo de las células PC12. Antes de sembrar las células se incubaron las placas a 37°C con 10 µg/ml de polilisina durante 30-45 minutos.

1.2. CULTIVOS PRIMARIOS

Cultivos primarios de neuronas corticales mixtas

Los cultivos primarios de corteza cerebral de rata que contenían tanto neuronas como glía fueron preparados de embriones de rata Wistar de 17 días de gestación. Las células fueron sembradas a una densidad de 3×10^5 células por centímetro cuadrado en medio completo (Basal Medium Eagle-BME-, 5% suero bovino fetal, 5% suero de caballo, 20 U/ml penicilina, 50 µg/ml estreptomicina, 2 mM glutamina y 10 mM de glucosa) en pocillos pre-incubados en poli-L-lisina. Las células fueron mantenidas a 37°C, 100% de humedad y 5% CO₂ durante 7 días, tras los cuales el medio fue sustituido por medio completo suplementado con 10% de suero de caballo y 10 µM de citosina arabinósida. Los experimentos fueron realizados a 11-13 días in viro (DIV).

Los animales fueron proporcionados por el Servicio de Estabulario de la Universitat Autònoma de Barcelona. El procedimiento experimental fue aprobado por el Comité ético de la Universidad Autònoma de Barcelona, en conformidad con las líneas directrices de las instituciones nacionales (Generalitat de Catalunya, Decreto 214/1997, DOG 2450) y realizado por el servicio de cultivos del Instituto de Neurociencias o por el Dr. Nahuai Badiola (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, UAB).

Tratamiento de los cultivos primarios

El tratamiento de los cultivos primarios se realizó entre los días 12-14 de cultivo *in vitro* (DIV), siempre en medio condicionado. Los tratamientos utilizados se describen a continuación: cicloheximida 20 µg/ml (Applichem), MDL28170 10 µM (Sigma), ALLN 1 µM y MK 801 10 µM (Calbiochem), TNFα 1 µg/ml (R&D Systems).

Privación de oxígeno y glucosa (OGD)

Cultivos mixtos de corteza cerebral de entre 12-14 DIV fueron sometidos a privación de oxígeno y glucosa (OGD), según los protocolos descritos por Goldberg y Choi (Goldberg y Choi, 1993), con mínimas modificaciones. Las células se lavaron dos veces con el tampón BSS (del inglés, Balanced Salt Solution) con la siguiente composición: NaCl 116 mM, KCl 5.4 mM, MgSO₄·7H₂O 0.8 mM, NaH₂PO₄·2H₂O 1 mM, NaHCO₃ 26.2 mM, Glicina 0.01 mM, CaCl₂·2H₂O 1.8 mM, pH 7.4, previamente equilibrado en una atmósfera de 0.5% O₂ /94.5% N₂ /5% CO₂ a 37°C. Con estos lavados se consigue diluir la glucosa residual del medio unas 2000 veces.

Posteriormente, las placas se introdujeron en una cámara de hipoxia (Invivo2 400, Ruskin Technologies) con una atmósfera de 0.5% O₂/ 94.5% N₂/ 5% CO₂ y a 37°C, donde se añadió BSS previamente equilibrado en esta atmósfera, y se dejaron durante 75 minutos. La OGD se finalizó aspirando el BSS y devolviendo a los pocillos el medio de cultivo guardado inicialmente (medio condicionado).

Este proceso se realizó también en paralelo con una placa control, expuesta a condiciones de normoxia, donde las células fueron lavadas con el tampón BSS con 5mM de glucosa y después se colocó en un incubador con una atmósfera húmeda, con un 5% de CO₂ y a 37°C, el mismo tiempo que la placa de OGD. La manipulación mecánica que supone los lavados no reduce la viabilidad celular de manera significativa.

Hipoxia

El medio de cultivo fue sustituido por BSS, suplementado con 5,5 mM de glucosa, equilibrado en una atmósfera con 0.8%O₂/ 94.2%N₂/ 5%CO₂ a 37°C durante 75 minutos para eliminar el oxígeno del tampón. Las células se introdujeron entonces en la cámara hipóxica con una atmósfera de 0.5% O₂/ 94.5% N₂/ 5% CO₂ y a 37°C. A

continuación, el medio condicionado del cultivo fue devuelto a las células. En paralelo, placas control con células procedentes del mismo cultivo fueron tratadas con BSS oxigenado y suplementado con glucosa e incubadas en presencia de oxígeno durante el mismo tiempo que el cultivo hipóxico.

Hipoglucemia

El medio de cultivo fue sustituido por BSS no desoxigenado, y las células fueron incubadas a 37°C, en una atmósfera al 100% de humedad y 5% CO₂ durante 75 minutos. A continuación, el medio condicionado del cultivo fue devuelto a las células. En paralelo, placas control con células procedentes del mismo cultivo fueron tratadas con BSS oxigenado y suplementado con glucosa e incubadas en presencia de oxígeno durante el mismo tiempo que el cultivo hipoglucémico.

1.3. CÁLCULO DE LA VIABILIDAD CELULAR

MTT

El MTT o Bromuro de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5,difeniltetrazolio, es una sal de tetrazolio hidrosoluble. Las deshidrogenasas mitocondriales de las células viables reducen el MTT a formazán, un compuesto violeta insoluble en medio acuoso pero que puede ser solubilizado con DMSO. Este derivado puede ser determinado espectrofotométricamente (570 nm), correlacionando la absorbancia obtenida con la viabilidad celular (Mosmann, 1983). Esta técnica se utiliza comúnmente para determinar el porcentaje de células viables que hay en el cultivo, aunque no permite discriminar si la muerte es necrótica o apoptótica.

A partir de una solución stock de MTT de 2 mg/mL en agua destilada, se añadió a las placas de cultivo el volumen necesario para conseguir una concentración de MTT final de 0,2 mg/mL. Las células se incubaron en una atmósfera húmeda, con un 5% de CO₂ y a 37°C, durante 30-45 minutos; se aspiró el medio de cultivo y se añadió la mitad del volumen del pocillo de DMSO para disolver el formazán formado. La medida espectrofotométrica se realizó en el lector de placas Sinergy® (BioTek).

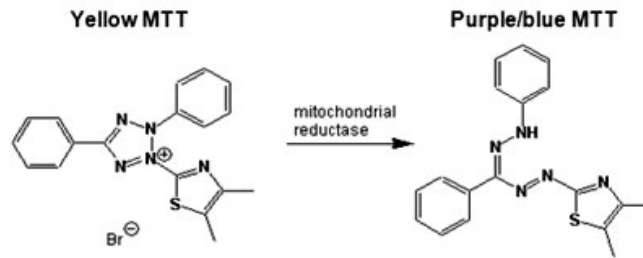


FIGURA 17. Esquema de la reducción del MTT. Obtenido de www.brightminds.uq.edu.au.

Alamar Blue

El compuesto activo de Alamar Blue (Invitrogen) es la resazurina, un compuesto de color azul, no fluorescente, no tóxico, soluble en agua, estable en cultivo y, lo que es más importante, permeable a las células. Una vez que entra en las células, la resazurina se reduce a resorufina y ésta produce una fluorescencia roja intensa. Las células viables convierten resazurina en resorufina continuamente, generando una medida cuantitativa de la viabilidad celular.

Para medir la viabilidad de los cultivos, el reactivo Alamar Blue fue disuelto en el medio de cultivo de las células, realizando una dilución 1:10 del stock original. Las células fueron incubadas durante 40 minutos en una atmósfera húmeda, con un 5% de CO₂ y a 37°C. A continuación el medio celular fue recogido en una placa nueva para realizar la lectura de la fluorescencia en el lector de placas Sinergy® (BioTek), utilizando una longitud de onda de excitación/emisión de 560/590 nm.

En paralelo a la lectura de la fluorescencia, se realizaron 2 lavados en PBS frío de los pocillos tratados con Alamar Blue. A continuación las células fueron lisadas siguiendo el protocolo habitual. Esta es la principal ventaja que presenta el reactivo Alamar Blue respecto al MTT: tras determinar la viabilidad celular se pueden obtener extractos celulares del mismo ensayo.



FIGURA 18. Esquema de la reducción de la resazurina a resorufina. Células metabólicamente activas reducen a la resazurina, no fluorescente, a resorufina, un compuesto que emite fluorescencia roja. La cantidad de fluorescencia producida es proporcional al número de células viables. Obtenido de www.invitrogen.com

1.4. FRACCIONAMIENTO CELULAR

Las células se cultivaron en placas de 10 cm de diámetro hasta que alcanzaron un 80-90% de confluencia. Cada placa se lavó dos veces con PBS frío, se lisó en PBS y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 500 µl de tampón de homogenización, se homogenizó mediante 30 *strokes* en potter con pistón de teflón y se mantuvo en hielo durante 30 minutos.

A continuación se centrifugó a 12000 rpm (15000 g) durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante (o **fracción citosólica**) se guardó a -20°C. Por su parte, el *pellet* se resuspendió en 100 µl de tampón RIPA, se homogenizó 4 veces con la ayuda de una jeringa (25 Gauge) y se centrifugó a 14000 rpm (20000 g) 10 min a 4°C. El sobrenadante final (**fracción nuclear**) se guardó a -20°C.

Tampón	Composición
Tampón de homogenización	25 mM Tris; 1mM EGTA; 10 mM NaCl. Añadir antes de usar 5 mM de MgCl ₂ ; 1 mM de DTT; 0,1 mM de ortovanadato; cocktail inhibidor de proteasas SIGMA
Tampón RIPA	25 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% SDS; 1% NP-40; 0,5% deoxicolato sódico; 1 mM EGTA; 5 mM pirofosfato sódico

TABLA 3. Composición de los tampones utilizados en el fraccionamiento celular.

2. ISQUEMIA *IN VIVO* EN RATAS SPRAGUE-DAWLEY

(Ensayos llevados a cabo por el equipo de la Dra. Anna Planas, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, IIBB-CSIC)

Se utilizó un modelo de isquemia cerebral focal descrito por Karibe et al., 1995, y modificado posteriormente (Soriano et al., 1997). Este método se basa en la obstrucción mecánica intraluminal de la arteria cerebral media mediante un filamento de nylon con el extremo redondeado.

Los ensayos se realizaron en ratas macho, adultas, de la cepa Sprague-Dawley, de entre 275 y 325 g de peso. En primer lugar el animal es anestesiado y se le introduce una sonda rectal para controlar la temperatura. Posteriormente es intubado para mantener la respiración asistida y se introduce una cánula en la arteria femoral para medir la presión arterial sistémica durante la operación. A continuación se procede a ocluir la arteria cerebral media durante 50 minutos, tras los cuales se inicia la reperusión (Sonia Solé, 2005).

Nos referiremos al hemisferio sometido a la isquemia como ipsilateral y al hemisferio control no isquémico como contralateral.

3. INMUNOCITOQUÍMICA

Para los estudios de inmunocitoquímica, los cultivos mixtos de neuronas corticales fueron sembrados en placas de 24 pocillos. A los 12 DIV las células se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0.1 M pH 7.2, durante 1 hora a 4°C. Se lavaron las placas dos veces con TBS-Tween 0.2% (TBS-T; Tris 20mM, NaCl 137mM, HCl 1M, pH 7,6, 0,2% Tween) a temperatura ambiente y se bloqueó con tampón de bloqueo (TBS-T, 5% FCS, 3% BSA) durante 45-60 minutos también a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron las células 24h a 4°C con el anticuerpo primario diluido 1:200 en TBS-T 5% de BSA. A continuación se hicieron dos lavados con TBS-T y se incubó con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado a fluorescencia (Alexa Fluor-rabbit 488 o mouse-594, Molecular Probes) diluido 1:500 en TBS-T 5% BSA, durante 1h. Tras dos lavados con TBS-T, se hizo un último lavado con TBS y se montaron las preparaciones con medio de montaje Fluorosave™ (Calbiochem). Las preparaciones se observaron bajo un microscopio de fluorescencia (LEICA) a una longitud de onda de excitación/emisión de: 492/519 o 584/617 nm, en función del secundario utilizado.

Anticuerpos primarios	Concentración	Casa comercial
Rabbit anti-GFAP	1:200	Chemicon
Mouse anti-MAP2	1:200	Chemicon

TABLA 4. Anticuerpos primarios utilizados en ensayos de inmunocitoquímica

Tinción de Hoechst 33258

El reactivo Hoechst es un compuesto fluorescente que se une al DNA, por lo que se utiliza habitualmente para el marcaje de los núcleos celulares. Además puede utilizarse para evaluar el estado de la cromatina. Si las células teñidas han sufrido una muerte apoptótica la cromatina estará condensada o fragmentada, y el compuesto se concentrará en mayor proporción, emitiendo una fluorescencia más intensa que en núcleos no condensados.

Tras la incubación de la muestra con anticuerpo secundario, se realizó un lavado de 5 minutos con TBS y se incubó con el reactivo Hoechst 33258 (1µg/mL) durante 5 minutos. A continuación, se realizaron dos lavados más con TBS. Se procedió al montaje de la muestra utilizando unas gotas de medio de montaje FluorSave™ Reagent (Calbiochem). Seguidamente se observaron las muestras en microscopio de fluorescencia (LEICA) a una longitud de onda de excitación/emisión de 350nm/460nm.

Tinción con Ioduro de Propidio (PI)

El ioduro de propidio es un agente intercalante y un compuesto fluorescente que puede ser utilizado para teñir DNA. Es muy polar, por lo que no es permeable a las células que mantienen la integridad de sus membranas. Permite visualizar aquellas células que presentan la membrana celular rota, una característica propia de la muerte celular por necrosis o apoptosis tardía.

Tras la OGD, las células fueron incubadas durante 1 hora con PI 10 µM, se lavaron con TBS atemperado a 37°C y, a continuación fueron fijadas con paraformaldehído al 4%. Tras la fijación y el montaje, las muestras se observaron en microscopio de fluorescencia (LEICA) a una longitud de onda de excitación/emisión de 488/538 nm.

Evaluación de necrosis y apoptosis mediante los marcadores fluorescentes PI y Hoechst 33258

Con el fin de obtener el porcentaje de células apoptóticas y necróticas tras realizar la OGD, las células fueron teñidas con PI y Hoechst, fijadas con paraformaldehído 4% y observadas al microscopio de fluorescencia.

Siguiendo el criterio resumido en la tabla 5 se contaron todas las células de un mínimo de cuatro campos por pocillo, de los cuatro pocillos de cada condición, es decir, 16 campos por condición (unas 1000 células por tratamiento).

Para evitar subjetividad en el conteo, una tercera persona realizó un enmascaramiento de los resultados. Así, la persona que realizó el conteo de núcleos apoptóticos y necróticos desconocía los tratamientos realizados.

Estado de las células	Estado de la cromatina (Hoechst 33258)	PI
Viables	Laxa	-
Apoptóticas	Condensada	-
	Gránulos	+
Necróticas	Laxa	+

TABLA 5. Criterios de discriminación entre necrosis y apoptosis

4. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS PARA EL ESTUDIO DE PROTEÍNAS

Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida

Para resolver las proteínas procedentes de lisados celulares se utilizó la electroforesis desnaturizante en gel de SDS-Poliacrilamida, utilizando el kit Mini-Protean III de Bio-Rad.

Las muestras se diluyeron en tampón de muestra, se calentaron 5 minutos a 100°C y se separaron por electroforesis en geles de diferente porcentaje de acrilamida, según el peso molecular de las proteínas a resolver. En algunos casos se utilizaron geles en gradiente del 4 al 12% de acrilamida (NuPAGE, Invitrogen) En cada carril se cargaron 30 µg de proteína. Se aplicó un voltaje constante de 150 V durante 75 minutos.

Electrotransferencia de proteínas. Western Blot

Una vez finalizada la electroforesis las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Schleicher & Schurell). La transferencia se realizó según el método descrito por Renart (Renart et al, 1979) y Towbin (Towbin et al, 1979). Esta técnica combina la resolución de proteínas por métodos electroforéticos con la especificidad de la detección por anticuerpos. Para ello se utilizó el sistema Mini Trans-Blot Electroforesis Transfer Cell (Bio Rad), aplicando un voltaje constante de 100 V durante 2 horas.

La membrana, con las proteínas transferidas, se bloqueó con tampón de bloqueo durante una hora y posteriormente se incubó con el anticuerpo primario a la dilución pertinente durante toda la noche a 4°C. Después de 3 lavados de 5 minutos con TBS-T, la membrana se incubó durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa diluido en tampón de bloqueo (1:6000). Tras 5

lavados de 5 minutos con TBS-T las proteínas se detectaron por quimioluminiscencia (ECL™ Western Blotting Detection Reagent; Amersham Pharmacia) utilizando películas fotográficas (Medical X-Ray Film, Agfa).

Tampón	Composición
Tampón de muestra	Tris-HCl 25 mM pH 6,8; 2% p/v SDS; 10% glicerol, DTT 10 M, 0,002% p/v de azul de bromofenol
Tampón de electroforesis	25 mM Tris; 192 mM Glicina; 20% SDS
Tampón de transferencia	25 mM Tris; 192 mM Glicina; 20% de Metanol
TBS-Tween (TBS-T)	20 mM Tris; 150 mM NaCl a pH 7,6; 0,2 % Tween
Tampón de bloqueo	TBS-T + 5% de leche desnatada

TABLA 6. Composición de los tampones utilizados en inmunoblot.

Anticuerpos primarios	Concentración	Casa comercial	Referencia
Sheep anti ERK5	0,2 µg/ml	MRC Unit Dundee *	---
Rabbit anti ERK5	1:6.000	Sigma	E1523
Rabbit anti P-ERK5	1:1.000	Biosource	44-612G
Mouse anti β-tubulina	1:20.000	BD Biosciences	556321
Mouse anti Actina	1:20.000	Sigma-Aldrich	A-1978
Mouse anti GAPDH	0,2 µg/ml	Ambion	4300
Rabbit anti CREB	1:1.000	Cell Signaling	9192
Mouse anti CSS1	0,5 µg/ml	Sigma	C-0230
Rabbit anti m-calpain, Domain I	1:1000	Calbiochem	208754
Rabbit anti 14-3-3β	1:1.000	Santa Cruz	SC-628
Mouse anti Espectrina	1:5000	Chemicon	MAB1622
Rabbit anti MAPK	1:2000	Cell Signaling	4695
Mouse anti HSP70	1:2000	Oncogene Science	HSP01
Mouse anti HSP90β	1:1000	Calbiochem	CA1024
Mouse anti PKM2	1:5000	Abnova	H00005315-A01
Rabbit anti GFP	1:500	Santa Cruz	Sc-8334
Mouse anti HA	1:1000	Boehringer Mannheim	1 583 816
Mouse anti FLAG	1:1000	Sigma	F-3165
Sheep anti GST	1.1000	MRC Unit Dundee*	---
Mouse anti MAP2	1:2000	Sigma	M1406
Anticuerpos secundarios	Concentración	Casa comercial	Referencia
Rabbit Anti Sheep-Peroxidase conjugated	1:6000	Pierce	31480
Goat Anti Mouse-Peroxidase conjugated	1:6000	Pierce	31430
Goat Anti Rabbit-Peroxidase conjugated	1:6000	Pierce	31460

TABLA 7. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en este trabajo.

*Anticuerpos obtenidos del MRC Protein Phosphorylation Unit de Dundee (Escocia), fue purificado a partir de suero de oveja tras la inyección en el animal del péptido correspondiente.

5. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

5.1. INMUNOPRECIPITACION (IP)

Para cada muestra, se mezclaron 2-5 µg del anticuerpo correspondiente con 5 µl de Proteína G Sepharose (GE Healthcare) preequilibrada en tampón de lisis. Tras 45 minutos de agitación a 1100 rpm a 4°C, se realizaron dos lavados con tampón de lisis.

En paralelo se realizó un *preclear* de las muestras para evitar posibles interacciones inespecíficas. De 0,1 a 5 mg de lisado celular fueron incubados con 5 µl de Proteína G-Sepharose preequilibrada en tampón de lisis y se incubó 45 minutos a 1100 rpm a 4°C. Trascurrido este tiempo, se centrifugaron las muestras 1 minuto a 1000 g y se recogió el sobrenadante (lisado celular o *preclear*).

A continuación, se añadió el lisado celular a la proteína G-Sepharose con anticuerpo y se incubó durante 90 minutos a 4°C en agitación a 1100rpm. Se realizaron dos lavados en tampón de lisis con 0,5 M NaCl y un lavado en tampón 50mM Tris pH 7,5; 0,1mM EGTA; 0,1% (v/v) β-mercaptoetanol. Al *pellet* final se añadieron 10 µl de tampón de muestra de electroforesis y tras calentar 5 min a 100°C las proteínas inmunoprecipitadas fueron separadas mediante electroforesis y analizadas mediante inmunoblot.

En paralelo a la inmunoprecipitación de las muestras se realizó un control negativo en ausencia de anticuerpo.

Inmunoprecipitación con FLAG-M2-Agarose

Células HEK293T fueron transfectadas con el vector que codifica para la proteína pertinente fusionada al péptido FLAG, incubadas 24 horas a 37°C en una atmósfera al 100% de humedad y 5% CO₂ y lisadas.

Para purificar la proteína recombinante fusionada a FLAG se utilizó una variante del ensayo de inmunoprecipitación, utilizando un anticuerpo anti-FLAG inmovilizado en resina de agarosa (FLAG-M2-Agarose, Sigma). Se incubaron 5µl de resina-anticuerpo con 150 µg de muestra durante 1 hora a 4°C en agitación a 1100 rpm. Tras este tiempo se realizaron diferentes lavados de la muestra siguiendo el protocolo arriba descrito.

5.2. ENSAYOS DE *PULL-DOWN*

Se utilizó esta técnica para purificar proteínas recombinantes fusionadas a la proteína GST. En primer lugar, células HEK293T fueron transfectadas con el vector que codifica para la proteína pertinente fusionada a GST, incubadas 24 horas a 37°C, en una atmósfera al 100% de humedad y 5% CO₂ y lisadas.

Se incubaron 150 µg de extracto celular con 5 µl de Glutathione-Sepharose (GE Healthcare) que une específicamente GST. A continuación se procedió de igual manera que en la IP a la incubación, lavados de la resina y análisis de la muestra purificada.

5.3. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MARCADAS CON GST o FLAG

Purificación de GST-ERK5

Para cada purificación se transfectaron 10 discos de 10 cm de células HEK 293T, se incubaron durante 24 horas a 37°C y se lisaron en tampón de lisis. A continuación, se incubó el lisado celular a 4°C con 100 µl de Glutathione Sepharosa (pre-equilibrados en tampón de lisis). Tras una hora en agitación se centrifugó la muestra 15 minutos a 3000 g.

En tubos falcon de 15 ml, se realizaron lavados secuenciales de la resina añadiendo 10 ml de tampón y centrifugando 1 minuto a 3000 g: 4 lavados con tampón de lisis 0,5 M de NaCl, seguidos de 3 lavados con tampón kinasa (50 mM Tris pH 7,5; 0,1% βME; 0,1 mM EGTA) y un lavado con tampón de elución (50 mM Tris pH 8; 0,1% βME; 0,1 mM EGTA; 0,27 M sacarosa). A continuación, se aspiró el sobrenadante del último lavado y se dejó un volumen de 500 µl en el que se resuspendió la resina. Se transfirió este volumen a un eppendorf y se eluyó la proteína mediante la adición de Glutathión a una concentración final de 40 mM. Se incubó 15 minutos a temperatura ambiente en agitación, se transfirió la muestra un tubo con filtro Spin X (0,45 µm de poro, Costar) y se centrifugó a 8000 g durante 1 minuto. El filtrado recogido corresponde a la proteína purificada.

La cuantificación y determinación de la pureza de la proteína purificada fue llevada a cabo mediante electroforesis SDS-PAGE, comparando la proteína obtenida con un patrón de concentración conocida de BSA.

Purificación de ERK5-FLAG y PKM2-FLAG

Las proteínas fusionadas al péptido FLAG en su extremo C-terminal, fueron purificadas utilizando el protocolo anterior con dos modificaciones: la resina utilizada fue FLAG-M2-agarosa (SIGMA) y la elución se llevó a cabo con péptido FLAG Peptide (SIGMA) a una concentración final de 50 ng/ml.

5.4. PURIFICACIÓN DE ERK1/2 ACTIVA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO EN COLUMNA MONO-Q HR-5/5

Esta resina cromatográfica fue utilizada con el fin de obtener una preparación pura y activa de ERK1 y ERK2 (ERK1/2). Se utilizó una columna Mono-Q HR-5/5 de Pharmacia (constituida por 1 ml de resina intercambiadora de iones monoQ) acoplada al sistema FPLC.

Para obtener los extractos celulares que contuvieran ERK1/2 activas, 5 discos de 10 cm de células HeLa fueron estimulados durante 15 minutos con 50 ng/ml de EGF y lisados en el tampón de lisis habitual. A continuación, fueron introducidos en una columna mono-Q HR-5/5 previamente equilibrada con tampón 50 mM Tris-HCl pH 7.5; 0,1% (v/v) β -mercaptoetanol. La columna fue lavada con 20 ml del mismo tampón y las proteínas retenidas se eluyeron mediante 20 ml de un gradiente de 0 a 0,375 M de NaCl en tampón de cromatografía. El flujo durante todo el proceso fue de 1 ml/min y se recogieron fracciones de 1ml.

La presencia de ERK1/2 en cada fracción fue determinada mediante inmunoblot, y la actividad kinasa medida utilizando como sustrato MBP y ^{32}P - γ -ATP-Mg.

5.5. CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA EN GEL FILTRACIÓN

El fraccionamiento cromatográfico de las muestras en función de su peso molecular se realizó en un sistema de FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) (Farmacia), equipado con 2 bombas de alta precisión P-500 y colector RediFrac. Se utilizó una columna Superdex 200-HR 10/30 (24 ml de lecho, Farmacia), constituida por dextrano unido covalentemente a agarosa, con un rango de exclusión de 10 a 600 kDa.

El volumen vacío de la resina se determinó tras la aplicación de 0,5 ml de azul dextrano (1 mg/ml) y la lectura de la absorbancia a 620 nm de las fracciones recogidas. La columna fue equilibrada con 2 volúmenes de tampón de cromatografía (50 mM Tris pH 7,5; 0,15 M NaCl; 0,1 mM EGTA; 0,1% β -mercaptoetanol) y la velocidad de flujo fue de 0,32 ml/min. Una vez aplicada la muestra (500 μ l, 0,5 a 2 mg de proteína) se recogieron fracciones de 0,33 ml.

Para la calibración de la columna se utilizaron los marcadores indicados en la tabla 8.

Marcador	Peso molecular (kDa)	Referencia	Casa Comercial
Azul dextrano	2.000	D-4772	Sigma-Aldrich
Tiroglobulina bovina	670		
γ -globulina bovina	158		
Ovoalbúmina de pollo	44	151-1901	Bio-Rad
Mioglobina equina	17		
Vitamina B12	1,35		

TABLA 8. Marcadores de peso molecular utilizados en la calibración de la columna Superdex 200-HR (FPLC)

6. TANDEM AFFINITY PURIFICATION (TAP)

Vectores utilizados

Se utilizó el vector pEGFP-C2-TAP, clonado por la Dra. Maria Deak de la *Protein Phosphorylation Unit* del MRC de Dundee a partir del plásmido pEGFP-C2 (Clontech) (figura 19). Este vector incorpora una proteína verde fluorescente (GFP) optimizada para obtener una fluorescencia más brillante y una mayor expresión en células de mamífero (excitación máxima = 488 nm; emisión máxima= 507 nm), que permite una selección más fácil de las células que lo expresan.

A continuación de la GFP, el vector codifica para dos dominios de unión a IgGs de la proteína A, una secuencia de corte de la proteasa TEV y un dominio de unión a calmodulina (CAM). El vector también contiene un origen de replicación en células de mamífero (SV40) y un cassette de resistencia a neomicina-kanamicina (KanR/NeoR). En él se clonaron las diferentes proteínas humanas objeto de este estudio: MEK5, ERK5 *full lenght* (o *wild type*) y ERK5- Δ Cterm (que carece del dominio de activación transcripcional situado en el extremo C-terminal, ERK5-1 \rightarrow 490).

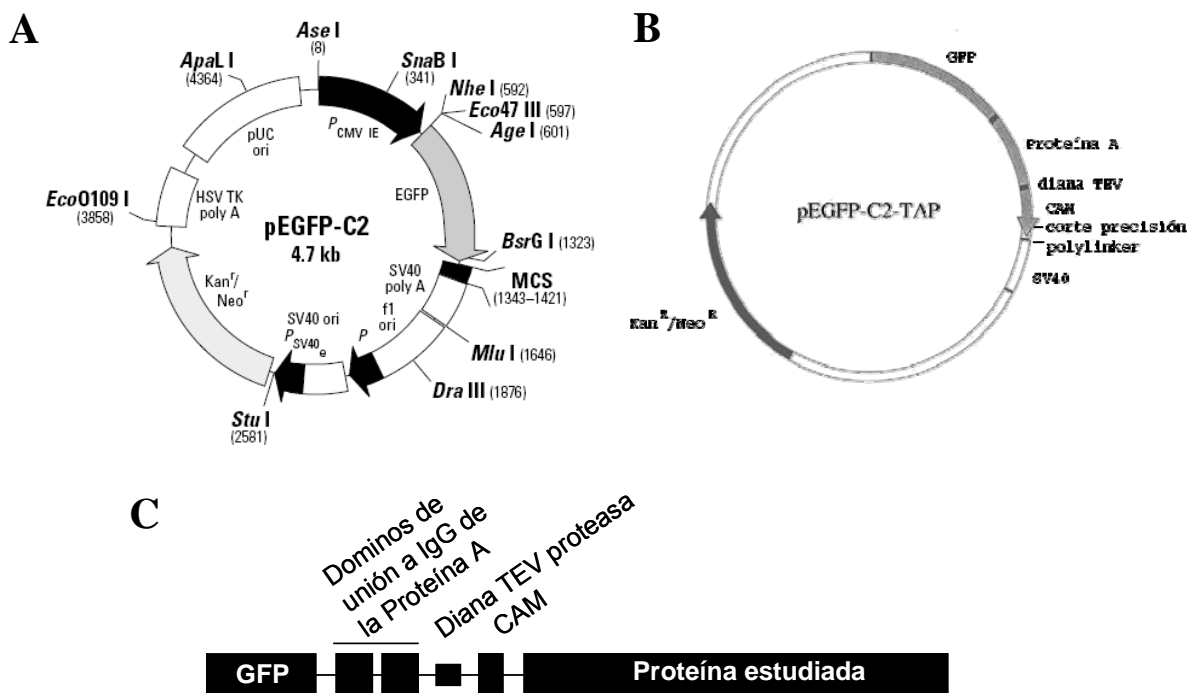


FIGURA 19. (A) Mapa de restricción y *Multiple Cloning Site* (MCS) del vector pEGFP-C2. **(B)** Vector pEGFP-C2-TAP. **(C)** Representación esquemática lineal de la proteína de fusión utilizada para el método TAP.

Todos los plásmidos utilizados fueron clonados por la Dra. Maria Deak de la *Protein Phosphorilation Unit* del MRC de Dundee (Escocia).

Generación de las líneas celulares estables

En primer lugar se procedió a la obtención de células de neuroblastoma (SH-SY5Y) que sobre-expresaran establemente las proteínas de fusión arriba descritas. Se sembraron células SH-SY5Y a baja confluencia (20-30%) en discos de 10 cm de diámetro y se transfectaron 5 µg del vector correspondiente, utilizando lipofectamina, según el protocolo descrito anteriormente. Tras 24 horas se añadió al medio 300 µg/ml del antibiótico G418 (Sigma-Aldrich), que permite la selección de los clones. El medio fue cambiado cada 24 horas manteniendo el antibiótico. 7 días después, la concentración de antibiótico fue rebajada a 100 µg/ml y el medio cambiado cada 3 días.

15-20 días después de la transfección, se seleccionaron las colonias individuales que expresaban niveles bajos de fluorescencia por GFP. Estas colonias fueron expandidas y sometidas a una segunda selección en función de los niveles de proteína de fusión analizados por inmunoblot con anticuerpos específicos. Se seleccionaron aquellas colonias que sobreexpresaron la proteína de fusión de manera moderada y que, además, no presentaban degradación.

Los clones seleccionados fueron congelados y guardados en nitrógeno líquido como stock para futuros experimentos.

Tandem Affinity Purification (TAP)

(Protocolo adaptado de Rigaut et al., 1999)

Como punto de partida, de cada clon estable de células SH-SY5Y se crecieron entre 100 y 200 discos de 15 cm. Cada disco fue lisado en 1 ml de tampón de lisis TAP frío (ver tabla 9). Los lisados fueron centrifugados a 23.000 g durante 20 minutos a 4°C y el sobrenadante se incubó durante 1 hora en un tubo Falcon de 50 ml, con 0,5 ml de resina Rabbit IgG-agarose beads (Sigma) preequilibradas en tampón de lisis TAP (de 3 a 5 lavados) en un agitador giratorio a 4°C. A continuación se transfirió la suspensión a un único tubo Falcon de 15 ml, mediante centrifugaciones cortas (30 segundos).

Se realizaron tres lavados con tampón A y dos con tampón B, dejando un volumen final de 2,5 ml tras el último lavado. Se añadieron 100 µg de TEV proteasa y se incubó durante 4h a 4°C en un agitador giratorio. La muestra fue transferida entonces a una columna Econopaq de 10 ml (Biorad) y el eluido se recogió en un tubo Falcon de 15 ml. A continuación, se añadieron tres volúmenes (7,5 ml) de tampón C, al que se añadieron 7,5 µl de CaCl₂ 1M y se incubó con 0,25 ml de la resina Calmodulin-Sepharose (Amersham Pharmacia, preequilibrada en tampón C). La mezcla se incubó durante una hora en un agitador giratorio a 4°C. Tras ello, se llevaron a cabo 3 lavados de la resina con tampón C y dos con tampón D y se aspiró la mayor parte del sobrenadante en el último lavado. Se añadió a la resina 0,5 ml de tampón de muestras electroforéticas Nupage LDS Sample Buffer (dilución 1/80 del stock en agua), se agitó mediante vórtex y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente.

La preparación final fue filtrada en tubo Spin X (0,45 µm de poro, Costar). En este punto 30 µl del filtrado fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida en gradiente NuPAGE 4-12% Bis-Tris (Invitrogen) y las proteínas separadas fueron visualizadas mediante tinción en *Colloidal Blue Coomassie* (Invitrogen) para estimar la cantidad de material purificado (gel analítico).

Tampón	Composición
Tampón de lisis TAP	10 mM Tris-HCl a pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,1% NP-40; cocktail de inhibidores de proteasas (añadir antes de usar)
Tampón A	50 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,1% NP-40; 1 mM DTT;
Tampón B	50 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,1% NP-40; 0,5 mM EDTA; 1mM DTT;
Tampón C	50 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,1% NP-40; 1 mM Mg ²⁺ acetato; 1 mM imidazol; 2mM CaCl ₂ ; 1 mM DTT;
Tampón D	10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM Mg ²⁺ acetato; 2 mM CaCl ₂ ; 1mM DTT

TABLA 9. Tampones utilizados en la purificación TAP.

El filtrado restante (aproximadamente 470 µl) fue concentrado mediante *speed vac* con trampa de frío para conseguir un volumen de unos 5 µl. Cada muestra fue

resuspendida en 25 μ l de H₂O miliQ y 10mM de DTT, y sometida a electroforesis en un gel NuPAGE 4-12% Bis-Tris (Invitrogen).

Procesamiento de las bandas

A partir de este punto, se realizaron todos los procesos en el interior de una campana de flujo y con guantes, con el fin de minimizar el riesgo de contaminación de las muestras con queratinas.

El gel fue teñido con *Colloidal Blue Coomassie* y tras su fotografía las diferentes bandas visualizadas fueron numeradas, recortadas con bisturí en cubos de aproximadamente un milímetro y procesadas para su análisis mediante espectrometría de masas.

Digestión en gel de proteínas para su análisis mediante espectrometría de masas

El protocolo se inició realizando sucesivos lavados de los fragmentos del gel, durante 10 minutos en agitación con 0,5 ml de: agua; 50% acetonitrilo, 50% agua; y finalmente 0,1 M NH₄HCO₃

A continuación se llevó a cabo la alquilación de los residuos de cisteína de las diferentes proteínas purificadas. Para ello, a cada muestra se añadió 75 μ l de NH₄HCO₃ 0,1 M con 10 mM de DTT para reducir los puentes disulfuro, y se incubó en bloque térmico a 65°C durante 45 min. A continuación, y para bloquear las cisteínas, se descartó el líquido y se incubaron los fragmentos del gel 10 minutos en agitación con 75 μ l de una solución que contenía 50% Iodoacetamida 50 mM y 50% de NH₄HCO₃ 50 mM.

En este punto las bandas ya habían perdido su color. Se añadieron 0,3 ml de acetonitrilo, se agitó durante 15 min y se aspiró el sobrenadante. Se evaporó el sobrenadante remanente mediante *speed vac* con trampa de frío hasta que los fragmentos del gel estuvieron totalmente secos. A continuación se re-hidrataron con bicarbonato de trietilamonio 25 mM y se añadió 30 μ l de Trypsin Gold (Boehringer) a una concentración final de 5 μ g/ml. La digestión se llevó a cabo durante 18 horas a 30°C en agitación constante. Transcurrido este tiempo, se añadió un volumen equivalente de acetonitrilo a la digestión y se agitó durante al menos 15 min. Se

recogió el sobrenadante y se añadió a un tubo limpio etiquetado (**Tubo 1**) que se evaporó por *speed vac*.

Simultáneamente, se añadió a los fragmentos de gel 100 µl de una solución 50% de acetonitrilo y 2,5% de ácido fórmico y se agitó durante 10-15 minutos. Se combinó este sobrenadante con el extracto desecado del Tubo 1. A continuación se sublimó el contenido del tubo mediante *speed vac* y las muestras fueron congeladas a -20°C hasta su procesamiento por el Dr. Nick Morrice, del servicio de Espectrometría de Masas del MRC de Dundee (Escocia).

Los péptidos fueron analizados por LC-MS/MS (*Liquid Chromatography/Mass Spectrometry/Mass Spectrometry*) en un aparato *Applied Biosystems 4000 Q-TRAP*. Para la identificación de los péptidos se utilizó la base de datos humana *Celera Discovery System* (Applied Biosystems) utilizando el algoritmo *Mascot Search Engine*.

7. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Ensayo radiométrico de actividad kinasa en geles de SDS-PAGE

La proteína ERK5 recombinante pura se incubó, en un volumen final de 20 μ l, con las proteínas substrato de interés en una mezcla de reacción que contenía: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$, 100 a 500 μ M de ATP frío y 2 μ Ci de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (GE Healthcare). La mezcla fue incubada a 30 °C durante 30 min en agitación (1100 rpm), y la reacción finalizó mediante la adición de 6 μ l de tampón 5x de muestra de electroforesis. Las muestras se calentaron 5 min a 100°C y se separaron en SDS-PAGE. Las proteínas resueltas fueron visualizadas mediante tinción Coomassie Blue R, y la incorporación de ^{32}P visualizada mediante autorradiografía (Hyperfilm MP, GE Healthcare). Por último la incorporación de ^{32}P fue cuantificada mediante el recorte de cada banda observada en autorradiografía y contaje en contador de centello (LKB).

Ensayo de actividad caspasa 8

La actividad de la caspasa 8 se determinó utilizando el sustrato fluorogénico Ac-IEPD-AMC. La caspasa 8 activa hidroliza el sustrato, liberándose una molécula fluorogénica (AMC). La fluorescencia resultante se correlaciona con la actividad de la caspasa 8 y puede ser cuantificada en un lector de fluorescencia.

Los lisados celulares se recogieron a distintos tiempos: 0, 3 y 6 horas después de la OGD (tampón de lisis: 100 mM HEPES pH 7.5, 10% sacarosa, 1 mM EDTA, 20 μ M EGTA, 0,1% CHAPS, 10 mM DTT, leupeptina 10 μ g/mL, ortovanadato 1 mM, aprotinina 2 μ g/mL y PMSF 1mM). La reacción se llevó a cabo en una placa de 96 pocillos opaca (para evitar la pérdida de fluorescencia) a la que se añadió la cantidad de proteína necesaria para que la concentración final fuera de 30-60 μ g/mL, 20 μ M del sustrato fluorogénico Ac-IEPD-AMC, y se llevó hasta un volumen final de 250 μ L con el tampón de lisis utilizado previamente. Inmediatamente se procedió a la lectura en el lector de fluorescencia (Victor III, Perkin Elmer). La actividad enzimática se expresó como unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF).

Ensayo de actividad de calpaína

Con el fin de analizar la actividad de corte de calpaína sobre ERK5 se diseñó una mezcla de reacción compuesta por 1 µg de ERK5 recombinante pura, tampón (50mM TRIS pH 8.0, 0.1 mM EGTA, 2 mM DTT), calpaína recombinante (calpain II, Calbiochem) y 1mM de CaCl₂ (añadido en último lugar) en una mezcla con un volumen final de 25 µl. La mezcla de reacción se incubó 1 minuto a 30°C y la reacción se detuvo añadiendo 5 µl de tampón de carga de electroforesis. Se hirvió la mezcla durante 5 minutos y las proteínas fueron resueltas mediante electroforesis en geles LDS-NuPAGE en gradiente del 4 al 12% de acrilamida (Invitrogen). Los geles fueron posteriormente teñidos con *Colloidal Blue Coomassie* (Invitrogen) o electrotransferidos para la posterior detección de ERK5 y calpaína mediante inmunoblot.

Ensayo de actividad piruvato kinasa

La piruvato kinasa cataliza la reacción que transforma fosfoenolpiruvato (PEP) en piruvato, esta reacción es regulada alostéricamente por fructosa 1-6, bisfosfato (FBP) y está acoplada a una segunda reacción catalizada por la enzima lactato dehidrogenasa (LDH) que transforma piruvato en lactato (ver figura 20). La enzima piruvato kinasa es dependiente de magnesio y potasio.



FIGURA 20. Representación esquemática de la reacción catalizada por la enzima piruvato kinasa.

El protocolo para medir la actividad de la piruvato kinasa fue modificado del protocolo utilizado por Christofk et al., 2008. Las muestras utilizadas para la determinación de actividad contenían lisados celulares (1-2 µg), TRIS pH 7,5 (50 mM), KCl (100 mM), MgCl₂ (5 mM), ADP (0,6 mM), PEP (0,5 mM), NADH (180 µM), FBP (10 µM) y LDH (8 unidades). Mediante el lector Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader de BioTek se midieron los cambios en la absorbancia a 340 nm debidos a la oxidación

de NADH, siendo estos proporcionales a la desaparición del sustrato de la reacción PEP.

Las muestras recogidas con el objetivo de analizar la actividad piruvato kinasa fueron lisadas en el siguiente tampón (tampón piruvato): 50 mM TRIS pH 7,5; 1 mM EDTA; 150 mM NaCl; 1% NP40; 1mM ortovanadato; 1mM DTT; inhibidores de proteasas (Sigma).

Los resultados se presentan en actividad específica (Unidades/mg), donde una Unidad equivale a los μ moles de producto formado por minuto.

8. BIOLOGÍA MOLECULAR

En todos los casos el marcaje de ácidos nucleicos en geles de agarosa se realizó mediante *Sybr Safe* (Invitrogen), utilizando una dilución 1:25000. La visualización posterior del gel se realizó en transiluminador.

Amplificación de los plásmidos de interés

Preparación de bacterias TOPO competentes

De una placa de bacterias crecidas en medio LB-Agar sin antibiótico se aisló una colonia en 5 ml de LB y se incubó 16 horas a 37°C en agitación (200 rpm/min). Al día siguiente, se añadió 150 µl del cultivo a 5ml de LB y se dejó crecer 90 minutos a 37°C en agitación. A continuación se centrifugó a 1500 g 5 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el *pellet* fue resuspendido en 2,5 ml de CaCl₂ 50 mM estéril y dejado en hielo 30 minutos. Seguidamente se realizó una nueva centrifugación a 1500 g 5 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 500 µl de CaCl₂ 50 mM estéril. Las bacterias se mantuvieron en hielo hasta su uso (el mismo día de la preparación).

Transformación de bacterias y purificación de plásmidos

Se añadió 1 µl de DNA sobre 100 µl de bacterias y se incubó en hielo durante 30 minutos. A continuación se procedió a realizar el choque térmico, mediante la incubación de las bacterias en un baño a 42°C durante 2 minutos. Tras el choque térmico las bacterias fueron incubadas en hielo durante 5 minutos. A continuación, se añadieron 900 µl de medio LB y se incubó durante una hora a 37°C en agitación. Transcurrido este tiempo se sembraron 100 µl de bacterias en una placa de LB-Agar con el antibiótico correspondiente a la resistencia del plásmido utilizado (Ampicilina 50 µg/ml o Kanamicina: 20 µg/ml).

La placa se incubó toda la noche a 37°C en estufa. A la mañana siguiente se aisló una colonia y se creció 8 horas en 2 ml de medio LB con el antibiótico correspondiente, para luego ser transferido a 300 ml de LB-antibiótico. El cultivo fue incubado toda la noche a 37°C en agitación, centrifugado y el DNA plasmídico fue purificado mediante el kit QIA filterTM Plasmid Maxi Kit de Quiagen.

Extracción de RNA de cultivos celulares

La extracción del RNA de células en cultivo fue realizada mediante el uso del reactivo Trizol (Invitrogen), un fenol que permite la separación de DNA, RNA y proteína basado en la formación de diferentes fases mediante la reacción con cloroformo.

Para la extracción de RNA, se sembraron células corticales de rata en placas de 12 pocillos. Al los 12 DIV se añadió 0,5 mL de Trizol a cada pocillo, y el material celular se transfirió a un tubo eppendorf de 2 mL. Después de incubar 5 minutos a temperatura ambiente se añadieron 200 μ L de cloroformo, se agitó vigorosamente y se dejó 2-3 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las muestras se centrifugaron 15 minutos a 12.000 g (4°C). La fase acuosa que contenía el RNA se transfirió a un tubo nuevo que contenía 0,5 mL de isopropanol y se dejó 10 minutos a temperatura ambiente para que el RNA precipitara. Después de una centrifugación de 10 minutos a 12.000 g (4°C) se decantó el sobrenadante, se añadió etanol al 75% y se agitó vigorosamente en vórtex. Finalmente, se centrifugó 5 minutos a 7.500 g (4°C), se decantó el etanol y se dejó secar. Una vez seco, el precipitado de RNA se diluyó en 50 μ L de agua miliQ libre de RNAsa. La concentración de RNA se midió mediante el kit Quant-it (Invitrogen) que confiere fluorescencia al RNA o DNA para su medición en el fluorímetro Qubit (Invitrogen).

La integridad del RNA se comprobó en cada ensayo mediante la separación electroforética de una alícuota en un gel de agarosa al 0,8%.

Transcripción inversa

El conjunto de productos necesarios para la transcripción inversa fueron suministrados por Invitrogen. Para el ensayo se utilizaron tubos libres de RNAsa.

Para cada muestra, se utilizó entre 1 y 5 μ g de RNA, 1 μ L de OligodT (500 μ g/ml) y 1 μ L de dNTP (10 mM). La mezcla se completó con agua libre de RNAsa hasta un volumen de 12 μ L. Las preparaciones se incubaron a 65°C durante 5 minutos y posteriormente se dejaron en hielo. Seguidamente, se añadió la mezcla que contenía 4 μ L del tampón *First-Strand* (5X), 2 μ L de DTT (0,1 M) y se incubó a 42°C durante 2 minutos. Finalmente se añadió el enzima *SuperScript II* y se incubó a 42°C durante 50 minutos. La reacción se inactivó subiendo la temperatura a 72°C durante 15 minutos. El cDNA obtenido se conservó a -20°C.

Amplificación del DNA por PCR semicuantitativa

Para cada muestra se utilizaron 2 µl del DNA resultante de la retrotranscripción del RNA extraído del cultivo. Además se añadieron 1.5 µL de MgCl₂ (50 mM), 1 µl de mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs, 10mM, Invitrogen), 1 µL de cada cebador (10 µM), 0.5 µl de Taq DNA Polimerasa (5 U/µL, Invitrogen), 5µL de tampón de PCR 10X (Invitrogen) y se llevó hasta 50 µl de volumen final con agua destilada. Los reactivos utilizados para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) semicuantitativa fueron adquiridos de Invitrogen.

Los cebadores utilizados para amplificar ERK5 de rata fueron 5'-GGAGAA GCGACGACAAGAGC-3' (*forward primer*) y 5'-GGAGGCAGGACCAGGAATAG-3' (*reverse primer*). Como control se utilizó el DNA de la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) de rata, y los cebadores utilizados fueron los siguientes: 5'-GCCAAGTATGATGACATCAACAAG-3' (*forward primer*) y 5'-TCCAGGGGATTTCTTACTCCTTGGA-3' (*reverse primer*) de TIB MOLBIOL.

Para cada pareja de *primers* se determinó la linealidad y el rango de ciclos en que la reacción era cuantitativa (antes de saturarse).

El protocolo utilizado para la amplificación de ERK5 consistió en una fase inicial de desnaturalización de 4 minutos a 94°C. A continuación, 31 ciclos que constaban de tres etapas: una primera desnaturalización de 30 segundos a 93°C, seguida de una etapa de rehibridación de 30 segundos a 65°C y 30 segundos a 72°C de elongación. Por último una fase de elongación de 5 minutos a 72°C. En el caso de GAPDH, control interno de la reacción, se realizaron 24 ciclos.

El termociclador utilizado fue el PTC-100 de MJ Research. 5 µl del producto obtenido en la PCR semicuantitativa fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa al 1%, que contenía Sybr Safe (Invitrogen) a una dilución 1:25000, y posteriormente visualizado mediante transiluminador.

Mutagénesis dirigida del DNA que codifica para la Piruvato Kinasa M2 (PKM2)

La mutagénesis dirigida permite introducir una mutación puntual en un DNA clonado en un plásmido de interés. La técnica en cuestión, consiste en diseñar dos *primers* que contengan la mutación que se quiere introducir y que cada uno hibride en una zona donde se tiene que llevar a cabo esta mutación en cada una de las dos cadenas complementarias. Una vez diseñados los *primers* se desarrolla de igual manera que una PCR excepto por dos modificaciones:

- Se amplifica todo el plásmido (no sólo el inserto), de manera que es necesario alargar la fase de elongación =2 minutos por kilobase de DNA a amplificar).
- Después de la PCR, y para asegurar que no queden copias de molde, se incuba el producto de PCR con DpnI, una enzima que degrada el DNA metilado (es decir, el DNA molde pero no el producto de la PCR).

En nuestro caso, se decidió mutar la serina 37 de la PKM2 a alanina (deficiente en fosforilación), y a aspártico (la carga negativa mimetiza la presencia del grupo fosfato).

En la reacción de PCR se utilizó 1 µl de DNA molde (vector pCMV4 que codifica para PKM2-FLAG), 5 µl de dNTPs 2mM, 0,6 µl de cada cebador (100 pmol/µl) y 1 µl de polimerasa, en un volumen total de reacción de 50 µl. En este ensayo se utilizó la polimerasa Pfu (Stratagene), que proviene del hiper-termofílico *Pyrococcus furiosus*, cuya función in vivo es replicar el DNA del organismo. Se utiliza este enzima por su fidelidad de copia. A diferencia de la Taq polimerasa, la Pfu polimerasa posee actividad 3'-5' exonucleasa, lo que significa que cataliza la hidrólisis de uno en uno de los nucleótidos no complementarios de la cadena molde.

Los cebadores utilizados para la mutación S37A fueron: 5'-CCTGGACATTGATGCACCCATCAC-3' (*forward primer*) y 5'-GTGATGGGTGGTGCATCAATGTCCAGG-3' (*reverse primer*). Para la mutación S37D se utilizaron los siguientes cebadores: 5'-CCTGGACATTGATGATCCACCCATCACAG-3' (*forward primer*) Y 5'-CTGTGATGG GTGGATCATCAATGTCCAGG-3' (*forward primer*).

El protocolo utilizado consistió en una fase inicial de 30 segundos a 95°C (hot start). A continuación se realizaron 16 ciclos que constaron de tres etapas cada uno: desnaturalización a 95°C 30 segundos, rehibridación a 50°C 1minuto y extensión a

72°C 5 minutos (2 minutos por kilobase a amplificar). Por último se realizó una extensión final de 5 minutos a 72°C.

Tras la reacción de PCR, de los 50 µl totales de cada tubo, 10 µl fueron resueltos en un gel de 1% agarosa, con el fin de comprobar que la reacción de PCR ha amplificado el producto. Los 40 µl restantes fueron incubados con 1 µl de DpnI (Stratagene) durante 2h en una estufa a 37°C. A continuación, se utilizaron 20 µl de la reacción para transformar bacterias TOPO competentes, que fueron sembradas en placa con medio selectivo para el plásmido utilizado e incubadas toda la noche a 37°C. Al día siguiente, las colonias que crecieron fueron aisladas, crecidas en 2ml de medio LB con antibiótico durante 8 horas y centrifugadas. El plásmido amplificado fue purificado mediante el kit GEN ELUTE™ PLASMID MINITREP KIT de Sigma.

Las mutaciones introducidas fueron comprobadas mediante secuenciación del DNA.

9. INTRODUCCIÓN DE DNA EN CÉLULAS EN CULTIVO

9.1. TRANSFECCIONES EN CÉLULAS DE MAMÍFERO

Se utilizaron diferentes vectores de expresión en mamífero (ver tabla 10). Estos plásmidos fueron clonados por la Dra. Maria Deak en la *Protein Phosphorilation Unit* del MRC de Dundee (Escocia), o por el Dr. Néstor Gómez del Departamento de Bioquímica de la UAB. En cada caso se utilizó el correspondiente plásmido vacío como control de la transfección.

VECTOR	Proteínas de fusión	Procedencia
pEBGT2	GST	Dra. Maria Deak (<i>Protein Phosphorilation Unit</i> del MRC de Dundee, Escocia)
	GST-ERK5wt	
	GST-ERK5 Δ CT (dominio catalítico, aa 1 a 491)	
	GST-MEK5DD	
pCMV4	FLAG	Dr. Néstor Gómez (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, UAB)
	ERK5wt-FLAG	
	PKM2-FLAG	
pCMV5	HA-MEK5DD	Dr. Néstor Gómez
	HA-HSP90 β	Dr. Papapetropoulos (University of Patras, Greece)
PDEST27	CAPN4	Dr. Kutsche (University of Hamburg)
pEGFP	GFP	Dra. Maria Deak
pCDNA3.1	HA \emptyset	Dr. Carles Saura (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, UAB)

TABLA 10. Vectores y proteínas recombinantes utilizadas.

Transfección con polietilenamina (PEI)

La técnica de transfección con polietilenamina (PEI, Polysciences Inc. MW 25000) se basa en la formación de un complejo DNA-polímero catiónico (en este caso PEI). Los policationes capturan el DNA en suspensión y lo condensan sobre sí, favoreciendo la entrada del DNA en la célula. Se preparó un *stock* de PEI a una concentración de 1 mg/ml en agua y fue alicuotado y guardado a -80°C. El ratio DNA:PEI ($\mu\text{g}:\mu\text{l}$) que permite obtener unos niveles óptimos de transfección debe ser previamente determinado para cada tipo celular. En este trabajo se han utilizado las siguientes: **HeLa**: 1 μg DNA: 10 μl PEI; **SH-SY5Y**: 1 μg DNA: 7,5 μl PEI; **HEK 293**: 1 μg -10,5 μl ; **PC12**: 1 μg DNA: 7 μl .

Las células fueron cultivadas en placas de 10 cm el día anterior a la transfección para obtener entre un 50 y un 80% de confluencia. El día de la transfección, el medio del cultivo celular fue cambiado unas horas antes del ensayo por medio fresco suplementado con 10% FBS. El plásmido fue diluido en DMEM sin suero en un volumen de 1ml y el PEI fue añadido a esta suspensión. La mezcla se agitó inmediatamente en vórtex durante 5 segundos, se incubó 10 minutos a temperatura ambiente, y se añadió gota a gota a las células. Las células fueron incubadas durante 30 horas a 37°C antes de ser lisadas.

Transfección con lipofectamina (Lipofectamine™ 2000, Invitrogen)

La técnica de transfección mediante Lipofectamina se basa en el uso de liposomas catiónicos de carga neta altamente positiva que interactúan con el esqueleto fosforado de la molécula de DNA. Las células fueron subcultivadas en placas de 10 cm el día anterior a la transfección para obtener un 90% de confluencia. Tres o cuatro horas antes de la transfección los 10 ml de medio fueron sustituidos por 5 ml de medio sin antibiótico. En un tubo Falcon de 15 ml se añadieron 5 μg de DNA en 2,5 ml de OPTIMEM (Gibco) y en otro tubo 25 μl de lipofectamina sobre 2,5 ml de medio OPTIMEM. Tras 5 minutos a temperatura ambiente, la mezcla con lipofectamina se añadió sobre la mezcla de DNA, se agitó suavemente y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos, tras los que se añadió la mezcla gota a gota sobre las células a transfectar. El medio de transfección se cambió por medio completo atemperado 3-4 horas después de la transfección.

Electroporación (protocolo optimizado para su uso en células PC12)

La técnica de transfección por electroporación o electropermeabilización consiste en aplicar un voltaje a las células que les produce una pérdida de la rigidez dieléctrica. Este proceso tiene como consecuencia la formación de poros en la membrana celular. Si la fuerza del campo eléctrico aplicado y la duración de la exposición se eligen apropiadamente, los poros formados por el pulso eléctrico se sellan tras un corto período de tiempo, durante el cual los compuestos extracelulares tienen la oportunidad de entrar en la célula.

Las células de una placa de 10 cm de diámetro fueron recogidas con un *scraper* y centrifugadas a 200 g durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 730 μl de PBS frío (para obtener un volumen final de 750 μl). A continuación, se añadieron 10 μg de DNA, se agitó suavemente y se incubó 10 minutos a 4°C. El contenido del tubo fue transferido a la cámara de electroporación (en este caso se utilizaron cámaras de 4mm), se introdujo en el electroporador Shock Pod™ Shocking Chamber (BioRad) y se aplicó un estímulo de 320 voltios y 975 microfaradays. Tras el estímulo eléctrico el contenido de la cámara fue transferido a una nueva placa de 10 cm que contenía 10 ml de medio completo. Esta placa había sido previamente pretratada con polilisina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para mejorar la adhesión de las células a la superficie. El medio de la placa con las células electroporadas fue cambiado 24 horas después de la transfección.

9.2. INFECCIONES

ADENOVIRUS Y ADENO-ASOCIADOS

Los vectores adenovirales permiten una alta eficiencia de entrada del transgen en la mayoría de tejidos *in vivo*, aunque su expresión es temporal. Esto se debe fundamentalmente a la respuesta inmune contra las células transducidas, que además expresan pequeñas cantidades de proteínas virales (Naldini et al., 1996).

Infección con adenovirus y adeno-asociados

Los adenovirus que codifican para ERK5 (Ad-MAPK7) fueron obtenidos de Vector Biolabs, mientras que los adenovirus y adeno-asociados control, que codifican para la proteína verde fluorescente GFP (Ad5-CMV-GFP) se obtuvieron del Dr. Miguel Chillón (CBATEG, UAB).

Los cultivos primarios mixtos de neuronas corticales fueron infectados tras 11-12 días de cultivo *in vitro*, utilizando una multiplicidad de infección (MOI) de 300, en ausencia de suero durante 1h a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂. A continuación, se retiraron los virus mediante un cambio de medio (el nuevo medio sí que contenía suero) y las células fueron incubadas durante 24-36 horas antes de llevar a cabo los ensayos.

El principal problema que presentan los vectores adenovirales es que sólo se integran en el genoma de células que se dividen activamente (Amado y Chen, 1999), lo cual explicaría su baja eficiencia en la infección neuronal.

LENTIVIRUS

Los lentivirus son un tipo de retrovirus que puede infectar tanto a células en división como a células quiescentes terminalmente diferenciadas. Se ha probado que son extremadamente eficientes en generar una expresión génica a largo plazo (superior a 6 meses) en diversas células que no se dividen (como neuronas o macrófagos) en modelos animales (Amado y Chen, 1999). Así, los vectores retrovirales derivados de lentivirus son herramientas prometedoras tanto para terapia génica como para investigación básica, ya que permiten una muy eficiente internalización e integración de transgenes. (Naldini et al., 1996)

Los lentivirus tienen un complejo genoma, a parte de los genes estructurales esenciales (*env*, *gag* y *pol*) contienen genes reguladores que promueven la expresión viral a través de los mecanismos de transcripción y postranscripción (*tat* y *rev*), y genes accesorios que no son necesarios para la replicación viral pero que representan factores esenciales para la virulencia del virus (*vpr*, *vif*, *vpu* y *nef*) (Amado y Chen, 1999).

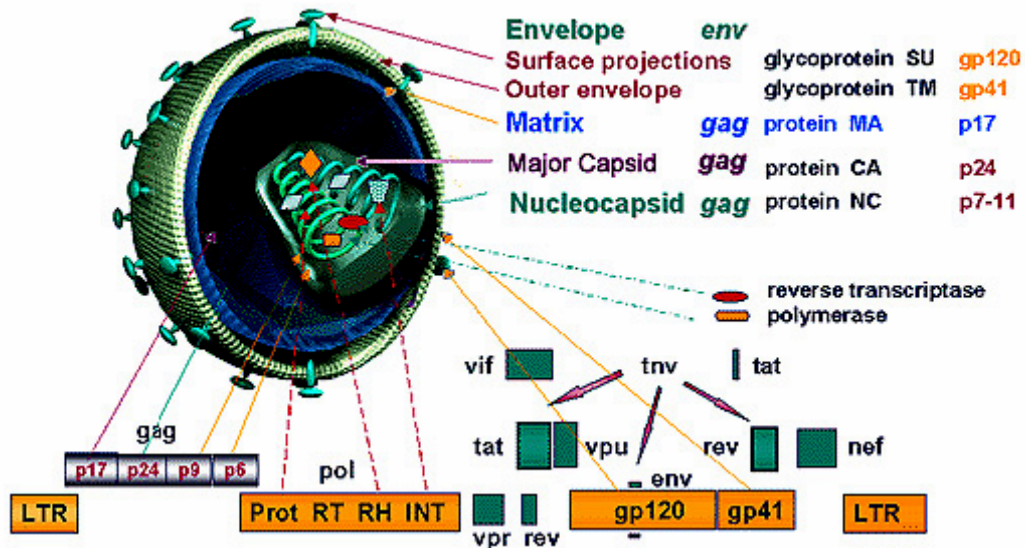


FIGURA 21. Mapa genómico de los lentivirus. Fuente: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb> (*The universal virus database of the Internacional Committee on Taxonomy of Viruses*)

El uso de vectores lentivirales presenta diversas ventajas. En primer lugar se encuentra la capacidad de integrar su carga en los cromosomas de las células diana, permitiendo expresiones estables. Además no codifican para proteínas virales, eliminando las respuestas inmunes contra las células transducidas (problema de los vectores basados en adenovirus). Otra de las ventajas es permiten una alta capacidad de introducción de transgenes, hasta 10 kilobases de secuencia. Y por último, como se ha citado anteriormente son capaces de infectar tanto células proliferantes como diferenciadas.

El mecanismo de infección es el siguiente: una vez el virus ha infectado la célula diana, el vector que contiene el RNA del gen experimental se retrotranscribe a DNA. Este DNA forma un complejo de preintegración que contiene la proteína accesorias

Vpr, la integrasa y la proteína de matriz. Las secuencias de localización nuclear de estas proteínas permiten que el complejo de preintegración atraviese la membrana nuclear sin tener que esperar a que ésta se rompa durante la división celular (como sucede en el caso de vectores basados en otros tipos de virus). Dentro del núcleo, el DNA se integra en el genoma del huésped (Blomer et al., 1997).

Las partículas lentivirales se generan por co-expresión de los elementos de empaquetamiento del virión y del DNA del vector experimental en células productoras HEK 293T. Se utilizan tres plásmidos separados, sin secuencias superpuestas entre ellas para minimizar la posibilidad de recombinación durante la producción de los vectores (Wiznerowicz y Trono, 2003):

A. Vector pEIGW-SK: contiene solamente el material genético a transferir a la célula diana, flanqueado por los elementos cis-activadores que en el lentivirus real serían necesarios para su encapsidación, transcripción inversa e integración. Contiene una serie de modificaciones descritas para que pierda la capacidad transcripcional de la región viral LTR una vez sea transferido a la célula diana. Esto minimiza el riesgo de aparición de recombinantes de replicación competentes y evita problemas ligados a la interferencia de promotores.



FIGURA 22. Vector pWPI. Vector bicistónico que expresa el cDNA experimental subclonado juntamente con el gen reportero eGFP. El vector lentiviral utilizado para sobre-expresiones es pEIGW-SK.

GEN	FUNCIÓN
EF-1alfa promoter	promotor del Factor de Elongación 1
cPPT	<i>central Polypurine Tract</i> . Secuencia de 118 bp que deriva del gen <i>pol</i> del HIV-1 que incrementa la eficiencia de la transducción de vectores lentivirales.
EMCV IRES	<i>encephalomyocarditis virus 5' Internal Ribosome entry site</i> . Fragmento interno de un mRNA de incorporación de ribosomas que proviene del virus de la encefalomiocarditis)
WPRE	<i>woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element</i> . Elemento regulador post-transcripcional del virus de la hepatitis de la marmota que se incorpora para aumentar la expresión del transgen.
SIN	<i>self-inactivating</i> . Región del 3' LTR del virus modificada para que los vectores lentivirales se auto-inactiven una vez integrados en el genoma del huésped, ya que esta región deletada se copia en el 5'LTR una vez integrado, reduciendo la movilización del genoma del vector y la influencia del LTR sobre promotores celulares endógenos cercanos al sitio de integración.

TABLA 11. Descripción de los genes que contiene el vector pWPI

B. Sistema de empaquetamiento: vector psPAX2 (figura 23) que contiene un promotor CAG (activador de citomegalovirus, CMV, y el promotor y el intrón de la β -actina de pollo) para promover una eficiente expresión de las proteínas Gag, Pol, Tat y Rev del virus. Se le han eliminado los genes accesorios *vif*, *vpr*, *vpu* y *nef* para evitar su efecto virulento, ya que no son necesarios para la generación de partículas lentivirales funcionales.

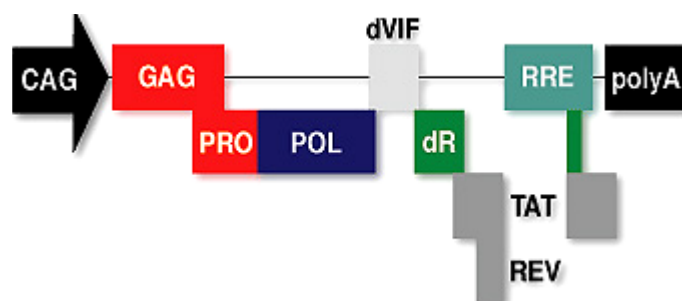


FIGURA 23. Esquema del vector psPAX2 de segunda generación.

GEN	FUNCIÓN
Gag	gen que codifica para diferentes proteínas de la nucleocápside y de la matriz
Pol	gen que codifica para la transcriptasa inversa, para una proteasa y para la integrasa.
Tat	gen que codifica para una proteína necesaria para la transactivación.
Rev	gen que codifica para una proteína necesaria para la regulación del transporte y el procesamiento del RNA.
RRE	(<i>'Rev-responsive element'</i>): necesario para la acción de Rev.

TABLA 12. Descripción de los genes que contiene el vector psPAX2

C. Plásmido de la envuelta viral: plásmido pMD2G (figura 24) que codifica para la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV). Se trata de una proteína heteróloga que es usada para pseudotipar las partículas generadas por las otras dos construcciones. La envuelta final ofrece así la ventaja adicional de tener una alta estabilidad que permite la concentración de las partículas por ultracentrifugación (Naldini et al., 1996).



FIGURA 24. Esquema del vector pMD2G. El gen heterólogo de la proteína G del VSV está flanqueado por un promotor de citomegalovirus (CMV) y por una cola de polyA.

Los vectores lentivirales pEIGW, PMD2.G y psPAX2 fueron obtenidos del Dr. Victor Yuste (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, UAB)

Generación de lentivirus que sobreexpresan ERK5

El siguiente objetivo fue introducir la secuencia que codifica para ERK5 en el vector pWPI, para lo cual fueron necesarios diversos pasos intermedios que se describen a continuación:

1. Amplificación de ERK5 mediante PCR e introducción de las dianas de corte BamHI y XhoI

Los cebadores utilizados para amplificar ERK5 se obtuvieron de Isogen Life Science: 5'-CCGCTCGAGTCAGGGGTCCTGGAGGTCAGG-3' (contiene la secuencia que reconoce BamHI) y 5'-CGCGGATCCGCCACCATGGCCGAGCCT CTGAAG-3' (contiene la secuencia de corte de XhoI).

Para la reacción de PCR se utilizó 1 µl de DNA molde (30 ng), 1 µl de dNTPs 10mM, 0,4 µl de cada cebador (100 µM) y 1 µl de Pfu polimerasa, en un volumen total de reacción de 50 µl. El protocolo utilizado para la amplificación de ERK5 consistió en una fase inicial de desnaturalización de 1 minuto a 95°C. A continuación se realizaron 21 ciclos de tres etapas: una primera desnaturalización de 1 minuto a 95°C seguida de 1 minuto de rehibridación a 50°C y 3 minutos de elongación a 72°C. Por último una fase de elongación de 5 minutos a 72°C.

La visualización del producto obtenido de la PCR se realizó mediante electroforesis de 30 µL de este producto en un gel de agarosa del 0,5%. La banda visualizada en el transiluminador fue cortada y el DNA purificado mediante el kit de extracción Gel Extraction Kit de QIAGEN. El producto de extracción fue resuspendido en 30 µl de agua miliQ estéril pH 8.

2. Digestión de pCMV5-ERK5 y pCRII-SK mediante las enzimas BamHI y XhoI:

El siguiente paso fue introducir la secuencia de ERK5 en el plásmido pEIGW-SK (figura 25). Dado que el polilinker de este vector no contiene dianas de restricción para BamHI y XhoI (dianas que flanquean el inserto de ERK5), fue necesario realizar un paso previo de clonaje de ERK5 en el vector pCRII-SK (figura 26), que sí contiene dianas de corte para las enzimas BamHI y XhoI.

Así, en dos tubos independientes se cortó en paralelo el vector que contenía ERK5 (pCMV5-ERK5) y pCRII-SK con las enzimas de restricción BamHI y XhoI (BioLabs, New England)). Para el corte de los vectores se utilizaron 20µl del vector que contenía ERK5 o 1µg de pCRII-SK, 10 unidades de BamHI, 10 unidades de XhoI, 3 µl de tampón 2 (BioLabs, New England) y se añadió H₂O miliQ hasta llegar a un volumen final de 30 µl. Los tubos se incubaron durante 4 horas a 37°C en una estufa. En el

caso de la digestión de pCRII-SK, transcurridas las 4 horas se añadieron 5 μ l de fosfatasa alcalina para obtener el vector desfosforilado.

El producto de la digestión fue resuelto en un gel de agarosa al 0,5%. Las bandas observadas (inserto y plásmido linearizado) fueron recortadas y los DNAs purificados mediante el kit de extracción Gel Extraction Kit de QIAGEN. El producto de extracción fue resuspendido en 30 μ l de agua miliQ estéril pH 8.

3. Ligación de ERK5 y pCRII

Con el fin de realizar la ligación del inserto (ERK5) en el plásmido (pCRII), se utilizaron diversas proporciones de plásmido e inserto (1:1; 1:3; 1:6), así como un control de autoligación sin inserto. En cada caso se añadió la cantidad pertinente de plásmido e inserto, 1 unidad de ligasa T4 (Invitrogen), 1 μ l de Buffer y H₂O miliQ hasta alcanzar los 10 μ l de volumen final. Los tubos con las distintas ligaciones se incubaron 4h a 16°C. Todas las relaciones utilizadas para la ligación funcionaron.

Inmediatamente tras la ligación se realizó una transformación de bacterias TOPO competentes frescas con 10 μ l del producto de la reacción. Seguidamente se sembró el resultado de cada transformación en una placa de LB-Agar con 50 μ g/ml de ampicilina, que se incubó toda la noche en una estufa a 37°C.

Con el fin de comprobar que las colonias crecidas en las placas contenían plásmido e inserto se crecieron las colonias en minicultivos de 5 ml y se purificó el DNA mediante el kit GEN ELUTE™ PLASMID MINITREP KIT de Sigma. 1 μ g de cada DNA problema fue digerido con el enzima PstI (BioLabs, New England) durante 3 horas a 37°C en un volumen total de 10 μ l. Se escogió uno de los clones que contenía plásmido e inserto, que en adelante denominamos pCRII-ERK5.

4. Introducción de ERK5 en pEIGW-SK (mediante el corte de los dos vectores en Sfil y ligación de fragmentos purificados).

Para introducir ERK5 en el vector pEIGW-SK se realizó una digestión de ambos vectores por separado con el enzima Sfil. Se incubó 1 μ g de plásmido (pEIGW-Sk o pCRII-ERK5) con 10 unidades de Sfil (Bio Labs, New England), 3 μ l de Buffer 2 y H₂O hasta llegar a los 30 μ l de volumen final. La reacción se incubó en una estufa a 50°C

durante 1 hora. A continuación, el producto de la reacción se resolvió en un gel de agarosa al 0,5 %. Se recortaron las 2 bandas visibles correspondientes al vector pEIGW (banda 1 y banda 2) y la banda correspondiente al inserto (ERK5) del vector pCRII-ERK5. El DNA de estas bandas fue purificado mediante el kit de extracción Gel Extraction Kit de QIAGEN. El producto de extracción fue resuspendido en 30 µl de agua miliQ estéril a pH 8.00.

A continuación se procedió a ligar el inserto purificado en el vector pEIGW también purificado, llevando a cabo una reacción de 4 horas a 16°C que contenía 2,5 µl de banda 1 de pEIGW; 2,5 µl de banda 2 de pEIGW; 2,5 µl de inserto procedente del vector pCRII-ERK5; 0,5 µl de H₂O; 1 µl de ligasa T4 (Invitrogen); 1 µl de tampón de la ligasa. El resultado de la ligación fue transformado en bacterias competentes TOPO frescas, y el resultado de la transformación se sembró en una placa de LB-Agar con 50 µg/ml de ampicilina, que se incubó toda la noche en una estufa a 37°C.

Con el fin de comprobar que las colonias obtenidas contenían el plásmido e inserto, se crecieron en minicultivos de 5 ml y se purificó el DNA mediante el kit GEN ELUTE™ PLASMID MINITREP KIT de Sigma. 1µg de cada DNA problema fue digerido con el enzima SfiI durante 3 horas a 37°C en un volumen total de 30 µl. Se escogió una de las colonias que contenía plásmido e inserto y el DNA fue amplificado con el kit QIA filter™ Plasmid Maxi Kit de Quiagen. En adelante denominaremos a este vector de sobre-expresión lentiviral que codifica para ERK5: pEIGW-ERK5.

5. Ensamblaje de lentivirus en células HEK293T (protocolo para una placa de 10 cm)

Para el ensamblaje de los lentivirus se llevó a cabo la co-transfección de los vectores pEIGW-ERK5 (vector lentiviral que sobre-expresa ERK5), pMD2.G, psPAX2 en células HEK293T utilizando PEI, con ligeras modificaciones del protocolo habitual. Se sembraron células HEK293T un día antes para tener un 70-80% de confluencia el día de la transfección. Una hora antes de la transfección se cambió el medio por medio sin suero y sin antibiótico.

Para cada placa se transfectó una mezcla de 40 µg de DNA y 200 µl de PEI. Así, los 40 µg de DNA (20 µg de pEIGW-ERK5, 13 µg de pMD2.G y 7 µg de psPAX2) se diluyeron en 970 µl de NaCl 150 mM estéril, y la solución se agitó durante 2 segundos en el vórtex. En paralelo se diluyeron 200 µl de PEI en 800 µl de NaCl 150 mM estéril

y también se agitó 2 segundos en vórtex. Seguidamente se añadió la solución que contenía PEI a la que contenía DNA y se agitó. Se dejó 10 minutos a temperatura ambiente y se transfectó. Tres horas más tarde se sustituyó el medio por medio fresco completo.

6. Purificación de lentivirus

Entre 48 y 60 horas después de la transfección se recogió el sobrenadante de las placas y se centrifugó a 26.000 xg durante 2 horas a 4°C. Se aspiró cuidadosamente el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 75 µl de TNE estéril (Tris 0,1 M; EDTA 1,25 mM; NaCl 0,2 M a pH 7,4; filtrado y autoclavado) y se dejó toda la noche a 4°C en agitación suave (200 rpm) con el fin de que se resuspendiera el pellet. Finalmente se alicuotaron los virus y se congelaron a -80°C.

Titulación de los lentivirus obtenidos

La capacidad infectiva de la preparación viral fue comprobada mediante la titulación en células HEK 293T sembradas en placa de 24 pocillos. Las células fueron sembradas a una densidad de 30.000 células por pocillo (60.000 células/ml). 24 horas después de la siembra las células se infectaron añadiendo 500 µl de medio completo que contenía 1 µl o 0,1 µl de virus. Al día siguiente de la infección se añadió 1ml de medio completo a los pocillos.

Para verificar que la preparación tiene el título de virus adecuado, 48 horas después de la infección el pocillo con menor cantidad de virus debe presentar el 90% de células fluorescentes.

Infección de cultivos mixtos de neuronas corticales mediante lentivirus

Los lentivirus fueron utilizados para infectar cultivos mixtos de neuronas corticales. Así, los cultivos mixtos de corteza cerebral de entre 8 y 10 DIV, sembrados en placas de 24 pocillos, fueron infectados con 10 µl de una preparación concentrada de virus por pocillo. Los virus se dejaron en el medio durante 4-6 horas, tras las cuales el medio fue sustituido por medio condicionado de una placa hermana. Cinco días después de la infección las células fueron sometidas a otros tratamientos, lisadas y procesadas.

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa Prism (GraphPad), utilizando un análisis de la varianza ANOVA de una vía, seguido por el test de comparación múltiple de Bonferroni. Los resultados de las gráficas se expresan como media \pm SEM, de un mínimo de tres experimentos. Se aceptó un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

FIGURA 25. Vector pEIGW-SK. Esquema del vector pEIGW-SK. Las flechas señalan las dianas de corte SfiI utilizadas para recombinar con el plásmido pCRII-SK.

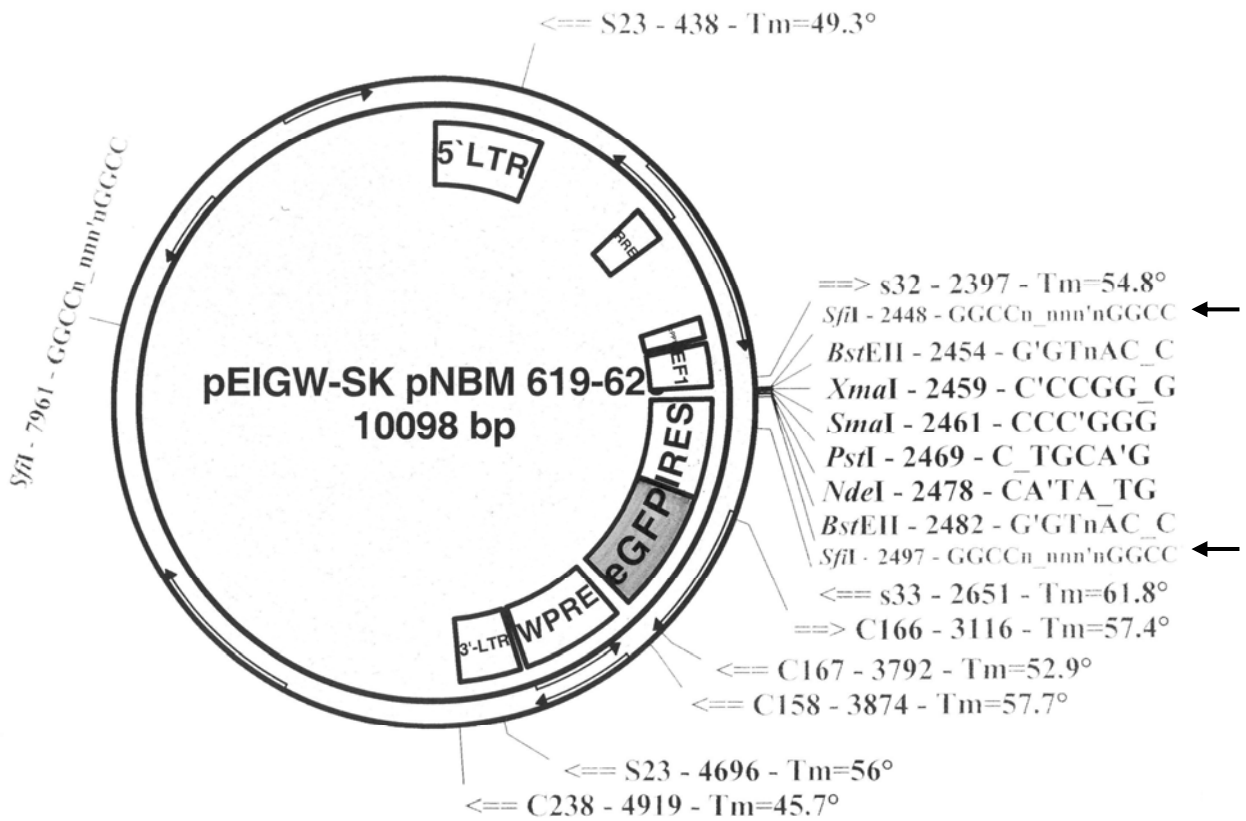


FIGURA 26. Vector pCR11-SK. Esquema del vector pCR11-SK mostrando los sitios de clonaje utilizados BamHI y XhoI utilizados para la introducción de ERK5. Las flechas señalan los lugares de corte SfiI utilizados para la recombinación con el vector pEIGW-SK.

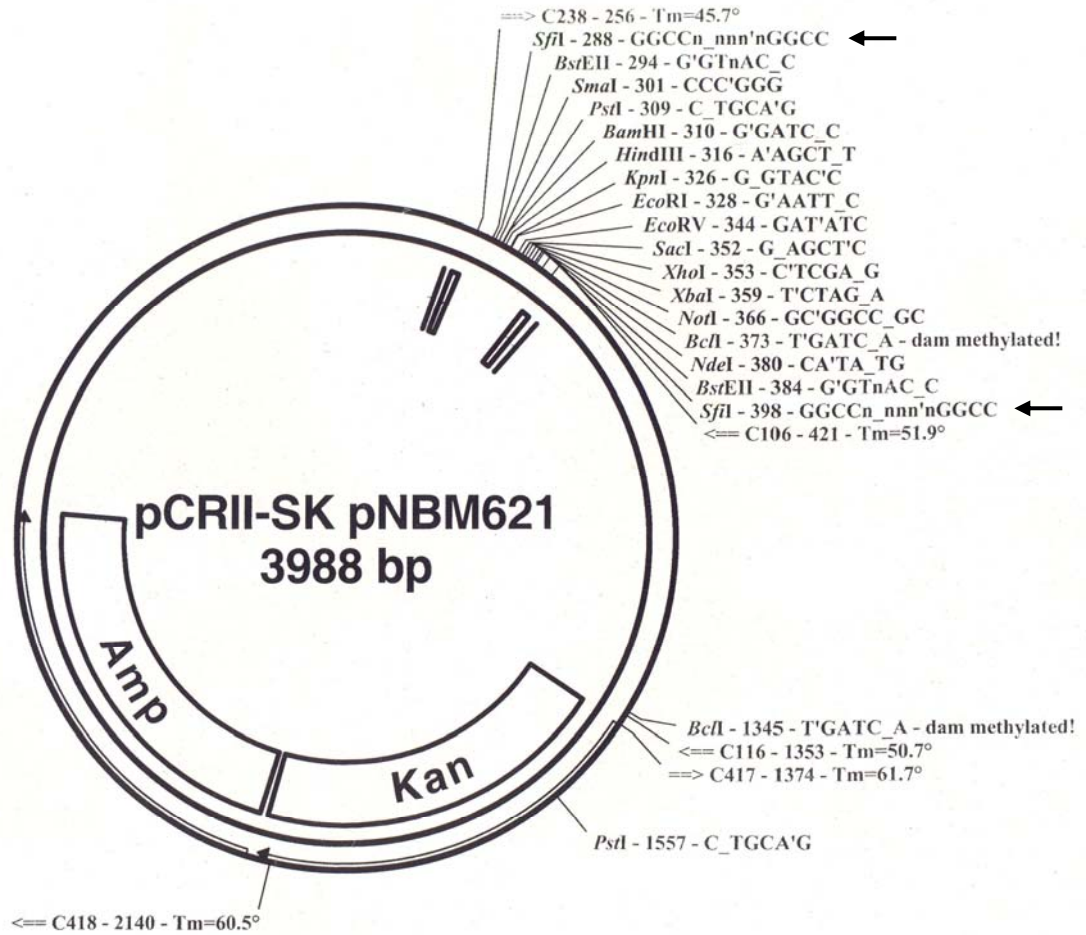


FIGURA 27. Vector pMD2.G. Esquema del vector que contiene la información de la envuelta del virus.

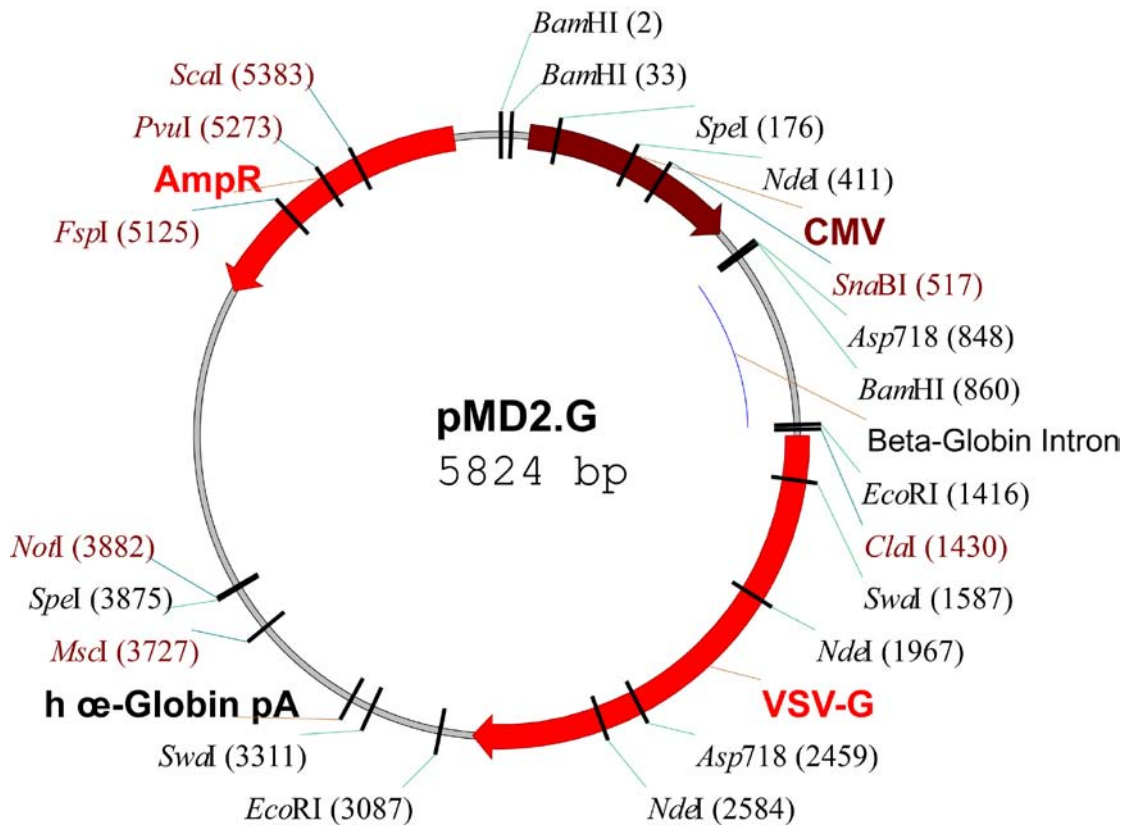
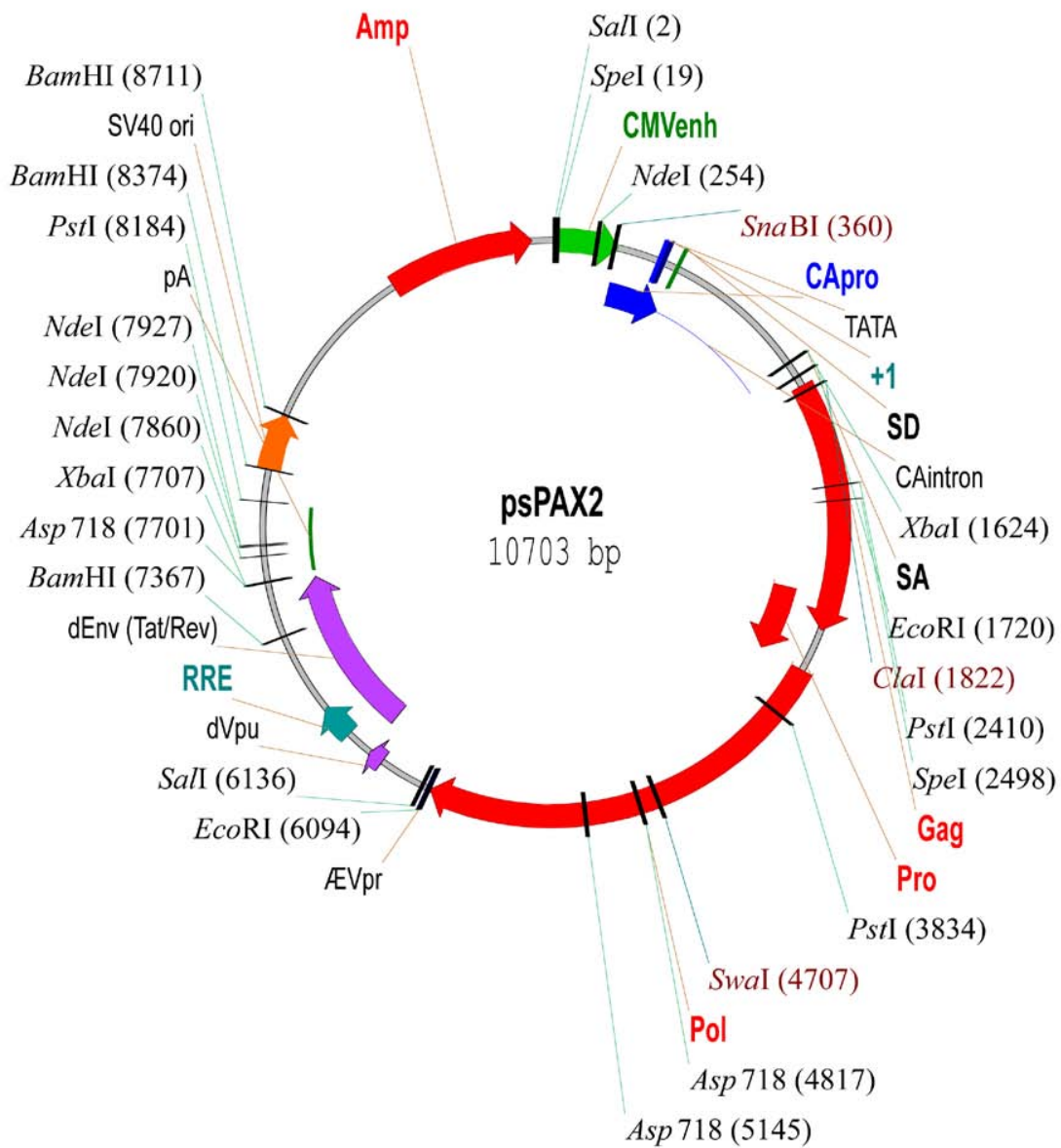


FIGURA 28. Vector psPAX2. Esquema del vector de segunda generación de empaquetamiento lentiviral.



VI. RESULTADOS

1. *TANDEM AFFINITY PURIFICATION*

1.1. PUESTA A PUNTO DE LA METODOLOGÍA

La activación de ERK5 se traduce en un retraso en la migración electroforética

En una primera etapa se diseñaron experimentos con el fin de reproducir los datos publicados previamente sobre la activación de ERK5 en diferentes líneas celulares. Con este fin, se llevaron a cabo ensayos en células HeLa, puesto que artículos anteriores describían la activación de ERK5 en este modelo celular (Kato et al., 1998; Abe et al., 1996).

En primer lugar, fue necesario poner a punto el inmunoblot utilizando un anticuerpo anti-ERK5 producido por la Unidad de Fosforilación de Proteínas del MRC de Dundee (Escocia), ya que no se trataba de un anticuerpo comercial. Este anticuerpo fue obtenido en oveja utilizando ERK5 humana como inmunógeno. Se realizaron diversas pruebas de concentración de anticuerpo para conocer las condiciones óptimas de incubación, en células HeLa los mejores resultados fueron los obtenidos al utilizar una concentración de 0,2 µg/ml.

A continuación, para conocer el patrón de activación de ERK5 endógena y recombinante, se realizaron ensayos de transfección de ERK5 recombinante en células HeLa y el posterior inmunoblot. La figura 29 muestra el correspondiente inmunoblot, utilizando anti-ERK5, de células HeLa transfectadas con ERK5 recombinante (GST-ERK5), MEK5 constitutivamente activa (MEK5-DD) o con GST, como control.

El análisis del inmunoblot de la transfección de células con GST-ERK5 muestra una gran abundancia de ERK5 recombinante respecto de la endógena. Además se aprecia que ambas formas de la proteína se encuentran en estado basal, no hiperfosforilado. En cambio, la transfección de las células con GST-ERK5 y MEK5-DD resulta en un retardo en la migración electroforética de ERK5 que se traduce en un doblete y que corresponde a la forma hiperfosforilada y activa de la proteína (tanto de la endógena como de la recombinante). En el último carril del inmunoblot se muestra, como control, lisado de células no transfectadas activadas con EGF 20 ng/ml durante 15 min, donde también se aprecia el doblete de ERK5 endógena activa.

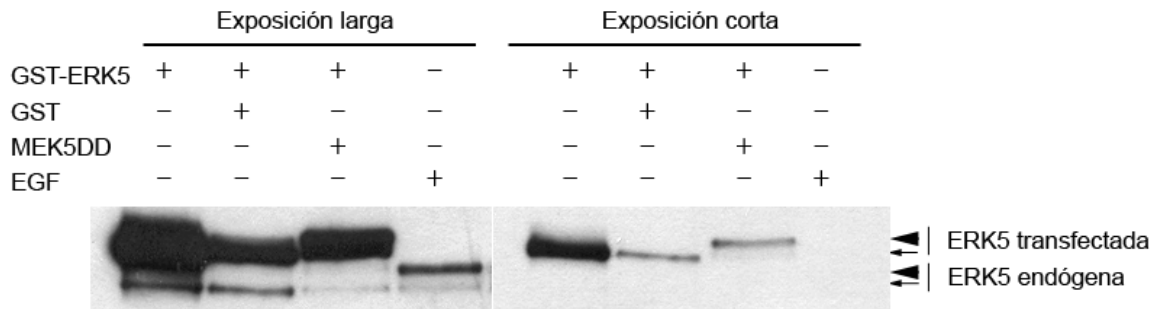


FIGURA 29. Hiperfosforilación de ERK5 endógena y recombinante en células HeLa transfectadas con MEK5-DD. Células HeLa fueron transfectadas con vectores de expresión para las proteínas GST-ERK5, GST y HA-MEK5-DD, lisadas y los niveles de ERK5 visualizados mediante inmunoblot. El último carril, como control, corresponde a células no transfectadas y estimuladas con EGF 20 ng/ml durante 15 min. En la exposición larga del revelado se aprecian los cambios en ERK5 endógena y en la corta los cambios en la proteína recombinante (→ ERK5 no hiperfosforilada, ► ERK5 hiperfosforilada). Resultados representativos de 3 experimentos independientes.

ERK5 se activa en células HeLa frente a EGF, estrés osmótico y oxidativo

Una vez puesta a punto la detección de ERK5 mediante *Western Blot*, se diseñaron experimentos con el fin de reproducir los datos publicados previamente sobre la activación de ERK5 en células HeLa. Para ello, se estimularon estas células con EGF y con diferentes tipos de estrés: estrés osmótico (sorbitol) y estrés oxidativo (H_2O_2) (figura 30). Se evaluó la activación de ERK5 mediante la aparición de la banda de proteína hiperfosforilada en el inmunoblot. Así, el EGF produce la máxima activación a los 15 minutos de tratamiento a una concentración de 20 ng/ml, donde prácticamente toda la proteína se encuentra en la forma hiperfosforilada (paneles A-B). La activación de ERK5 inducida por estrés producido por H_2O_2 es muy débil (paneles C-D), sólo apreciable a una concentración de 1 mM durante 30 minutos (panel D). En cambio, el estrés osmótico inducido por Sorbitol sí que produce activación de la proteína, con un pico máximo al tratar las células 30 minutos a una concentración de 0,5 M (panel E). Esta activación se mantiene a los 45 min de tratamiento (panel F), pero disminuye al incrementar la concentración de Sorbitol (paneles E).

En paralelo se utilizó un anticuerpo comercial que reconoce la forma fosforilada activa de ERK5 (P-ERK5, Biosource). Este anticuerpo reconoce las tirosinas 218 y 220 en el

activation loop de ERK5, fosforiladas por MEK5. Se analizó por inmunoblot con el fosfo-anticuerpo la activación de ERK5, y el resultado fue equivalente al obtenido con el anticuerpo que reconoce a la proteína total: contra más intenso era el doblete observado mediante *Western Blot* de la forma total de la proteína, más intensa era la banda en el inmunoblot utilizando el anticuerpo anti P-ERK5 (figura 31). Los resultados observados están en concordancia con lo descrito por otros autores en células HeLa (Kato et al., 1998).

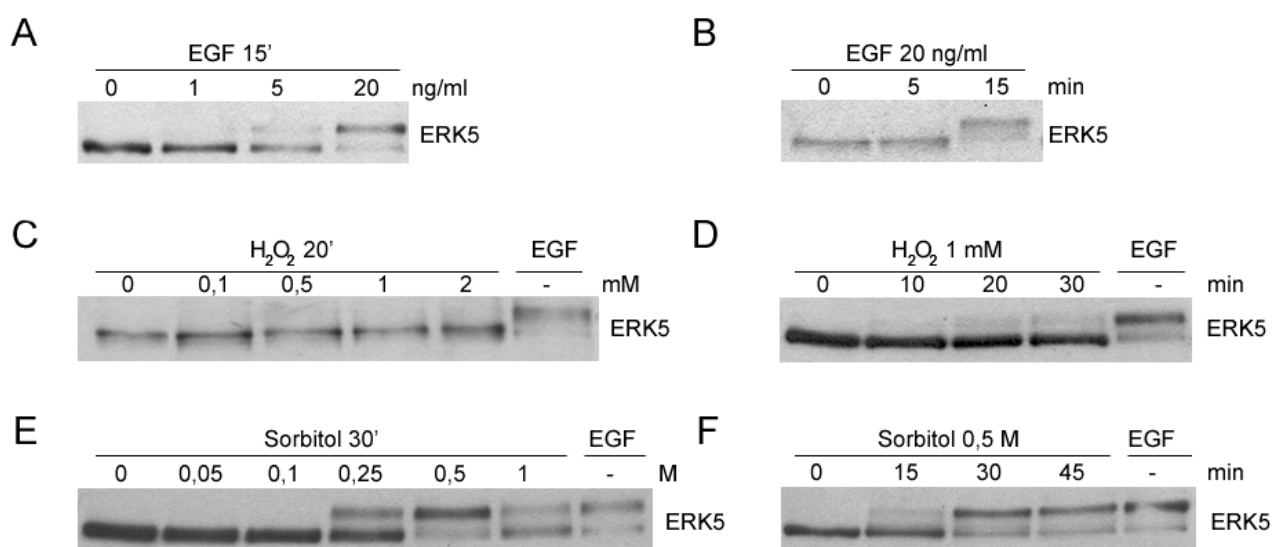


FIGURA 30. Efecto de diferentes estímulos en la activación de ERK5 en células HeLa. Células HeLa fueron tratadas con: **A.** concentraciones crecientes de EGF durante 15 minutos. **B.** EGF 20 ng/ml durante 0-15 minutos. **C.** concentraciones crecientes de H₂O₂ durante 20 minutos. **D.** H₂O₂ 1mM durante 0-30 min. **E.** concentraciones crecientes de Sorbitol durante 30 minutos. **F.** Sorbitol 0,5 M durante 0-45 min. **C-F** Se muestra un control positivo de células estimuladas con EGF 20 ng/ml durante 15 min. A continuación, las células fueron lisadas y los niveles de ERK5 visualizados mediante inmunoblot. Resultados representativos de 3 experimentos independientes.

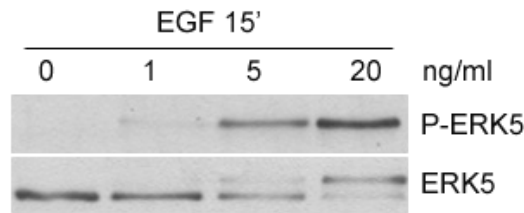


FIGURA 31. Comparación de los anticuerpos P-ERK5 y ERK5 total. Células HeLa fueron tratadas con concentraciones crecientes de EGF durante 15 min, lisadas y los extractos analizados mediante inmunoblot utilizando anticuerpos de ERK5 total o de su forma fosforilada. Resultado representativo de 3 experimentos independientes.

ERK5 se activa en células SH-SY5Y frente a EGF y estrés osmótico

Seguidamente se estudió la activación de ERK5 en la línea celular SH-SY5Y. Esta línea, modelo de estudio de nuestro proyecto, fue establecida en 1970 a partir de la biopsia de un neuroblastoma metastático de médula ósea humana, procedente de una niña de 4 años caucásica (http://www.dsmz.de/human_and_animal_cell_lines). En nuestro trabajo, se optó por este modelo celular como modelo de células neuronales ampliamente descrito, ya que son activas frente a la dopamina- β -hidroxilasa, la acetilcolina y el glutamato. Además se diferencian a neuronas en respuesta a ácido retinoico y BDNF.

Para la identificación de las proteínas que interaccionan con ERK5 mediante el método TAP es necesaria gran cantidad de material de partida, por lo que se utilizan líneas celulares.

En primer lugar, se estudió la activación de ERK5 en respuesta a EGF, estrés osmótico y estrés oxidativo en células SH-SY5Y. En el inmunoblot de la figura 32 se muestra como la estimulación de estas células con EGF 20 ng/ml produce la activación de ERK5, máxima a los 15 minutos de exposición y que se mantiene al aumentar la concentración del mitógeno (panel A) y el tiempo de exposición a éste (panel B). A diferencia de lo que ocurría en células HeLa, en células SH-SY5Y no toda la proteína resulta hiperfosforilada.

El tratamiento con H₂O₂ en el rango de concentraciones y tiempos ensayados no produce activación de la proteína en este modelo celular (paneles C-D). La activación por Sorbitol 0,5 M es muy leve comparada con la producida por EGF (panel E). Otros

autores también han observado diferencias en la activación de ERK5 dependiendo de la línea celular.

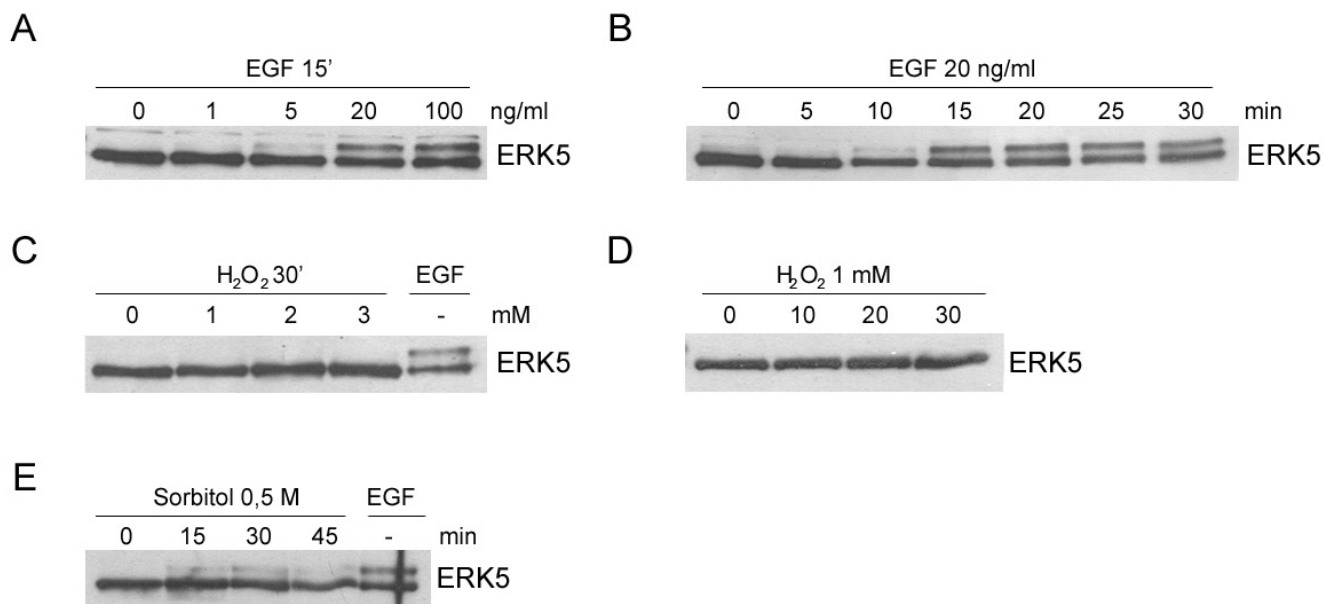


FIGURA 32. Efectos de diferentes factores en la activación de ERK5 en células SH-SY5Y. Células SH-SY5Y fueron tratadas con: **A.** concentraciones crecientes de EGF durante 15 minutos. **B.** EGF 20 ng/ml durante 0-30 minutos. **C.** concentraciones crecientes de H_2O_2 durante 30 minutos. **D.** H_2O_2 1mM durante 0-30 min. **E.** Sorbitol 0,5 M durante 0-45 min. **F.** Neuroblastomas transfectados con GST-ERK5 y MEK5-DD. **C-E** Se muestra un control positivo de células estimuladas con EGF 20 ng/ml durante 15 min. A continuación, las células fueron lisadas y los niveles de ERK5 visualizados mediante inmunoblot. Resultados representativos de un mínimo de tres experimentos independientes.

Inmunoprecipitación de ERK5 de lisados celulares

En paralelo se llevaron a cabo experimentos con el fin de inmunoprecipitar la proteína. De los diferentes anticuerpos anti-ERK5 utilizados en este trabajo, el único que inmunoprecipita la proteína es el anticuerpo comercial de Sigma (E1523) que reconoce los residuos 789 a 802 de la cola C-terminal característica de ERK5. Este anticuerpo inmunoprecipita tanto la forma no fosforilada de ERK5 como la hiperfosforilada (figura 33.A).

Como muestra la figura 33.B, en los ensayos iniciales de inmunoprecipitación aparecía una banda inespecífica de 150 kDa, además de la banda correspondiente a ERK5 inmunoprecipitada. Fue necesario realizar un *preclear* (ver material y métodos) de los lisados iniciales y añadir 0,15 M NaCl al tampón de lisis utilizado en los lavados para obtener una inmunoprecipitación limpia sin inespecificidades

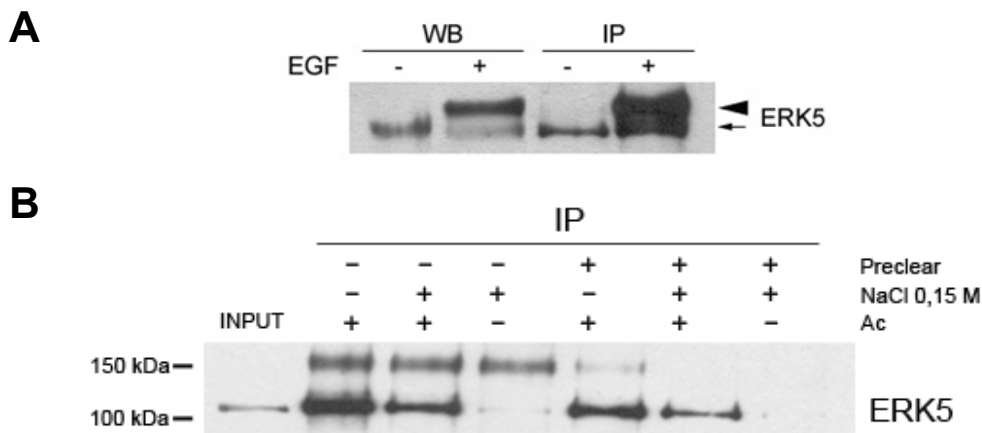


FIGURA 33. Inmunoprecipitación de ERK5. **A.** Células SH-SY5Y fueron estimuladas durante 15 min con EGF 20 (ng/ml) y lisadas. 150 μ g de extracto celular fue inmunoprecipitado con el anticuerpo anti-ERK5 de Sigma y analizado por inmunoblot utilizando el anticuerpo anti ERK5 no comercial (\rightarrow ERK5 no hiperfosforilada, \blacktriangleright ERK5 hiperfosforilada). **B.** Puesta a punto de la inmunoprecipitación de ERK5. Se inmunoprecipitaron 150 μ g de extracto de células SH-SY5Y con el anticuerpo anti ERK5 de Sigma y se analizó el resultado mediante inmunoblot con el anticuerpo no comercial. Se modificaron diferentes factores para obtener una señal más limpia: *preclear* de los lisados iniciales, adición de NaCl 0,15 M en los últimos lavados de la IP. También se utilizaron controles sin anticuerpo (Ac).

ERK5 se localiza en el citosol y el núcleo de las células SH-SY5Y no activadas y activadas

Por último, y dentro de la caracterización del modelo, se estudió la distribución subcelular de ERK5 en células SH-SY5Y no activadas y activadas. El inmunoblot de la figura 34 muestra el fraccionamiento subcelular de estas células. Como marcador citoplasmático del fraccionamiento se utilizó GAPDH y el factor de transcripción CREB como marcador nuclear. No aparece GAPDH en las fracciones nucleares, ni CREB en las citoplasmáticas, por lo que se puede concluir que el fraccionamiento fue

realizado correctamente. ERK5 se localiza tanto en el citosol como en el núcleo de células SH-SY5Y, con un ligero predominio citoplasmático.

A diferencia de lo descrito para otras células, no se apreciaron diferencias en la localización subcelular de ERK5 en células que sobre-expresan MEK5-DD. Sin embargo, tan sólo en la fracción citoplasmática se aprecia el *shift* correspondiente a la hiperfosforilación de ERK5 endógena (ERK5 activa).

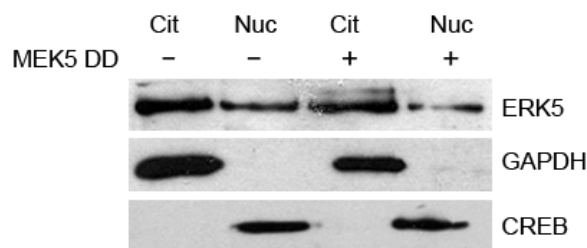


FIGURA 34. ERK5 se localiza en el citosol y el núcleo de las células SH-SY5Y. Células control o células que sobre-expresaban MEK5-DD fueron fraccionadas según lo descrito en Material y Métodos. 30 μ g de cada fracción fueron resueltos mediante SDS-PAGE y las proteínas visualizadas mediante inmunoblot (se utilizó GAPDH como marcador citoplasmático y CREB como marcador nuclear). Resultado representativo de 3 experimentos independientes.

ERK5 endógena existe como complejo de alto peso molecular

La cromatografía en gel filtración permite el fraccionamiento de muestras biológicas según su peso molecular en condiciones nativas. Esta técnica permite monitorizar la existencia de complejos de una proteína determinada. La figura 35.A muestra el perfil de elución de ERK5 de extracto de células SH-SY5Y control, o extracto de células que sobre-expresaban MEK5 constitutivamente activa (MEK5-DD). El peso molecular teórico de la kinasa ERK5 es de 110 kDa. En células control no activadas (gel superior del panel A) se observa la existencia de 2 poblaciones de ERK5 endógena: una correspondiente a un peso molecular de 110 kDa (fracciones 16-17) y que corresponde al peso molecular de ERK5, y otra correspondiente a un peso molecular >700 kDa (fracciones 5-6). Cuando se cromatografiaron extractos de células SH-SY5Y que sobre-expresaban MEK5-DD (gel inferior del panel A) se obtuvieron 3 poblaciones de ERK5: una correspondiente a un peso molecular >700 kDa (frac. nº 5-6), otra correspondiente a un peso de 200 kDa (frac. nº 14-15), que podría tratarse de un dímero de ERK5 y la correspondiente a su peso molecular (110 kDa, frac. nº 16-

17). En este mismo gel inferior del panel A se aprecia el *shift* de ERK5, lo que indica que MEK5-DD ha sido transfectada correctamente. Con el fin de comprobar si la formación de complejos de alto peso molecular era dependiente del tipo celular analizado, se realizó el fraccionamiento cromatográfico de células Hela. Como muestra la figura 35.B, se obtuvieron idénticos resultados a los observados anteriormente en células SH-SY5Y.

Este tipo de cromatografía en condiciones nativas sugiere que ERK5 endógena activa e inactiva forma complejos de alto peso molecular, posiblemente debidos a su interacción con otras proteínas.

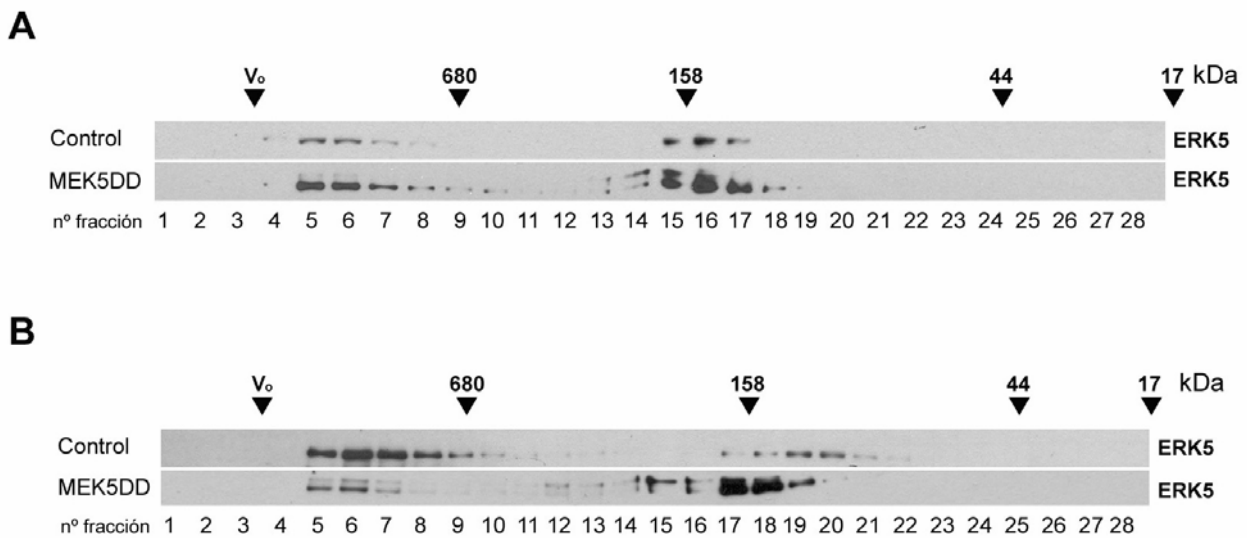


FIGURA 35. ERK5 endógena existe como complejo de alto peso molecular. Lisados procedentes de células SH-SY5Y (**A**) o HeLa (**B**), control o transfectadas con la kinasa activadora MEK5-DD (constitutivamente activa), fueron cromatografiados en columna de Gel Filtración Superdex 200HR-FPLC según lo descrito en la sección Material y Métodos. En cada fracción recogida, ERK5 fue detectada mediante inmunoblot. En la parte superior de cada panel se muestra la elución de los estándares de las proteínas globulares tiroglobulina (680 kDa), γ -globulina bovina (158kDa), ovoalbúmina de pollo (44 kDa) y mioglobina de caballo (17 kDa).

1.2. TANDEM AFFINITY PURIFICATION

Generación de las líneas estables de neuroblastoma

Uno de los objetivos principales de este proyecto es la identificación de proteínas que interaccionan con ERK5. Con este fin se ha utilizado el método *tandem affinity purification* (TAP), que permite la identificación de complejos de proteínas en condiciones nativas. Para ello y en primer lugar, se obtuvieron clones de células de neuroblastoma SH-SY5Y que sobre-expresaban establemente las diferentes proteínas quimeras: TAP control, TAP-MEK5, TAP-ERK5wt y TAP-ERK5 Δ CT (dominio catalítico de ERK5, comprende los aminoácidos 1-490, las siglas hacen referencia a la delección de la cola C-terminal). En adelante se hará referencia a estos clones con el nombre de la proteína recombinante que sobre-expresan. Como se ha mencionado en la introducción, es absolutamente crítico que la sobre-expresión de la proteína recombinante sea suave, idealmente no debe superar más de 5-10 veces los niveles endógenos de la proteína objeto de estudio.

Dado que el vector TAP contiene GFP, se realizó una primera selección de los clones según la fluorescencia observada, escogiendo los moderadamente fluorescentes. De los diferentes clones fluorescentes se amplificaron aquellos que, tras su análisis por *Western Blot*, sobre-expresaron de forma leve la proteína recombinante sin degradar. La figura 36 muestra el inmunoblot de los diferentes clones. Se escogió el clon 3 de la línea control (figura 36.A), el clon 9 de entre los clones que sobre-expresaban una forma de ERK5 que carecía del fragmento C-terminal (figura 14.B) y el clon 3 de entre los que sobre-expresaban TAP-ERK5 *wild type* (wt) (figura 36.C).

Las líneas celulares que sobre-expresaban establemente TAP-MEK5, perdían la fluorescencia a los pocos días de la transfección. No se obtuvieron clones fluorescentes aunque sí colonias resistentes a la selección con G-418, por lo que se continuó su expansión. Se analizó la sobre-expresión de MEK5 en las colonias resistentes a G-418 por inmunoblot, pero no se apreciaron diferencias de expresión respecto a células no transfectadas. Tras diversos intentos infructuosos de conseguir la línea estable, se decidió descartarla de este estudio. La sobre-expresión de ciertas proteínas kinasas en líneas celulares resulta tóxica para las células.

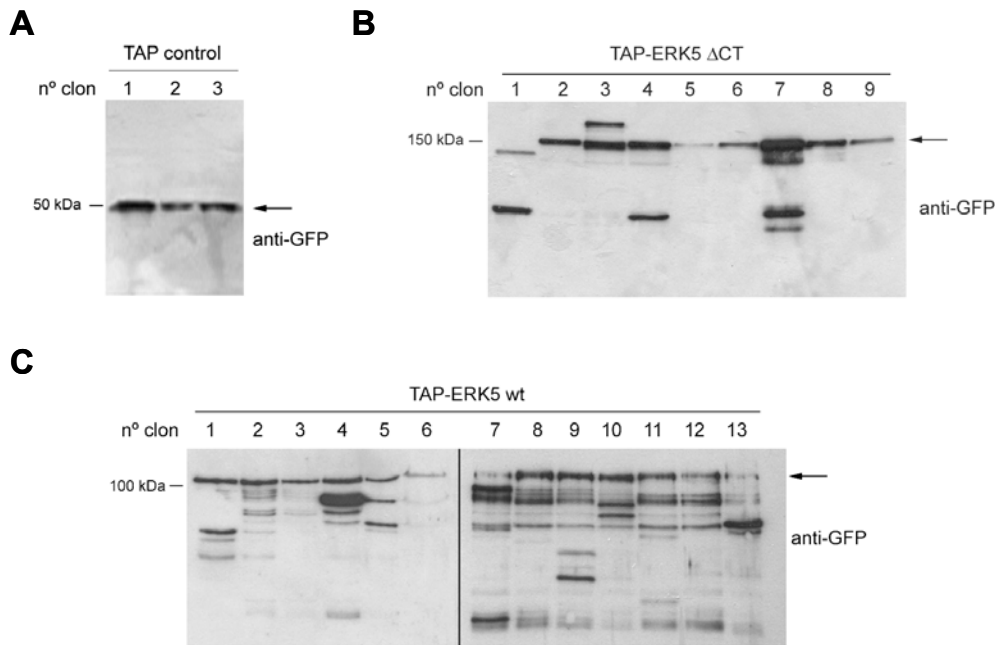


FIGURA 36. Análisis mediante inmunoblot de clones estables de células SH-SY5Y que sobre-expresan las proteínas recombinantes utilizadas en el método TAP. A. Clones que expresan el vector TAP-control. **B.** Clones que expresan el vector TAP-ERK5ΔCT. **C.** Clones que expresan el vector TAP-ERK5wt. Los clones fueron amplificados, lisados y analizados mediante inmunoblot utilizando anticuerpo anti-GFP.

A continuación se estudió la localización subcelular de las proteínas recombinantes, mediante la visualización por microscopía de la fluorescencia emitida por el GFP de los clones. Tanto los clones que expresaban la proteína TAP-control (figura 37.B) como los que expresaban TAP-ERK5ΔCT (figura 37.D) presentaron fluorescencia homogénea en toda la célula, a pesar de que el control mostraba una mayor intensidad en el núcleo. En cambio, el clon que sobre-expresaba la proteína TAP-ERK5wt mostró una localización citoplasmática (figura 37.C). Esta última observación coincide con lo observado en los experimentos de fraccionamiento subcelular en la figura 34, cuando se observa que la proteína ERK5 endógena presenta una localización subcelular citosólica.

La localización parcial de la proteína ERK5ΔCT en el núcleo estaría de acuerdo con otros estudios (Buschbeck y Ullrich, 2005) que muestran la importancia de la cola C-terminal en la translocación a núcleo de ERK5.

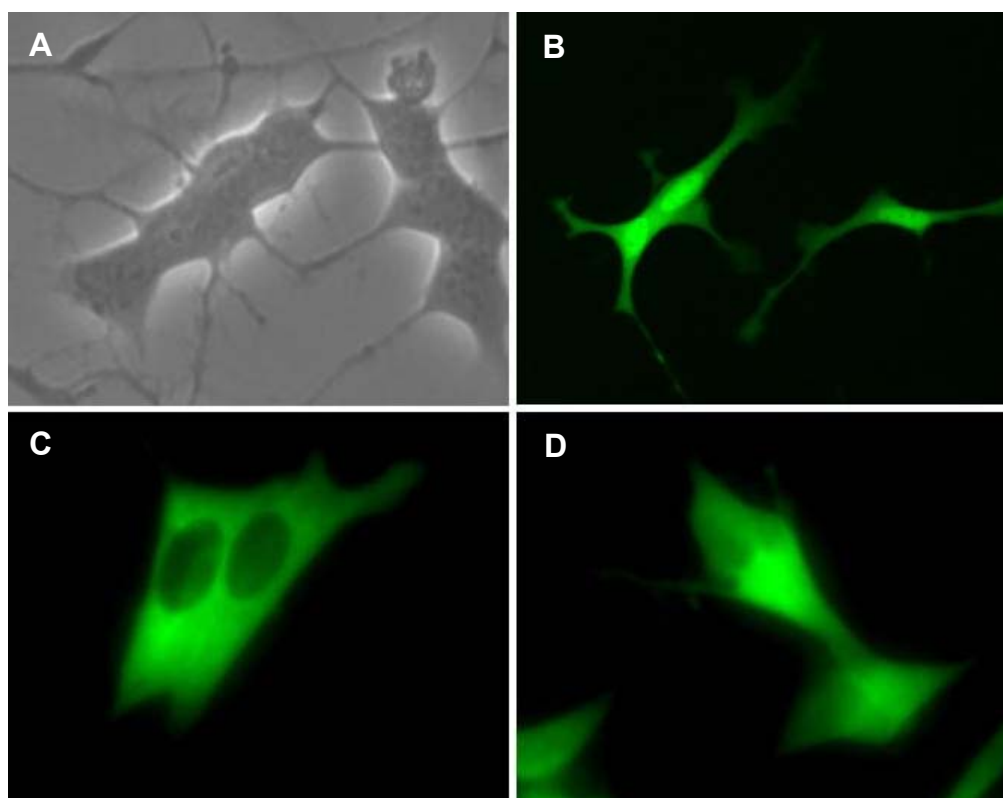


FIGURA 37. Visualización mediante contraste de fase y microscopía de fluorescencia de los clones estables de células SH-SY5Y. A. Contraste de fase de un clon TAP-control. **B.** Visualización de GFP mediante microscopía de fluorescencia del clon 3 que sobre-expresa TAP-control. **C.** Visualización de GFP mediante microscopía de fluorescencia del clon 9 que sobre-expresa TAP-ERK5 *wild type*. **D.** Visualización de GFP mediante microscopía de fluorescencia del clon 3 que sobre-expresa TAP-ERK5 Δ CT.

A continuación y mediante microscopía de fluorescencia, se estudiaron los posibles cambios en la localización subcelular de ERK5wt en respuesta a EGF y a la sobre-expresión de MEK5-DD. Este estudio resultaba interesante para comparar el comportamiento de la proteína sobre-expresada con el de la proteína endógena. Anteriormente se había observado en el fraccionamiento celular de células SH-SY5Y que ERK5 activa presentaba una localización citosólica. Como se observa en la figura 38, ni el factor de crecimiento EGF ni la transfección de las células con la kinasa activadora MEK5-DD produjeron un cambio en la localización citosólica de TAP-ERK5wt.

Estos estudios muestran que la proteína TAP-ERK5wt localiza en la fracción citosólica de las células en reposo o expuestas a factores que activan ERK5, tal y como se observó para la proteína endógena. Esta observación es sumamente relevante, dado que los tampones utilizados en este trabajo para llevar a cabo la metodología TAP no permiten purificar proteínas nucleares.

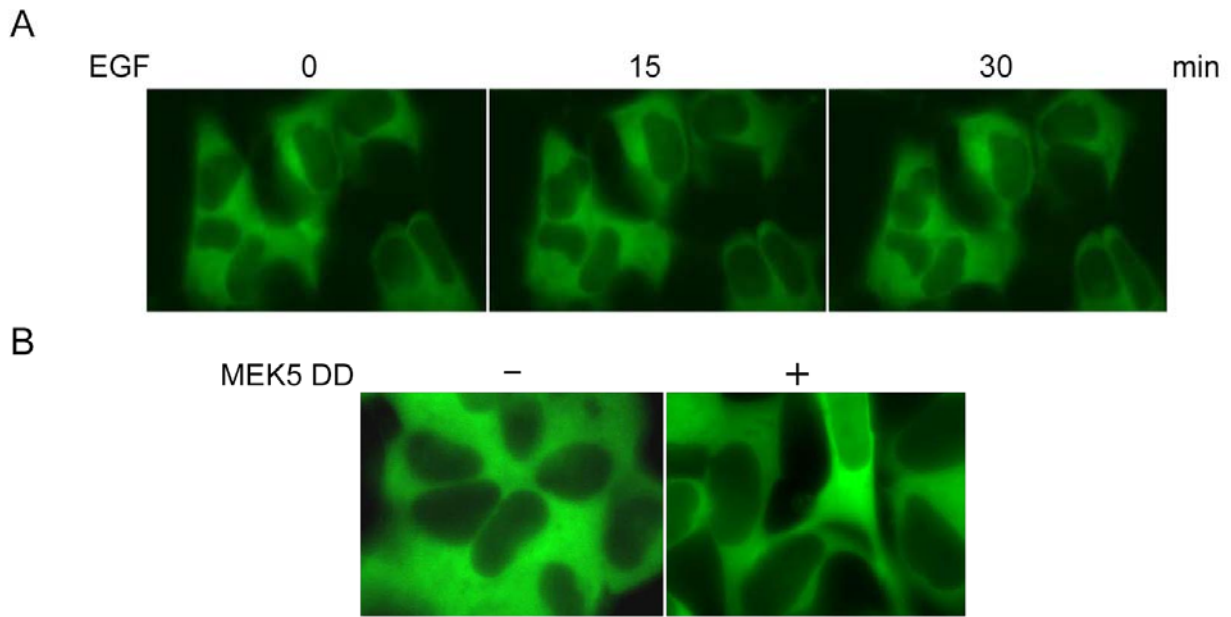


FIGURA 38. La estimulación con EGF o la sobre-expresión de MEK5DD no altera la localización subcelular de la proteína de fusión TAP-ERK5wt en células SH-SY5Y. A. Células SH-SY5Y que sobre-expresan de forma estable TAP-ERK5wt fueron colocadas en una cámara que permitía mantener la temperatura constante a 37°C, estimuladas con EGF 20 ng/ml durante 0-30 minutos y observadas en microscopio de fluorescencia durante todo el proceso. **B.** Células SH-SY5Y fueron transfectadas con MEK5DD y observadas en microscopio de fluorescencia 24 horas después de la transfección.

Purificación TAP

Uno de los problemas asociados a las técnicas que permiten la identificación de complejos de proteínas es la obtención de falsos negativos (ver introducción). Para minimizar este problema, en este trabajo se ha optado por realizar dos purificaciones independientes, de tal manera que sólo aquellas proteínas identificadas en ambas purificaciones serían tenidas en cuenta como posibles candidatos a interactuar con ERK5.

En la primera purificación (**purificación 1**), los clones seleccionados fueron amplificados hasta obtener el lisado de 100 discos de 150 cm confluentes para cada caso, mientras que la **purificación 2** se realizó con el extracto de 200 discos de 150 cm confluentes. A excepción de la cantidad de extracto inicial, se siguió el mismo protocolo para ambas purificaciones.

Una vez recogidos los lisados necesarios se procedió a la purificación. Tras la primera ultra centrifugación de las muestras, se descartaron las fracciones nucleares de los extractos. Tras la centrifugación inicial se realizaron las dos cromatografías secuenciales (ver Material y Métodos). Se realizó una primera cromatografía incubando los extractos en resina Ig-G agarosa, a la que debía unirse el dominio de unión a Ig-G de las proteínas de fusión. Después de incubar con la proteasa TEV, se realizó la segunda cromatografía con resina calmodulina-sepharose, a la que se unió el dominio de unión a calmodulina de las proteínas de fusión. Se utilizaron dos resinas diferentes (agarosa y sepharose) para minimizar las interacciones inespecíficas a la resina.

El producto de la purificación fue concentrado, cargado en un gel, sometido a electroforesis y la tinción del gel se muestra en la figura 39. En el panel A se muestra el resultado de la purificación 1 a partir del lisado de 100 discos de cada clon, donde se aprecia un menor número de bandas procedentes del clon TAP-ERK5wt que en el TAP-ERK5 Δ CT. Esto podría ser debido a que el vector TAP-ERK5wt se expresa en menor cantidad. En la figura 39.B se muestra el resultado de la purificación 2. El patrón de bandas observado en ambas purificaciones es similar.

Todas las bandas visualizadas fueron numeradas (hasta un total de 47 en la purificación 1 y 61 en la purificación 2), cortadas, procesadas y secuenciadas mediante espectrometría de masas. Este análisis fue llevado a cabo por el Dr. Nicolas

Morrice del servicio de Espectrometría de Masas de la *Protein Phosphorylation Unit* del MRC, Dundee (Escocia). La figura 40 muestra, como ejemplo, el resultado obtenidos tras LC-MS/MS y “Mascot search engine” para una de las bandas del gel. Contiene el análisis global de las secuencias encontradas, con los péptidos más significativos (*hits*) (figura 40.A) y una descripción de las características de cada uno de los *hits* (figura 40.B): masa molecular, número de fragmentos encontrados y puntuación. Un *hit* se considera positivo si su puntuación es mayor de 100. Una puntuación de 100 implica que en una base de datos con 5000 péptidos habrá una posibilidad entre 2 millones de obtener un falso positivo.

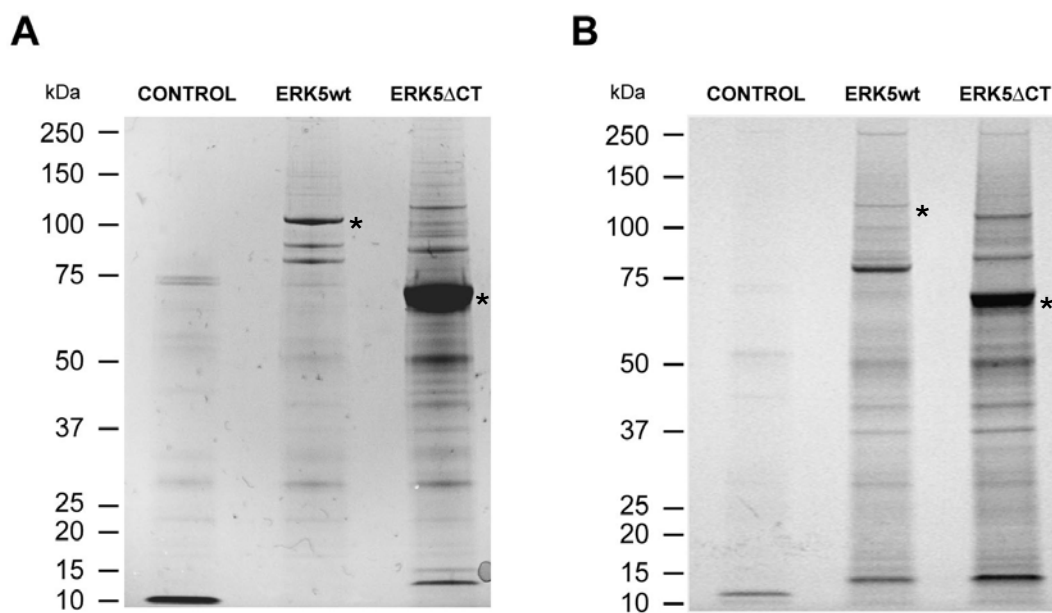


FIGURA 39. Tinción con Colloidal Coomassie de geles de acrilamida resultado de correr las muestras de la purificación TAP. Las diferentes bandas fueron numeradas y procesadas para su análisis por espectrometría de masas. **A.** Primera purificación TAP del lisado de 50 discos para cada clon. **B.** Segunda purificación TAP del lisado de 50 discos del clon control, 200 de ERK5wt y 80 de ERK5ΔCT. A la izquierda de cada gel se muestran los marcadores de peso molecular. * Proteína cebo.

Los resultados obtenidos mediante espectrometría de masas fueron analizados: la tabla 13 resume los resultados de la purificación 1 y la tabla 14 los resultados obtenidos en la purificación 2. La figura 41 muestra de forma esquemática la identificación de las bandas de gel tras el análisis de los resultados del “Mascot Search”.

Las proteínas identificadas se pueden clasificar en los siguientes grupos: chaperonas (Hsp70, Hsp90, Grp94), proteínas del citoesqueleto (tubulina, actina) y proteínas del metabolismo celular (piruvato kinasa, ATP sintasa α , LDH).

De los positivos obtenidos algunos fueron descartados dado que suelen aparecer en este tipo de purificación en células HeLa y HEK293. Es el caso de la actina, la tubulina y chaperones como Hsp70.

Destaca en las dos purificaciones realizadas el resultado obtenido para Hsp90 β , obtuvo un *score* de 865 en la primera purificación (banda 28, tabla 13) y de 1065 en la segunda purificación (banda 39, tabla 14) puntuaciones similares a las obtenidas por la proteína cebo en ambos casos. En el caso de la segunda purificación se identificaron péptidos que cubren el 55,3 % de la secuencia de la proteína Hsp90 β .

También destaca la alta puntuación (347) de la piruvato kinasa tipo 2 (PKM2) (banda 43, purificación 2), con un total del 40,2% de la secuencia de la proteína identificada en el fragmento de gel analizado.

Otras proteínas obtenidas son la PPIAsa A, la Fosfatasa 2B (calcineurina) y la ATP sintasa α .

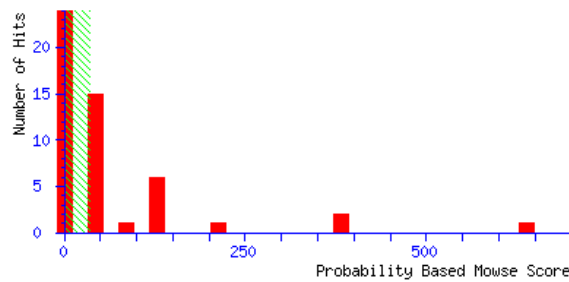
Además, la identificación de la proteína 14-3-3 puede considerarse un control positivo de la técnica, ya que estudios previos utilizando *yeast two hybrid* habían descrito su interacción con ERK5 (Zheng et al., 2004).

{MATRIX}
{SCIENCE} Mascot Search Results

User : Mascot Daemon
 Email :
 Search title : Submitted from JLizcano 060802 by Mascot Daemon on DELL14028 (JLizcano060802_13)
 MS data file : D:\Mascot\JLizcano 060802\JLizcano060802_13.wiff
 Database : Uniprot_Swall (6945799 sequences; 2396436684 residues)
 Taxonomy : Homo sapiens (human) (96070 sequences)
 Timestamp : 28 Aug 2006 at 09:02:44 GMT
 Significant hits: [UniRef100 P08238](#) Heat shock protein HSP 90-beta [Homo sapiens (Human)]
[UniRef100 P04264](#) Keratin, type II cytoskeletal 1 [Homo sapiens (Human)]
[UniRef100 P07900](#) Heat shock protein HSP 90-alpha [Homo sapiens (Human)]
[UniRef100 Q13164](#) Mitogen-activated protein kinase 7 [Homo sapiens (Human)]
[UniRef100 P35527](#) Keratin, type I cytoskeletal 9 [Homo sapiens (Human)]
[UniRef100 P13645](#) Keratin, type I cytoskeletal 10 [Homo sapiens (Human)]
[UniRef100 Q58FF8](#) Heat shock protein 90Bb [Homo sapiens (Human)]
[UniRef100 P14625](#) Endoplasmin precursor [Homo sapiens (Human)]

Probability Based Mowse Score

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
 Individual ions scores > 36 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$).
 Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Peptide Summary Report

Format As: Peptide Summary [Help](#)

Significance threshold $p <$ Max. number of hits

Standard scoring MudPIT scoring Ions score cut-off Show sub-sets

Show pop-ups Suppress pop-ups Sort unassigned Decreasing Score Require bold red

Select All Select None Search Selected Error tolerant Archive Report

- [UniRef100 P08238](#) Mass: 83423 Score: 638 Queries matched: 34
 Heat shock protein HSP 90-beta [Homo sapiens (Human)]
 Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 109	558.3300	557.3227	557.3285	-0.0058	0	7	54	1	K.AQALR.D
332	523.2500	1044.4854	1044.5927	-0.1073	1	13	11	6	K.VEKVTISNR.L
333	523.3000	1044.5854	1044.5927	-0.0073	1	(11)	18	5	K.VEKVTISNR.L
<input checked="" type="checkbox"/> 353	540.7600	1079.5054	1079.5287	-0.0233	0	50	0.0019	1	R.APFDLFENK.K
<input checked="" type="checkbox"/> 427	576.3100	1150.6054	1150.5506	0.0549	0	52	0.0012	1	K.YIDQEELNK.T
<input checked="" type="checkbox"/> 441	597.8000	1193.5854	1193.6404	-0.0550	0	(14)	7.2	1	K.IDIIPNPQER.T
<input checked="" type="checkbox"/> 442	597.8500	1193.6854	1193.6404	0.0450	0	(24)	0.86	1	K.IDIIPNPQER.T
<input checked="" type="checkbox"/> 443	597.8600	1193.7054	1193.6404	0.0650	0	37	0.046	1	K.IDIIPNPQER.T
<input checked="" type="checkbox"/> 454	618.8600	1235.7054	1235.6298	0.0756	1	54	0.00079	1	R.RAPDFLFENK.K
<input checked="" type="checkbox"/> 455	621.8700	1241.7254	1241.6979	0.0275	0	60	0.00026	1	K.ADLINNLGTIAK.S
<input checked="" type="checkbox"/> 457	624.7600	1247.5054	1247.4984	0.0070	0	29	0.26	1	R.DNSTMGYMAK.K

FIGURA 40. Resultado del análisis LC-MS/MS de la banda 13 de la purificación 2. A.Péptidos más significativos (*hits*) de la banda secuenciada. **B.** Análisis de uno de los *hits*.

Clon	Banda	Proteína	Peso mol.	Score	péptidos	% Sec	Swiss-Prot
\emptyset	2	Hsp70	71454	219	6	11,5%	Q3MHM4
	8	CSS1	28028	275	4	21,9%	P13135
ERK5 wt	11	ERK5	88787	680	11	18,7%	Q96G51
	12	ERK5	88787	472	8	12,2 %	Q96G51
	13	ERK5	88787	462	7	11,3%	Q96G51
	16	Tubulin-1 α	50686	143	4	8,2%	Q8T6A5
	17	α -Actina	42052	207	5	16,0%	P60712
	20	14-3-3 α	28456	118	3	11,8%	Q5PQB4
ERK5 Δ CT	24	SAP97	100578	142	3	4,4%	Q12959
	25	Neutral α -glucosidase precursor	107263	255	5	6,7%	Q14697
	26	GRP94	92696	254	7	9,7%	P14625
	27	EF-2	96115	149	4	4,5%	P13639
	28	Hsp90 β	83484	865	19	30,0%	P11499
	29	ERK5	88787	748	23	23,0%	Q96G51
	31	Piruvato kinasa M1/M2	58391	157	5	10,1%	P11979
	33	ATP sintasa α	38966	427	6	21,0%	P19482
	34	Tubulin-1 α	50686	713	15	39,0%	Q8T6A5
	35	EF1- α	50467	175	4	10,2%	Q90835
	36	eIF4A- α	46309	240	5	15,6%	Q90835
	38	α -Actina	42052	287	6	21,3%	P60712
	39	GAPDH	36070	71	1	4,4%	P04406
	40	LDH-A	36819	105	6	16,0%	P00338
	41	14-3-3 ϵ	29326	192	6	26,7%	Q5PQB9
	42	14-3-3 δ/ζ	27899	280	4	21,8%	Q5R651
		14-3-3 γ	28456	166	4	16,7%	Q5PQB4
	43	CSS1	28028	269	7	26,6%	P13135
44	CSS1	28028	314	7	31,6%	P13135	
45	PPIasa A	18098	94	3	21,2%	P622938	

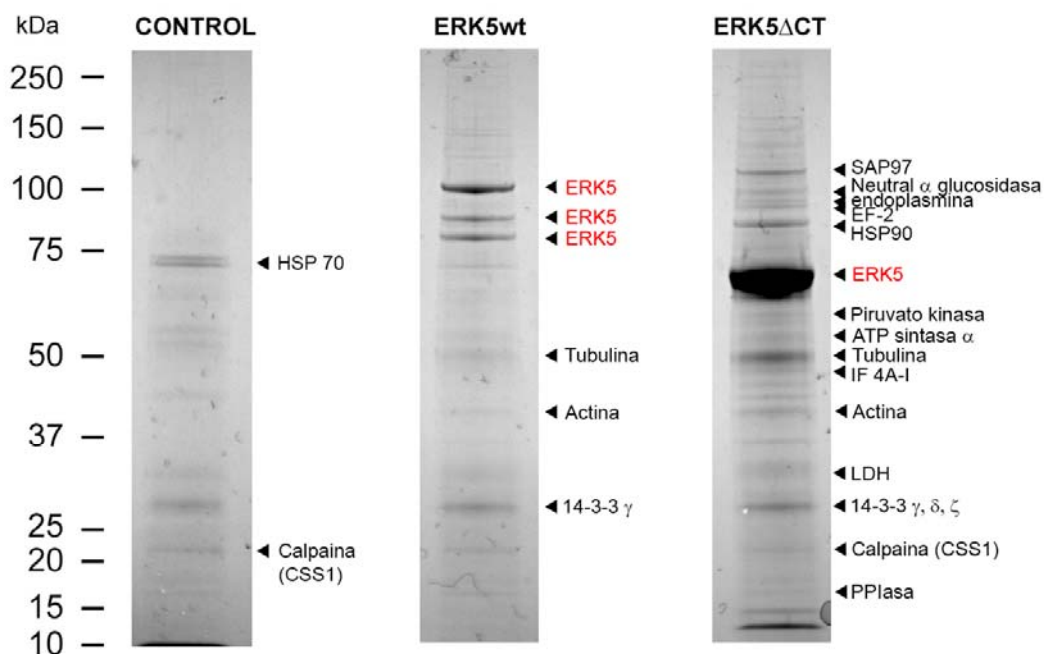
TABLA 13. Identificación de proteínas asociadas a ERK5 (primera purificación TAP).

El primer tercio de la tabla corresponde a las proteínas identificadas en el control (\emptyset), el segundo tercio (sombreado) corresponde a las proteínas asociadas a ERK5wt y el último tercio a los positivos que interaccionan con ERK5 Δ CT. La tabla muestra el número de banda (de las 47 obtenidas originalmente), la identificación de la proteína, el peso molecular, la puntuación del *hit* (*score*), el número de péptidos encontrados de esa proteína, el tanto por ciento del total de la proteína que representan los péptidos encontrados y la referencia de cada proteína en la base de datos Swiss-Prot.

Clon	Banda	Proteína	Peso mol.	Score	péptidos	% Sec	Swiss-Prot
\emptyset	0	Hsp70	71440	114	3	8,1 %	P17066
	2	Tubulina- β 2	50095	140	4	13,1 %	P07437
	5	CSS1	28469	52	2	10,4 %	P04632
ERK5 wt	8	Espectrina	286161	338	19	11,2 %	UPI00004577B5
	9	ERK5	89151	160	6	11,0 %	Q13164
	10	ERK5	89151	359	15	27,9 %	Q13164
		Neutral α -glucosidasa	107263	38	5	9,6 %	Q14697
	11	ERK5	89151	191	9	16,9 %	Q13164
	13	Hsp90 β	83423	638	18	33,14 %	P08238
	15	Hsp70	71083	445	15	38,7 %	Q53GZ6
	16	Piruvato kinasa3	58470	298	14	37,9 %	UPI0000169DBC
	17	ATP sintasa	59828	294	9	26,8 %	P25705
		Fosfatasa 2B	59335	139	6	16,12 %	Q08209
		FSCN1	55729	93	5	16,0 %	Q96IH1
	23	GAPDH	36483	497	7	41,7 %	UPI000051AD9D
	24	LDH A	36819	154	4	16,6 %	P00338
LDH B		5			21,8 %		
26	14-3-3 γ	28325	145	5	29,3 %	P61981	
	14-3-3 δ/ζ	27896	120	3	18,6 %	UPI00001415F5	
	14-3-3 η	28459	40	2	9,3 %	UPI00006036FB	
29	PPIasa A	18229	50	2	13,3 %	Q3KQW3	
ERK5 Δ CT	33	Espectrina	285162	141	14	8,9 %	Q13813
	34	ERK5	89151	348	10	24,9 %	Q13164
	36	Neutral α -glucosidasa	107263	138	7	13,6 %	Q14697
	37	Endoplasmina	92696	106	3	5,6 %	P14625
	39	Hsp90 β	83423	1065	25	55,3 %	P08238
	40	ERK5	59690	1257	15	49,9 %	Q6QLU7
		HSP70	71083	29	4	8 %	Q56GZ6
	41	ERK5	59690	1473	18	56,3 %	Q6QLU7
	43	PKM2	58470	347	14	40,2 %	P14618-2
	44	ATP sintasa	59828	360	8	24,7 %	P25705
		FSCN1	55729	255	10	30,2 %	Q96IH1
		Fosfatasa 2B	59335	141	4	11,7 %	Q08209
	50	GAPDH	36483	818	10	57,1 %	UPI000051AD9D
	51	14-3-3 ϵ	29326	157	7	43,5 %	P62258
		LDH A	36819	46	2	7,9 %	P00338
52	14-3-3 γ	28325	206	3	16,3 %	P61981	
	14-3-3 δ/ζ	29413	153	4	28,2 %	UPI00005E2B76	
	14-3-3 η	28459	96	3	13,8 %	UPI00006036FB	

TABLA 14. Identificación de asociadas a ERK5 (segunda purificación TAP). Proteínas identificadas en el clon control (\emptyset), ERK5wt y ERK5 Δ CT. La tabla muestra el número de banda (de las 61 obtenidas originalmente), la identificación de la proteína, el peso molecular, la puntuación del *hit* (score), el número de péptidos encontrados de esa proteína, el tanto por ciento del total de la proteína que representan los péptidos encontrados y la referencia de cada proteína en la base de datos Swiss-Prot.

A



B

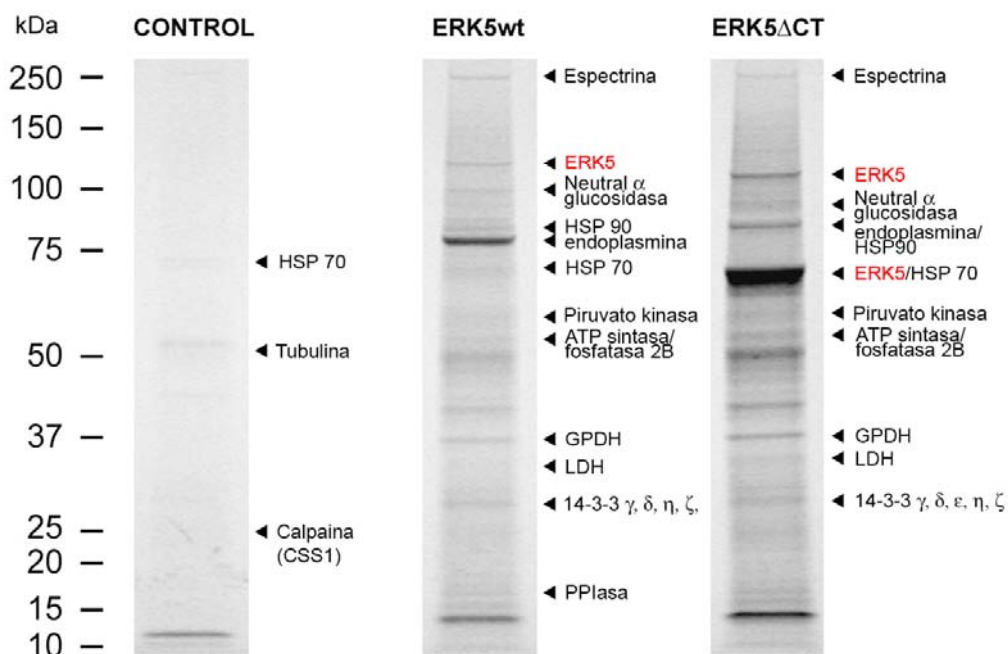


FIGURA 41. Identificación de las bandas tras el análisis de los resultados de la espectrometría de masas. En la parte superior de cada fragmento de gel se indica la proteína recombinante que contenía el vector TAP del clon amplificado (control, es decir, sin proteína problema; ERK5wt; ERK5 Δ CT). A. Resultado de la primera purificación TAP. B. Identificación de bandas de la segunda purificación TAP.

1.3. ANÁLISIS DE INTERACCIONES OBTENIDAS MEDIANTE LA PURIFICACIÓN TAP

1.3.1. HSP90

Hsp90 es una proteína chaperona que juega un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis regulando la conformación, activación y en consecuencia la función de unas 100 proteínas (Belova et al., 2008).

La interacción entre ERK5 y Hsp90 ha sido descrita en levadura, mediante ensayos de two-hybrid (Truman et al., 2006). Estos autores muestran, además, que la actividad kinasa de ERK5 se suprime al inhibir Hsp90 (Truman et al., 2006; Piper et al., 2006). Además también se pierde la actividad *in vivo* de la kinasa en una cepa de levadura que expresa una proteína Hsp90 mutante (T22I), esta cepa es defectiva en el mantenimiento de la integridad celular (Truman et al., 2006).

Estos antecedentes juntamente con nuestros resultados obtenidos de la purificación TAP, hacen de Hsp90 un buen candidato a interactuar con ERK5 en células de mamífero.

Hsp90 α y Hsp90 β se encuentran en el citosol, donde son requeridas para la estabilidad y maduración funcional de diversas proteínas de señalización como el receptor de esteroides, las serina kinasas Raf, la kinasa dependiente de ciclina 4 (cdk4) y algunos receptores tirosina kinasa (Basso et al., 2002).

Hsp90 β endógena co-inmunoprecipita con ERK5 recombinante

En primer lugar se estudió la posible interacción entre ERK5 y Hsp90 β . Para empezar, se estudió la interacción de las proteínas endógenas, para lo cual 5 mg de extractos de células SH-SY5Y fueron inmunoprecipitados con anticuerpo anti-ERK5 (Sigma) y se analizó Hsp90 β mediante inmunoblot y viceversa: inmunoprecipitación de Hsp90 β e inmunoblot de ERK5. En ninguno de los dos casos se detectó co-inmunoprecipitación (figura 45).

Los cerebros de embrión de rata de 17 días de gestación expresan una elevada concentración de ERK5, mayor que en las líneas celulares. Se inmunoprecipitó 1 mg de ERK5 de este extracto y se realizó un inmunoblot con anticuerpo anti Hsp90 β . En

este caso tampoco se detectó co-inmunoprecipitación de ambas proteínas (datos no mostrados).

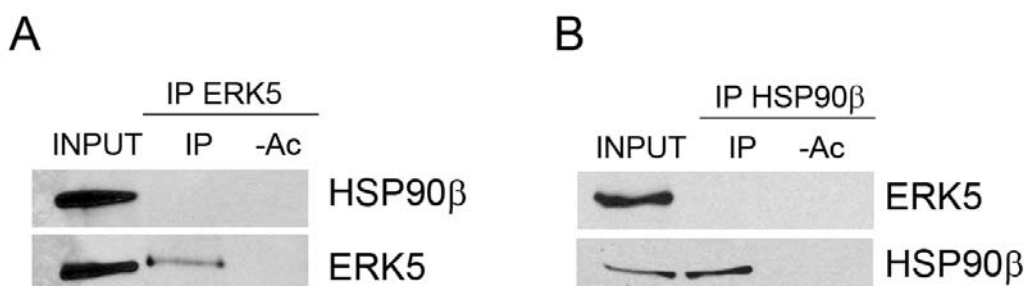


FIGURA 45. Hsp90 y ERK5 endógena no co-inmunoprecipitan en células SH-SY5Y.

Inmunoprecipitación con anticuerpo anti ERK5 (**A**) o anti Hsp90β (**B**) de 5 mg de extracto de células SH-SY5Y. Se muestra el inmunoblot con los anticuerpos anti ERK5 y anti HSP90β. Resultados representativos de 3 experimentos independientes.

A causa de que no fue posible establecer la interacción entre ambas proteínas endógenas se optó por estudiar la interacción entre una Hsp90β endógena y ERK5 recombinante. Se sobre-expresó GST-ERK5 o GST-ERK5 y su activador constitutivamente activo MEK5DD en células HEK293 y SH-SY5Y y se inmunoprecipitó Hsp90β. Tanto ERK5 inactiva como activa co-inmunoprecipitan en este ensayo como muestra en inmunoblot de la figura 46 para las dos líneas celulares distintas (HEK293 y SH-SY5Y). Este tipo de aproximación para determinar la interacción entre una proteína endógena y otra recombinante ha sido frecuentemente utilizado en la literatura, es el caso de la inmunoprecipitación del dominio catalítico de LKB1 recombinante para validar su interacción con Hsp90-cdc37 endógenas (Boudeau et al., 2003).

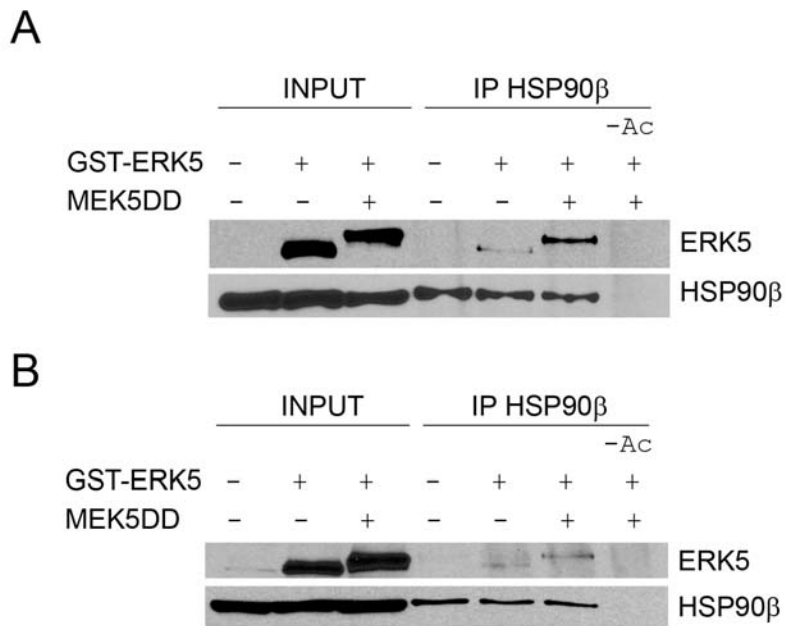


FIGURA 46. ERK5 recombinante co-inmunoprecipita con Hsp90. Células HEK293T (A) o SH-SY5Y (B) fueron transfectadas con ERK5 y MEK5DD. 24 horas después de la transfección las células fueron lisadas y 150 μ g de proteína fueron inmunoprecipitados con anticuerpo anti Hsp90 β siguiendo el método descrito en Material y Métodos. Los inmunoprecipitados fueron resueltos en geles SDS-PAGE y la proteína visualizada mediante el uso de anticuerpos. -Ac indica el control sin anticuerpo. Resultados representativos de tres experimentos independientes.

Efecto del uso de inhibidores de Hsp90 sobre los niveles de expresión de ERK5

Diversos productos de origen natural, que incluyen el radicol y antibióticos como la geldanamicina y la herbimicina-A, se unen fuertemente al bolsillo ATP/ADP de Hsp90, lo que previene que la proteína cliente pueda ser plegada. Como resultado, el tratamiento con estos fármacos desencadena una degradación dependiente de proteosoma de las proteínas que requieren Hsp90 para su maduración conformacional. Así estas sustancias han sido utilizadas para probar la función de Hsp90 (Basso et al., 2002; Nomura et al., 2005).

Para estudiar la posible relación entre ERK5 y Hsp90 en células de mamífero se utilizaron inhibidores de Hsp90, como la benzoquinona Geldanamicina o el radicol, que unen Hsp90 alterando su función. Estos ensayos se realizaron en dos tipos celulares, SH-SY5Y y HeLa, para comprobar que el resultado no fuera exclusivo de un tipo celular. En ambos tipos celulares se apreció una disminución en los niveles de ERK5 tras el tratamiento con los dos inhibidores de Hsp90 (figura 42). En células SH-

SY5Y (panel izquierdo) la disminución en los niveles de ERK5 empezaba tras 8 horas de tratamiento con geldanamicina o radicicol 10 μM . En el caso de células HeLa, el tratamiento con geldanamicina no produjo disminución en los niveles de ERK5 hasta las 12 horas de tratamiento. Sin embargo, los efectos del radicicol eran apreciables 3 horas después de iniciar el tratamiento. No se apreciaron diferencias en los niveles de ERK1/2, utilizados como control.

La disminución en los niveles de ERK5 en respuesta al tratamiento de las células con los inhibidores de Hsp90 es similar a lo observado con otras proteínas clientes de Hsp90, como la proteína supresora de tumores LKB1 (Boudeau et al., 2003).

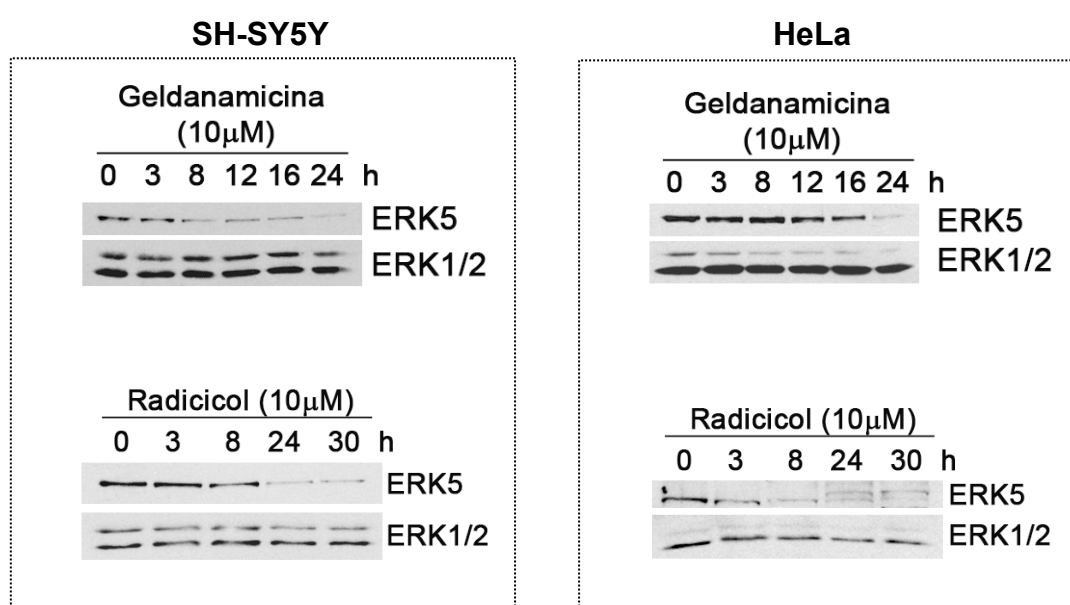


FIGURA 42. Inhibidores de Hsp90 provocan una disminución en los niveles de la proteína ERK5. Células SH-SY5Y (izquierda) o HeLa (derecha) fueron tratadas con geldanamicina o radicicol 10 μM a los tiempos indicados, y los niveles de ERK5 y ERK1/2 visualizados mediante inmunoblot. Resultados representativos de 3 experimentos independientes.

Efecto del inhibidor de proteosoma MG-132 en la disminución de ERK5 inducida por geldanamicina y radicicol

La degradación que se observaba en ERK5 tras el tratamiento con los inhibidores de Hsp90 podía ser producida por diversas proteasas. Sin embargo, la mayoría de proteínas cuya estabilidad es regulada por Hsp90 son degradadas por el proteosoma (Boudeau et al., 2003).

Así, analizamos el efecto del tratamiento con el inhibidor del proteosoma (MG-132) en células SH-SY5Y, para comprobar si prevenía la degradación de ERK5 endógena inducida por geldanamicina y radicicol. Tras 24 horas de tratamiento con el inhibidor de proteosoma las células fueron lisadas en tampón de lisis que contenía el detergente Tritón X-100, centrifugadas 10 minutos a 18.000 g y el pellet resuspendido en tampón con 50 mM de TRIS pH 7,5 y 2% de SDS para recuperar la fracción insoluble en tritón que podía contener proteínas precipitadas debido a un mal plegamiento (como ERK5 en ausencia de Hsp90). La figura 43 muestra que, como se había observado anteriormente, el tratamiento con radicicol disminuye los niveles de ERK5 respecto al control. Además, se observa que el inhibidor del proteosoma MG-132 aumenta los niveles de ERK5 en la fracción insoluble en tritón (precipitado). Así, posiblemente ERK5 mal plegada esta siendo degradada por el proteosoma. Cabe destacar, que en células no tratadas con radicicol, una parte de ERK5 aparece en la fracción insoluble a tritón, esta proteína precipitada aumenta al tratar las células con MG-132.

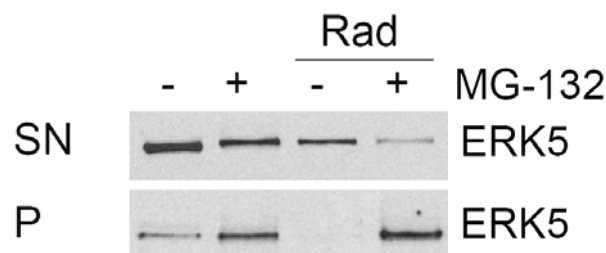


FIGURA 43. ERK5 aumenta en la fracción insoluble en tritón tras el tratamiento con inhibidores de HSP90. Células SH-SY5Y fueron pre-tratadas durante 3h con el inhibidor del proteosoma MG-132 (5 μ M), tratadas con Radicicol (10 μ M) durante 24 horas, lisadas en tampón de lisis con 1% tritón (SN: sobrenadante), centrifugadas 10 minutos a 18.000 g y el pellet obtenido (P) solubilizado en tampón 50 mM de TRIS pH 7,5; 2% SDS. Los extractos obtenidos fueron analizados mediante inmunoblot. Resultado representativo de 2 experimentos independientes.

Ubiquitinación de ERK5

Una de las señales de degradación proteosomal es la ubiquitinación de proteínas. Dado que se había observado que la inhibición del proteosoma provocaba un aumento de la proteína en los precipitados de lisados celulares tratados con radicicol, se diseñaron una serie de experimentos con el fin de comprobar si ERK5 sufría ubiquitinación. Así, se pre-trataron células SH-SY5Y durante 3 horas con MG-132, se trataron 24 horas con radicicol y se lisaron directamente en tampón 50 mM TRIS pH 7,5 y 2% SDS. Se inmunoprecipitó ERK5 de 200 µg de cada muestra y se detectó ubiquitina mediante inmunoblot de las muestras inmunoprecipitadas. En la figura 44.A se aprecia un aumento de la señal de ubiquitina en las muestras tratadas con el inhibidor del proteosoma MG-132. Los controles no inmunoprecipitados muestran que el radicicol provoca la disminución de los niveles de ERK5, es decir, que el ensayo ha funcionado. El tratamiento con MG-132 produce, aunque tenuemente, un *laddering* al realizar el inmunoblot con anticuerpo anti-ubiquitina. El *laddering* es más intenso en el carril correspondiente a las células tratadas con radicicol y MG-132. Este patrón es típicamente observado en proteínas ubiquitinadas (Basso et al., 2002).

A continuación, se llevó a cabo el estudio de la ubiquitinación de ERK5 recombinante, después de sobre-expresar ERK5-FLAG en células HEK293T. La figura 44.B muestra los resultados preliminares de este ensayo, donde se observa un gran aumento del *laddering* tras tratar las células con MG-132.

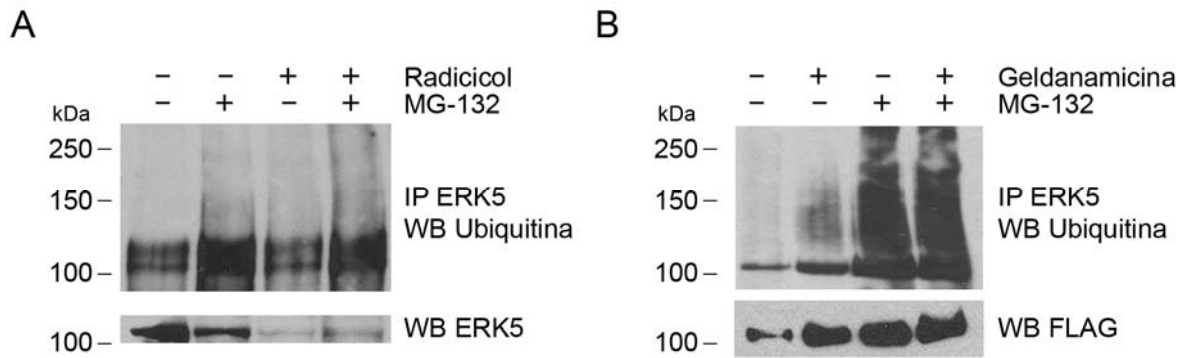


FIGURA 44. Ensayo de ubiquitinación de ERK5. **A.** Células SH-SY5Y fueron pre-tratadas durante 3h con MG-132 5 μ M y tratadas durante 24 horas con radicol 10 μ M. Las células fueron lisadas en tampón 50 mM de TRIS pH 7,5; 2% SDS. 200 μ g de proteína fueron inmunoprecipitados con anticuerpo anti-ERK5 y analizados mediante inmunoblot con un anticuerpo que reconoce ubiquitina. El panel inferior muestra los niveles de ERK5 de los extractos. Resultados preliminares. **B.** Células HEK-293 fueron transfectadas con el vector de expresión pCMV4-ERK5-FLAG. 24 horas después fueron pre-tratadas 3 horas con MG132 30 μ M y tratadas durante 15 horas con geldanamicina 5 μ M. Las células fueron lavadas con PBS conteniendo NEM 20 mM y lisadas en tampón 50 mM de TRIS pH 7,5 50 mM pH 7.5; 1% SDS. 500 μ g de proteína fueron inmunoprecipitados con 10 μ l de resina FLAG-M2-agarose (Sigma) y analizados mediante inmunoblot con anticuerpo anti-ubiquitina. El panel inferior muestra los niveles de ERK5-FLAG de los inmunoprecipitados.

1.3.2. PKM2

Estudio de la secuencia y estructura de PKM2

La piruvato kinasa es una enzima que cataliza el último paso de la glucólisis, la desfosforilación de fosfoenolpiruvato (PEP) a piruvato, y es responsable de la producción neta de ATP de la glucólisis. Existen cuatro isoenzimas de piruvato kinasa en humanos. Las isoformas R y L son codificadas por el gen L y están bajo el control de promotores específicos de tejido. La isoforma R se expresa en eritrocitos y la L en hígado. Por su parte, isoformas M1 y M2 son codificadas por el gen M y resultan del *splicing* alternativo de los exones 9 y 10 del gen. Esto genera las diferencias en las isoformas M1 y M2. La isoforma M1 se expresa en músculo esquelético y tejido cerebral. La isoforma M2 se expresa en tejido fetal y en células tumorales. En el caso de la PKM2 fetal es reemplazada progresivamente en alguna de las otras tres isoformas. En células tumorales ocurre lo contrario, la expresión de isoformas adultas vuelven a la forma embrionaria M2, de manera que esta isoforma ha sido designada como piruvato kinasa específica de tumores (Christofk et al., 2008; Dombrauckas et al., 2005).

En este trabajo, la proteína piruvato kinasa M2 fue detectada con una puntuación elevada (157 en la purificación 1 y 347 en la purificación 2) en las dos purificaciones TAP realizadas. Además, el análisis mediante espectrometría de masas de la correspondiente banda obtenida en la segunda purificación TAP resultó en la identificación de péptidos que cubrían el 40% de la secuencia de esta proteína.

En un principio se decidió realizar un estudio *in silico* preliminar para valorar la posible interacción de PKM2 con ERK5. La figura 47.A muestra el resultado del análisis de la secuencia de PKM2 humana mediante la opción Motif Scan del algoritmo Scansite (<http://scansite.mit.edu/index.html>). Este programa predice la existencia de un D-domain en torno a la secuencia de la Isoleucina 142 (KKGATLK_ITLDNAYM). Cuando en paralelo se analizan todas las proteínas humanas, este algoritmo da una las puntuaciones más altas a la putativa secuencia D-domain de PKM2. Esta secuencia es idéntica en M1 y M2, está totalmente conservada en PKM2 de diferentes especies de mamíferos (humana, rata, ratón), pero no se encuentra en las isoformas R y L (figura 47.B).

Basophilic serine/threonine kinase group (Baso_ST_kin)				
PKC delta			Gene Card PRKCD	
Site	Score	Percentile	Sequence	SA
S420	0.3827	0.105 %	AVGAVEASFKCCSGA	0.499

Kinase binding site group (Kin_bind)				
Erk D-domain			Gene Card MAPK1	
Site	Score	Percentile	Sequence	SA
I142	0.3974	0.004 %	KKGATLKITLDNAYM	0.527

PKM2	113	DTKGPEIIRTGLIKGSGTAEVEI	KKGATLKITLDN	AYMEKCDENILWLDYKNICKVVEVGS
PKM1	113	DTKGPEIIRTGLIKGSGTAEVEI	KKGATLKITLDN	AYMEKCDENILWLDYKNICKVVEVGS
PKLI	181	DTKGPEIIRTGIIQGGPESEVEI	VKGSQVLVTVDP	AFRTRGNANTVWVDYPNIVRVVPVGG
PKRE	156	DTKGPEIIRTGIIQGGPESEVEI	VKGSQVLVTVDP	AFRTRGNANTVWVDYPNIVRVVPVGG

FIGURA 47. Análisis de secuencias de la piruvato kinasa. A, análisis de los dominios de la PKM2 humana mediante el algoritmo Scansite. *Score* representa el valor asignado a la secuencia: un valor de 0 se da cuando la secuencia es idéntica a la secuencia canónica de un dominio determinado, y se incrementa a medida que difiere de ésta. *Percentile* indica cómo de bueno es el *score* obtenido para un dominio dado: se considera “bueno” cuando es inferior a 0.1% y excelente cuando es inferior a 0.01%. **B,** alineamiento de las secuencias de las Piruvato Kinasas humanas. Enmarcado en rojo se muestra el putativo *D-domain* de unión a MAP kinasas. PKM2, isoforma fetal y tumoral; PKM1, isoforma de músculo esquelético y cerebro; PKLI, isoforma de hígado; PKRE, isoforma de eritrocito. Los aminoácidos idénticos se muestran enmarcados en negro; los conservados, en gris.

Dado que PKM2 celular se encuentra en dos formas (dimérica o tetramérica), a continuación se valoró la accesibilidad del putativo *D-domain*. Para ello se utilizaron los datos de la estructura resuelta de PKM2 humana y el programa de modelaje tridimensional de proteínas Cn3D. La figura 48 muestra la estructura de PKM2 tetramérica, donde se observa que la secuencia de este *D-domain* se encuentra en la zona exterior de cada monómero, muy accesible para interactuar con otras proteínas. De lo arriba expuesto se concluyó que PKM2 podría ser un buen candidato para interactuar con ERK5.

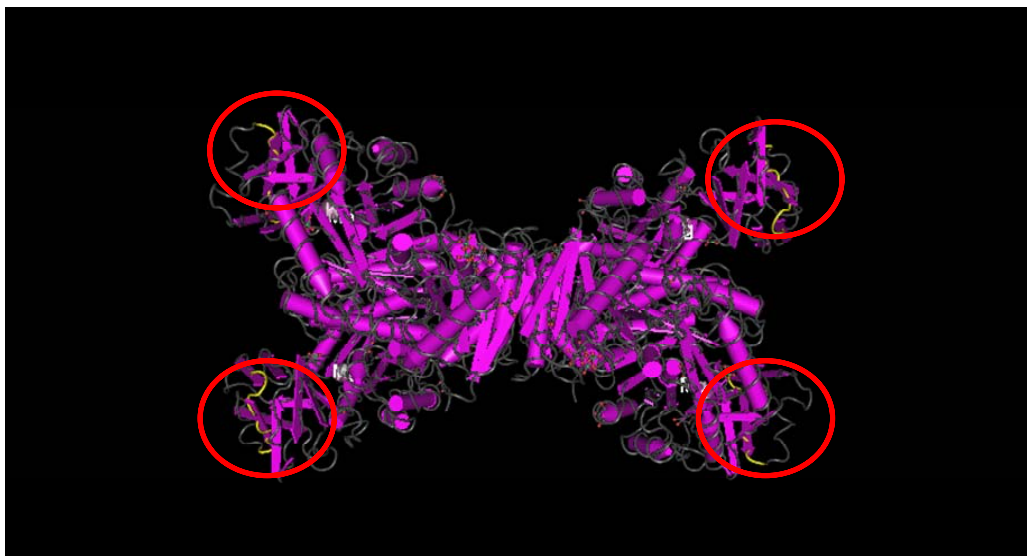


FIGURA 48. Localización del *D-domain* en la estructura tetramérica de la PKM2 humana. Representación obtenida mediante el programa Cn3D. Número de acceso de PKM2 humana en la base de datos PDB: 1T5A. El círculo rojo enmarca el *D-domain*.

Estudio del patrón de elución de PKM2 en cromatografía en gel filtración

Como primera aproximación a la posible interacción de PKM2 con ERK5 se realizó una cromatografía en gel filtración, con el fin de evaluar la formación de complejos de alto peso molecular de PKM2 (como ocurría para el caso de ERK5).

En primer lugar se realizó un estudio sobre la localización subcelular de PKM2 en células SH-SY5Y. La figura 49, muestra una localización exclusivamente citosólica de PKM2, tanto en condiciones basales como en células en las que se activó ERK5 mediante la sobre-expresión de MEK5-DD (constitutivamente activa).

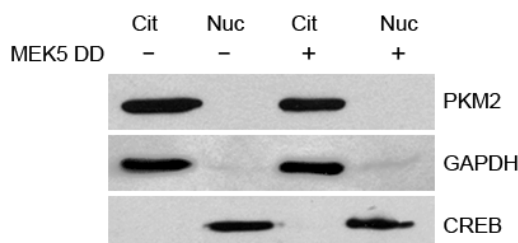


FIGURA 49. Localización subcelular de PKM2 en células SH-SY5Y. Células SH-SY5Y (control o transfectadas con MEK5-DD) fueron fraccionadas. 30 μ g de cada fracción fueron resueltos mediante SDS-PAGE y las proteínas visualizadas mediante inmunoblot. Se utilizó GAPDH como marcador citoplasmático y CREB como marcador nuclear. Resultado representativo de 3 experimentos independientes.

A continuación extractos citosólicos de células SH-SY5Y, control o de que sobreexpresaban MEK5-DD, fueron cromatografiados en resina de gel filtración. La figura 50 muestra dichos fraccionamientos, donde se observa 2 poblaciones de PKM2: una de peso molecular >700 kDa (frac. n° 5-6) que podría corresponder a PKM2 acomplejada a otras proteínas; otra con un peso molecular de 60 kDa (frac. n° 22-24) que podría corresponder al monómero de PKM2 y una tercera de unos 120 kDa (frac. n°19-20) que podría tratarse del dímero de la proteína. Este mismo ensayo fue repetido con otro tipo celular, células HeLa obteniéndose resultados similares (figura 50, panel inferior).

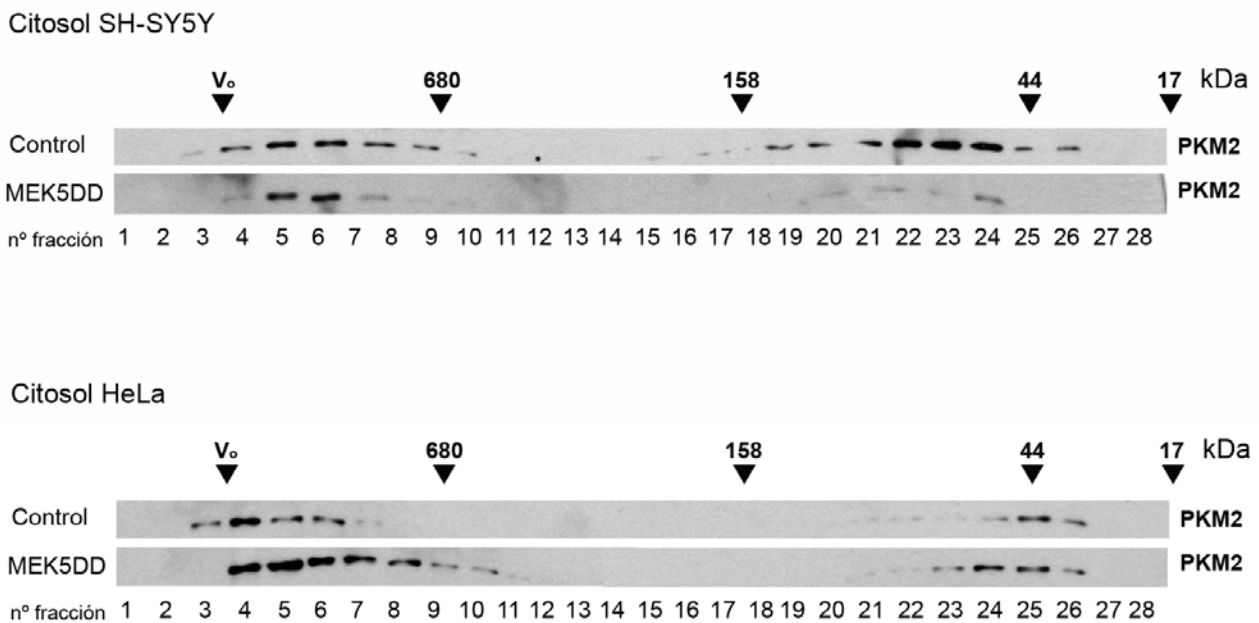


FIGURA 50. PKM2 existe como complejo de alto peso molecular. 250 μ g de citosoles procedentes de células SH-SY5Y (arriba) o HeLa (abajo), control o transfectadas con la kinasa activadora MEK5-DD (constitutivamente activa), fueron cromatografiados en columna de Gel Filtración Superdex 200HR-FPLC. PKM2 fue detectada de las fracciones recogidas mediante inmunoblot. En la parte superior de cada panel se muestra la elución de los estándares de proteínas globulares tiroglobulina (680 kDa), g-globulina bovina (158kDa), ovoalbúmina de pollo (44 kDa) y mioglobina de caballo (17 kDa)

Estudio de la interacción entre PKM2 y ERK5

El estudio de la interacción entre PKM2 y ERK5 fue iniciado mediante ensayos de co-inmunoprecipitación de ambas proteínas endógenas de células SH-SY5Y. Se inmunoprecipitó ERK5 de 5 mg de extracto celular y el resultado fue analizado mediante inmunoblot con anticuerpo anti-PKM2 (Figura 51, panel izquierdo). No se detectó co-inmunoprecipitación de ambas proteínas. En paralelo se realizó el experimento inverso, inmunoprecipitando de PKM2 y detección de ERK5 mediante inmunoblot (Figura 51, panel derecho). En este caso lo que se aprecia es que aparece la misma señal en el inmunoprecipitado de PKM2 que en control sin muestra, por lo que se concluyó que el anticuerpo anti-PKM2 utilizado no permite la inmunoprecipitación de la proteína.

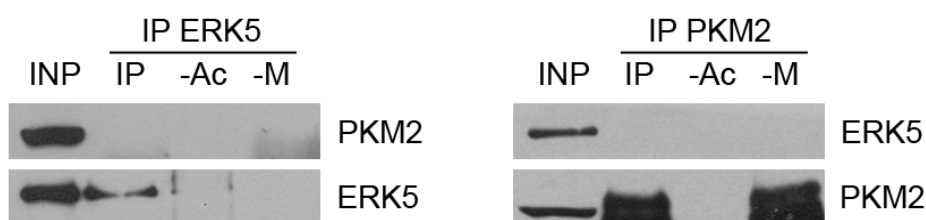


FIGURA 51. ERK5 y PKM2 endógenas no co-inmunoprecipitan. 5mg de extracto proveniente de células SH-SY5Y fueron inmunoprecipitados utilizando 2 μ g de anticuerpo anti-ERK5 (izquierda) o anti-PKM2 (derecha). A continuación se detectó ERK5 y PKM2 mediante inmunoblot. En los dos casos se incluyeron un control sin anticuerpo (-Ac) y un control sin muestra (-M).

A continuación se estudió la posible interacción entre las proteínas ERK5 y PKM2 recombinantes. Para ello se co-transfectó GST-ERK5 y Flag-PKM2 en células HEK293. Se utilizó esta línea celular por su elevada eficiencia de transfección. Se realizaron los correspondientes controles negativos con los vectores vacíos de los tags. En la figura 52 se aprecia que el *pull-down* de GST-ERK5 de 300 μ g extracto celular e inmunoblot con anticuerpo anti-FLAG (PKM2) no muestra señal en el último carril donde se co-transfectaron ambas proteínas. Esta figura muestra también la inmunoprecipitación de Flag-PKM2 de 300 μ g de extracto de celular. En este caso sí que se detecta GST-ERK5 en el carril en que se co-transfectaron ambas proteínas

pero también aparece señal en el control sin PKM2, lo que indica que la señal es inespecífica. Se obtuvieron resultados análogos (negativos) cuando se utilizaron extractos celulares lisados en tampones que contenían diferentes detergentes. Tampoco se observó co-inmunoprecipitación cuando se sobre-expresó en células PKM2 y el dominio kinasa de ERK5.

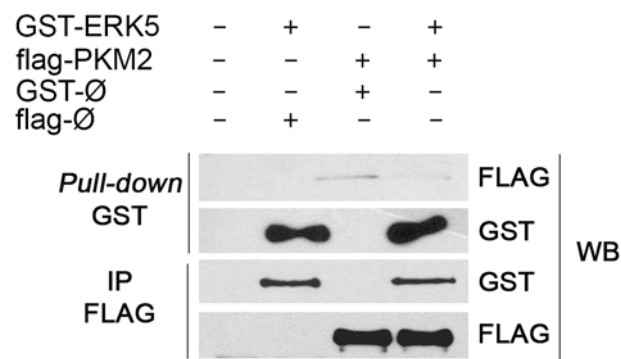


FIGURA 52. ERK5 y PKM2 recombinantes no co-immunoprecipitan. Células HEK293T fueron transfectadas con plásmidos que codifican para GST-ERK5, FLAG-PKM2 o los correspondientes vectores vacíos (∅). 300 µg de extracto celular fueron incubados con Glutathione-Sepharose y visualizados mediante inmunoblot utilizando anticuerpo anti-FLAG o anti-GST. Análogamente, 300 µg de extracto fueron inmunoprecipitados con resina anti-FLAG-agarosa y visualizados por inmunoblot utilizando anticuerpo anti-FLAG o anti-GST. Resultados representativos de 3 experimentos independientes.

De los arriba expuesto se concluyó que ERK5 y PKM2 (endógenas y recombinantes) no parecen interactuar en las condiciones estudiadas. Estos resultados, sin embargo, no explican la interacción observada mediante la purificación TAP. Por ello, y en paralelo se iniciaron una serie de estudios con el fin de estudiar el posible efecto de ERK5 sobre la actividad enzimática de la PKM2.

Puesta a punto del ensayo de actividad para PKM2

Como se ha comentado con anterioridad, la piruvato kinasa cataliza la reacción que transforma fosfoenolpiruvato (PEP) en piruvato. Se trata de un enzima alostérico regulado positivamente por fructosa 1,6-bisfosfato (FBP).

El ensayo de actividad piruvato kinasa se basa en acoplar a la reacción de la piruvato kinasa la reacción de la lactato deshidrogenasa (LDH), que en presencia del cofactor NADH permite la reducción del piruvato a lactato (figura 53). La reducción del NADH a NAD⁺ puede ser monitorizada espectrofotométricamente a 340 nm.



FIGURA 53. Reacción acoplada de piruvato kinasa y lactato deshidrogenasa

El método fue optimizado para la medición de PKM2 de extractos celulares, lisados en tampón de lisis que contenía el detergente NP-40 al 0.5%. La figura 54.A muestra que el ensayo es lineal entre 0 y 8 µg de proteína de lisados de células HeLa. También se muestran los valores de actividad PKM2 obtenidos frente a baja (0.2 mM) o alta (2 mM) concentración del sustrato, análogos a los descritos por otros autores en otros tipos celulares (figura 54.B). Por último, la figura 54.C muestra que la reacción responde al activador alostérico fructosa-1,6-bisfosfato (FBP): la actividad PKM2 aumenta 5 veces al adicionar FBP a la mezcla de reacción.

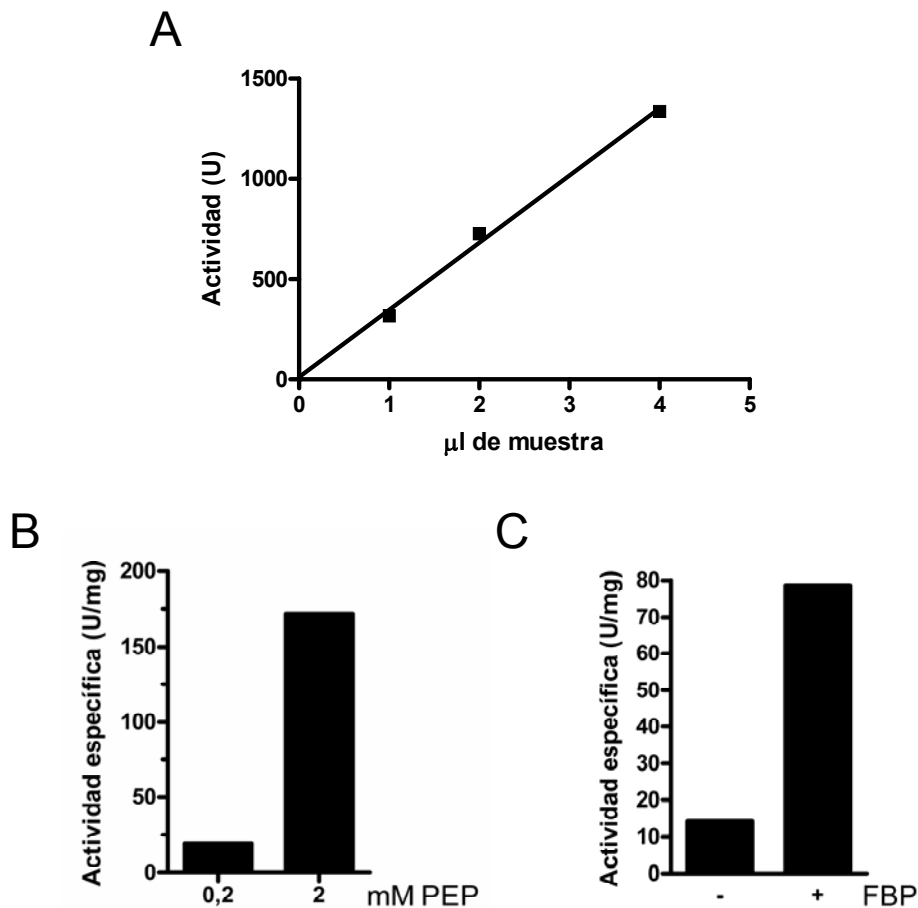


FIGURA 54. Ensayo de actividad PKM2 de lisados de células HeLa. A. Linealidad de la actividad PKM2 en función de la concentración de proteína. **B.** Actividad específica de PKM2 frente a baja (0.2 mM) y alta (2mM) concentración del sustrato PEP. **C.** Actividad específica de PKM2 en presencia y ausencia de FBP. U = μ moles producto formado/ min.

Actividad Piruvato Kinasa M2 de células HeLa en respuesta a EGF y Sorbitol

A continuación, se trataron células HeLa con estímulos que activan óptimamente a ERK5 (EGF 20 ng/ml 15 minutos y Sorbitol 0,5 M 30 minutos), y los lisados analizados para actividad PKM2. La figura 55 muestra que el tratamiento de las células con EGF o sorbitol resulta en un aumento del 100% de la actividad específica de la PKM2 celular.

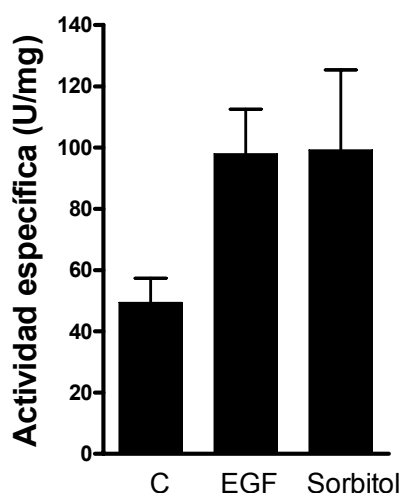


FIGURA 55. Actividad PKM2 de células HeLa en respuesta a EGF y Sorbitol. Células HeLa fueron tratadas con EGF 20 ng/ml (15 min) o Sorbitol 0,5 M (30min), y la actividad PKM2 determinada. (N=6). U= μ mol producto formado / minuto

Ensayos de fosforilación de PKM2

Puesto que la actividad PKM2 de células HeLa aumentaba en respuesta a EGF y sorbitol, a continuación nos planteamos la posibilidad de que ERK5, o alguna otra MAP kinasa, fosforilara y activara a PKM2. En primer lugar se consultaron las diferentes bases de datos que contienen los residuos fosforilados identificados en proteínas. Tanto la base de datos Phospho.ELM (<http://phospho.elm.eu.org/>), como la base de datos Phosida (<http://www.phosida.de/>) identifican 4 residuos fosforilados *in vivo* en PKM2 mediante espectrometría de masas: S37, Y83, Y105, Y 390 (figura 56).

Substrate	Short Description	UniPROT/Ensembl Id	Species	Interaction Network	Position	Sequence	Kinase	PubMed	Source
Pyruvate kinase isozyme M2	Pyruvate kinase family	P14618	Homo sapiens	NetworkKIN	S37	LEHMCRLDIDSPITARNGTI	-	17081983 16964243	HTP
					Y83	RLNFSGTHEYHAETIKNVRT	-	15592455	HTP
					Y105	TESFASDPILYRPVAVALDTK	-	15592455 16497976	HTP
					Y390	LIAREAEAAYHQLFEELRR	-	15592455	HTP

FIGURA 56. Residuos fosforilados de PKM2 en la base de datos Phospho.Elm.

Por otra parte, recientemente ha visto la luz una base de datos que contiene más de 18,000 fosfopéptidos obtenidos mediante espectrometría de masas, después de estimular células HeLa con EGF a diferentes tiempos (Olsen et al., 2006). El análisis detallado de esta base de datos nos llevó a identificar la serina 37 de PKM2 como un residuo fosforilado *in vivo* en respuesta a EGF. Dada la presencia de un putativo *D-domain* de unión a MAP kinasas en la secuencia de PKM2, y dado que las MAP kinasas ERK1/2 y ERK5 se activan en respuesta a EGF, a continuación se estudió la fosforilación *in vitro* de PKM2 por estas kinasas.

ERK1 y 2 activas fueron purificadas mediante la cromatografía de extractos de células HeLa tratadas 15 min con 20g/ml EGF en columna de intercambio iónico Mono-Q (ver Material y Métodos). ERK5 activa pura fue obtenida de extractos de células HEK293T que co-expresaban GST-ERK5 y su activador constitutivamente activo MEK5DD (ver Material y Métodos). La figura 57 muestra los resultados preliminares de fosforilación de PKM2 pura con ERK1, ERK2 o ERK5 activas, y en presencia de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$. No aparece señal alguna que pueda corresponder a la fosforilación de PKM2. La débil banda de 60 kDa aparece en la muestra que contiene ERK5 es apreciable tanto en presencia como ausencia de PKM2, por lo que debe tratarse de un contaminante de la preparación de ERK5.

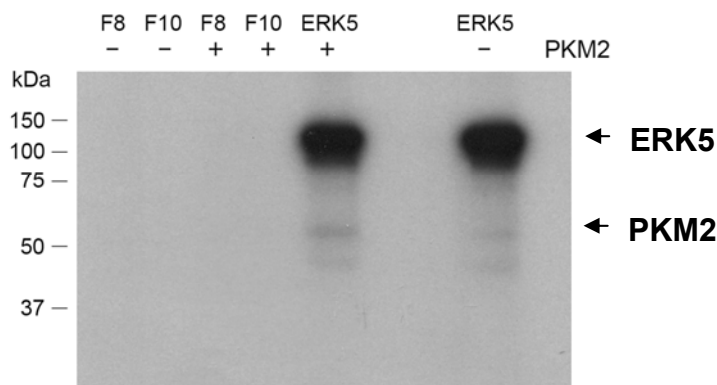


FIGURA 57. Ensayo de fosforilación de PKM2. 1 μg de PKM2-FLAG pura fue incubado durante 30 min con 1 μg de ERK5 activa o 10 mU de una preparación pura de ERK1/2, en presencia de 100 μM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ y 10 mM Mg^{2+} . Las proteínas fueron resueltas en electroforesis en SDS-PAGE, el gel teñido y autorradiografiado.

Efecto de mutaciones de la Ser37 en la actividad de PKM2

Los resultados negativos obtenidos en la fosforilación de PKM2 por ERK1, ERK2 y ERK5 podrían deberse a que en el proceso de purificación de PKM2 se obtuviera un forma no fosforilable, dado que desconocemos si es la forma dimérica, la tetramérica o ambas, la que resulta fosforilable *in vivo*. Por ello, a continuación se diseñaron experimentos con el fin de obtener la actividad de la PKM2 recombinante. La figura 58 muestra que no hay diferencias en la actividad de PKM2 de extractos de células HEK293T control con respecto a aquellas que sobre-expresan PKM2. Por otra parte, al ensayar en paralelo 1 μ l de lisado celular frente 1 μ l de preparación pura de PKM2, la PKM2 purificada presentaba unos valores de actividad específica 10 veces mayores que los obtenidos al analizar la proteína endógena de extractos celulares. Sin embargo, la concentración de PKM2 en la preparación pura era >1000 veces mayor que la del lisado celular. Estos resultados podrían deberse a una pérdida de la actividad PKM2 recombinante durante el proceso de lisis celular.

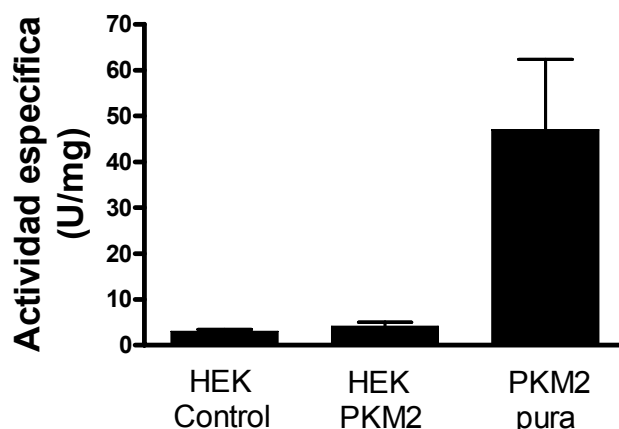


FIGURA 58. Actividad PKM2 de lisados celulares y de preparaciones puras. Actividad específica de PKM2 de lisados de células HEK control no transfectadas (HEK control), transfectadas con PKM2 (HEK-PKM2) o de PKM2 purificada (PKM2 pura). 1 U = μ mol producto formado / minuto.

Como se ha mencionado anteriormente, PKM2 en respuesta a EGF se fosforila en la Ser37. Esta Serina, así como los residuos adyacentes, se encuentran conservados en los homólogos de PKM2 de ratón, rata y humano, y no se encuentra en las isoformas R y L de piruvato kinasa (figura 59). Además, la secuencia de PKM2 presenta una prolina en posición +1 con respecto a Ser37, y está ampliamente aceptado que las

MAP kinasas requieren una prolina en posición +1 con respecto a las Ser o Thr fosforilada. Por ello, y con el fin de estudiar el rol de esta serina en la actividad piruvato kinasa de PKM2, se decidió estudiar el efecto de la mutación de este residuo. Mediante mutagénesis dirigida se obtuvieron los mutantes S37A (mutada a alanina, forma deficiente en fosforilación) y S37D (mutada a ácido aspártico, que mimetiza el efecto del fosfato y, por tanto, actúa como mutante constitutivamente fosforilado)



FIGURA 59. Alineamiento de las secuencias de las Piruvato Kinasas humanas. La flecha indica la serina 37 en PKM1 y PKM2. Los aminoácidos idénticos se muestran enmarcados en negro, los conservados en gris.

Los vectores que contenían las mutaciones o la proteína salvaje (Flag-PKM2-wt, Flag-PKM2-S37A y Flag-PKM2-S37D) fueron transfectados en células HEK293T, purificados en paralelo y utilizados en ensayos de actividad enzimática. Con el fin de llevar una caracterización cinética, estos ensayos fueron realizados utilizando dos concentraciones del sustrato PEP (0,2 mM, por debajo del valor de K_m ; y 2 mM, velocidad máxima) en presencia y ausencia del efector alostérico FBP.

La figura 60 muestra los resultados preliminares. En ella se aprecia, en primer lugar, que ninguna de las proteínas recombinantes puras responde a la presencia del activador alostérico FBP, independientemente de la concentración de sustrato. La mutación a Ala produce un aumento de la actividad enzimática PKM2 de 4 veces cuando se analizó frente a 0.2 mM de PEP, y de 9 veces cuando se ensayó frente a 2 mM PEP. La mutación a Glu resultó en una activación de 2 veces (PEP 0.2 mM) o 5 veces (PEP 2 mM). Se ha previsto llevar a cabo en el futuro próximo un estudio cinético completo, con el fin de caracterizar el efecto que provoca las diferentes mutaciones de la Ser37 en la actividad PKM2.

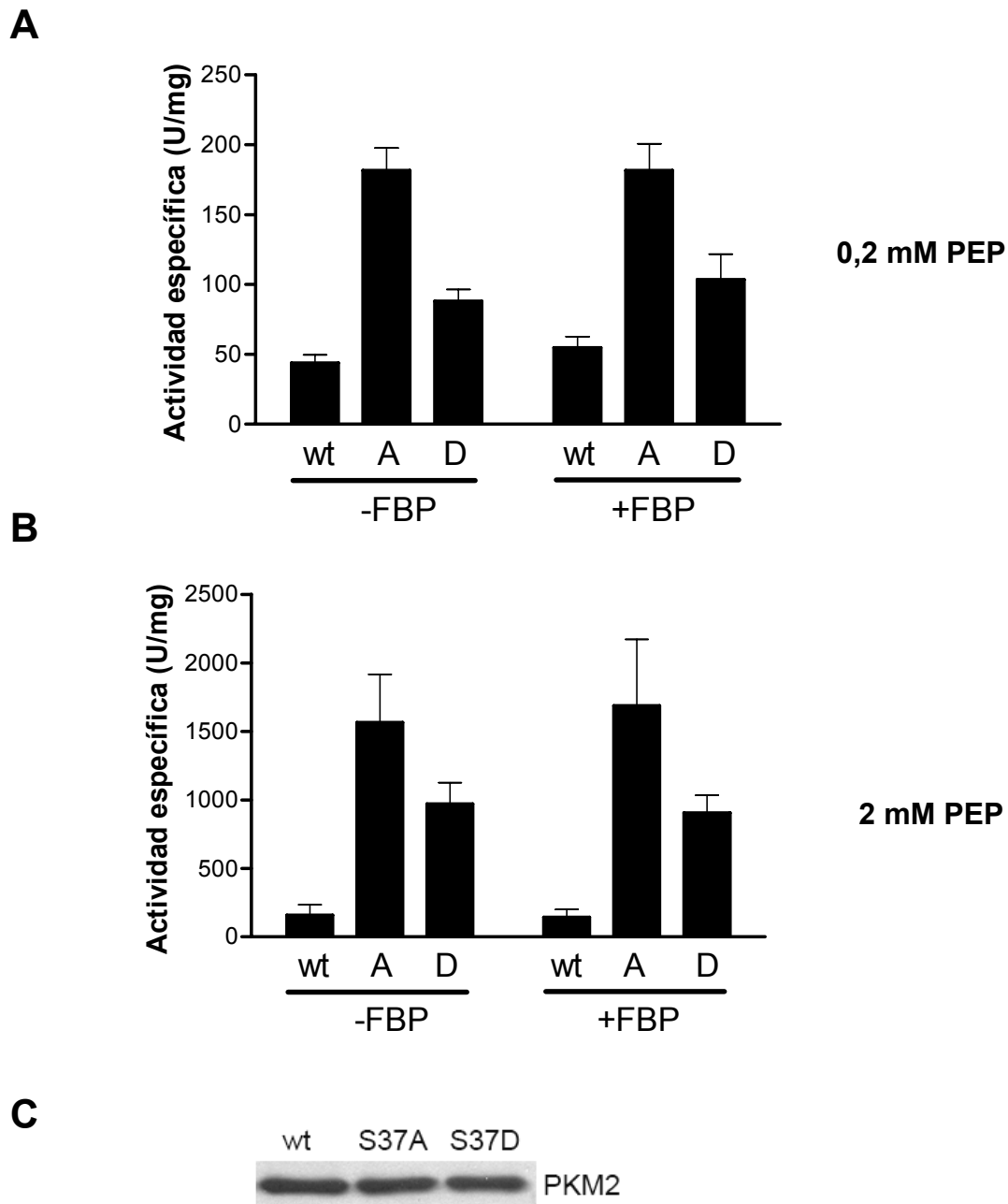


FIGURA 60. Actividad específica de las proteínas recombinantes PKM2. Vectores que contienen las mutaciones o la proteína salvaje (Flag-PKM2-wt, Flag-PKM2-S37A y Flag-PKM2-S37D) fueron transfectados en células HEK293T, purificados en paralelo, y la actividad PKM2 fue determinada utilizando 0.2 mM **(A)** o 2 mM **(B)** del sustrato PEP. **C.** 1 μ l de las proteínas recombinantes purificadas fueron resueltas en electroforesis en gel SDS-acrilamida y analizados mediante inmunoblot con anticuerpo anti-PKM2.

2. PAPEL DE ERK5 EN LA ISQUEMIA CEREBRAL

2.1. PAPEL DE ERK5 EN LA ISQUEMIA CEREBRAL

La OGD produce una disminución en los niveles de la proteína ERK5

▪ Ensayos en cultivos mixtos de neuronas corticales

Durante las primeras fases de este proyecto salieron a la luz dos trabajos que describían el papel neuroprotector de ERK5 en la isquemia cerebral (Wang et al., 2004; Wang et al., 2006). Debido a ello se decidió profundizar en el estudio de ERK5 en isquemia cerebral utilizando un modelo *in vitro* basado en la privación de oxígeno y glucosa de cultivos mixtos de neuronas corticales de rata (ver Material y Métodos).

En primer lugar se observó que al privar las células de oxígeno y glucosa se producía una disminución en los niveles de proteína ERK5, incluso a tan sólo una hora de reperusión. Esta disminución no se producía en los controles no isquémicos, ni en las proteínas utilizadas como control (tubulina y ERK1/2) (figura 61). Es la primera vez que se describe la disminución de una MAP quinasa en un modelo de isquemia.

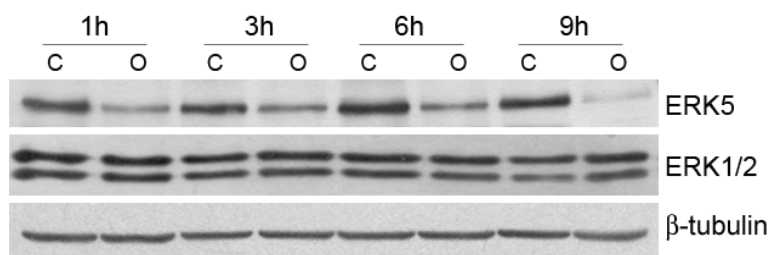


FIGURA 61. La OGD produce una disminución en los niveles de proteína ERK5 de cultivos de neuronas corticales mixtas. Los cultivos mixtos de neuronas corticales fueron expuestas (O) o no (C) a 75 minutos de OGD. A los tiempos indicados, las células fueron lisadas y se analizaron los niveles de las proteínas indicadas mediante inmunoblot. El panel muestra el inmunoblot con diferentes anticuerpos. Resultados representativos de 3 experimentos.

Diferentes autores han observado un aumento en la actividad de las MAP kinasas ER1/2, p38 y JNK en respuesta al daño isquémico. Por otra parte, Wang et al. describieron una activación de ERK5 en hipocampo de cerebro de rata tras la isquemia cerebral, con un máximo de fosforilación a los 30 minutos (Wang et al., 2005). Esto nos llevó a estudiar en nuestro modelo la fosforilación de ERK5 a tiempos cortos de reperusión (0, 15, 30, y 60 minutos). En la gráfica de la figura 62 se aprecia un aumento en los niveles de P-ERK5 a los tiempos estudiados, al relativizarlos

respecto a los niveles de proteína total (que disminuye en las muestras isquémicas según aumenta el tiempo). En el inmunoblot de las muestras control se observa fosforilación basal a 0 minutos de reperfusion, seguida de un aumento en los niveles de P-ERK5 a los 15 minutos, debido probablemente a la reposición del medio condicionado que contiene suero. Esta fosforilación vuelve al nivel basal a los 30 minutos. En el inmunoblot de las células sometidas a OGD no se aprecia fosforilación alguna de ERK5 a tiempo 0 post-OGD, pero a partir de 15 minutos se produce un aumento de la señal de P-ERK5 que conduce a una hiper-fosforilación a los 30 minutos de reperfusion, y se mantiene a los 60 minutos.

Así, ERK5 se activa rápidamente en respuesta a la OGD como se ha descrito para otras MAP kinasas. Como han descrito otros autores, ERK5 tiene un máximo de actividad a los 30 minutos de reperfusion.

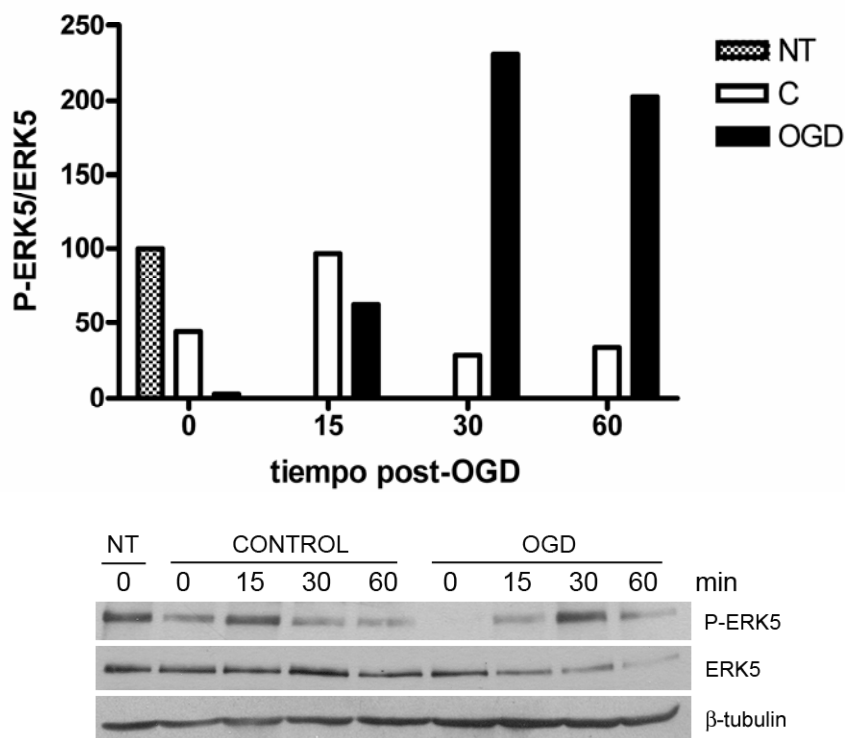


FIGURA 62. Fosforilación de ERK5 en respuesta a la OGD. Cultivos mixtos de neuronas corticales fueron sometidos (OGD) o no (CONTROL) a 75 minutos de OGD y reperfundidas mediante la reposición del medio condicionado. Las células fueron lisadas a diferentes tiempos post-OGD (0, 15, 30, 60 minutos) y los niveles de las proteínas ERK5, tubulina y P-ERK5 fueron detectados mediante inmunoblot (panel inferior). NT corresponde a las células No Tratadas en las que, a diferencia de las células control, no se realizó ningún cambio de medio. El panel superior muestra los niveles relativos de P-ERK5 respecto a ERK5 total. Resultados representativos de tres experimentos independientes.

▪ Ensayos en células PC12

Con el fin de estudiar si la disminución en los niveles de ERK5 era específica de tipo celular se llevó a cabo una OGD en células PC12, una línea celular procedente de feocromocitoma de glándula adrenal de rata. En este tipo celular la privación de oxígeno y glucosa se realizó durante 3 horas, ya que son más resistentes al daño producido por estas condiciones. Las células fueron reperfundidas durante 3h lisadas y analizadas mediante Western Blot. En la figura 63 se observa una disminución en los niveles de ERK5 similar a la descrita en neuronas corticales, de lo que se concluye que esta disminución no es exclusiva de un tipo celular.

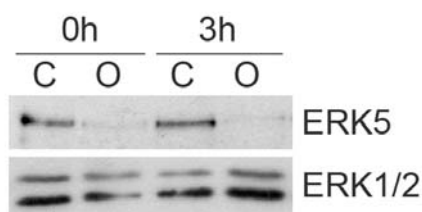


FIGURA 63. La OGD produce una disminución en los niveles de proteína ERK5 en células PC12. Las células fueron sometidas (O) o no (C) a 3 horas de OGD, reperfundidas con medio completo durante 0 o 3 horas y lisadas. El panel muestra los niveles de ERK5 y ERK1/2 analizados mediante inmunoblot.

La disminución de ERK5 es proporcional a la mortalidad celular tras la OGD

Una vez observada la disminución de los niveles de ERK5 tras 75 minutos de OGD, se realizaron privaciones de oxígeno y glucosa de 25, 50 y 75 minutos con el fin de estudiar el efecto de OGDs menos severas en la disminución de la MAP kinasa ERK5. La figura 64 muestra que la viabilidad celular es inversamente proporcional al tiempo de OGD: al aumentar el tiempo de la OGD aumenta la mortalidad celular.

En el correspondiente inmunoblot de la figura 66 se muestran los niveles de ERK5 tras la OGD a dos tiempos de reperusión (1 y 9 horas). Así, se aprecia que la disminución de ERK5 es proporcional al tiempo de OGD y a la mortalidad celular. Es decir, cuanto mayor es el tiempo de privación de oxígeno y glucosa, mayor mortalidad celular y mayor disminución en los niveles de ERK5. La disminución de ERK5 es ligeramente mayor tras nueve horas de reperusión a los tres tiempos de OGD estudiados.

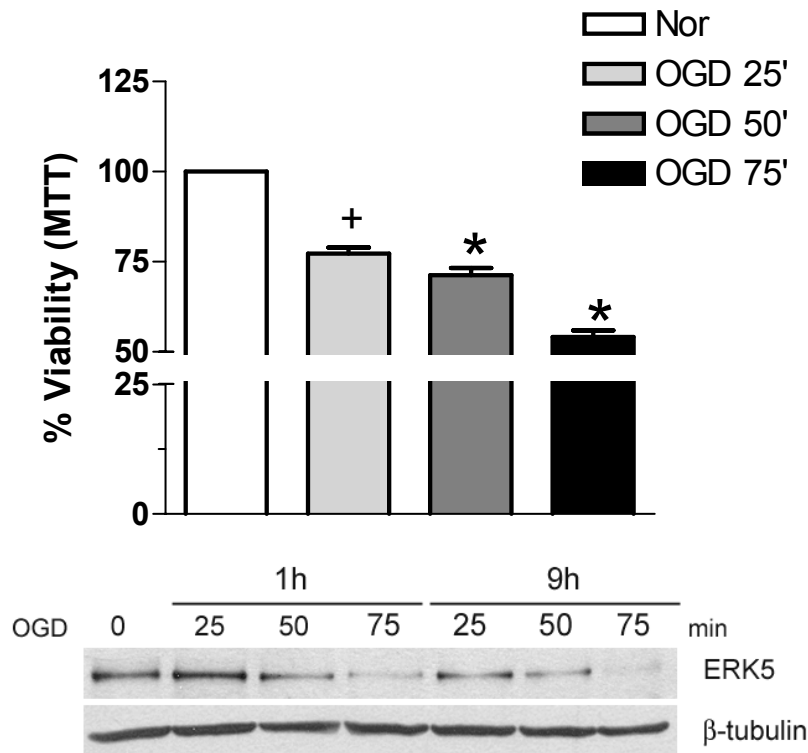


FIGURA 64. La disminución de los niveles de proteína ERK5 es proporcional a la muerte ocasionada por la OGD. Los cultivos mixtos de neuronas corticales fueron sometidos a diferentes tiempos de OGD (0, 25, 50 y 75 minutos). Las células fueron lisadas a los tiempos indicados de reperfusion (1h o 9h), y los niveles de proteína ERK5 y tubulina fueron analizados mediante inmunoblot. El gráfico muestra la viabilidad de las células 24 horas post-OGD (calculada por la reducción de MTT). Los resultados se muestran como la media \pm SEM de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. Las diferencias significativas respecto al control se marcan con + ($P < 0.01$) o * ($P < 0.001$).

La disminución de ERK5 requiere la privación de oxígeno y glucosa simultánea

Dado que el modelo de OGD consiste en la privación de oxígeno y glucosa simultáneas, a continuación se estudió los niveles de ERK5 frente a la privación exclusiva de glucosa o de oxígeno durante 75 minutos.

No se apreciaron diferencias significativas en la viabilidad de los cultivos mixtos de neuronas corticales 24 horas después de la reperfusion de oxígeno o la reposición de glucosa (ver gráfica de la figura 65). En el inmunoblot de la figura 65 no se aprecia disminución de los niveles de ERK5 a ninguno de los tiempos de reperfusion estudiados. Así parece necesaria la privación simultánea de oxígeno y glucosa para

reducir la viabilidad celular y producir una disminución en los niveles de proteína ERK5.

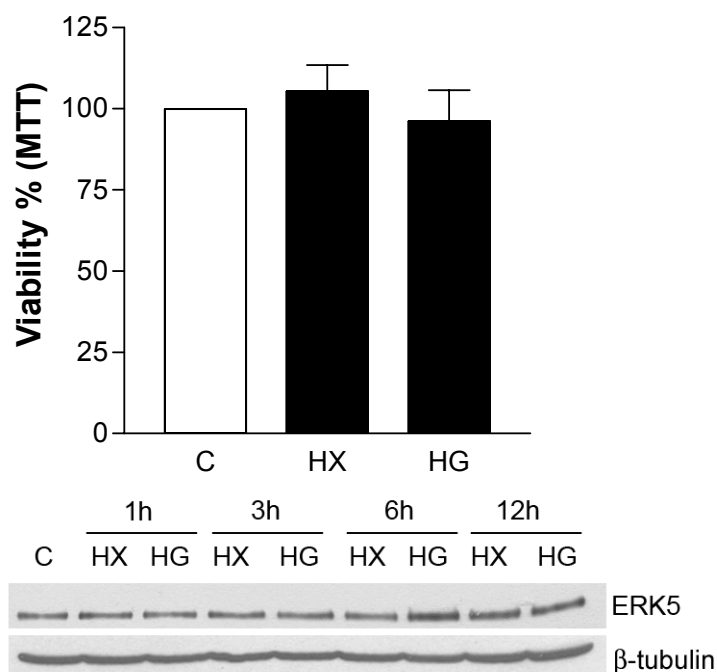


FIGURA 65. La hipoxia o la hipoglucemia *per se* no producen una disminución en los niveles de proteína ERK5. Inmunoblot de ERK5 y tubulina de cultivos mixtos de neuronas corticales sometidas a 75 minutos de hipoxia (HX) o hipoglucemia (HG). Las células fueron lisadas a los tiempos que se indica tras el tratamiento. El gráfico muestra la viabilidad de las células (calculada mediante MTT) tras la hipoxia o la hipoglucemia. Los datos se muestran como la media \pm SEM de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado.

El antagonista de los receptores NMDA MK801 revierte la disminución de ERK5 en respuesta a la OGD o al tratamiento con NMDA

A continuación se llevaron a cabo ensayos con el fin de determinar el mecanismo implicado en la degradación de ERK5 en respuesta a la OGD.

En primer lugar, los cultivos mixtos de neuronas corticales fueron sometidos a 75 minutos de OGD en presencia o ausencia de anticuerpo anti TNF α (1 μ g/ml). El tratamiento *in vitro* con este anticuerpo reduce significativamente la muerte apoptótica inducida por la OGD (Badiola et al., 2008), ya que bloquea el efecto del TNF α (una citoquina que induce muerte apoptótica e inflamación). Las células fueron lisadas tras 3, 6 o 9 horas de perfusión. Se realizó un inmunoblot de los extractos celulares con

anticuerpos contra ERK5 y β -tubulina (figura 66.A, panel izquierdo). No se apreciaron diferencias en la disminución de los niveles de ERK5 en presencia o ausencia de anti-TNF α . Para demostrar que el anticuerpo anti-TNF α había funcionado, se determinó la actividad caspasa 8 seis horas después de la OGD. En presencia del anticuerpo anti-TNF α se produce una disminución significativa de la actividad caspasa 8 (figura 66.A, panel derecho).

A continuación los cultivos mixtos de corticales fueron expuestos a 75 minutos de OGD en presencia o ausencia de un antagonista de los receptores de NMDA: el MK 801 (10 μ M). Así se bloquea en parte la necrosis, ya que se evita la excitotoxicidad producida por la activación de los receptores de NMDA. En la figura 66.B se aprecia que el tratamiento con MK 801 revierte la disminución en los niveles de ERK5 tras la OGD a los tiempos estudiados (de 3 a 9 horas).

Dado que el antagonista de los receptores NMDA MK 801 revertía la disminución de ERK5 se estudió el efecto del tratamiento de las células con NMDA (ácido *N-methyl-D-aspartic.*). El NMDA es un derivado de aminoácido que actúa como agonista específico de los receptores de NMDA, mimetizando la acción del neurotransmisor glutamato en estos receptores. La activación de receptores de NMDA activa parte de la cascada isquémica que produce la muerte necrótica en el core (ver introducción), de manera que el bloqueo con un antagonista evita la excitotoxicidad y entrada de calcio a las células, disminuyendo la muerte celular.

La figura 66.C muestra que el tratamiento con NMDA produce una disminución en los niveles de ERK5 similar a la que se había observado anteriormente tras la OGD. Esta disminución revertía al pretratar las células con el antagonista del receptor de NMDA, MK 801. No se apreciaron diferencias en los niveles de ERK1/2 y tubulina utilizados como control.

Estos resultados muestran que los receptores de NMDA juegan un papel importante en la degradación de ERK5 en respuesta a la isquemia, posiblemente a través de una entrada de calcio en la célula neuronal.

El siguiente objetivo consistió en estudiar la causa de la disminución de ERK5 observada. Se estudió si la disminución de ERK5 era debida a la degradación de la proteína, a una disminución en los niveles de mRNA, o a ambas cosas.

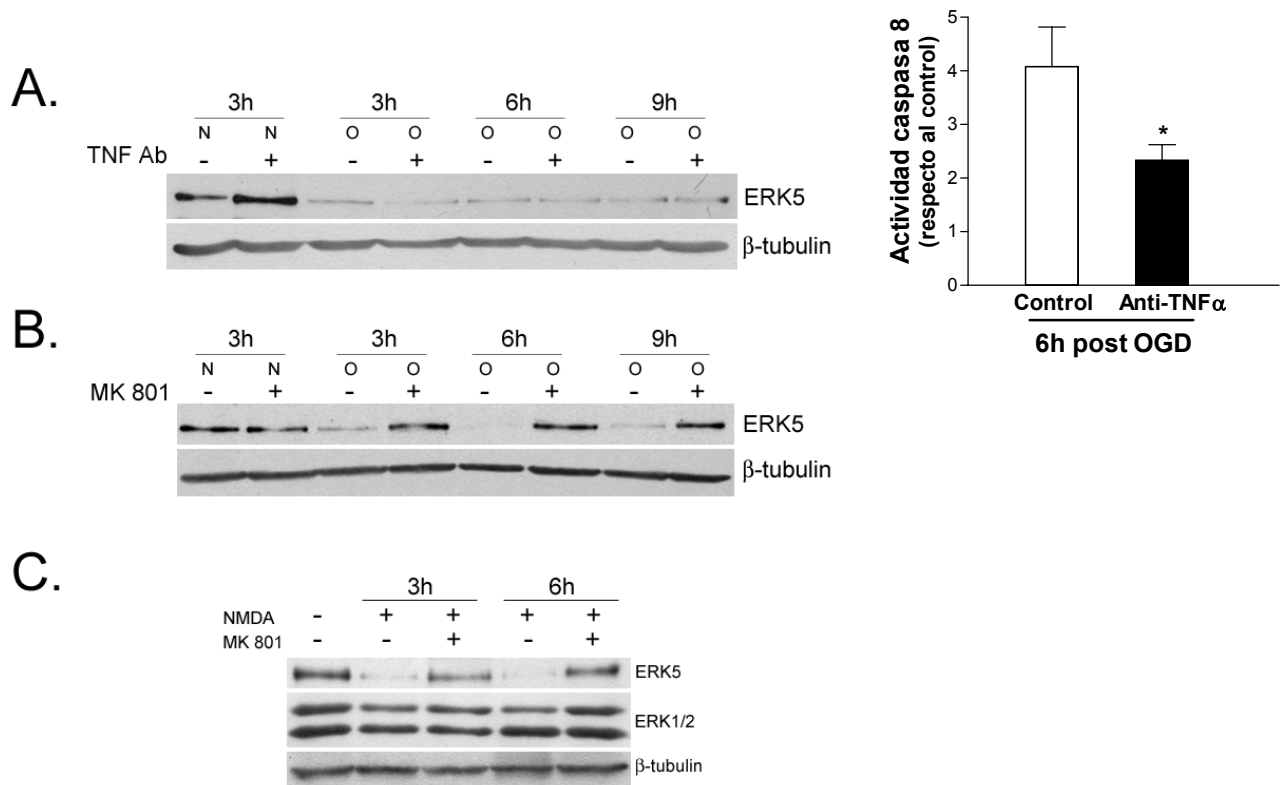


FIGURA 66. Efecto del tratamiento con anticuerpo anti TNF α , MK 801 y NMDA en los niveles de ERK5. Izquierda: Cultivos mixtos de neuronas corticales fueron tratados con anti TNF α (1 μ g/ml), sometidos a OGD durante 75 minutos, reperfundidos (3, 6 o 9 horas), lisados y analizados por inmunoblot. Derecha: Actividad caspasa 8 (unidades arbitrarias de fluorescencia) calculada 6 horas post-OGD en cultivos de corticales en presencia o ausencia del anticuerpo anti-TNF α (1 μ g/ml). Los datos se muestran como la media \pm SEM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. El asterisco indica una diferencia significativa ($P < 0.05$) en las células sometidas a OGD. **B.** Cultivos mixtos de neuronas corticales fueron tratados con MK 801 (10 μ M), sometidos a 75 minutos de OGD, reperfundidos (3, 6 o 9 horas), lisados y analizados mediante inmunoblot. **C.** Tratamiento de los cultivos mixtos de neuronas corticales con MK 801 (10 μ M) y NMDA (100 μ M) durante 3 o 6 horas, lisados y analizados por inmunoblot. N: normoxia, O: OGD. Resultados representativos de tres experimentos independientes.

Los niveles de mRNA de ERK5 no se ven afectados inmediatamente después de la OGD

A continuación se estudió la vida media de ERK5. Con este objetivo, las células fueron tratadas con cicloheximida, un inhibidor de la síntesis proteica de eucariotas, ya que al bloquear la síntesis proteica se puede conocer el tiempo que la proteína tarda en degradarse.

La figura 67.A muestra el resultado del ensayo en cultivos mixtos de neuronas corticales. El gráfico de la figura 67 muestra la disminución de ERK5 en relación a la actina. Como se observa, la vida media de ERK5 es unas 14 horas (tiempo que transcurre hasta que ERK5 es degradada a la mitad de los niveles iniciales). Las bandas observadas en el inmunoblot de un experimento representativo fueron densitometradas. Los valores de ERK5 para cada tiempo fueron normalizados respecto a los valores de actina y el resultado se muestra en el gráfico de la figura.

La figura 67.B muestra el ensayo realizado en células PC12, en las cuales la vida media de ERK5 se sitúa en torno a las 17 horas. Se trata de una vida media larga en comparación con la de otras MAP kinasas como JNK1, cuya vida media es de 8 horas (Das et al., 2007).

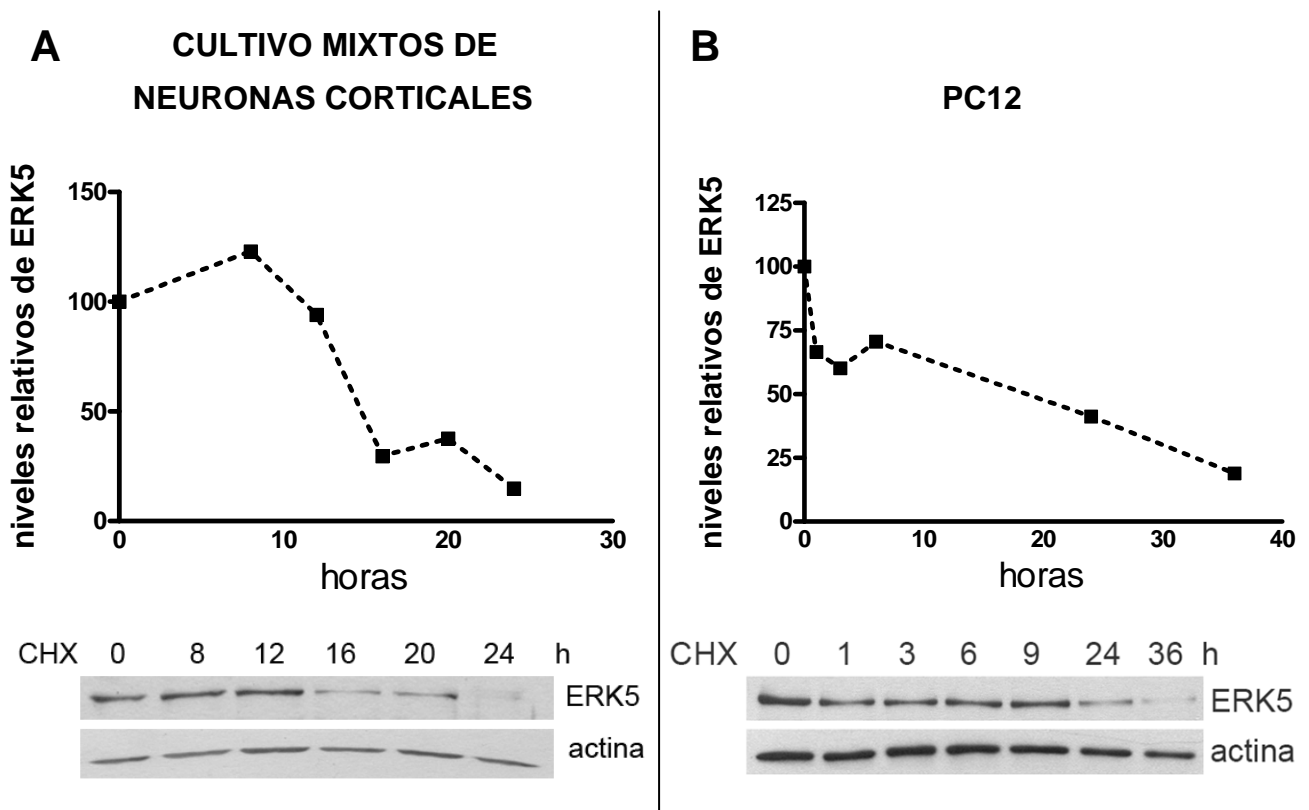


FIGURA 67. Cálculo de la vida media de ERK5. Cultivos mixtos de neuronas corticales (A) y células PC12 (B) fueron tratados con cicloheximida (CHX) 20 μ g/ml. Las células fueron recogidas a los tiempos indicados, lisadas y las proteínas ERK5 y actina visualizadas mediante inmunoblot. Los gráficos muestran la disminución de ERK5 en relación a la actina. La densitometría de las bandas se realizó con el programa ImageJ de un experimento representativo de los 3 realizados. Resultados representativos de tres experimentos independientes.

A continuación se estudiaron los niveles de mRNA de ERK5 en los cultivos mixtos de neuronas corticales sometidos a 75 minutos de OGD. Así, el mRNA fue extraído, retrotranscrito y analizado por PCR semicuantitativa (ver Material y Métodos).

La figura 68 muestra los niveles relativos de mRNA de ERK5 a diferentes tiempos de reperfundición de un experimento representativo. El gráfico de la figura 68 (arriba) resume el resultado de tres experimentos independientes. No se observa disminución del mRNA de ERK5 inmediatamente después de la OGD, aunque los niveles de mensajero sí que disminuyen al aumentar el tiempo de reperfundición. Estos resultados contrastan con los obtenidos para proteína, donde a tiempo 0 post-OGD ya se aprecia una disminución importante en los niveles de ERK5.

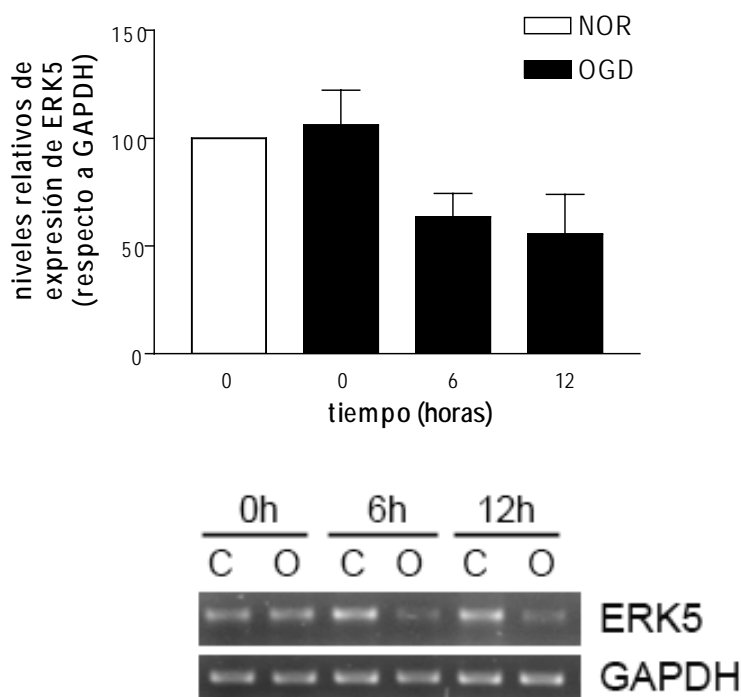


FIGURA 68. Cambios de los niveles de mRNA de ERK5 en respuesta a la OGD. Los cultivos mixtos de neuronas corticales fueron expuestos (O) o no (C) a 75 minutos de OGD, reperfundidos durante los tiempos indicados, los mRNAs extraídos y retrotranscritos. El cDNA fue amplificado por PCR semi-cuantitativa y sometido a electroforesis en un gel de agarosa. La abundancia relativa de los transcritos fue determinada en tres experimentos independientes normalizando los valores de ERK5 contra los de GAPDH. Las barras de error indican la desviación estándar de los triplicados.

Teniendo en cuenta que la proteína ERK5 tiene una vida media de unas 16 horas, que los niveles de mRNA de ERK5 no se ven alterados inmediatamente después de la OGD y que la disminución en los niveles de proteína se aprecia una hora después de la OGD se concluyó que la OGD debía de producir la degradación de ERK5 a través de proteasas o a través de la degradación proteosomal. Por ello, se diseñaron experimentos con inhibidores de diferentes proteasas.

Se ha descrito la activación de varias proteasas en respuesta a la isquemia (ver Introducción). En nuestro trabajo se decidió utilizar inhibidores de caspasas y calpaínas para evaluar su efecto en la disminución de los niveles de ERK5. Las caspasas son proteasas activadas en la muerte apoptótica, y las calpaínas se activan en respuesta a la entrada de calcio de la cascada isquémica.

Los inhibidores de caspasas no revierten la disminución en los niveles de proteína ERK5 en respuesta a la OGD

En primer lugar se utilizó el inhibidor general de caspasas Z-VAD. En la figura 69 se observa que la disminución de ERK5 en respuesta a la OGD no se altera con el tratamiento con Z-VAD. Con este ensayo se descartó que la degradación de ERK5 observada en respuesta a la OGD fuera debida a la activación de las diferentes caspasas implicadas en la muerte celular isquémica.

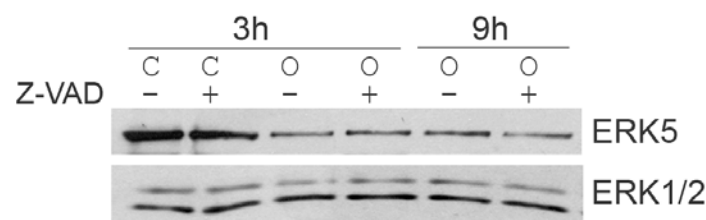


FIGURA 69. El tratamiento de los cultivos corticales con Z-VAD no revierte la disminución en los niveles de proteína ERK5. Cultivos mixtos de neuronas corticales fueron pre-tratados durante 45 minutos con Z-VAD 100 μ M. A continuación fueron sometidos a 75 minutos de OGD (C: control; O: OGD). Las células fueron lisadas tras 3 o 9 horas de perfusión y los extractos se analizaron por inmunoblot utilizando anticuerpos anti ERK5 o ERK1/2 (control).

También se ensayó el inhibidor del proteosoma MG-132, pero producía una gran disminución de los niveles de proteína ERK5 tanto en los controles como en las

células sometidas a OGD, como se ha descrito para otras proteínas como Akt (Basso et al., 2002).

Los inhibidores de calpaína revierten la disminución en los niveles de proteína ERK5 en respuesta a la OGD o al tratamiento con NMDA

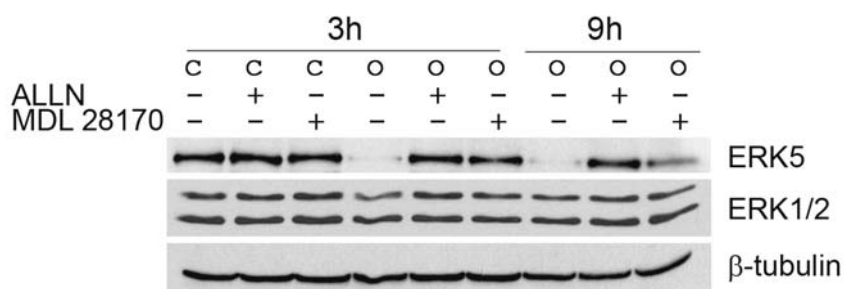
A continuación se utilizaron los inhibidores de calpaína ALLN y MDL 28170. La figura 70.A muestra que ambos inhibidores revierten la disminución en los niveles de ERK5 a 3 y 9 horas post-OGD.

Los cultivos mixtos de neuronas corticales fueron tratados con NMDA, para ver si el uso de inhibidores de calpaína también revertía la disminución de los niveles de ERK5. El tratamiento con NMDA produce una disminución en los niveles de ERK5 (como habíamos observado anteriormente) y el tratamiento con los dos inhibidores de calpaína revierten esta disminución, al igual que el antagonista de los receptores de NMDA MK 801 (figura 70.B).

Estos resultados sugieren que la proteasa calpaína sería la responsable de la degradación de ERK5 en respuesta a la OGD o al tratamiento con NMDA.

Como muestra la figura 71, el uso de inhibidores de calpaína no tiene efecto neuroprotector frente al tratamiento con NMDA en cultivos mixtos de neuronas corticales. Estos resultados están en consonancia con estudios previos obtenidos por el grupo del Dr. José Rodríguez en cultivos mixtos de neuronas corticales, donde observaron que el pre-tratamiento con inhibidores de calpaína no protegía a las neuronas de la muerte producida por la OGD.

A



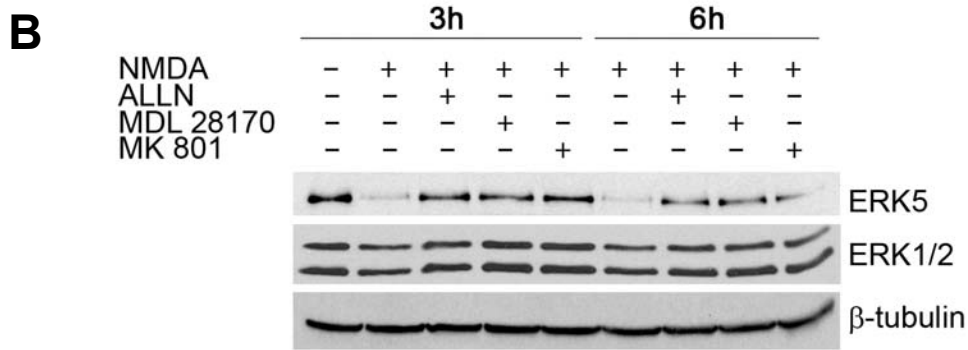


FIGURA 70. Los inhibidores de calpaína revierten la disminución en los niveles de proteína ERK5 tras la OGD o el tratamiento con NMDA. A. Las células corticales fueron expuestas al daño isquémico durante 75 minutos, en presencia o ausencia de inhibidores de calpaína ALLN (1µM) o MDL 28170 (10µM) y lisadas tras 3 o 9 horas de reperusión. Se muestra el inmunoblot de los extractos utilizando anticuerpos anti ERK5, ERK1/2 y β-tubulina. **B.** Neuronas corticales fueron pre-tratadas durante 30 minutos con MK 801 (10 µM) o con inhibidores de calpaína ALLN (1µM) y MDL 28170 (10µM). A continuación las células fueron tratadas con NMDA 100 µM durante 3 o 6 horas, lisadas y los extractos analizados por inmunoblot. Resultados representativos de tres experimentos independientes.

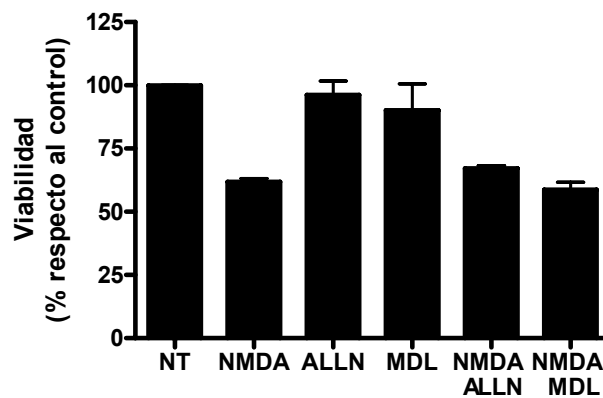


FIGURA 71. Los inhibidores de calpaína no protegen de la muerte inducida por NMDA. Los cultivos mixtos de neuronas corticales fueron pre-tratados durante 30 minutos con ALLN (1µM) o MDL 28170 (10µM). A continuación las células fueron tratadas con NMDA 100 µM y la viabilidad calculada por MTT 24 horas después. El gráfico muestra la media de viabilidad ± desviación estándar de tres experimentos independientes: NT: células no tratadas.

Identificación fragmentos de ERK5 tras su degradación por calpaína

Dado que calpaína parecía ser la responsable de la degradación de ERK5 inducida por OGD, se diseñaron una serie de experimentos con el fin de identificar los posibles fragmentos de ERK5 que podrían producirse como consecuencia de la acción de esta proteasa.

Extractos procedentes de cultivos mixtos de neuronas corticales sometidos a OGD fueron analizados mediante inmunoblot utilizando dos anticuerpos anti-ERK5 diferentes: anti-ERK5 procedente de la MRC *Protein Phosphorylation Unit* en Dundee (Escocia), que reconoce a la proteína entera; y anti-ERK5 (Sigma) que reconoce la los residuos 789 a 802 de la cola C-terminal de ERK5. La figura 72 muestra los resultados. En el inmunoblot obtenido al utilizar el anticuerpo anti-ERK5 de Sigma no se aprecian fragmentos de degradación de ERK5 exclusivos de las muestras sometidas a isquemia. Sin embargo, al utilizar el anticuerpo contra la proteína total aparece un fragmento de unos 40 kDa en las muestras sometidas a OGD que no se aprecia en las muestras control.

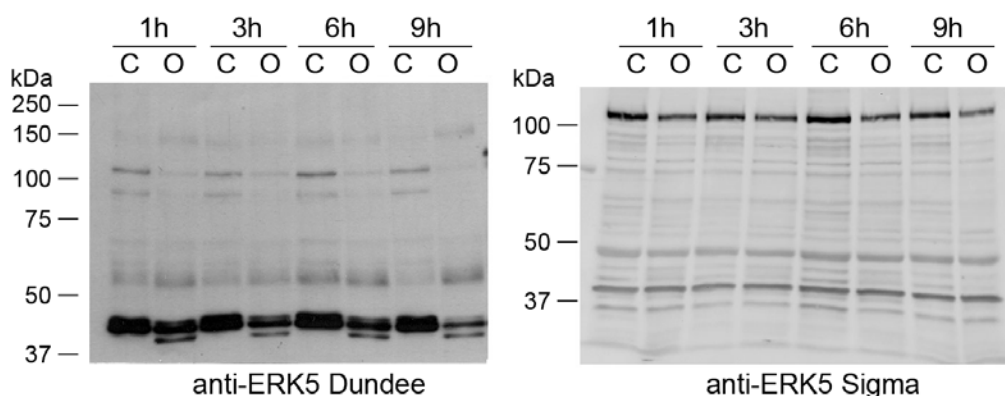


FIGURA 72. Identificación de fragmentos de degradación de ERK5 tras la OGD en cultivos mixtos de neuronas corticales. Cultivos mixtos de neuronas corticales fueron expuestos (O) o no (C) a 75 minutos de OGD. Las células fueron lisadas a diferentes tiempos post-OGD, y los niveles de ERK5 analizados mediante inmunoblot utilizando dos anticuerpos diferentes anti-ERK5. Resultados representativos de dos experimentos independientes

Es posible que no se aprecien más fragmentos de ERK5 porque el tiempo más corto de reperfusión es una hora, y quizás la proteína ya ha sido degradada por completo. En paralelo, también se utilizaron gels con porcentajes elevados de acrilamida con el

fin de resolver las proteínas de bajo peso molecular. Sin embargo, no se observaron bandas menores de 50 kDa.

Con el fin de estudiar la degradación de ERK5 a tiempos cortos, se utilizó el modelo de NMDA. Como se ha mostrado anteriormente, el tratamiento de las neuronas corticales con NMDA provoca, de manera calpaína-dependiente, la degradación de ERK5. La figura 73 muestra que tras 30, 45 y 60 minutos de tratamiento una banda de unos 55 kDa aumenta de intensidad. La intensidad de esta banda disminuye a las 2 horas de tratamiento. Esta banda podría corresponder a un fragmento de ERK5.

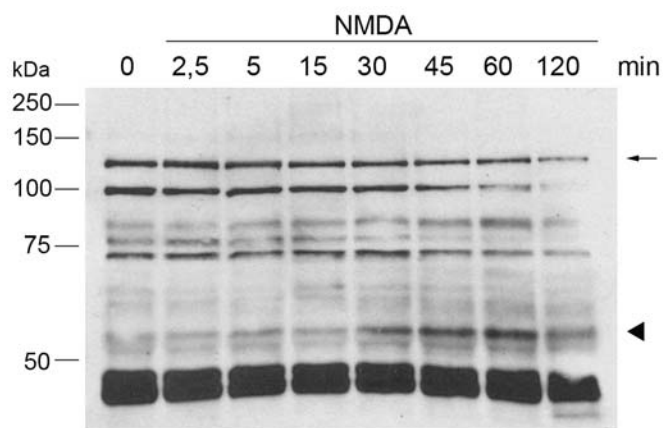


FIGURA 73. El tratamiento de neuronas corticales con NMDA a tiempos cortos produce un fragmento de degradación de unos 55 kDa. Cultivos mixtos de neuronas corticales fueron tratados con 100 μ M NMDA. A los tiempos indicados, las células fueron lisadas y los extractos analizados mediante inmunoblot utilizando anticuerpo anti-ERK5 (Dundee). (\rightarrow ERK5, \blacktriangle posible fragmento de degradación de ERK5).

Calpaína degrada a ERK5 *in vitro*

Llegados a este punto, habíamos demostrado una relación entre ERK5 y calpaína de forma indirecta, mediante el uso de inhibidores de calpaína (que revertían la disminución de ERK5 en respuesta a la OGD). A continuación se procedió a estudiar la degradación de ERK5 por calpaína de forma directa. Para ello, se llevaron a cabo ensayos *in vitro* de actividad calpaína, utilizando una preparación comercial de m-calpaína activa y ERK5 recombinante como sustrato (ver Material y Métodos). La figura 74 muestra que m-calpaína (o calpaína-2) degrada a ERK5 *in vitro*. Esta degradación, además es dependiente de calcio, dado que no se observó degradación

de ERK5 cuando se incubó con calpaína en ausencia de calcio. Esta la degradación es muy rápida: a 1 minuto de reacción la desaparición de ERK5 es considerable).

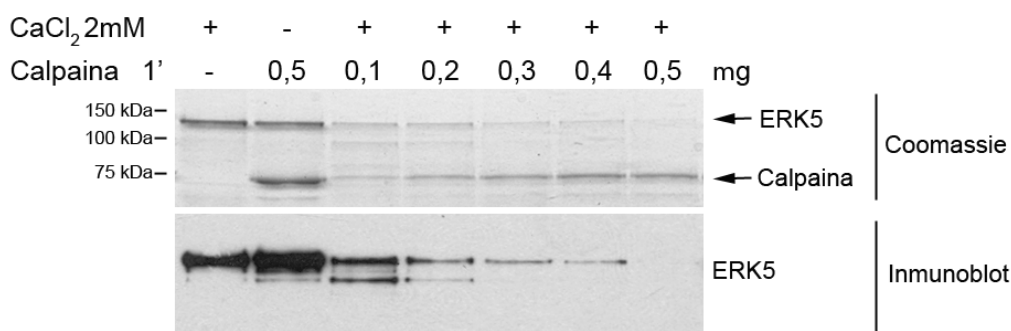


FIGURA 74. m-calpaína degrada a ERK5 *in vitro*. 1 μ g de GST-ERK5 pura enzimática fue incubada con diferentes concentraciones de m-calpaína, en presencia de 2 mM de CaCl₂ durante 1 minuto a 30°C. La reacción finalizó con la adición de tampón SDS de electroforesis, y las muestras resueltas mediante electroforesis en gel SDS-PAGE. El gel fue gel teñido con Coomassie (panel superior) o analizado mediante inmunoblot utilizando el anticuerpo anti-ERK5 (panel inferior). Se utilizó un control negativo sin calcio. Resultados representativos de tres experimentos independientes.

A continuación, se procedió a establecer cómo afectaba el estado de activación de ERK5 a su degradación por calpaína, como se ha observado para otras proteínas kinasas. Así, la proteína kinasa C (PKC), una vez activada, es degradada por m-calpaína y μ -calpaína *in vivo*. Esta degradación forma parte de un mecanismo de *down-regulation* de la proteína, ya que la sobre-expresión de PKC fosforila y activa a calpaína *in vivo* (Xu y Deng, 2006). En nuestro caso, no se apreciaron diferencias en la cinética de degradación de ERK5 recombinante activa o inactiva (figura 75).

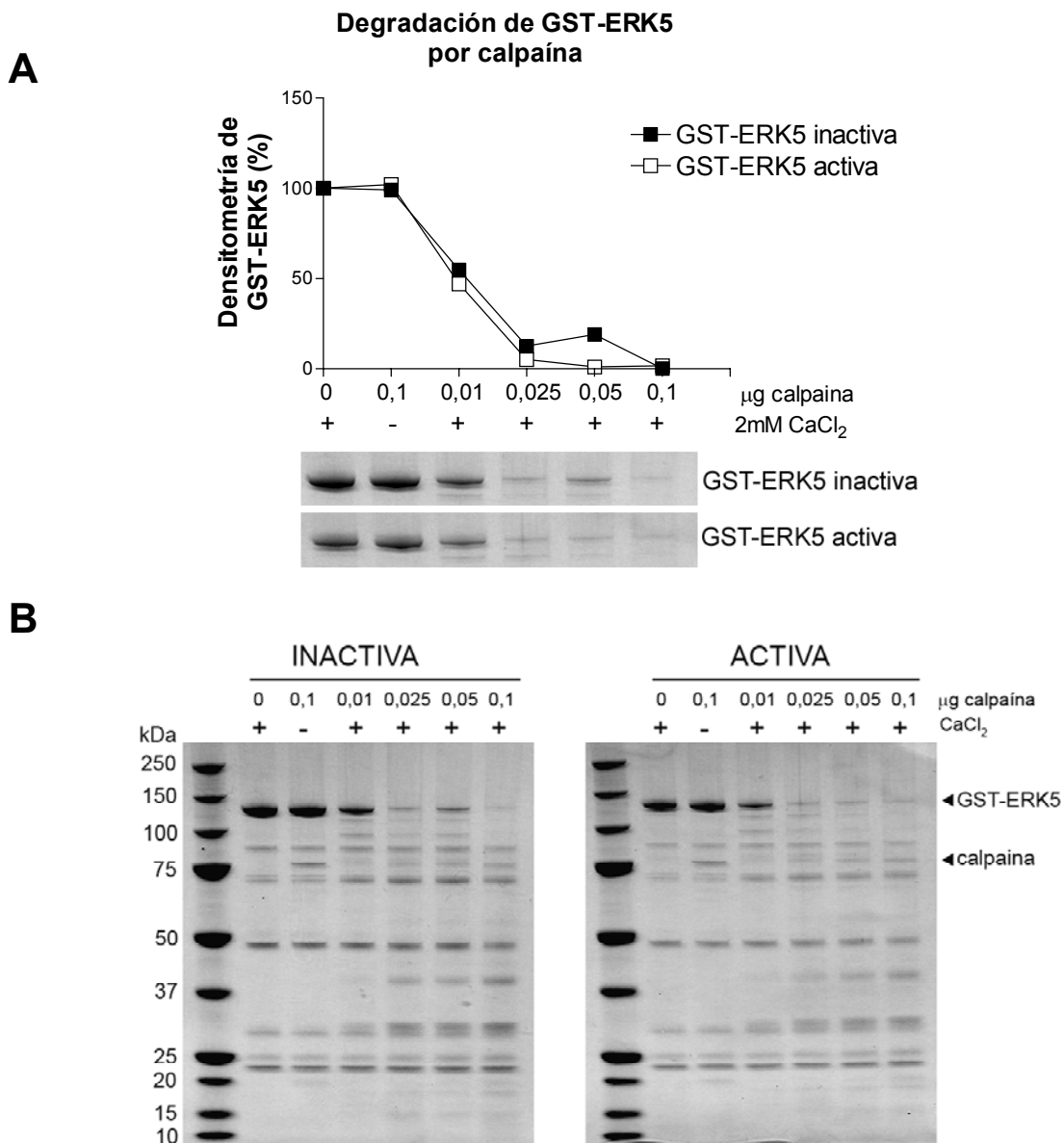


FIGURA 75. Degradación *in vitro* de ERK5 recombinante activa o inactiva por m-calpaína. Concentraciones crecientes de calpaína fueron incubadas con 1 µg de GST-ERK5 durante 1 minuto a 30°C. Las muestras fueron resueltas mediante electroforesis en gel SDS-PAGE, y los geles teñidos con Coomassie. **A.** Comparación de la degradación de ERK5 activa e inactiva, resultante del análisis densitométrico de los geles mostrados en B. **B.** tinción de Coomassie los geles tras la actividad para apreciar los fragmentos de degradación que aparecen. Resultados representativos de tres experimentos independientes.

Identificación del sitio primario de corte de ERK5 por calpaína

Inicialmente, la proteasa calpaína corta la proteína sustrato en una secuencia específica, conocida como “sitio primario de corte”. Este corte puede, a su vez, generar nuevas secuencias de corte, por lo que en algunos casos la acción de la calpaína puede llevar a la degradación completa de la proteína sustrato. Con el fin de

identificar el sitio primario de corte de ERK5 por calpaína se utilizaron diferentes preparaciones de ERK5 recombinante: dos de ellas con el tag en el N-terminal (GST-ERK5, His-ERK5) y una con el tag en posición C-terminal (ERK5-Flag). El objetivo de estos ensayos era encontrar un fragmento de degradación de ERK5 que pudiera ser secuenciado mediante degradación de Edman (esta técnica permite la secuenciación de unos pocos aminoácidos en posición N-terminal).

Se empezó por estudiar la degradación de GST-ERK5. Se llevaron a cabo incubaciones con concentraciones crecientes de calpaína a tiempos cortos (1 min), y los resultados se muestran en la figura 76. La proteína GST-ERK5 recombinante utilizada en este ensayo presenta el tag en su extremo N-terminal. Para poder identificar el sitio primario de corte, por tanto, debería obtenerse un fragmento reconocido por el anticuerpo anti-ERK5 pero no por el anticuerpo anti-GST. Ninguna de las bandas obtenidas en este ensayo del inmunoblot cumple estas condiciones. Se obtuvieron resultados similares cuando se utilizó una preparación de His-ERK5 o ERK5-flag puras (resultados no mostrados). Estos experimentos anteriores fueron realizados un mínimo de 3 veces. También se llevaron a cabo, sin éxito, modificaciones de las condiciones de los ensayos (reduciendo o aumentando la concentración de calcio, de calpaína y la temperatura). En ningún caso se encontró banda alguna susceptible de ser secuenciada mediante degradación de Edman.

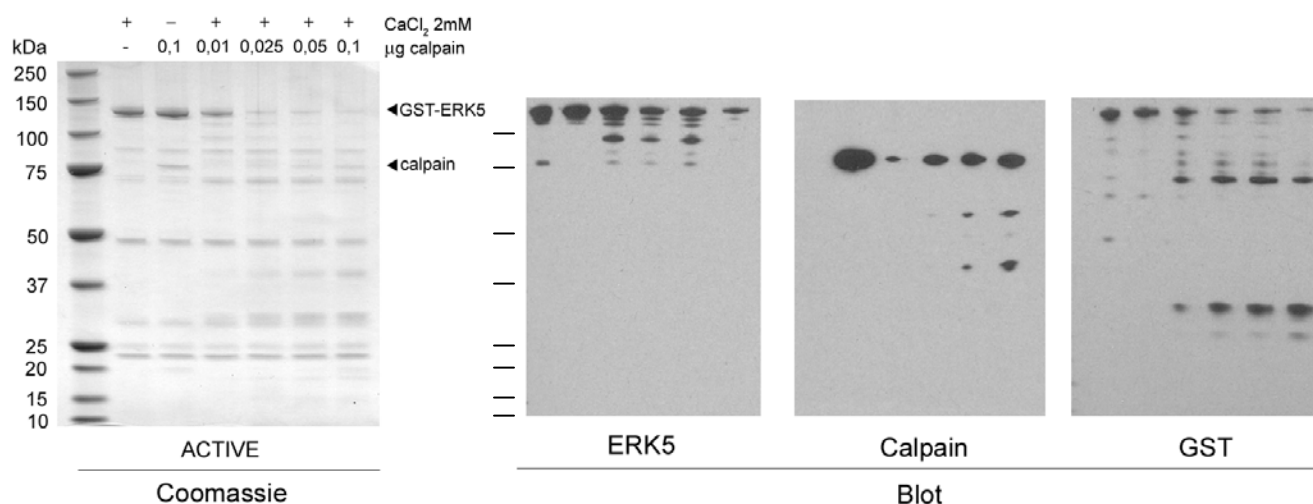


FIGURA 76. Degradación de GST-ERK5 pura por m-calpaína. 1 µg de GST-ERK5 fue incubada con concentraciones crecientes de calpaína 1 minuto a 30°C. Las muestras fueron resueltas en electroforesis en gel SDS-PAGE, teñidas con Coomassie (izquierda) o analizadas por inmunoblot utilizando anticuerpos anti-ERK5, anti-calpaína y o anti-GST. Resultados representativos de tres experimentos independientes.

Como se ha mostrado en las figuras 72 y 73, la exposición corta de neuronas corticales a la OGD o a 100 μ M NMDA conlleva la aparición de un fragmento de 55 kDa reconocido por el anticuerpo anti-ERK5. Dado que este fragmento podría corresponder al dominio kinasa de ERK5, a continuación se llevaron a cabo ensayos *in vitro* en los que se analizó la degradación de ERK5-full length y de una forma de ERK5 (ERK5-490) que codifica para los primeros 490 aa. Esta proteína posee el dominio kinasa pero carece de la cola C-Term. La figura 77 muestra que en las condiciones ensayadas (0,1 μ g de calpaína 1 minuto), la proteína GST-ERK5-wt es casi totalmente degradada por calpaína, y que GST-ERK5-490 es parcialmente resistente a la acción de la proteasa.

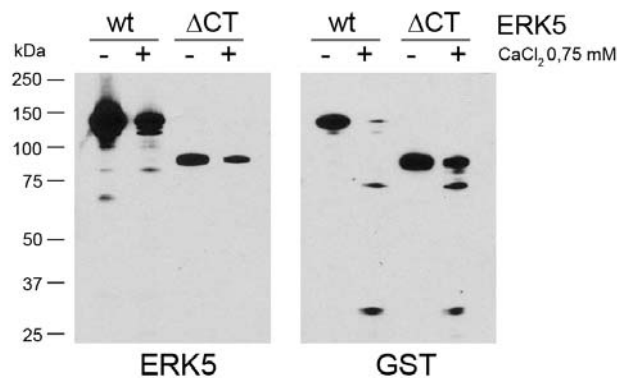


FIGURA 77. Degradación de ERK5-wt y ERK5-1-490 (ERK5- Δ CT) puras por m-calpaína. 1 μ g de GST-ERK5 wt o GST-ERK5-490 fueron incubados con 0,1 μ g de calpaína durante 1 minuto a 30°C. Las muestras fueron resueltas en electroforesis en gel SDS-PAGE, y analizadas mediante inmunoblot utilizando anticuerpos anti-ERK5 o anti-GST. Resultados representativos de tres experimentos independientes.

La subunidad reguladora de calpaína CSS1 interacciona con ERK5 en células SH-SY5Y

Teniendo en cuenta las evidencias obtenidas de la degradación de ERK5 por calpaína *in vitro* y en cultivos mixtos de neuronas corticales sometidos a OGD, y dado que uno de los positivos de la metodología TAP era la subunidad pequeña reguladora de calpaína, CSS1, se decidió estudiar la interacción entre ERK5 y CSS1.

Se realizaron los correspondientes experimentos de co-inmunoprecipitación, utilizando anticuerpos que inmunoprecipitaran ERK5 o CSS1 y los resultados del inmunoblot se muestran en la figura 78. El panel A muestra la inmunoprecipitación de

ERK5 y la detección de CSS1 y la subunidad grande de calpaína por inmunoblot. En la parte superior del panel A, se observa que CSS1 aparece en la muestra inmunoprecipitada con el anticuerpo anti-ERK5 pero no en el control sin anticuerpo. Es decir, CSS1 co-inmunoprecipita con ERK5, pero no co-inmunoprecipita la subunidad grande de calpaína.

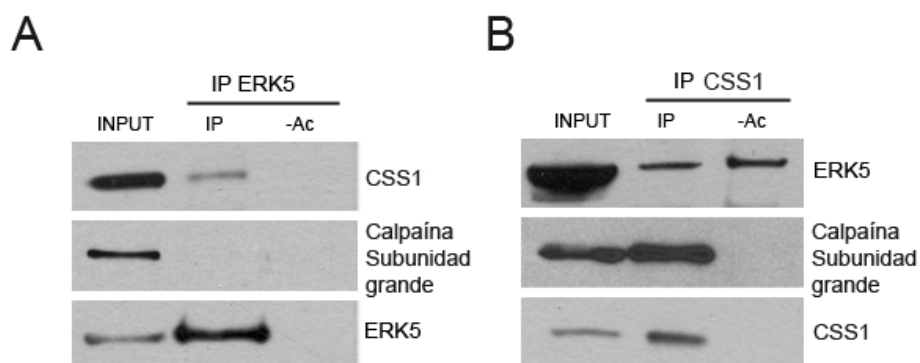


FIGURA 78. ERK5 co-inmunoprecipita con la subunidad pequeña reguladora de calpaína (CSS1). Lisados celulares (SH-SY5Y) fueron inmunoprecipitados con 5 μ g de anticuerpo anti-ERK5 o con 2 μ g de anticuerpo anti-CSS1 o anti-calpaína subunidad grande. Los inmunoprecipitados fueron resueltos en geles de acrilamida y las proteínas visualizadas con el anticuerpo anti-CSS1 o anti-ERK5 en cada caso. **A.** Inmunoprecipitación de 5mg de lisado con anticuerpo anti ERK5 e inmunoblot contra CSS1 (arriba), calpaína subunidad grande (medio); ERK5 (abajo). **B.** Inmunoprecipitación de 5mg de lisado celular con anticuerpo anti-CSS1 e inmunoblot contra ERK5 (arriba), calpaína subunidad grande (medio); CSS1 (abajo). Se muestran los controles sin anticuerpo (-Ac).

La figura 78.B muestra la inmunoprecipitación de CSS1 y la detección de la subunidad grande de calpaína y ERK5 por inmunoblot. Al inmunoprecipitar CSS1 y detectar ERK5 mediante inmunoblot se aprecia una banda en el carril correspondiente a la inmunoprecipitación pero también en el control sin anticuerpo. Sí que se detecta inmunoprecipitación de la subunidad grande al inmunoprecipitar CSS1. Así, ERK5 interacciona con CSS1 en la célula y CSS1 con la subunidad grande de calpaína, pero ERK5 y la subunidad grande no parecen interactuar, indicando que existen dos complejos diferentes de CSS1, uno unida a ERK5 y otro unida a la subunidad catalítica de calpaína.

Por último, se estudió el patrón de elución en cromatografía de gel filtración de la subunidad reguladora de calpaína CSS1. La figura 79 muestra el inmunoblot de CSS1 de las fracciones obtenidas mediante cromatografía de gel filtración de extractos de células SH-SY5Y. La proteína CSS1 aparece en tres poblaciones, una entorno a su peso molecular (28 kDa) (fracciones 25-27), otra de unos 80-100 kDa (fracciones 20-22) y una última de alto peso molecular (> 680 kDa) (fracciones 5-6). La población de 80-100 kDa podría tratarse de la asociación de CSS1 a la subunidad grande de calpaína. La población de alto peso molecular coincide con la población de alto peso molecular observada tras el WB con el anticuerpo anti-ERK5 de las mismas muestras (fracciones 5-6).

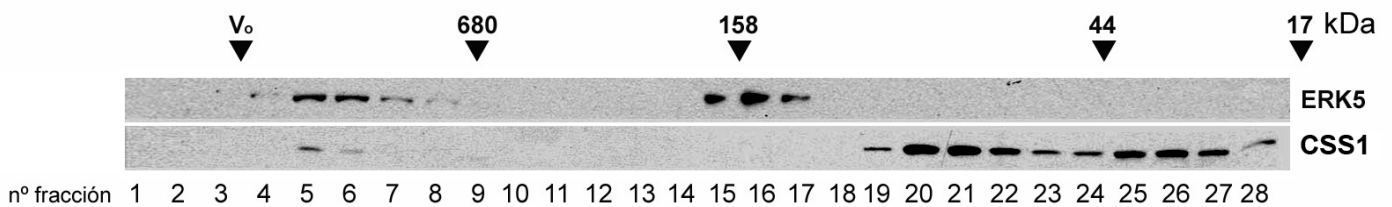


FIGURA 79. Calpaína endógena existe como complejo de alto peso molecular.

Lisados procedentes de células SH-SY5Y fueron cromatografiados en columna de Gel Filtración Superdex 200HR-FPLC, las fracciones resueltas mediante electroforesis en gel SDS-PAGE y posteriormente analizadas mediante inmunoblot utilizando los anticuerpos anti-ERK5 y anti CSS1.

2.2. PAPEL DE ERK5 EN LA VIABILIDAD CELULAR TRAS LA OGD

Los niveles de expresión de ERK5 disminuye tras la OGD y esta disminución es inversamente proporcional a la viabilidad celular, por lo que a continuación se planteó estudiar si la disminución de ERK5 era causa o consecuencia de la muerte celular. Si ERK5 juega un papel protector de la muerte en la isquemia, su sobre-expresión podría proteger en cierto grado de la muerte tras la OGD. Partiendo de esta premisa se decidió sobre-expresar ERK5 en los cultivos mixtos de neuronas corticales. Para ello fue necesaria la utilización de vectores virales, ya que la transfección de neuronas presenta una eficiencia muy baja.

Uso de adenovirus y adenoasociados

Los adenovirus tipo 5 infectan neuronas a través de los receptores de adenovirus Coxsackie, y han sido utilizados para la infección de este tipo celular en diversos estudios (Persson et al., 2007). Además existen adenovirus tipo 5 comerciales que codifican para ERK5, así que los obtuvimos. Se infectaron cultivos mixtos de neuronas corticales con Ad-5-ERK5/GFP, transcurridos 5 días las células fueron fijadas y se realizó una inmunohistoquímica con el marcador neuronal MAP2 y una tinción nuclear con Hoechst. La figura 80.A muestra que la infección era escasa y las células GFP positivas eran mayoritariamente astrocitos (no co-localizan con MAP2, marcador neuronal). En experimentos posteriores se aumentó la MOI de virus utilizados, como se muestra en la figura 80.B, pero no se consiguió infectar neuronas (sólo los astrocitos son GFP-positivos) y se deterioraba visiblemente el cultivo, como muestra en el contraste de fase. Así pues, los adenovirus de tipo 5 no pueden ser utilizados en nuestro modelo de OGD.

A continuación y para evaluar el nivel de infección neuronal, el Dr. Chillón del Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica (CBATEG, UAB) nos facilitó tres pseudotipos de adenoasociados y un vector adenoviral canino CAV2, cuya infección neuronal había sido descrita (Soudais et al., 2001). Todos codificaban para la proteína fluorescente GFP. Se llevaron a cabo diferentes pruebas en cultivos mixtos de neuronas corticales y se comprobó que la infección con adeno-asociados producía una mortalidad muy alta a las 72 horas de la infección. En el caso del pseudo-tipo 2, se obtuvo una infección del 100% de las células, pero las neuronas perdieron su morfología 24 horas después de la infección, por lo que se descartó su uso. En el

caso de los adenovirus CAV2-GFP, producía una expresión de GFP escasa y muy tenue, por lo que se decidió no utilizarlos.

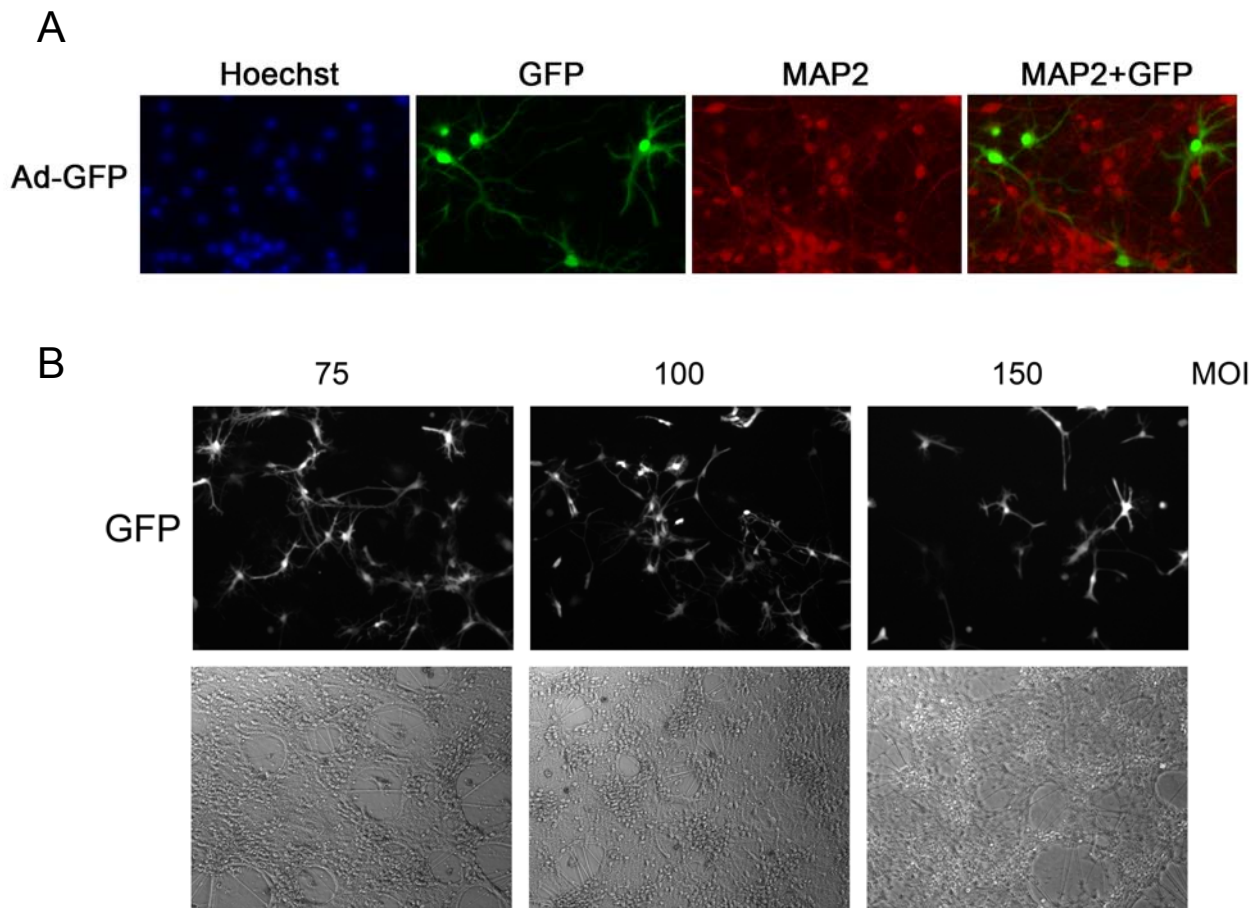


FIGURA 80. La infección de cultivos mixtos de neuronas corticales de rata con adenovirus sólo afecta a los astrocitos. A. Infección de los cultivos con adenovirus-GFP, para ver la infección en el microscopio. Se utilizó Hoechst como marcador nuclear y MAP2 como marcador neuronal. El GFP muestra las células infectadas con adenovirus-GFP. **B.** El aumento de la MOI no aumenta la infección neuronal. La parte superior del panel muestra las células infectadas (GFP-positivas) y la inferior el total de células con contraste de fase.

Obtención de lentivirus que codifican para ERK5

Dado el fracaso en la infección neuronal que mostraron los diferentes adenovirus y adenoasociados ensayados en nuestro modelo, se optó por generar lentivirus que codificasen para ERK5. Para ello se utilizó la metodología descrita en el apartado Material y Métodos.

La figura 81 muestra que los lentivirus no sólo infectan a los astrocitos, sino también a las neuronas, aunque la intensidad de fluorescencia de los astrocitos es mayor que la de las neuronas. Estos datos demuestran la idoneidad del uso de lentivirus para la sobre-expresión de proteínas en neuronas corticales.

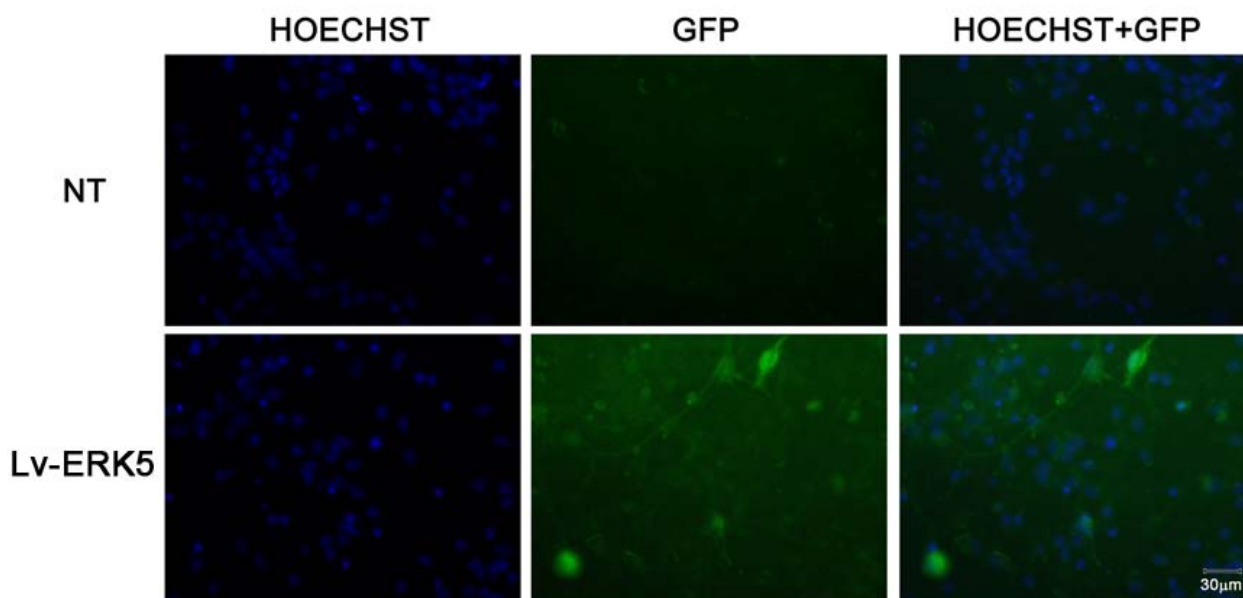


FIGURA 81. Los lentivirus que codifican para ERK5 infectan tanto a neuronas como astrocitos en cultivos corticales mixtos. Las células, sembradas en placas de 24 pocillos, fueron infectadas a 8 DIV con 10µl de virus concentrado por pocillo. 4 días después de la infección las células fueron fijadas, los núcleos teñidos con Hoechst y la infección evaluada mediante microscopía de fluorescencia. NT: cultivo no tratado (no infectado), Lv-ERK5: cultivo infectado con lentivirus-ERK5.

La infección de cultivos mixtos de corticales con lentivirus que codifican para ERK5 no altera la viabilidad de los cultivos sometidos a OGD

Los cultivos mixtos de neuronas corticales fueron infectados con lentivirus que codifican para ERK5 o lentivirus control a 8 DIV. Cuatro días después fueron sometidos a OGD para analizar la viabilidad de las células infectadas respecto a las no infectadas. La parte inferior de la figura 82 muestra un inmunoblot representativo de este ensayo, en el que se aprecia la sobre-expresión de GFP en las células infectadas con el virus control, y de GFP y ERK5 en las células infectadas con lentivirus-ERK5/GFP (se trata de un promotor policistrónico que genera las dos proteínas de forma independiente). Como control de la OGD se muestra la fragmentación de la proteína espectrina (sustrato canónico de calpaína). En el gráfico 82 de la figura se observa un ligero aumento de la viabilidad de los cultivos infectados, pero no se aprecian diferencias debidas a la infección de ERK5 o de GFP. Así, la sobre-expresión de ERK5 en cultivos mixtos de neuronas corticales no tiene efectos en la viabilidad celular después una la isquemia *in vitro*.

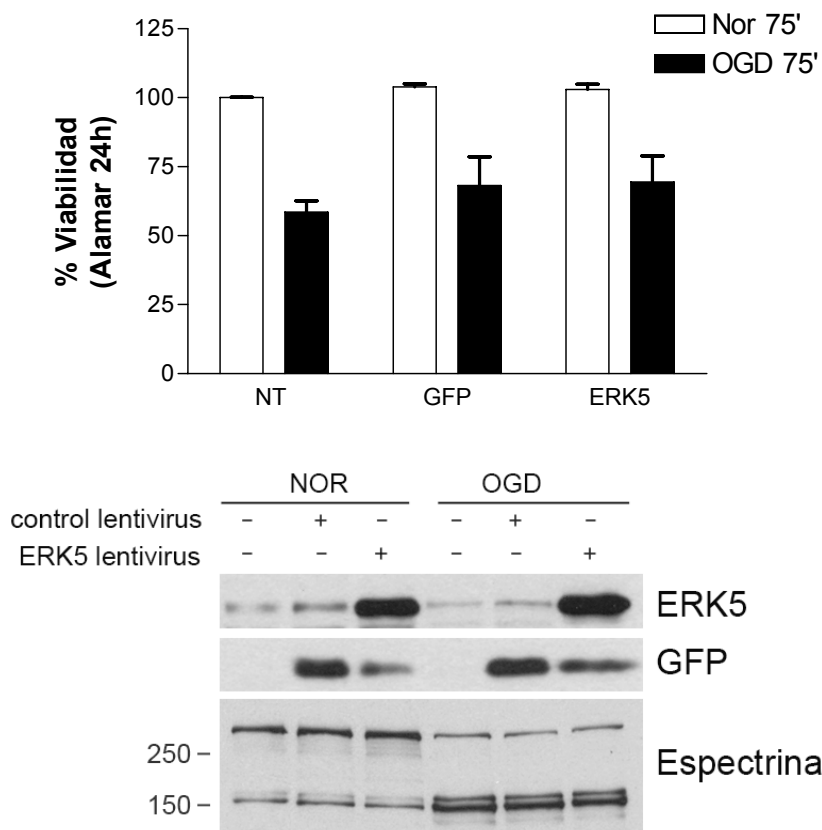


FIGURA 82. La sobre-expresión de ERK5 en cultivos mixtos de neuronas corticales no altera la viabilidad de los cultivos tras ser sometidos a OGD. Los cultivos fueron infectados con lentivirus que codificaban para ERK5 o lentivirus control a 8 DIV. Cuatro días después de la infección fueron sometidos (OGD) o no (NOR) a 75 minutos de OGD. Se analizó la viabilidad de las células por Alamar Blue, se realizaron dos lavados con PBS y las células fueron lisadas. Los extractos fueron analizados mediante inmunoblot con anticuerpos anti ERK5, GFP y espectrina. El gráfico (arriba) muestra la media de viabilidad \pm desviación estándar de tres experimentos independientes: NT (células no infectadas), GFP (células infectadas con virus control) y ERK5 (células infectadas con lentivirus que codifica para ERK5).

Papel de la infección lentiviral de ERK5 en el tipo de muerte de los cultivos sometidos a OGD

Los estudios anteriores se realizaron midiendo la viabilidad mediante Alamar Blue, que ofrece una medida de las células metabólicamente activas, pero no permite discriminar en el tipo de muerte acaecida. Así, se decidió estudiar si la sobre-expresión de ERK5 incidía en el tipo de muerte: necrótica o apoptótica.

Los cultivos mixtos de neuronas corticales fueron infectados a 8 DIV y sometidos a OGD cuatro días después. A continuación, fueron teñidos con Ioduro de Propidio (PI), fijados y teñidos con Hoechst. Estas tinciones permitirían realizar un conteo de las células apoptóticas y necróticas.

La figura 83 muestra el resultado de la tinción con PI y Hoechst para células no infectadas control y sometidas a OGD. Se aprecia un aumento significativo de células PI positivas tras la OGD. La ampliación muestra las células consideradas apoptóticas: presentan la cromatina fragmentada o condensada.

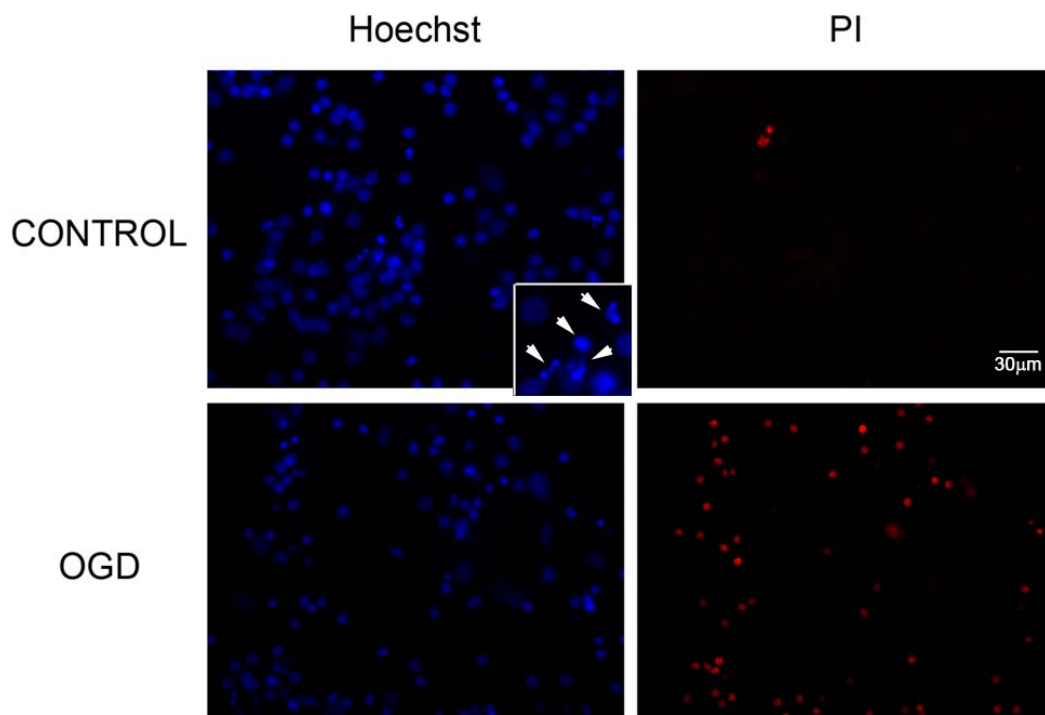


FIGURA 83. Análisis de células necróticas y apoptóticas en cultivos mixtos de neuronas corticales sometidos a OGD. Se infectaron los cultivos celulares a 8 DIV y se realizó una OGD de 75 minutos cuatro días después de la infección. 24 horas después las células fueron teñidas durante una hora con Ioduro de Propidio (PI), fijadas y teñidas con Hoechst. Se consideran células necróticas (derecha) las PI positivas que presentan la cromatina no condensada y apoptóticas aquellas en las que el DNA está condensado o fragmentado (mirando la tinción con Hoechst). En la ampliación, las flechas señalan los sucesos apoptóticos que se observan.

Esta metodología permite contar fácilmente las células PI positivas. Sin embargo, el principal problema consiste en el conteo de las células apoptóticas. En cultivos control el conteo resulta sencillo, ya que se distinguen perfectamente los núcleos con

la cromatina condensada o fragmentada (como en la figura). Sin embargo, tras someter las células a OGD, muchas pierden la morfología y resulta difícil distinguir la cromatina condensada de la no condensada.

La figura 84 muestra el resultado del conteo de uno de los tres ensayos llevados a cabo después de infectar los cultivos mixtos de neuronas corticales con los correspondientes lentivirus y ser sometidos posteriormente a OGD. Como control se utilizó el inhibidor de calpaína ALLN (que debería reducir la muerte necrótica) y el inhibidor general de caspasas Z-VAD (que debería reducir la muerte apoptótica). Fue necesario poner a punto las condiciones del modelo para el conteo de los núcleos, ya que los 75 minutos de OGD utilizados normalmente producían un 90% de células necróticas, que no disminuía en respuesta a ALLN. Finalmente se utilizaron 60 minutos de OGD.

La figura 84 muestra los resultados preliminares obtenidos, el panel superior muestra los resultados del conteo de las células PI positivas (necróticas). Las células control (no sometidas a OGD) presentan un 10% de muerte necrótica, mientras que la OGD producía un aumento este porcentaje a un 45%. La expresión del vector lentiviral control disminuía el número de células necróticas a un 15% (prácticamente a los niveles de las células no sometidas a OGD). Las células infectadas con Ad-ERK5/GFP presentaban un 35% de muerte necrótica. También disminuía la necrosis tras el tratamiento con el inhibidor de calpaína ALLN utilizado como control. El tratamiento con Z-VAD aumenta ligeramente este tipo de muerte, quizás debido a la toxicidad que produce en las células. El gráfico inferior de la figura 84 muestra el conteo de las células apoptóticas. Se aprecia un ligero aumento de la apoptosis en la OGD, que revierte con el virus control, el virus que sobre-expresa ERK5, con ALLN y Z-VAD.

En resumen, la sobre-expresión de ERK5 mediante la infección con lentivirus de cultivos mixtos de neuronas corticales, produce un aumento de la viabilidad celular tras la OGD. Este aumento de viabilidad no puede ser atribuido a un efecto de ERK5, ya que la infección con virus control produce una neuroprotección mucho mayor. Así, la mera infección lentiviral protege de la muerte frente a la isquemia in vitro. Esto podría ser debido a la respuesta inflamatoria de las células infectadas (Liu et al., 2006), ya que diversos estudios reportan el papel neuroprotector de la inflamación

(Pluchino et al., 2005) y del preconditionamiento (Davis y Patel, 2003; Sharp et al., 2004; Steiger y Hanggi, 2006).

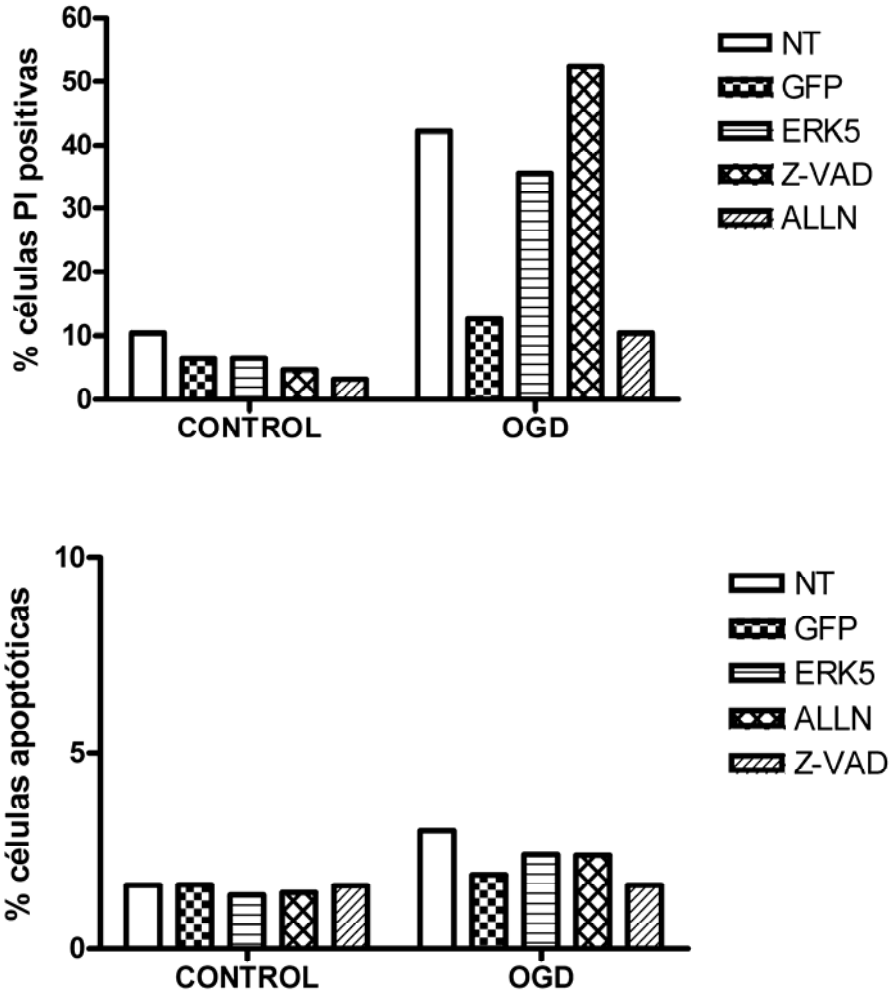


FIGURA 84. Análisis de células necróticas y apoptóticas en cultivos mixtos de neuronas corticales sometidos a OGD. Cultivos mixtos de neuronas corticales fueron infectados con lentivirus control o lentivirus que codificaban para ERK5 a 8 DIV. Cuatro días después se realizó una OGD de 75 minutos. 24 horas después fueron teñidas durante una hora con Ioduro de Propidio (PI), fijadas y teñidas con Hoechst. Se realizaron fotos de cada tratamiento en el microscopio de fluorescencia y se llevó a cabo el conteo de células apoptóticas y necróticas según lo descrito en Material y Métodos. Resultados representativos de tres experimentos independientes. En cada ensayo se realizaron cuadruplicados para cada condición y se contaron un mínimo de 1000 células.

ERK5 disminuye tras la isquemia *in vivo* en cerebro de ratas Sprague-Dawley

Por último, se estudió si la degradación de ERK5 observada en el modelo de isquemia *in vitro* (OGD) también era observada *in vivo* en cerebros de rata sometidos a isquemia.

Los ensayos con animales fueron realizados por el equipo de la Dra. Anna Planas de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB-CSIC). Para llevar a cabo estos estudios, ratas macho adultas de la cepa Sprague–Dawley fueron expuestas a 50 minutos isquemia *in vivo* por oclusión de la arteria cerebral media. Los animales fueron sacrificados sin anestesia a diferentes tiempos de reperusión y los córtex separados y homogenizados. La figura 85 muestra el inmunoblot de las muestras utilizando los distintos anticuerpos. Se aprecia una disminución de ERK5 a 6 y 24 horas de reperusión. No se aprecian cambios en ERK1/2, utilizado como control de carga. Como cabía esperar, los niveles de Hsp70 β aumentan en respuesta a la isquemia. El aumento de Hsp70 β es mayor a medida que incrementa el tiempo de reperusión y sirve como control de que la isquemia ha funcionado.

De este ensayo se concluye que la disminución en los niveles de ERK5 que se había observado tras la OGD ocurre también en córtex de cerebro de ratas sometidas a isquemia cerebral.

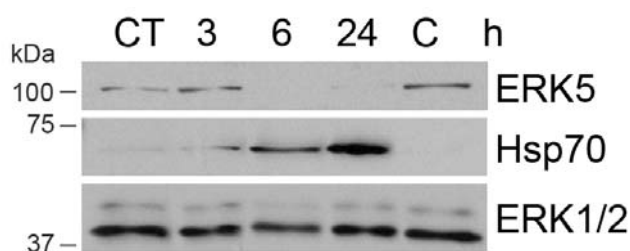


FIGURA 85. Los niveles de proteína ERK5 disminuyen en el córtex de cerebro de ratas Sprague–Dawley en respuesta a la isquemia *in vivo*. Ratas macho adultas de la cepa Sprague–Dawley fueron expuestas a 50 minutos isquemia *in vivo* por oclusión de la arteria cerebral media, sacrificadas sin anestesia a diferentes tiempos de reperusión (3, 6, 24) y los córtex fueron separados, homogenizados y analizados mediante inmunoblot. CT. Contralateral; C: rata control no operada; los tiempos indican las horas de reperusión a las que fueron sacrificados los animales.

A continuación se estudió la disminución de los niveles de ERK5 en cerebro de rata sometida a isquemia mediante ensayos de inmunohistoquímica. Después de realizar varias pruebas, se comprobó que el único anticuerpo anti-ERK5 apto para ensayos de inmunohistoquímica era un anticuerpo anti-ERK5 de Santa Cruz (sc-5626). En primer lugar, se determinó la localización subcelular de ERK5 en córtex de cerebro de rata, utilizando en paralelo el anticuerpo anti-NeuN como marcador de núcleos neuronales. La figura 86 muestra la co-localización de ERK5 y NeuN en los núcleos neuronales.

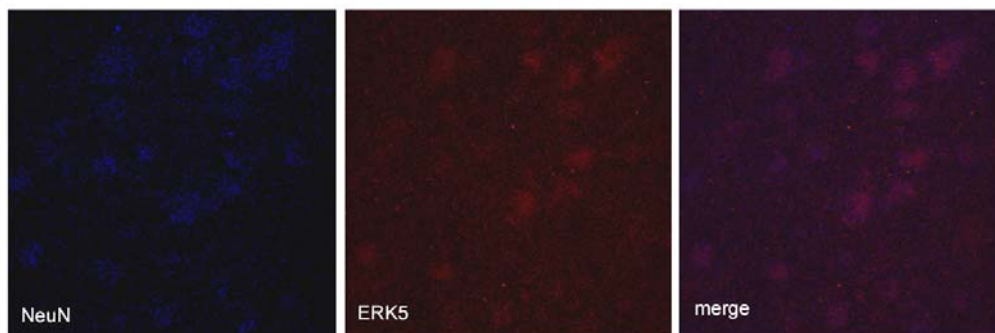


FIGURA 86. ERK5 se localiza en el núcleo de las neuronas. Ratas macho adultas de la cepa Sprague–Dawley fueron expuestas a 50 minutos isquemia *in vivo* por oclusión de la arteria cerebral media, sacrificadas sin anestesia tras 4 horas de reperusión. Los córtex de cerebro fueron analizados mediante inmunohistoquímica.

Seguidamente se estudió la distribución de ERK5 en core y penumbra isquémicos de los córtex de cerebro de rata respecto al control no isquémico. Las figuras 87 y 88 muestran los resultados preliminares obtenidos utilizando animales sacrificados después de 4 o 24 horas de reperusión (figuras 87 y 88, respectivamente). Para estos ensayos se utilizó el marcador nuclear Topro. La figura 87.A muestra ,utilizando diferentes anticuerpos, la tinción inmunohistoquímica del córtex del animal sacrificado tras 4 horas de reperusión. En el control contralateral (no isquémico), se aprecia el marcaje para ERK5. Este marcaje aumenta en algunas zonas del core isquémico (CORE1), pero desaparece prácticamente por completo en la mayor parte del core (CORE2). En la región de penumbra isquémica la señal de ERK5 parece ligeramente mas intensa que en el control del hemisferio contralateral. En la figura 87.B se observa que la disminución en los niveles de ERK5 es específica de esta kinasa, ya que los niveles de ERK1/2 no se ven afectados tras la isquemia/reperusión. El estudio del animal sacrificado después de 24 horas de reperusión (figura 88) muestra resultados similares, a excepción de que no se encuentran áreas del core con un

aumento del marcaje de ERK5, sino que todas las zonas del núcleo isquémico presentan una disminución de la señal de ERK5.

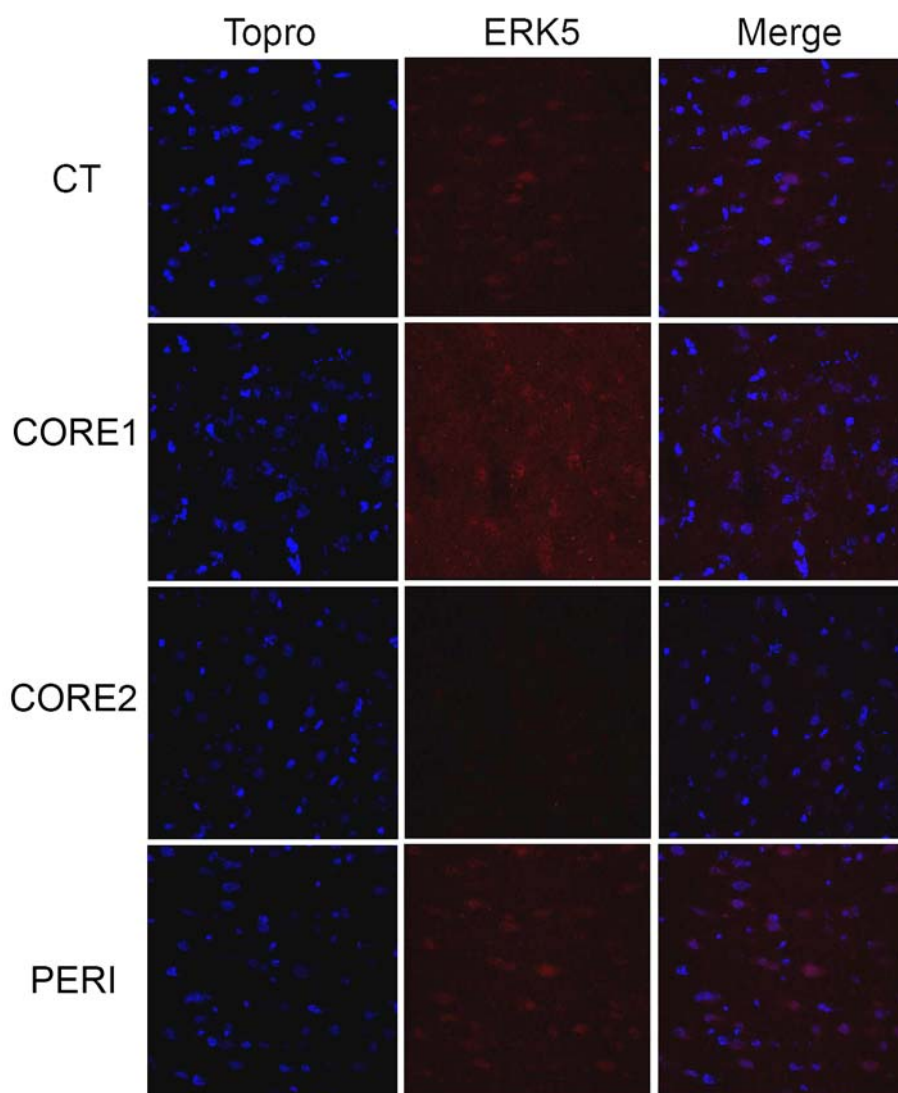
A

FIGURA 87.A. Niveles de proteína ERK5 en núcleo y penumbra del córtex de cerebro de rata sometida a isquemia *in vivo* y reperfundida durante 4 horas. Ratas macho adultas de la cepa Sprague–Dawley fueron expuestas a 50 minutos de isquemia *in vivo* por oclusión de la arteria cerebral media y sacrificadas sin anestesia tras 4 horas de reperfusión. Los córtex fueron analizados mediante inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo anti-ERK5 y el marcador nuclear Topro. CT. Contralateral; CORE: núcleo de la isquemia; PERI: zona periférica al núcleo isquémico.

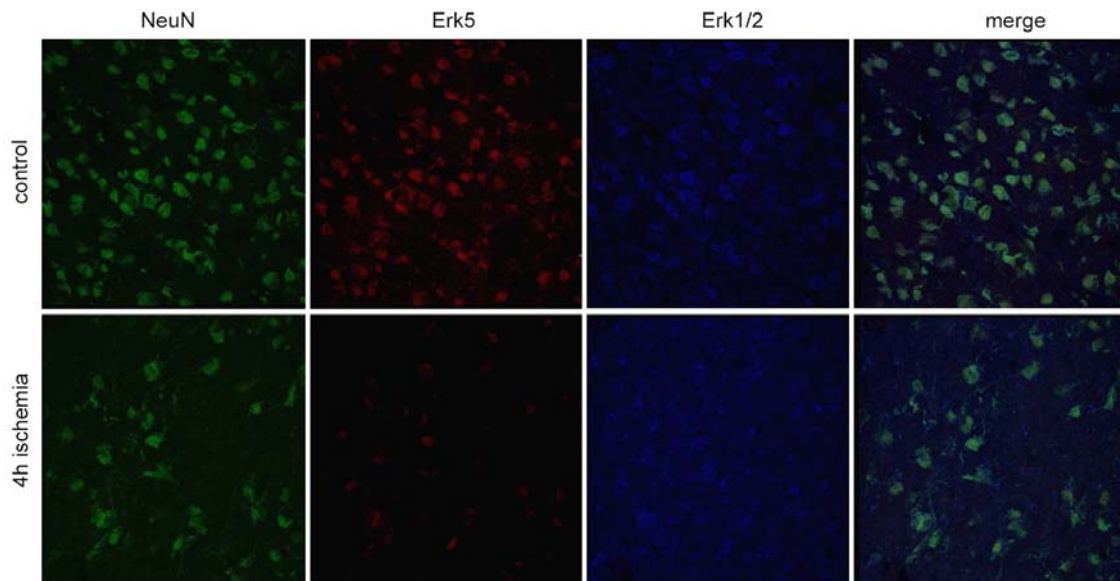
B

FIGURA 87.B. Niveles de proteína ERK5 en núcleo y penumbra del córtex de cerebro de rata sometida a isquemia *in vivo* y reperfundida durante 4 horas. Ratas macho adultas de la cepa Sprague–Dawley fueron expuestas a 50 minutos de isquemia *in vivo* por oclusión de la arteria cerebral media y sacrificadas sin anestesia tras 4 horas de reperfusión. Los córtex fueron analizados mediante inmunohistoquímica utilizando anticuerpos anti-NeuN, anti-ERK5 y anti-ERK1/2. CT. Contralateral; CORE: núcleo de la isquemia; PERI: zona periférica al núcleo isquémico.

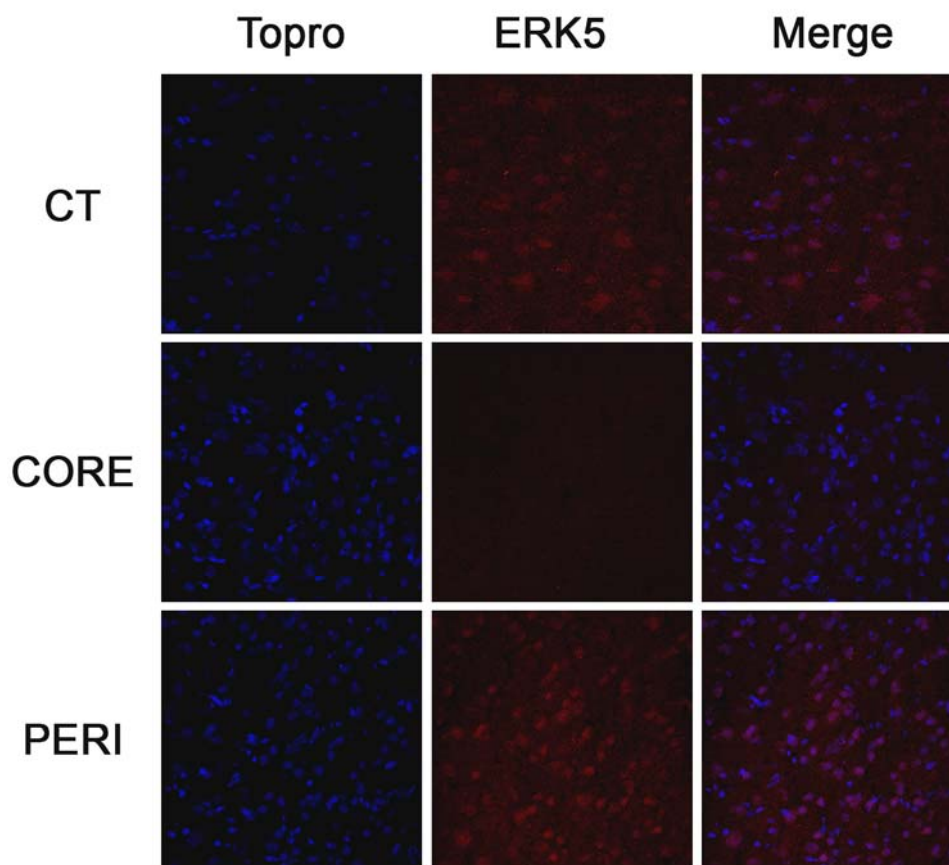


FIGURA 88. Los niveles de proteína ERK5 disminuyen en el núcleo de la isquemia en córtex de cerebro de ratas sometidas a isquemia *in vivo* y reperfundidas durante 24 horas. Ratas macho adultas de la cepa Sprague–Dawley fueron expuestas a 50 minutos isquemia *in vivo* por oclusión de la arteria cerebral media, sacrificadas sin anestesia tras 24 horas de reperfusión. Los córtex fueron analizados mediante inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo anti-ERK5 y el marcador nuclear Topro. CT. Contralateral; CORE: núcleo de la isquemia; PERI: zona periférica al núcleo isquémico.

Así, ERK5 desaparece completamente del core isquémico, la zona donde la muerte se produce con más rapidez. Los resultados de los ensayos inmunohistoquímicos corroboran lo observado mediante inmunoblot, y pone de manifiesto que la disminución en los niveles de proteína ERK5 se producen en respuesta a las isquemia *in vitro* e *in vivo*.

VII. DISCUSIÓN

1. CARACTERIZACIÓN DE ERK5 EN CÉLULAS NEURONALES

En 1995 fue descubierta una nueva vía de señalización de MAPK, la vía MEK5-ERK5 (Zhou et al., 1995; Lee et al., 1995). Se trata de una vía importante en el desarrollo embrionario como demuestra la letalidad de los embriones *knock out* de ERK5 (Yan et al., 2003; Regan et al., 2002) y de su activador MEK5 (Wang et al., 2005). Esta vía también juega un papel fisiológico importante, al estar implicada en enfermedades cardiovasculares (Pi et al., 2005; Kohara et al., 2001), carcinogénesis (Mulloy et al., 2003; Hayashi y Lee, 2004; Wang y Tournier, 2006) y en supervivencia neuronal (Cavanaugh, 2004). Así, ERK5 tiene un papel relevante en sistema nervioso, dada su activación frente a neurotrofinas (Watson et al., 2001; Liu et al., 2003), frente al estrés oxidativo producido por *reactive oxygen species* (ROS) (Touyz et al., 2003), tras la isquemia cerebral (Wang et al., 2004; Wang et al., 2006) y su papel en la especificación de fenotipo neuronal (Liu et al., 2006).

Un paso importante para entender la función de las cascadas de MAPK es la identificación de sus sustratos. Poco se conoce aún sobre los sustratos y las proteínas que interaccionan con ERK5. La mayoría de los sustratos descritos han sido únicamente ensayados *in vitro*, a excepción del factor de transcripción MEF2C (Yoon et al., 2005). Un estudio *in vivo* describe la interacción de este factor de transcripción con ERK5 y cómo esta kinasa lo fosforila. Otra proteína que interacciona con ERK5 *in vitro* e *in vivo* es 14-3-3 β (Zheng et al., 2004), aunque no se ha demostrado que sea sustrato de ERK5.

En este trabajo se ha utilizado la metodología TAP en la línea celular SH-SY5Y para identificar proteínas que interaccionan con ERK5. Se escogió la línea celular SH-SY5Y como modelo de estudio por tratarse de un modelo neuronal ampliamente utilizado. El neuroblastoma es el tumor sólido más común en niños y se origina a partir de precursores de neuronas simpáticas de la cresta neuronal que no llegan a completar su diferenciación. Las células SH-SY5Y son un subclon de la línea de neuroblastoma humano SK-N-SH y presentan un fenotipo catecolaminérgico con características dopaminérgicas. Además, se diferencian a neuronas en respuesta a ácido retinoico y BDNF.

La metodología TAP requiere de una puesta a punto inicial previa a la purificación, que incluye el estudio de la línea celular y la generación y amplificación de los clones que sobre-expresan las proteínas recombinantes TAP.

En este estudio se corrobora la activación de ERK5 en células HeLa estimuladas con EGF, H₂O₂ y Sorbitol a las concentraciones y tiempos descritos en la bibliografía (Kato et al., 1998; Abe et al., 1996). La herramienta utilizada para medir la activación de ERK5 ha sido el *shift* o retraso en la migración electroforética de la proteína hiperfosforilada (activa) en el inmunoblot utilizando anticuerpos específicos anti-ERK5.

En este trabajo se describe por primera vez la activación de ERK5 en células SH-SY5Y en respuesta a la estimulación con EGF o Sorbitol. A diferencia de lo que ocurre en células HeLa, en neuroblastomas el estrés osmótico y oxidativo activan en menor grado a ERK5. Dado que ERK5 es activada por estrés (igual que pasa con las MAPK p38 y JNK) y por mitógenos y factores de crecimiento (como ocurre con ERK1/2), podría darse el caso que diferentes tipos celulares ERK5 se activen mayoritariamente por un tipo de estímulo u otro. El hecho de que en los inmunoblots de lisados de células SH-SY5Y la banda correspondiente a ERK5 hiperfosforilada sea más tenue que en células HeLa, no implica que sea menos activa, ya que se ha descrito que la banda no hiperfosforilada también es activa (Mody et al., 2003). Estos estudios demuestran que las células que se iban a utilizar como modelo de estudio para la metodología TAP contenían una proteína ERK5 funcional, capaz de activarse en respuesta a diferentes estímulos.

Los trabajos que describen la localización subcelular de ERK5 ponen de manifiesto diferencias en función del tipo celular y del estado de activación de las células (Buschbeck y Ullrich, 2005). Algunos hacen referencia a la translocación nuclear de ERK5 recombinante (Kamakura et al., 1999; Barros y Marshall, 2005) y endógena (Watson et al., 2001) una vez activada, aunque otros estudios describen una localización tanto nuclear como citosólica de ERK5 endógena en células HeLa y Rat1 no activadas (Raviv et al., 2004). La localización subcelular de ERK5 en neuroblastomas no ha sido descrita previamente en la bibliografía. En este trabajo, el fraccionamiento subcelular del lisado de neuroblastoma y el análisis por inmunoblot de ERK5 muestra una localización pancelular de esta proteína en células no activadas, igual que lo observado por Raviv *et al.* en células HeLa y Rat-1. Sin

embargo, al someter a fraccionamiento subcelular las células SH-SY5Y transfectadas con el activador constitutivamente activo MEK5-DD sólo se aprecia hiperfosforilación de ERK5 en el citosol. En otras líneas se ha descrito que la presencia de ERK5 activa en el núcleo podría ser debida a la translocación del activador *upstream* MKK2 (Raviv et al., 2004). De estos estudios se deduce que la localización nuclear de ERK5 es diferente de la de ERK1/2 en células en reposo, indicando que cada una de estas cascadas de señalización celular utilizan diferentes mecanismos para transmitir las señales extracelulares a sus dianas nucleares (Raviv et al., 2004).

2. IDENTIFICACIÓN DE COMPLEJOS DE PROTEÍNAS MEDIANTE TAP

Muchas proteínas se encuentran formando complejos en la célula. La cromatografía en gel filtración permite fraccionar complejos de proteína en condiciones nativas. En los resultados obtenidos mediante filtración en gel de células SH-SY5Y y HeLa se observa que ERK5 endógena se encuentra en forma de dos complejos: uno de alto peso molecular (>700kDa) y otro en torno a 110 kDa, que corresponde con su peso molecular aparente. La activación de ERK5 endógena provoca la formación de complejos de peso molecular >700 kDa y 200 kDa. Así, los complejos formados varían según el estado de activación de la kinasa. El complejo de unos 200 kDa obtenido en células activadas podría tratarse del dímero de ERK5. En la bibliografía se describe la dimerización de ERK5 (Yan et al., 2001), igual que ocurre con ERK1/2 (Khokhlatchev et al., 1998). Serán necesarios futuros ensayos de electroforesis en condiciones no desnaturalizantes e inmunoblot para comprobar que se trata del dímero de ERK5. Sin embargo, y asumiendo la dimerización de ERK5, nuestros resultados contrastan con los obtenidos por Yan *et al.* utilizando células CHO-K1, donde se observa el dímero de ERK5 tanto en células activadas como inactivadas (Yan et al., 2001). Una posibilidad consiste en que la dimerización de ERK5 dependa del tipo celular estudiado (igual que ocurre con su localización citoplasmática). Es decir, que en determinados tipos celulares ERK5 formaría dímeros en condiciones de no activación y en otras células sería necesaria la activación para la dimerización, como ocurre con ERK1 y 2 (Khokhlatchev et al., 1998). Por otro lado, la aparición de una población de ERK5 de alto peso molecular (>700 kDa) podría corresponder a ERK5 asociada a otras proteínas.

Una vez observado que ERK5 forma complejos de alto peso molecular se procedió a la identificación de las proteínas que interaccionan con ERK5 mediante el método TAP. En primer lugar se obtuvieron líneas de neuroblastoma que expresaban de forma estable las proteínas recombinantes TAP-control, TAP-ERK5wt y TAP-ERK5 Δ CT. Los clones que sobre-expresaban la proteína recombinante TAP-MEK5 presentaban crecimiento lento y un alto índice de muerte celular. Esto puede deberse a que un exceso de MEK5 resulte tóxico para la célula. Es frecuente la toxicidad celular debida a la sobre-expresión de proteínas kinasas, como se ha observado en la Unidad de Fosforilación de Proteínas del MRC de Dundee (Escocia). Este laboratorio observó que la sobre-expresión de las serina-treonina kinasas BRSK1, BRSK2, TAO1, TAO2 y NEK2 con el fin de obtener líneas estables resultaba tóxica para las células. El problema se evita mediante la expresión de un mutante inactivo de la kinasa. En nuestro caso se ha obtenido el correspondiente mutante de MEK5 inactivo y se pretende obtener la línea estable en células SH-SY5Y.

La localización subcelular de la proteína sobre-expresada se estudió mediante microscopía de fluorescencia, y se observaron diferencias en la localización subcelular de la proteína recombinante TAP-ERK5wt (citoplásmica) respecto a la proteína recombinante que carece de cola C-terminal TAP-ERK5 Δ CT (difusa por toda la célula). Estos resultados resaltan la importancia de la cola C-Terminal de ERK5 en su localización subcelular, tal y como describen Buschbeck *et al.* en su trabajo, donde observaron que la transfección de ERK5 recombinante *wild type* en células COS-7 presentaba una localización predominantemente citoplásmica, mientras que la sobre-expresión de un mutante de delección sin los últimos 100 aminoácidos mostraba una localización predominantemente nuclear (Buschbeck y Ullrich, 2005).

En nuestro sistema, la proteína recombinante TAP-ERK5wt no transloca a núcleo tras su activación con EGF, ni tras la expresión de MEK5-DD. Es decir, la proteína quimera TAP-ERK5wt es citoplásmica tanto en condiciones basales como tras su activación. Este resultado contrasta con los obtenidos en el fraccionamiento subcelular de neuroblastomas con la proteína endógena, donde se observó que ERK5 endógena basal se encuentra en el citoplasma y el núcleo de estas células, aunque tras su activación la forma hiperfosforilada (activa) sólo se observa en citosol. Esto está en consonancia con el trabajo de Raviv *et al.*, 2004, donde se alerta de las diferencias en la localización subcelular de ERK5 endógena y recombinante en

diferentes tipos celulares. Se ha sugerido que estas diferencias en la localización son debidas a la existencia en determinados tipos celulares de sitios de anclaje nucleares a los que se une ERK5, que quedarían saturados por la proteína endógena.

Una de las limitaciones de la metodología TAP utilizada en este trabajo es la pérdida de la fracción nuclear, debido a la utilización del detergente NP-40 en el tampón de lisis. En nuestro caso, la proteína recombinante utilizada como cebo es mayoritariamente citosólica en células SH-SY5Y. Así pues, la metodología TAP utilizada en este trabajo permitiría la identificación de las proteínas citosólicas que interaccionen con ERK5, pero no de las nucleares.

En este trabajo se ha optimizado el protocolo de la metodología TAP publicado por Rigaut *et al.* en 1999 para su uso en células SH-SY5Y. Para empezar se realizó una centrifugación a 23.000 g con el fin de eliminar los residuos no citosólicos y obtener una fracción más limpia. Además, la utilización de dos resinas diferentes en la purificación, Agarosa-IgG y Sepharose-calmodulina, minimiza la unión inespecífica de proteínas a la resina. Por otra parte, la generación de líneas celulares estables que expresan niveles bajos de la proteína cebo maximiza la unión del cebo a las proteínas endógenas (Al-Hakim *et al.*, 2005). Así, se prefirió aumentar la cantidad de extracto inicial a escoger clones que sobre-expresaran niveles elevados de proteína cebo. En este sentido, fue necesario aumentar la cantidad de extracto celular inicial para la purificación, ya que la expresión de los vectores TAP en células SH-SY5Y era leve. Así se pasó de los 50 discos de 15 cm utilizados por otros autores para cada clon (Al-Hakim *et al.*, 2005) a 100 ó 200 discos de 15 cm.

En el presente estudio se han llevado a cabo dos purificaciones TAP. En la primera purificación se partió del lisado de 100 discos de 15 cm para cada clon, mientras que en la segunda purificación se realizó a partir de lisado de 200 discos de 15 cm. Se recortaron 47 y 61 bandas respectivamente y se identificaron los positivos por LC-MS/MS. De las proteínas identificadas se descartaron las proteínas de citoesqueleto como actina y tubulina a pesar de su elevada puntuación, ya que aparecen frecuentemente en este tipo de purificación. Del análisis de los resultados obtenidos en la segunda purificación, donde se partió de mayor cantidad de lisado, destaca la ausencia de diferencias en las proteínas identificadas al utilizar como cebo ERK5wt o ERK5 Δ CT, lo que parecería indicar que ERK5 se une a las proteínas identificadas mediante su dominio kinasa.

De los resultados obtenidos destacaban principalmente dos proteínas: Hsp90 β y Piruvato kinasa M2 (PKM2). Hsp90 obtuvo un *score* de 865 en la primera purificación y 1065 en la segunda y el 55,3% de la secuencia total de la proteína identificado en el fragmento de gel analizado. Por otra parte piruvato kinasa tipo 2 apareció con un *score* de 347 en la purificación 2 y un 40,2% de la secuencia identificada por espectrometría de masas.

Otra proteína identificada mediante TAP con una puntuación elevada (280) fue 14-3-3. Zheng *et al.* describieron la interacción de 14-3-3 ϵ con ERK5 mediante la metodología *yeast two hybrid*. En su trabajo describen en células HEK293 la unión de 14-3-3 β al residuo fosforilado de ERK5 serina 486, lo que provoca la estabilización de la forma inactiva de ERK5 al impedir su interacción con la kinasa activadora MEK5 (Zheng *et al.*, 2004). La proteína 14-3-3 se une a diversas kinasas, incluyendo ASK (*Apoptosis signal-regulating kinase*), proteína kinasa C- μ , y p90RSK, e inhibe su actividad (Zheng *et al.*, 2004), de manera que juega un papel importante en señalización. Hasta la fecha se han identificado 7 isoformas altamente conservadas de 14-3-3 (β , ϵ , γ , η , σ , τ , ζ), que forman homo- o hetero-dímeros. Algunos estudios indican que las diferentes isoformas de 14-3-3 no son selectivas en cuanto a la interacción con sus ligandos (Fu *et al.*, 2000), lo que podría explicar que en la purificación TAP llevada a cabo en este trabajo se hayan obtenido 5 isoformas de 14-3-3 (ϵ , γ , η , τ , ζ) interaccionando con ERK5. La identificación de 14-3-3, una proteína cuya interacción con ERK5 ha sido previamente validada, puede considerarse un control positivo de la metodología TAP utilizada.

Por otra parte, en nuestro laboratorio se ha validado la interacción de ERK5 y ATP sintasa α , otro de los positivos obtenidos mediante la metodología TAP. La ATP sintasa es una enzima situada en la cara interna de la membrana interna de las mitocondrias y de la membrana de los tilacoides de los cloroplastos. Se encarga de la fosforilación oxidativa del ATP, es decir, de sintetizar ATP a partir de ADP, un grupo fosfato y la energía suministrada por protones (H⁺). Margarita Espona validó la interacción entre ATP sintasa α y ERK5 endógenas y advirtió la presencia de ERK5 en mitocondria de células HeLa (Espona, 2008).

Hsp90

Hsp90 es una proteína chaperona que regula la conformación, estabilidad y activación de unas 100 proteínas (Belova et al., 2008). Ensayos de *two-hybrid* en levadura describieron la interacción entre ERK5 humana y Hsp90 de levadura (Truman et al., 2006), pero esta interacción no ha sido confirmada en células de mamífero.

Frecuentemente, se utilizan inhibidores de Hsp90 para probar que está implicada en una vía (Basso et al., 2002; Nomura et al., 2005). En nuestro caso, dos inhibidores de Hsp90, geldanamicina y radicicol, producen una disminución en los niveles de ERK5 en células HeLa y SH-SY5Y, vinculando funcionalmente ambas proteínas.

Mediante ensayos de co-inmunoprecipitación se ha demostrado que HSP90 β endógena co-inmunoprecipita con ERK5 recombinante en dos líneas celulares diferentes, lo que indica que ambas proteínas interaccionan. No se apreciaron diferencias en la co-inmunoprecipitación con Hsp90 β de ERK5 activa e inactiva, de manera que parece que Hsp90 es necesaria para el correcto plegamiento de ERK5, independientemente de su estado de activación. No ha sido posible co-inmunoprecipitar ambas proteínas recombinantes, lo que podría indicar que se trata de un complejo trimérico que necesita de una tercera proteína, como sucede con otras proteínas cliente de Hsp90. La función de Hsp90 depende de una batería de proteínas co-chaperonas que regulan la actividad ATPasa de Hsp90 o que dirigen su interacción con proteínas cliente específicas (Johnson y Brown, 2009).

Se han identificado 12 proteínas co-chaperonas para Hsp90, pero falta por definir el mecanismo biológico de las mismas, y las combinaciones en las que interaccionan con Hsp90 (Roe et al., 2004). Destacan principalmente dos grupos de proteínas co-chaperonas:

1. Co-chaperonas que poseen un dominio TPR (estructura helicoidal formada por la concatenación de *hairpins* helicoidales de unos 34 residuos), que se une a un motivo MEEVD del extremo C-terminal de Hsp90. En este grupo de co-chaperonas se encuentran WISp39, que parece actuar como factor de especificidad para el reclutamiento de proteínas cliente, Hop/Sti1/p60 y el receptor de membrana mitocondrial externa Tom70, que facilitan la unión de complejos de proteínas unidos a Hsp90 a otras proteínas. Algunas co-chaperonas con dominio

TPR incorporan funcionalidad enzimática adicional. Por ejemplo, las inmunofilinas Cyp40 y FKBP son peptidil-prolil isomerasas, PP5 es una proteína Ser/Thr fosfatasa, y CHIP es una E3/E4-ubiquitin ligasa (Pearl y Prodromou, 2006).

2. Co-chaperonas que regulan la actividad ATPasa de Hsp90. Se conocen 3 co-chaperonas que tienen un efecto inhibitor en el ciclo ATPasa de Hsp90 (Hop/Sti1, Cdc37 y p23) y dos que tienen un efecto activador (Aha1 y CPr6) (Pearl y Prodromou, 2006)

Se ha descrito la unión de un complejo heterodimérico Hsp90/Cdc37 al dominio catalítico de diversas kinasas, lo que influye en la actividad de las kinasas a las que se une. Algunas de las proteínas que requieren de la interacción con Hsp90/Cdc37 son CDK4, IKK (*inhibitory κ B kinase*), Raf1 o MOK (*MAPK-overlapping kinase*), Akt (Basso et al., 2002), LKB1 (Boudeau et al., 2003). La interacción Hsp90/Cdc37 con IKK es necesaria para su activación por el factor de necrosis tumoral (Chen et al., 2002). La interacción de CDK4 con Hsp90/Cdc37 es necesaria para su correcto ensamblaje con la ciclina D (Dai et al., 1996). Teniendo en cuenta estos antecedentes, se pone de manifiesto la necesidad de realizar ensayos de inmunoprecipitación de Hsp90 y ERK5 recombinantes, co-transfectando la proteína Cdc37, para comprobar si es necesaria para la interacción Hsp90-ERK5. Sin embargo, la proteína co-chaperona Cdc37 no ha sido purificada mediante la metodología TAP, lo que sugiere que tal vez no sea la proteína co-chaperona que favorece la unión ERK5-Hsp90. Será necesario determinar la proteína/as co-chaperón/es que utiliza Hsp90 para la unión a ERK5, de lo contrario la proteína Hsp90 transfectada no es funcional. En este sentido, una de las proteínas identificadas mediante la purificación TAP es la Peptidil-prolil isomerasa A (o ciclofilina A). Teniendo en cuenta que otras peptidil-prolil isomerasas (Cyp40 y FKBP) han sido descritas como co-chaperonas de Hsp90 (Pirkl y Buchner, 2001), podría darse el caso de que la PPIA actuara como co-chaperona de Hsp90. Será necesario realizar los correspondientes ensayos de co-inmunoprecipitación con Hsp90, PPIA y ERK5 para comprobarlo.

La sobre-expresión de ERK5 en líneas celulares presenta una expresión relativamente baja, no responde a la activación por EGF y es poco activa en respuesta al activador constitutivamente activo MEK5DD. La identificación de la co-

chaperona de Hsp90 podría resultar de suma utilidad en el estudio de la proteína ERK5 recombinante.

Hsp90 tiene dos isoformas: Hsp90 α y β , que son consecuencia de una duplicación genética hace unos 500 millones de años. Ambas isoformas tienen una identidad del 76%. Hsp90 β es ligeramente más larga que la isoforma α (originalmente denominada Hsp86 o Hsp84) y es la forma que se expresa constitutivamente (Csermely et al., 1998). Por su parte, Hsp90 α es inducible y suele expresarse en células tumorales (Barginear et al., 2008). En nuestro estudio, no se observó ERK5 endógena ni recombinante en los inmunoprecipitados de la forma α de Hsp90. Podría ser que las pequeñas diferencias en la secuencia entre Hsp90 α y β fueran suficientes para su interacción con otras proteínas. Otra posibilidad sería que el anticuerpo utilizado para inmunoprecipitar Hsp90 α compitiera con el sitio de unión a ERK5. Serán necesarios futuros ensayos utilizando otros anticuerpos anti-Hsp90 α para definir si realmente interacciona con ERK5.

Una de las funciones de Hsp90 es la estabilización de las proteínas con las que interacciona, previniendo así su degradación por el proteosoma. El tratamiento de células HeLa o SH-SY5Y con geldanamicina o radicicol disminuye drásticamente los niveles de ERK5. En esta línea, observamos que el tratamiento con el inhibidor del proteosoma MG-132, previo al uso de radicicol, revertía la degradación de ERK5, y conllevaba la aparición de ERK5 mal plegada en el precipitado. Se sabe que los inhibidores de Hsp90 inducen la disociación de Hsp90 de sus proteínas cliente, exponiendo lugares para la ubiquitinación o SUMOilación. Esta hipótesis se corrobora en nuestros resultados preliminares, donde se aprecia que células tratadas con geldanamicina e inhibidor de proteosoma MG-132 presentan un aumento de la ubiquitinación de ERK5, detectado mediante inmunoblot, como pasa para otras proteínas kinasas como Chk-1 (Nomura et al., 2005), Akt (Basso et al., 2002) o SGK-1 (Belova et al., 2008). En la actualidad se están llevando a cabo ensayos para establecer el mecanismo por el que ERK5 es degradada tras la inhibición de Hsp90, y si esta degradación es producida únicamente por ubiquitinación.

Recientemente Woo *et al.* han descrito la SUMOilación de ERK5 en respuesta a la exposición de las células a especies reactivas de oxígeno (ROS) y a *advanced glycation end products* (AGE), que resultaba en la inhibición de la actividad transcripcional de ERK5. SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) une covalentemente

ciertos residuos de proteínas diana y altera diversas funciones proteicas (localización subcelular, interacciones proteicas, unión a DNA o funciones de transactivación) dependiendo del sustrato (Woo et al., 2008). Por ello, se deberá estudiar si la SUMOilación de ERK5 afecta a su ubiquitinación o a su interacción con Hsp90.

Por último, se ha descrito que la inhibición de Hsp90 con geldanamicina resulta en una disminución en la fosforilación y actividad de ciertas proteínas kinasas, como es el caso de SGK-1 (*Serum y Glucocorticoid regulated Kinase-1*) (Belova et al., 2008). Por ello, en la actualidad se están llevando a cabo los correspondientes ensayos con el fin de comprobar si éste es también el caso para ERK5.

PKM2

Se decidió estudiar la interacción de PKM2 con ERK5 por dos motivos principales: la elevada puntuación obtenida en la purificación TAP (347) y el resultado del análisis *in silico* de PKM2. Dicho análisis mediante el programa Motif Scan del algoritmo Scansite reveló la presencia de un dominio de interacción a MAP kinasas (*D-domain*) que se localizaba en una zona exterior y accesible para interactuar con otras proteínas. Por otro lado, la búsqueda en bases de datos de residuos fosforilados dio como resultado varios residuos, de los cuales la serina 37 era fosforilada *in vivo* en respuesta a EGF.

La enzima piruvato kinasa cataliza la desfosforilación de fosfoenolpiruvato (PEP) a piruvato, con la correspondiente formación de ATP. Todas las células proliferativas expresan la isoenzima PKM2, que puede presentar una forma tetramérica altamente activa o una dimérica con baja afinidad por PEP (Rosenberger et al., 2005). El ratio tetrámero/dímero es regulado por intermediarios metabólicos como fructosa-1,6-bisfosfato y serina, que inducen la activación de la tetramerización, pero también puede ser activado por oncogenes como la kinasa pp60^{v-src}.

La isoforma PKM2 se expresa exclusivamente en embrión, pero se re-expresa en células cancerígenas. La mayoría de células no tumorales del organismo adulto son quiescentes, y utilizan los nutrientes para producir energía para mantener la maquinaria celular. Sin embargo, las células cancerígenas deben dividir sus nutrientes entre la producción de energía y la síntesis de macromoléculas para afrontar el crecimiento celular y la replicación del DNA. Estas diferencias fueron observadas por Otto Warburg cuando describió que las células tumorales necesitan mayores aportes de glucosa y muestran ratios de glucólisis y producción de lactato elevados incluso en presencia de oxígeno (WARBURG, 1956). Este fenotipo metabólico se denomina glucólisis anaeróbica o efecto Warburg. Recientemente se ha descubierto que la enzima piruvato kinasa desempeñar un papel en el origen del efecto Warburg (Christofk et al., 2008). Estos autores han observado que la expresión de una variable de *splicing* de piruvato kinasa PKM2, y su asociación a dominios fosfo-tirosina, permite a las células utilizar predominantemente la glucólisis anaeróbica en vez de la fosforilación oxidativa. Estos hallazgos ofrecen nuevas expectativas en la comprensión del metabolismo de las células tumorales. Entender

más a cerca de PKM2 (como se expresa, regulación de su *splicing* alternativo, qué proteínas fosfo-tirosina son importantes para su regulación en los tumores) puede abrir nuevos caminos para la terapia del cáncer basada en el control del metabolismo (Ferguson y Rathmell, 2008). Sin embargo, se desconoce el mecanismo que controla cuándo el piruvato pasa a lactato o forma parte de la fosforilación oxidativa. Es posible que además de la isoforma de piruvato kinasa otros aspectos afecten a la glucólisis aeróbica, como la asociación de piruvato kinasa a complejos de proteínas (Ferguson y Rathmell, 2008). Así, decidimos estudiar la posible interacción entre ERK5 y PKM2.

En primer lugar se estudió el patrón de elución de PKM2 mediante cromatografía en gel filtración de extractos de células SH-SY5Y y HeLa para evaluar la presencia de complejos de alto peso molecular. En células SH-SY5Y se observaron 3 poblaciones principales: una de 60 kDa que correspondería con la forma monomérica, otra de 120 kDa que correspondería con la forma dimérica y una población de alto peso molecular (>700 kDa), que podría corresponder con PKM2 formando complejos con otras proteínas. En células HeLa se obtuvieron resultados similares, excepto por el hecho de que no se apreciaba la población correspondiente a la forma dimérica. Destaca de estos resultados la ausencia de forma tetramérica de PKM2, pero sería necesario repetir el ensayo utilizando FBP para comprobar la existencia de la forma tetramérica de la proteína.

Dado el indicio de la formación de complejos por parte de PKM2 observado mediante filtración en gel, decidimos llevar a cabo ensayos de co-inmunoprecipitación con ERK5. Sin embargo, no conseguimos ver la interacción entre ambas proteínas endógenas ni recombinantes. Cabe decir que en el caso de Hsp90 sólo se apreciaba la interacción al inmunoprecipitar Hsp90 endógena y detección de ERK5 recombinante. En el caso de PKM2, sin embargo, no existen anticuerpos anti-PKM2 comerciales capaces de inmunoprecipitar PKM2.

También es posible que PKM2 y ERK5 no interactúen directamente, ya que la metodología TAP permite purificar complejos de proteínas. En este sentido, estudios previos han descrito la interacción de Hsp90 con PKM2 en células HEK293T (Falsone et al., 2005). Así, se llevarán a cabo ensayos en células HEK293T co-transfectando Hsp90, PKM2 y ERK5, para evaluar si las 3 proteínas forman un complejo.

Como se ha mencionado anteriormente, el estudio de la base de datos publicada por Olsen et al. en 2006 identifica la serina 37 de PKM2 como un residuo fosforilado *in vivo* en respuesta a EGF. Además, esta serina presenta una prolina en posición +1, necesaria para poder ser fosforilada por las MAP kinasas. Con todo, decidimos llevar a cabo ensayos de quinasas con las principales MAP kinasas que responden a EGF (ERK1, ERK2 y ERK5) utilizando PKM2 como sustrato, pero no se obtuvo señal de fosforilación de PKM2 en la autorradiografía correspondiente. Podría ser que estas kinasas no sean las responsables de la fosforilación de PKM2, pero también es posible que las condiciones del ensayo no fueran las óptimas para su fosforilación. Por ejemplo, podría ser necesaria la presencia de FBP.

Por otra parte, se estudió la actividad de PKM2 procedente de extractos de células HeLa y se observó que la actividad enzimática de PKM2 aumentaba en respuesta a EGF y Sorbitol. En el futuro habrá que estudiar el patrón temporal de activación de PKM2 frente a EGF y Sorbitol mediante cinéticas de dosis y concentración. Ensayos muy preliminares con Sorbitol (n=1) muestran un pico máximo de activación de PKM2 a 15 minutos que va disminuyendo progresivamente hasta llegar a los niveles basales tras dos horas de tratamiento.

Decidimos realizar mutagénesis dirigida de la serina 37 (residuo fosforilado *in vivo*) a alanina (para ver el efecto de la ausencia de fosforilación) y a ácido aspártico (para ver el efecto de una fosforilación constitutiva, ya que el residuo negativo mimetiza al grupo fosfato). La mutación de la serina 37 de esta proteína produce un aumento en la actividad cuando se cambió a ácido aspártico y un aumento aun mayor cuando se cambió a alanina, indicando que este residuo podría jugar un papel importante en la actividad de PKM2. A diferencia de lo observado con PKM2 endógena, PKM2 recombinante (mutantes y wt) no responden a FBP, aunque sí aumentan la actividad al aumentar la concentración del sustrato de la reacción PEP.

3. PAPEL DE ERK5 EN ISQUEMIA CEREBRAL

En este trabajo se ha utilizado un modelo de isquemia *in vitro* que permite una aproximación fiable a una situación de isquemia *in vivo* (Goldberg y Choi, 1993). Este modelo permite además llevar a cabo una caracterización bioquímica exhaustiva de la vía. Así, se escogió como modelo la privación de oxígeno y glucosa (OGD) en cultivos mixtos de neuronas corticales de rata. Existen otros modelos de infarto cerebral *in vitro*, como por ejemplo los cortes de tejidos organotípicos. Estos sistemas, a diferencia de los cultivos primarios, conservan la integridad del tejido, contienen células endoteliales y proinflamatorias y mantienen la estructura neuronal. Sin embargo, los cultivos primarios presentan las siguientes ventajas: permiten un control más riguroso de las condiciones, mayor accesibilidad de los fármacos y el seguimiento de cada tipo celular es mucho más sencillo. Así, los cultivos neuronales son un sistema adecuado, accesible y práctico para el estudio del daño neuronal isquémico (Malagelada, 2003). Además, la elección de este sistema presentaba otra ventaja, dado que es el modelo de estudio de isquemia cerebral de otro grupo de investigación de nuestro Departamento, el equipo del Dr. José Rodríguez. Esto resultaba extremadamente útil para la puesta punto de la metodología. El grupo del Dr. Rodríguez había estudiado previamente en qué grado contribuían la necrosis y la apoptosis a la muerte generada por la OGD. Observaron que en respuesta a la OGD se producía una muerte del 50% de las células, y que aproximadamente la mitad de la muerte era de tipo necrótico y la otra mitad de tipo apoptótico (Malagelada et al., 2005).

En diversos estudios se ha observado la activación de las MAP kinasas ERK1/2, JNK y p38 en respuesta a la isquemia y reperusión (Herdegen et al., 1998; Ozawa et al., 1999; Wang et al., 2004; Lennmyr et al., 2002). En este sentido, Xia *et al.* afirman que la activación de ERK1/2 protege a las células neuronales del daño isquémico, mientras que la de JNK y p38 contribuyen a la apoptosis (Xia et al., 1995). Wang et al. observaron un aumento de fosfo-ERK5 en hipocampo de ratas Sprague-Dawley sometidas a 15 minutos de isquemia global mediante la oclusión transiente de cuatro vasos (Wang et al., 2004). Estos autores también observaron que el preconditionamiento producía un aumento de la fosforilación de ERK5 en la región hipocampal CA1 que se mantenía entre 1 y 5 días (Wang et al., 2006). Este grupo también ha descrito que la vía ERK5-MEF2C contribuye al efecto anti-apoptótico del

precondicionamiento (Wang et al., 2008). Sin embargo, la activación de ERK5 descrita por estos autores mediante inmunohistoquímica debería ser cuestionada, ya que no existen anticuerpos que reconozcan específicamente la forma fosforilada de ERK5. Los anticuerpos anti-P-ERK5 comerciales reconocen también a P-ERK1/2. Por lo tanto, pueden ser utilizados en inmunoblot, ya que la diferencia de peso molecular entre estas kinasas permite distinguirlas, pero no en ensayos de inmunohistoquímica.

Tras los primeros ensayos de OGD de este trabajo, se observó una disminución en los niveles totales de proteína ERK5. Esta disminución era proporcional al daño producido por la isquemia. Es la primera vez que se describe que una MAP kinasa es degradada tras la isquemia.

Wang *et al.* observaron un aumento en la señal de P-ERK5 mediante inmunoblot, con un pico de activación a los 30 minutos de reperfusión (Wang et al., 2004). En nuestro modelo, a tiempo 0 post-OGD, ERK5 se encuentra totalmente desfosforilada. Se observa una hiper-fosforilación de ERK5 en respuesta a la reperfusión, con un máximo a 30 minutos post-OGD, a pesar de la gran disminución de los niveles de proteína total. Estos resultados están de acuerdo con los publicados previamente e indican que ERK5 se activa en respuesta a la reperfusión, y no a la isquemia. Esto indica que ERK5 puede jugar un papel durante la reperfusión en la muerte o supervivencia de las neuronas (como ocurre con otras MAP kinasas activadas tras la isquemia-reperfusión).

Con el objetivo de determinar si ERK5 estaba siendo degradada por alguna proteasa, se estudió la vida media de ERK5 y se determinó que es de unas 17 horas en cultivos mixtos de neuronas corticales y en células PC12. Se trata de una vida media larga si se compara con la de otras MAP kinasas como JNK1 cuya vida media es de 8 horas (Das et al., 2007). Así, la rápida disminución de ERK5 debía ser producida por la acción una proteasa activada en la isquemia. Se ensayaron diversos inhibidores de proteasas para estudiar su efecto en la disminución de ERK5 inducida por la isquemia-reperfusión. El pan-inhibidor de las caspasas Z-VAD y el inhibidor del proteosoma MG-132 no revertían la disminución en los niveles de ERK5 tras la OGD. Sin embargo, dos inhibidores diferentes de calpaína (ALLN y MDL 28170) revertía la disminución de los niveles de ERK5, señalando a calpaína como la responsable de la degradación de ERK5 en la OGD.

Las calpaínas son una familia de cisteína proteasas dependientes de calcio (Huang y Wang, 2001). Ambas proteínas son heterodímeros que contienen una subunidad grande de 80 kDa y una subunidad reguladora (CSS1) de 28 kDa (Asangani et al., 2006). Aunque se desconoce la regulación de la actividad de las calpaínas, se sabe que participan en variedad de procesos celulares, incluyendo remodelación del anclaje del citoesqueleto a la membrana, diferentes vías de transducción de señales, apoptosis y necrosis (Goll et al., 2003). Tras la isquemia, la entrada de calcio producida por la despolarización celular activa a las calpaínas. Además el kainato y glutamato liberados durante la cascada isquémica también inducen la activación de calpaína (Yamashima, 2004).

Las calpaínas mejor descritas son μ -calpaína o calpaína 1 (requiere concentraciones micromolares de calcio para activarse) y m-calpaína o calpaína 2 (requiere concentraciones milimolares de calcio para activarse) (Goll et al., 2003). En este trabajo se decidió utilizar m-calpaína en los ensayos *in vitro* dado que había sido descrito que ERK fosforila a esta isoforma *in vitro* e *in vivo* en respuesta a EGF (Glading et al., 2000; Shiraha et al., 2002a; Glading et al., 2004). Los estudios llevados a cabo por Glading et al. utilizaban PD98059 para inhibir MEK1. Sin embargo, y como se ha comentado anteriormente, este compuesto también inhibe a MEK5, de manera que ERK5 podría ser la responsable de la fosforilación de m-calpaína.

Así, se llevaron a cabo ensayos *in vitro* para comprobar la degradación de ERK5 por m-calpaína, y los resultados obtenidos apuntan a que ERK5 es sustrato de calpaína. Sin embargo, no fue posible determinar el lugar primario de corte de la proteasa, en parte debido a que la degradación de ERK5 es muy rápida (a pesar de disminuir la temperatura de la reacción y la concentración de la proteasa). Dado que numerosos estudios apuntan a la activación de μ -calpaína tras la isquemia cerebral (Yamashima, 2004), se evaluará en futuros ensayos la actividad *in vitro* de μ -calpaína utilizando ERK5 como sustrato.

Las proteínas diana de calpaína contienen típicamente secuencias PEST, denominadas así por ser ricas en prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S) y treonina (T), flanqueadas por aminoácidos cargados positivamente (Tompa et al., 2004). La comparación interespecífica de la secuencia de ERK5, revela dominios PEST altamente conservados en rata, ratón y humano (figura 89). La secuencia de

ERK5 presenta 4 regiones PEST con puntuaciones elevadas, que podrían ser lugares putativos de corte por calpaína (puntuaciones mayores de -5 se consideran significativas). Las puntuaciones obtenidas se encuentran entre +3 y +18, y son muy altas en comparación con las observadas por otros autores para proteínas sustrato de calpaína. Por ejemplo, el receptor de la hormona paratiroidea rPTH1R contiene una región PEST con un score de -0,08 validado como lugar de corte de calpaína (Shimada et al., 2005).

		PEST (+18)		-----
mERK5	1	MAEFLKEEDGEDGS	GEPEGRVKAEPVHTAASVVAKNLALLKARSFDVTFDVGDEYEI IET	
rERK5	1	MAEFLKEEDGEDGS	GEPEGRVKAEPVHSAASVVAKNLALLKARSFDVTFDVGDEYEI IET	
hErk5	1	MAEFLKEEDGEDGS	AEPFAREGTRPHERCLCSAKN-LALLKARSFDVTFDVGDEYEI IET	

mERK5	61	IGNGAYGVVSSARRRLTGQQVAIKKIPNAFVVTNAKRTLRELKILKHKFKHDNI IAIKDI		
rERK5	61	IGNGAYGVVSSARRRLTGQQVAIKKIPNAFVVTNAKRTLRELKILKHKFKHDNI IAIKDI		
hErk5	60	IGNGAYGVVSSARRRLTGQQVAIKKIPNAFVVTNAKRTLRELKILKHKFKHDNI IAIKDI		

mERK5	121	LKPTVPYGEFRSVYVVLDMESDLHQI IHSSQPLTLEHVRYFLYQLLRGLKYMHSAQVIH		
rERK5	121	LRPTVPYGEFRSVYVVLDMESDLHQI IHSSQPLTLEHVRYFLYQLLRGLKYMHSAQVIH		
hErk5	120	LRPTVPYGEFRSVYVVLDMESDLHQI IHSSQPLTLEHVRYFLYQLLRGLKYMHSAQVIH		

mERK5	181	RDLKPSNLLVNENCELKIGDFGMARGLCTSPAEHQYFMTEYVATRWRAPELMLSLHEYT		
rERK5	181	RDLKPSNLLVNENCELKIGDFGMARGLCTSPAEHQYFMTEYVATRWRAPELMLSLHEYT		
hErk5	180	RDLKPSNLLVNENCELKIGDFGMARGLCTSPAEHQYFMTEYVATRWRAPELMLSLHEYT		

mERK5	241	QAIDLWSVGCIFGEMLARRQLFPGKNYVHQLQLIMMVLGTPSPAVIQAVGAERVRAYIQS		
rERK5	241	QAIDLWSVGCIFGEMLARRQLFPGKNYVHQLQLIMMVLGTPSPAVIQAVGAERVRAYIQS		
hErk5	240	QAIDLWSVGCIFGEMLARRQLFPGKNYVHQLQLIMMVLGTPSPAVIQAVGAERVRAYIQS		

mERK5	301	LPPRQPVPWETVYPGADRQALSLLGRMLRFEP SARISAAAALRHPFLAKYHDPDDEPDCA		
rERK5	301	LPPRQPVPWETVYPGADRQALSLLGRMLRFEP SARISAAAALRHPFLAKYHDPDDEPDCA		
hErk5	300	LPPRQPVPWETVYPGADRQALSLLGRMLRFEP SARISAAAALRHPFLAKYHDPDDEPDCA		

mERK5	361	PPFDFAFDREALTRERIKEAIVAEIEDFHARREGIRQCIRFQPSLQPVASEPVC	PDVEME	
rERK5	361	PPFDFAFDREALTRERIKEAIVAEIEDFHARREGIRQCIRFQPSLQPVASEPVC	PDVEME	
hErk5	360	PPFDFAFDREALTRERIKEAIVAEIEDFHARREGIRQCIRFQPSLQPVASEPVC	PDVEME	
		PEST (+10)		
mERK5	421	SPWAPSGDCAMESPPPALPFCSDPAPDVTDLTLQPAPPASELAPPKREGAISDNTKAALK		
rERK5	421	SPWAPSGDCAMESPPPALPFCSDPAPDVTDLTLQPAPPASELAPPKREGAISDNTKAALK		
hErk5	420	SPWAPSGDCAMESPPPALPFCSDPAPDVTDLTLQPAPPASELAPPKREGAISDNTKAALK		
		PEST (+8)		
mERK5	481	AALLKSLRSRI RDGPSAPLEAEPFKPVTAQERQREEREKRRRRQERAKEREKRRQERER		
rERK5	481	AALLKSLRSRI RDGPSAPLEAEPFKPVTAQERQREEREKRRRRQERAKEREKRRQERER		
hErk5	480	AALLKSLRSRI RDGPSAPLEAEPFKPVTAQERQREEREKRRRRQERAKEREKRRQERER		

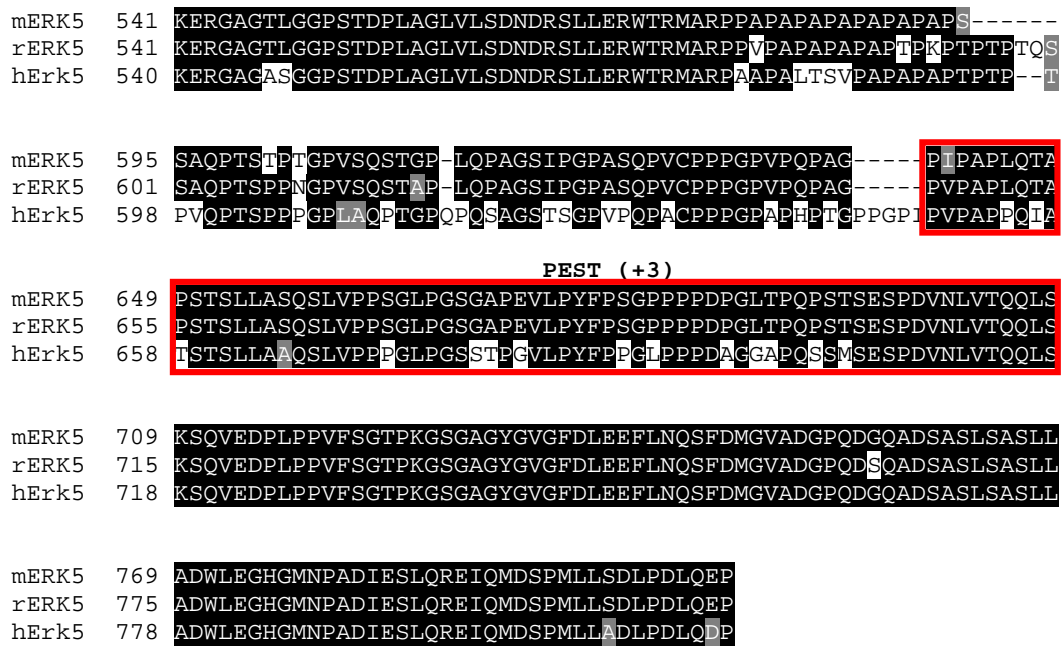


FIGURA 89. Localización de las secuencias PEST en el alineamiento de secuencias de proteína ERK5 de ratón, rata y humana. En rojo se señalan las secuencias PEST reconocidas por el programa PEST FINDER, junto con el score de la secuencia (entre paréntesis). --- indica el dominio kinasa de ERK5. Los aminoácidos idénticos se muestran enmarcados en negro, los cambios conservativos en gris y los no conservativos en blanco (m:mouse; r: rat; h: human).

Una de las regiones PEST identificadas (399-440) se encuentra inmediatamente a continuación del dominio kinasa de ERK5. Dado que la cola C terminal de ERK5 empieza en el residuo 410, el corte de calpaína en esta región dejaría a ERK5 sin su cola C-terminal característica. En los ensayos *in vitro* realizados con m-calpaína y ERK5 como sustrato aparecían fragmentos N-terminal de unos 55 kDa que podrían corresponder al dominio kinasa de ERK5. Además en los correspondientes inmunoblots de cultivos de neuronas corticales tratados con NMDA a tiempos cortos también se apreciaba la aparición de un fragmento de ERK5 de unos 55 kDa. Por otra parte, hemos observado que la proteína ERK5 recombinante ERK5(1-490) sin el dominio C-Terminal es más resistente al corte por calpaína que la proteína *wild type*. Lo arriba expuesto indica que calpaína produciría un corte primario situado entre el dominio kinasa y la cola C-terminal. De ser así, se habría de contemplar la posibilidad de que el dominio kinasa de ERK5 realizara alguna función en la célula, ya que la mayoría de sustratos de calpaína se proteolizan para producir fragmentos activos

biológicamente. Por ejemplo, Bid es cortado por calpaína durante la isquemia reperusión de corazones adultos de conejo y el fragmento generado media la liberación del citocromo c (Chen et al., 2001).

Se han descrito varias proteínas kinasas sustrato de calpaína: *calcium/calmodulin-dependent kinase*, *doublecorin-like kinase*, *ERF receptor kinase*, *myosin Light chain kinase* (MCK), ppFAK¹²⁵, pp60^{SRK}, Proteína kinasa C (PKC) (Goll et al., 2003), pero es la primera vez que se describe una MAPK como sustrato de calpaína. La rápida degradación de ERK5 por calpaína podría deberse a la presencia de varias secuencias PEST. Para comprobarlo, en la actualidad, se están obteniendo los correspondientes mutantes de delección de ERK5 para cada una de las secuencias PEST, con el fin de evaluar si la delección de alguna de estas secuencias PEST confiere resistencia a la degradación por calpaína.

La proteína kinasa PKC sólo es degradada por calpaína en su forma activa (Xu y Deng, 2006). PKC se degrada por calpaína en respuesta a estrés frente a ésteres de forbol TPA (12-O-tetradecanoil-forbol-13-1cetato) y esto forma parte de un mecanismo de *down regulation* de la kinasa (Savart et al., 1992). Por ello, estudiamos las diferencias en la degradación de ERK5 activa e inactiva por calpaína. Sin embargo, no se apreciaron diferencias en la degradación de ERK5 en función de su estado de activación.

Diferentes autores han observado propiedades neuroprotectoras de inhibidores de calpaína MDL28170, PD150606 y SJA6017 en cultivos celulares y en modelos de daño neuronal *in vivo* en respuesta a isquemia cerebral focal o *diffuse head injury* (Huang y Wang, 2001). Sin embargo, en nuestro modelo de isquemia los inhibidores de calpaína no tienen efectos en la viabilidad celular. Estas diferencias observadas podrían deberse simplemente al método utilizado para medir la viabilidad. En nuestro modelo de OGD en cultivos mixtos de neuronas corticales, no se observan cambios en la viabilidad celular tras la OGD al ser medidos con MTT o Alamar Blue. Sin embargo, el tratamiento con ALLN sí que produce una disminución de las células PI positivas (necróticas). A la vista de estas discrepancias, cabe plantearse si MTT y Alamar Blue son un índice fiable para medir la viabilidad. Se debería comparar el resultado obtenido mediante MTT y Alamar Blue con otro método, como la medida de actividad lactato deshidrogenasa (LDH). Este método determina las células que

presentan la membrana citoplasmática rota, a partir de la medición de la actividad LDH del medio de cultivo.

En este trabajo se ha demostrado que CSS1 endógena co-inmunoprecipita con ERK5, lo que indica una interacción directa entre ambas proteínas. Además, la cromatografía en gel filtración de extractos de células SH-SY5Y pone de manifiesto la existencia de una población de CSS1 que eluye a alto peso molecular, y que coincide con la fracción de ERK5 de alto peso molecular. Se ha descrito la interacción de la subunidad pequeña de calpaína con otras proteínas. En la base de datos PINA (*Protein Interaction Network Analysis platform*) figuran las siguientes: *Rho guanine nucleotide exchange factor 6*, Arrestina-C, subunidad catalítica de Calpain-1 y Calpain-2, Calpastatin, *Cell division protein kinase 4* (CDK4), Developmentally regulated GTP-binding protein 1, subunidad beta-2 de la proteína de unión a guanina G_i/G_s/G_t, precursor de la cadena gamma del receptor de citosina, Rab-1A, αPIX (Rosenberger et al., 2005). En la bibliografía existen otros casos interacción con CSS1 y degradación por la subunidad catalítica: CSS1 interacciona con el receptor de hormona paratiroidea PTH1R, que no sólo interaccionaba con CSS1 sino que también es degradada por calpaína de forma dependiente de calcio (Shimada et al., 2005).

Nuestros resultados muestran que ERK5 no interacciona con la subunidad grande de calpaína. Sin embargo, sí se comprobó la interacción descrita entre la subunidad de calpaína CSS1 y la subunidad grande. De estos resultados se deduce que en la célula existen al menos dos complejos diferentes para CSS1, uno formado por ERK5-CSS1 y otro por CSS1-Subunidad grande de calpaína, pero no un complejo trimérico CSS1-ERK5-Subunidad grande de calpaína. Otra posibilidad es que exista un complejo ERK5-CSS1, que CSS1 facilite la unión de la subunidad catalítica de calpaína, pero que la degradación de ERK5 sea tan rápida que impida visualizar la interacción.

Por otro lado, sería interesante comprobar si ERK5 es capaz de regular la actividad de calpaína por fosforilación. Existen precedentes de proteínas kinasas que inducen fosforilación de calpaína. La proteína kinasa A fosforila a m-calpaína en la serina 369, inhibiendo la activación de m-calpaína inducida por factores de crecimiento (Shiraha et al., 2002b). ERK1/2 fosforilan y activan m-calpaína en la serina 50 en respuesta a factores de crecimiento (Glading et al., 2004). Otra proteína kinasa que fosforila a calpaína es la proteína kinasa C₁ (PKC₁), asociada con la migración acelerada y la

invasión de las células tumorales del cáncer de pulmón humano (Xu y Deng, 2006), y que fosforila tanto a μ - como a m-calpaína.

El tratamiento con NMDA *per se* también produce una disminución de los niveles de ERK5 de cultivos mixtos de neuronas corticales. Además, el uso del antagonista de los receptores de NMDA, el MK801, revierte la disminución de ERK5 observada tras la OGD. Estos resultados relacionan la disminución de ERK5 en respuesta a la isquemia con la excitotoxicidad producida por la sobre-estimulación de los receptores de NMDA, y la consecuente entrada masiva de calcio a la célula. Este hecho nos llevó a plantearnos si una entrada masiva de calcio producida por otra vía también induciría la degradación de ERK5. Para ello se utilizó la tapsigargina, un inhibidor de las enzimas SERCA (Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase), que se utiliza para simular situaciones de estrés reticular. Este compuesto produce un aumento de la concentración de calcio intracelular, bloqueando la habilidad de la célula de bombear calcio al retículo endoplasmático y sarcoplásmico, lo que produce que estas reservas se agoten. Sin embargo, el tratamiento de los cultivos mixtos de neuronas corticales con 5 μM de tapsigargina no disminuye los niveles de ERK5, indicando que no sólo es necesario un aumento de calcio intracelular para la activación de calpaína que degrada a ERK5 en la célula. Así, para que se produzca esta degradación es necesaria la activación de los receptores de NMDA, la consecuente entrada de calcio y la activación de calpaína. La figura 90 resume el modelo que proponemos en este trabajo.

En este punto, se había establecido la disminución en los niveles de ERK5 en respuesta a la OGD eran debidos a la acción de calpaína, y que esta disminución era proporcional a la viabilidad celular. Por ello, nos planteamos la posibilidad de que la disminución en los niveles de ERK5 produzca la muerte celular. En este caso, la sobre-expresión de ERK5 debería producir un aumento en la viabilidad celular.

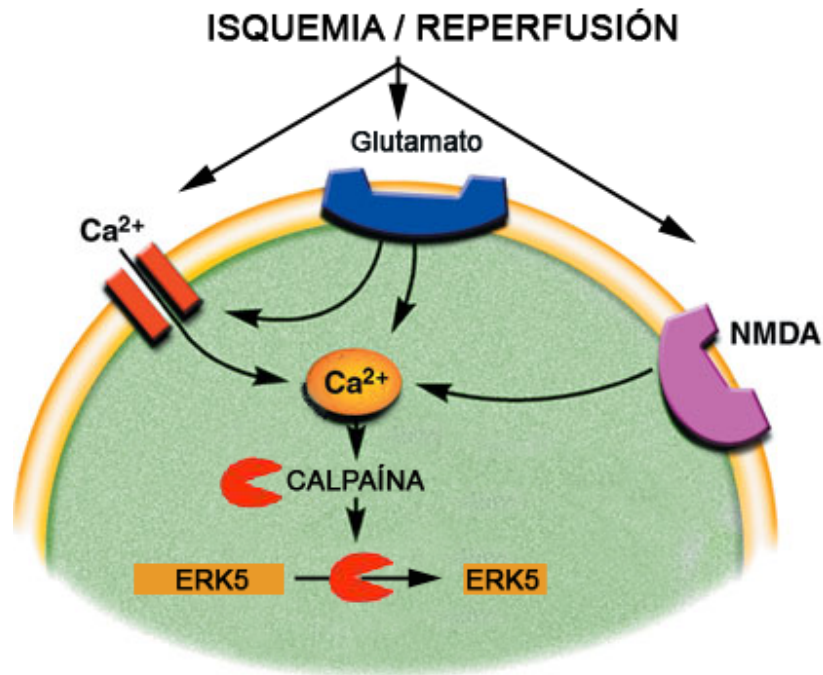


FIGURA 90. Modelo propuesto para la degradación de ERK5 en respuesta a la isquemia cerebral, en que calpaína es responsable de la degradación de la kinaasa.

Diversos trabajos se centran en el papel protector de ERK5 frente a la muerte celular (Pi et al., 2004; Winn et al., 2006; Heerssen y Segal, 2002). Además, se ha observado un aumento de la activación de ERK5 en corazones de cobaya, y que esta activación disminuye el daño tras la isquemia y reperfusion del tejido. En este sentido, se asigna a ERK5 un papel protector frente a la isquemia miocárdica, a través de la reducción de la permeabilidad de *gap junctions* y de la inhibición de la proteína pro-apoptótica BAD (Hausenloy y Yellon, 2006). Tal vez se pueda establecer una correlación entre lo observado en la isquemia cardíaca y la cerebral. Se decidió estudiar el papel de la sobre-expresión de ERK5 en nuestro modelo de OGD. Se descartó el uso de adenovirus tipo 5, adenovirus caninos CAV2 y adenoasociados debido a la escasa infección neuronal. Finalmente se generaron lentivirus que expresaban ERK5 y GFP o sólo GFP (control). La expresión de los vectores lentivirales control y ERK5 en cultivos mixtos de neuronas corticales aumentaban ligeramente la viabilidad (mediada con Alamar Blue) tras la OGD, pero no se apreciaban diferencias entre expresar GFP o ERK5.

Se decidió estudiar el efecto de la sobre-expresión de ERK5 (con lentivirus) en el tipo de muerte que inducía la OGD, apoptótica o necrótica. Dada la activación de calpaína

tras el aumento de calcio producido por la excitotoxicidad de la cascada isquémica, estábamos principalmente interesados en la respuesta necrótica. Las células sometidas a OGD presentaban una morfología diferente, y resultaba muy complicado distinguir los núcleos condensados o fragmentados de los no condensados, por lo que resultó extremadamente difícil llevar a cabo el conteo de núcleos apoptóticos, y se obtuvo un tanto por ciento bajo (10%) de células apoptóticas. Estos resultados difieren de los obtenidos por Malagelada *et al.*, que observó un 25% de células apoptóticas tras la OGD (Malagelada *et al.*, 2005). Estas diferencias pueden ser debidas a la introducción de un cambio importante en el protocolo de OGD. El protocolo fue puesto a punto originalmente para realizar las OGDs manualmente (el tampón se desoxigenaba burbujeando nitrógeno en un falcón), pero actualmente se realizan los ensayos utilizando una cámara anóxica, que probablemente es mucho más eficiente. Por otro lado, sí fue posible realizar el conteo de células necróticas. En los primeros ensayos se obtuvo un 90% de células necróticas, y no respondían a ninguno de los tratamientos realizados, indicando que la OGD era demasiado agresiva, por lo que se bajó el tiempo de privación de oxígeno y glucosa de 75 a 60 minutos. Tras el ajuste de las condiciones, se observó que un 45% del total de células eran PI positivas (necróticas) tras la OGD. La expresión del vector lentiviral control disminuía el número de células necróticas, pero aumentaban de nuevo si el vector lentiviral expresaba ERK5. Las diferencias observadas en la viabilidad de los cultivos tras la infección de virus control o virus con ERK5 debe ser atribuida a ERK5. Así, el aumento de la muerte al sobre-expresar ERK5 en comparación con el control podría ser debido a que la sobre-expresión de ciertas kinasas puede resultar tóxica para la célula.

Nuestros resultados muestran que la simple infección con un vector lentiviral de sobre-expresión neuroprotege a las células corticales. Esta neuroprotección podría ser debida a los factores inflamatorios liberados por las células en respuesta a la infección viral. Otros autores han descrito que la infección lentiviral produce neuroinflamación y daño neuronal en cultivos de ganglio de espina dorsal de gato (Zhu *et al.*, 2005). Este daño neuronal era mediado por la activación de STAT1. Los STATs son miembros de la familia de factores de transcripción *Signal Transducers and Activators of Transcription*, una de las vías más importantes implicadas en convertir la señal de las citoquinas en programas de expresión génica (Pfitzner *et al.*, 2004). La

inflamación producida por la infección lentiviral podría proteger al cultivo de la OGD, igual que lo hace un preconditionamiento, donde un insulto isquémico corto protege de la muerte frente a un daño isquémico mayor posterior (Davis y Patel, 2003; Hausenloy y Yellon, 2006; Steiger y Hanggi, 2006; Pluchino et al., 2005). Se debería comprobar si la infección lentiviral produce inflamación en los cultivos, por ejemplo, monitorizando los niveles de expresión de STAT1.

Otra posible explicación a la neuroprotección observada tras la infección con lentivirus consiste en que la expresión de GFP protegiera a las neuronas corticales del daño isquémico. Se ha descrito que la proteína GFP induce la expresión de diversos genes, entre los que se encuentra Hsp70 β (Zhang et al., 2003). Por otro lado se ha descrito que Hsp70 tiene un papel neuroprotector en la isquemia (Van Der et al., 2005). En nuestro caso, se podrían explicar las diferencias en la neuroprotección observada entre el lentivirus control y el que sobre-expresa ERK5 por los niveles de GFP que expresan las células infectadas. En todos los casos, la expresión de GFP de las células infectadas con lentivirus-ERK5 fue menor que la del virus control.

A pesar de los resultados obtenidos, no se puede descartar que ERK5 juegue un papel neuroprotector en la isquemia cerebral, pero que sea necesaria su activación para desarrollarlo. Como ocurre en otros modelos celulares, la proteína recombinante que hemos utilizado no es activa, por lo que sería necesario infectar también a las células con el activador MEK5DD. Dadas las dificultades que hemos tenido en la infección de las células y la interpretación de los resultados debido a la protección intrínseca de los virus, se debe de contemplar una aproximación diferente para esclarecer el papel de ERK5 en la isquemia. Por ejemplo, llevar a cabo isquemias *in vivo* en ratones *knockout* de ERK5 condicionales de cerebro, y comprobar si son más o menos sensibles al daño isquémico.

Finalmente, se ha utilizado un modelo de isquemia *in vivo* por oclusión de la arteria cerebral media de rata. Mediante la tinción inmunohistoquímica del córtex cerebral se ha corroborado la disminución en los niveles de proteína ERK5 que se había observado tras la OGD *in vitro*. Además las inmunohistoquímicas de córtex cerebral revelaron que ERK5 desaparece en el core isquémico (zona más afectada por la isquemia). Estudios preliminares parecen indicar que en algunas zonas de la penumbra isquémica aumenta la intensidad de señal de ERK5 nuclear.

Tanto *in vivo* como *in vitro* hemos comprobado la degradación de ERK5 en respuesta a la isquemia. Nuestros resultados difieren de los obtenidos por Wang *et al.* en hipocampo, a pesar de que también observamos la hiperfosforilación inicial de ERK5. Las diferencias observadas podrían deberse al modelo de isquemia utilizado. La oclusión de la arteria cerebral media afecta principalmente al córtex cerebral, mientras que la oclusión de cuatro vasos afecta principalmente al hipocampo. Así, hemos observado que en córtex ERK5 es degradada por calpaína, mientras que en hipocampo no se aprecia disminución en los niveles de ERK5. Las diferencias entre lo observado en hipocampo y en córtex podrían deberse a diferencias en la calpaína de cada zona, como por ejemplo a diferentes subunidades catalíticas en los dos tejidos. También podría deberse a diferencias en los complejos de proteínas que forma calpaína en una u otra zona del cerebro, que facilitarían la degradación por calpaína.

Como se ha comentado anteriormente, la degradación de ERK5 en respuesta a la OGD se correlaciona inversamente con la viabilidad celular en cultivos mixtos de neuronas corticales. Además, también se ha observado una disminución de la proteína ERK5 en córtex de cerebros de rata sometidas a isquemia. Por ello, proponemos a ERK5 como un marcador de la gravedad de la isquemia: a mayor daño producido mayor disminución de ERK5. Teniendo en cuenta que la variabilidad entre los ensayos de isquemia cerebral es alta, resultaría muy útil un marcador para verificar que la isquemia ha funcionado. En la actualidad se utilizan marcadores como Hsp70 β , cuyos niveles aumentan tras la isquemia y se le atribuye un papel neuroprotector (Van Der *et al.*, 2005). Una ventaja que presenta el uso de ERK5 como marcador es que días después de la lesión no se recuperan los niveles normales de la proteína (estudio realizado a 48 y 72 horas post-OGD en cultivos mixtos de neuronas corticales).

VIII. CONCLUSIONES

- En este trabajo se ha caracterizado la activación de la MAP kinasa ERK5 en la línea celular SH-SY5Y. ERK5 se activa en estas células en respuesta a EGF, sorbitol y a la sobre-expresión de la kinasa activadora constitutivamente activa MEK5-DD. ERK5 se localiza tanto en el citosol como en el núcleo de células SH-SY5Y en reposo, mientras que ERK5 activa se encuentra únicamente en el citosol.
- La aplicación de la metodología TAP en células SH-SY5Y ha permitido identificar diversas proteínas que interactúan con ERK5 (que incluyen proteínas de citoesqueleto, chaperonas y proteínas de metabolismo celular), entre las que destacan la proteína chaperona Hsp90 β y la piruvato kinasa PKM2.
- HSP90 β endógena co-inmunoprecipita con ERK5 recombinante en dos líneas celulares diferentes, lo que indica que ambas proteínas interactúan. Los inhibidores de Hsp90 geldanamicina o radicicol, producen una disminución en los niveles de la proteína ERK5, que son revertidos mediante la inhibición de la actividad proteosomal. Preliminarmente se ha observado la ubiquitinación de ERK5, no descrita previamente.
- No se ha podido establecer la interacción entre PKM2 y ERK5. Sin embargo, la PKM2 celular existe como complejo de alto peso molecular donde también se encuentra ERK5, contiene un *D-domain* de unión a MAP kinasas y su actividad enzimática aumenta en respuesta a EGF y Sorbitol. La mutación de la serina 37 de PKM2 a alanina o aspártico conlleva un aumento en la actividad catalítica de PKM2, lo que indica que este residuo podría jugar un papel importante en la actividad piruvato kinasa.
- ERK5 es degradada por calpaína en respuesta a la isquemia *in vitro* (OGD) de cultivos mixtos de neuronas corticales, y la degradación es proporcional al daño producido por la isquemia. Esta disminución en los niveles de ERK5 también se observa en el córtex de cerebros de ratas Sprague-Dawley sometidas a isquemia.
- El tratamiento de los cultivos mixtos de neuronas corticales con NMDA produce una disminución de los niveles de proteína ERK5. El pretratamiento de los cultivos con el antagonista de los receptores de NMDA MK801 revierte la disminución de ERK5 en respuesta a la OGD, relacionando la disminución de ERK5 con la activación de los receptores de NMDA.

- m-calpaína degrada rápidamente a ERK5 *in vitro*, independientemente de su estado de activación. No se ha podido identificar el sitio primario de corte de calpaína. Sin embargo, el dominio kinasa de ERK5 es parcialmente resistente a la acción de calpaína, por lo que es probable que calpaína inicie su acción reconociendo la región PEST situada entre el dominio kinasa y la cola C-terminal de ERK5.
- ERK5 y la subunidad reguladora de calpaína CSS1 endógenas co-immunoprecipitan, lo que implica que ambas proteínas interactúan en la célula.
- La sobre-expresión de ERK5 en cultivos mixtos de neuronas corticales no altera la viabilidad de los cultivos sometidos a OGD, ni produce diferencias en el tipo de muerte producido (apoptótica o necrótica) respecto a lo observado en los controles. Sin embargo, la infección lentiviral *per se* protege de la muerte en respuesta a la isquemia.
- Así, se establece por primera vez que tras la isquemia la entrada masiva de calcio a través de los receptores de NMDA y la consiguiente activación de calpaína conlleva la degradación de ERK5, lo que produce una disminución de los niveles de esta kinasa.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abe J, Kusuhara M, Ulevitch RJ, Berk BC, Lee JD (1996) Big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) is a redox-sensitive kinase. *J Biol Chem* 271:16586-16590.
- Abe MK, Kuo WL, Hershenson MB, Rosner MR (1999) Extracellular signal-regulated kinase 7 (ERK7), a novel ERK with a C-terminal domain that regulates its activity, its cellular localization, and cell growth. *Mol Cell Biol* 19:1301-1312.
- Al-Hakim AK, Goransson O, Deak M, Toth R, Campbell DG, Morrice NA, Prescott AR, Alessi DR (2005) 14-3-3 cooperates with LKB1 to regulate the activity and localization of QSK and SIK. *J Cell Sci* 118:5661-5673.
- Alessandrini A, Namura S, Moskowitz MA, Bonventre JV (1999) MEK1 protein kinase inhibition protects against damage resulting from focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12866-12869.
- Amado RG, Chen IS (1999) Lentiviral vectors--the promise of gene therapy within reach? *Science* 285:674-676.
- Ananieva O, Macdonald A, Wang X, McCoy CE, McIlrath J, Tournier C, Arthur JS (2008) ERK5 regulation in naive T-cell activation and survival. *Eur J Immunol* 38:2534-2547.
- Arthur JS, Elce JS, Hegadorn C, Williams K, Greer PA (2000) Disruption of the murine calpain small subunit gene, *Capn4*: calpain is essential for embryonic development but not for cell growth and division. *Mol Cell Biol* 20:4474-4481.
- Asangani IA, Leupold JH, Gil-Parrado S, Post S, Allgayer H (2006) Promoter characterization of human small regulatory subunit calpain, *CSS1*. *AACR Meeting Abstracts* 2006:207-20b.
- Badiola N (2008) Estudio de los mecanismos moleculares implicados en la muerte apoptótica en un modelo de isquemia cerebral in vitro. Tesis Doctoral. Tesis Doctoral. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Badiola N, Malagelada C, Llecha N, Hidalgo J, Comella JX, Sabria J, Rodríguez-Alvarez J (2008). Activation of caspase-8 by tumor necrosis factor receptor 1 is necessary for OGD-mediated caspase-3 activation and apoptosis in cultured cortical cells. Submitted.
- Barginear MF, Van PC, Rosen N, Modi S, Hudis CA, Budman DR (2008) The heat shock protein 90 chaperone complex: an evolving therapeutic target. *Curr Cancer Drug Targets* 8:522-532.
- Barros JC, Marshall CJ (2005) Activation of either ERK1/2 or ERK5 MAP kinase pathways can lead to disruption of the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 118:1663-1671.
- Basso AD, Solit DB, Chiosis G, Giri B, Tsihchlis P, Rosen N (2002) Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function. *J Biol Chem* 277:39858-39866.
- Belova L, Brickley DR, Ky B, Sharma SK, Conzen SD (2008) Hsp90 regulates the phosphorylation and activity of serum- and glucocorticoid-regulated kinase-1. *J Biol Chem* 283:18821-18831.
- Biondi RM, Nebreda AR (2003) Signalling specificity of Ser/Thr protein kinases through docking-site-mediated interactions. *Biochem J* 372:1-13.
- Blomer U, Naldini L, Kafri T, Trono D, Verma IM, Gage FH (1997) Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector. *J Virol* 71:6641-6649.

- Blomgren K, Zhu C, Wang X, Karlsson JO, Leverin AL, Bahr BA, Mallard C, Hagberg H (2001) Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia: a mechanism of "pathological apoptosis"? *J Biol Chem* 276:10191-10198.
- Bogoyevitch MA, Court NW (2004) Counting on mitogen-activated protein kinases--ERKs 3, 4, 5, 6, 7 and 8. *Cell Signal* 16:1345-1354.
- Borges J, Pandiella A, Esparis-Ogando A (2007) Erk5 nuclear location is independent on dual phosphorylation, and favours resistance to TRAIL-induced apoptosis. *Cell Signal* 19:1473-1487.
- Boudeau J, Deak M, Lawlor MA, Morrice NA, Alessi DR (2003) Heat-shock protein 90 and Cdc37 interact with LKB1 and regulate its stability. *Biochem J* 370:849-857.
- Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH, Yancopoulos GD (1991) ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 65:663-675.
- Boulton TG, Yancopoulos GD, Gregory JS, Slaughter C, Moomaw C, Hsu J, Cobb MH (1990) An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science* 249:64-67.
- Brott BK, Pinsky BA, Erikson RL (1998) Nlk is a murine protein kinase related to Erk/MAP kinases and localized in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:963-968.
- Buschbeck M, Ullrich A (2005) The unique C-terminal tail of the mitogen-activated protein kinase ERK5 regulates its activation and nuclear shuttling. *J Biol Chem* 280:2659-2667.
- Cameron SJ, Abe J, Malik S, Che W, Yang J (2004) Differential role of MEK5alpha and MEK5beta in BMK1/ERK5 activation. *J Biol Chem* 279:1506-1512.
- Castillo J (2001) Luces y sombras de la neuroprotección en la isquemia cerebral. *Revista de Neuro-psiquiatria* 64:354-381.
- Cavanaugh JE (2004) Role of extracellular signal regulated kinase 5 in neuronal survival. *Eur J Biochem* 271:2056-2059.
- Chang CI, Xu BE, Akella R, Cobb MH, Goldsmith EJ (2002) Crystal structures of MAP kinase p38 complexed to the docking sites on its nuclear substrate MEF2A and activator MKK3b. *Mol Cell* 9:1241-1249.
- Chao TH, Hayashi M, Tapping RI, Kato Y, Lee JD (1999) MEKK3 directly regulates MEK5 activity as part of the big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) signaling pathway. *J Biol Chem* 274:36035-36038.
- Chen G, Cao P, Goeddel DV (2002) TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90. *Mol Cell* 9:401-410.
- Chen M, He H, Zhan S, Krajewski S, Reed JC, Gottlieb RA (2001) Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion. *J Biol Chem* 276:30724-30728.
- Chien CT, Bartel PL, Sternglanz R, Fields S (1991) The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:9578-9582.
- Choi DW (1988) Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci* 11:465-469.

- Choi KW, Benzer S (1994) Rotation of photoreceptor clusters in the developing *Drosophila* eye requires the nemo gene. *Cell* 78:125-136.
- Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, Ramanathan A, Gerszten RE, Wei R, Fleming MD, Schreiber SL, Cantley LC (2008a) The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* 452:230-233.
- Christofk HR, Vander Heiden MG, Wu N, Asara JM, Cantley LC (2008b) Pyruvate kinase M2 is a phosphotyrosine-binding protein. *Nature* 452:181-186.
- Chu CT, Levinthal DJ, Kulich SM, Chalovich EM, DeFranco DB (2004) Oxidative neuronal injury. The dark side of ERK1/2. *Eur J Biochem* 271:2060-2066.
- Coulombe P, Meloche S (2006) Atypical mitogen-activated protein kinases: Structure, regulation and functions. *Biochim Biophys Acta* ..
- Csermely P, Schnaider T, Soti C, Prohaszka Z, Nardai G (1998) The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol Ther* 79:129-168.
- Cude K, Wang Y, Choi HJ, Hsuan SL, Zhang H, Wang CY, Xia Z (2007) Regulation of the G2-M cell cycle progression by the ERK5-NF κ B signaling pathway. *J Cell Biol* 177:253-264.
- Cuerrier D, Moldoveanu T, Davies PL (2005) Determination of peptide substrate specificity for mu-calpain by a peptide library-based approach: the importance of primed side interactions. *J Biol Chem* 280:40632-40641.
- Dai K, Kobayashi R, Beach D (1996) Physical interaction of mammalian CDC37 with CDK4. *J Biol Chem* 271:22030-22034.
- Das M, Jiang F, Sluss HK, Zhang C, Shokat KM, Flavell RA, Davis RJ (2007) Suppression of p53-dependent senescence by the JNK signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:15759-15764.
- Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 351:95-105.
- Davis DP, Patel PM (2003) Ischemic preconditioning in the brain. *Curr Opin Anaesthesiol* 16:447-452.
- de Leciñana A (2008) Fisiopatología de la isquemia cerebral.
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22:391-397.
- Dombrackas JD, Santarsiero BD, Mesecar AD (2005) Structural basis for tumor pyruvate kinase M2 allosteric regulation and catalysis. *Biochemistry* 44:9417-9429.
- Dong F, Gutkind JS, Larner AC (2001) Granulocyte colony-stimulating factor induces ERK5 activation, which is differentially regulated by protein-tyrosine kinases and protein kinase C. Regulation of cell proliferation and survival. *J Biol Chem* 276:10811-10816.
- Drakas R, Prisco M, Baserga R (2005) A modified tandem affinity purification tag technique for the purification of protein complexes in mammalian cells. *Proteomics* 5:132-137.

- Dudderidge TJ, McCracken SR, Loddo M, Fanshawe TR, Kelly JD, Neal DE, Leung HY, Williams GH, Stoeber K (2007) Mitogenic growth signalling, DNA replication licensing, and survival are linked in prostate cancer. *Br J Cancer* ..
- Dwivedi Y, Rizavi HS, Teppen T, Sasaki N, Chen H, Zhang H, Roberts RC, Conley RR, Pandey GN (2007) Aberrant Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) 5 Signaling in Hippocampus of Suicide Subjects. *Neuropsychopharmacology* ..
- Dziembowski A, Seraphin B (2004) Recent developments in the analysis of protein complexes. *FEBS Lett* 556:1-6.
- Edwards AM, Kus B, Jansen R, Greenbaum D, Greenblatt J, Gerstein M (2002) Bridging structural biology and genomics: assessing protein interaction data with known complexes. *Trends Genet* 18:529-536.
- English JM, Pearson G, Baer R, Cobb MH (1998) Identification of substrates and regulators of the mitogen-activated protein kinase ERK5 using chimeric protein kinases. *J Biol Chem* 273:3854-3860.
- English JM, Pearson G, Hockenberry T, Shivakumar L, White MA, Cobb MH (1999) Contribution of the ERK5/MEK5 pathway to Ras/Raf signaling and growth control. *J Biol Chem* 274:31588-31592.
- English JM, Vanderbilt CA, Xu S, Marcus S, Cobb MH (1995) Isolation of MEK5 and differential expression of alternatively spliced forms. *J Biol Chem* 270:28897-28902.
- Esparis-Ogando A, az-Rodriguez E, Montero JC, Yuste L, Crespo P, Pandiella A (2002) Erk5 participates in neuregulin signal transduction and is constitutively active in breast cancer cells overexpressing ErbB2. *Mol Cell Biol* 22:270-285.
- Espona M (2008) Estudio Molecular y Funcional de la MAP kinasa ERK5. Memoria del trabajo experimental del Master en Bioquímica. UAB.
- Falsone SF, Gesslbauer B, Tirk F, Piccinini AM, Kungl AJ (2005) A proteomic snapshot of the human heat shock protein 90 interactome. *FEBS Lett* 579:6350-6354.
- Ferguson EC, Rathmell JC (2008) New roles for pyruvate kinase M2: working out the Warburg effect. *Trends Biochem Sci* 33:359-362.
- Ferrer I, Friguls B, Dalfo E, Planas AM (2003) Early modifications in the expression of mitogen-activated protein kinase (MAPK/ERK), stress-activated kinases SAPK/JNK and p38, and their phosphorylated substrates following focal cerebral ischemia. *Acta Neuropathol* 105:425-437.
- Fromont-Racine M, Rain JC, Legrain P (1997) Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nat Genet* 16:277-282.
- Fu H, Subramanian RR, Masters SC (2000) 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40:617-47.:617-647.
- Fujikawa DG, Ke X, Trinidad RB, Shinmei SS, Wu A (2002) Caspase-3 is not activated in seizure-induced neuronal necrosis with internucleosomal DNA cleavage. *J Neurochem* 83:229-240.
- Garaude J, Kaminski S, Cherni S, Hipskind R, Villalba M (2005) The role of ERK5 in T-cell signalling. *Scand J Immunol* 62:515-520.
- Garaude J, Cherni S, Kaminski S, Delepine E, Chable-Bessia C, Benkirane M, Borges J, Pandiella A, Iniguez MA, Fresno M, Hipskind RA, Villalba M (2006) ERK5 Activates NF- κ B in Leukemic T Cells and Is Essential for Their Growth In Vivo. *J Immunol* 177:7607-7617.

- Garcia JH (1975) The neuropathology of stroke. *Hum Pathol* 6:583-598.
- Ginty DD, Segal RA (2002) Retrograde neurotrophin signaling: Trk-ing along the axon. *Curr Opin Neurobiol* 12:268-274.
- Glading A, Bodnar RJ, Reynolds IJ, Shiraha H, Satish L, Potter DA, Blair HC, Wells A (2004) Epidermal growth factor activates m-calpain (calpain II), at least in part, by extracellular signal-regulated kinase-mediated phosphorylation. *Mol Cell Biol* 24:2499-2512.
- Glading A, Chang P, Lauffenburger DA, Wells A (2000) Epidermal growth factor receptor activation of calpain is required for fibroblast motility and occurs via an ERK/MAP kinase signaling pathway. *J Biol Chem* 275:2390-2398.
- Goldberg MP, Choi DW (1993) Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *J Neurosci* 13:3510-3524.
- Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J (2003) The calpain system. *Physiol Rev* 83:731-801.
- Gonzalez FA, Raden DL, Rigby MR, Davis RJ (1992) Heterogeneous expression of four MAP kinase isoforms in human tissues. *FEBS Lett* 304:170-178.
- Graham SH, Chen J (2001) Programmed cell death in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:99-109.
- Gursoy-Ozdemir Y, Bolay H, Saribas O, Dalkara T (2000) Role of endothelial nitric oxide generation and peroxynitrite formation in reperfusion injury after focal cerebral ischemia. *Stroke* 31:1974-1980.
- Hajimohammadreza I, Raser KJ, Nath R, Nadimpalli R, Scott M, Wang KK (1997) Neuronal nitric oxide synthase and calmodulin-dependent protein kinase IIalpha undergo neurotoxin-induced proteolysis. *J Neurochem* 69:1006-1013.
- Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ (1994) A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265:808-811.
- Han Z, Boyle DL, Chang L, Bennett B, Karin M, Yang L, Manning AM, Firestein GS (2001) c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 108:73-81.
- Hardingham GE, Bading H (2003) The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends Neurosci* 26:81-89.
- Hausenloy DJ, Yellon DM (2006) Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc Res* ..
- Hayashi M, Lee JD (2004) Role of the BMK1/ERK5 signaling pathway: lessons from knockout mice. *J Mol Med* 82:800-808.
- Hayashi M, Tapping RI, Chao TH, Lo JF, King CC, Yang Y, Lee JD (2001) BMK1 mediates growth factor-induced cell proliferation through direct cellular activation of serum and glucocorticoid-inducible kinase. *J Biol Chem* 276:8631-8634.
- Heerssen HM, Segal RA (2002) Location, location, location: a spatial view of neurotrophin signal transduction. *Trends Neurosci* 25:160-165.

- Herdegen T, Claret FX, Kallunki A, Martin-Villalba C, Winter C, Hunter T, Karin M (1998) Lasting N-Terminal phosphorylation of c-Jun and activation of c-Jun N-terminal kinases after neuronal injury. *J Neurosci* 18:5124-5135.
- Hetman M, Gozdz A (2004) Role of extracellular signal regulated kinases 1 and 2 in neuronal survival. *Eur J Biochem* 271:2050-2055.
- Hirsch T, Marchetti P, Susin SA, Dallaporta B, Zamzami N, Marzo I, Geuskens M, Kroemer G (1997) The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene* 15:1573-1581.
- Hou ST, MacManus JP (2002) Molecular mechanisms of cerebral ischemia-induced neuronal death. *Int Rev Cytol* 221:93-148.:93-148.
- Huang Y, Wang KK (2001) The calpain family and human disease. *Trends Mol Med* 7:355-362.
- Irving EA, Bamford M (2002) Role of mitogen- and stress-activated kinases in ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:631-647.
- Jaeschke H, Lemasters JJ (2003) Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology* 125:1246-1257.
- Johnson GL, Lapadat R (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298:1911-1912.
- Johnson JL, Brown C (2009) Plasticity of the Hsp90 chaperone machine in divergent eukaryotic organisms. *Cell Stress Chaperones* 14:83-94.
- Kamakura S, Moriguchi T, Nishida E (1999) Activation of the protein kinase ERK5/BMK1 by receptor tyrosine kinases. Identification and characterization of a signaling pathway to the nucleus. *J Biol Chem* 274:26563-26571.
- Karibe H, Zarow GJ, Weinstein PR (1995) Use of mild intraischemic hypothermia versus mannitol to reduce infarct size after temporary middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurosurg* 83:93-98.
- Kasler HG, Victoria J, Duramad O, Winoto A (2000) ERK5 is a novel type of mitogen-activated protein kinase containing a transcriptional activation domain. *Mol Cell Biol* 20:8382-8389.
- Kato Y, Tapping RI, Huang S, Watson MH, Ulevitch RJ, Lee JD (1998) Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor. *Nature* 395:713-716.
- Kato Y, Zhao M, Morikawa A, Sugiyama T, Chakravorty D, Koide N, Yoshida T, Tapping RI, Yang Y, Yokochi T, Lee JD (2000) Big mitogen-activated kinase regulates multiple members of the MEF2 protein family. *J Biol Chem* 275:18534-18540.
- Khokhlatchev AV, Canagarajah B, Wilsbacher J, Robinson M, Atkinson M, Goldsmith E, Cobb MH (1998) Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* 93:605-615.
- Kohara K, Kitamura A, Morishima M, Tsumoto T (2001) Activity-dependent transfer of brain-derived neurotrophic factor to postsynaptic neurons. *Science* 291:2419-2423.
- Kolch W (2000) Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 351 Pt 2:289-305.:289-305.

- Kondoh K, Terasawa K, Morimoto H, Nishida E (2006) Regulation of nuclear translocation of extracellular signal-regulated kinase 5 by active nuclear import and export mechanisms. *Mol Cell Biol* 26:1679-1690.
- Krajewska M, Rosenthal RE, Mikolajczyk J, Stennicke HR, Wiesenthal T, Mai J, Naito M, Salvesen GS, Reed JC, Fiskum G, Krajewski S (2004) Early processing of Bid and caspase-6, -8, -10, -14 in the canine brain during cardiac arrest and resuscitation. *Exp Neurol* 189:261-279.
- Kuan CY, Yang DD, Samanta Roy DR, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA (1999) The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron* 22:667-676.
- Kumamoto H, Ooya K (2007) Immunohistochemical detection of phosphorylated JNK, p38 MAPK, and ERK5 in ameloblastic tumors. *J Oral Pathol Med* 36:543-549.
- Kupina NC, Nath R, Bernath EE, Inoue J, Mitsuyoshi A, Yuen PW, Wang KK, Hall ED (2001) The novel calpain inhibitor SJA6017 improves functional outcome after delayed administration in a mouse model of diffuse brain injury. *J Neurotrauma* 18:1229-1240.
- Kyriakis JM, Avruch J (1990) pp54 microtubule-associated protein 2 kinase. A novel serine/threonine protein kinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L-lysine. *J Biol Chem* 265:17355-17363.
- Lee JD, Ulevitch RJ, Han J (1995) Primary structure of BMK1: a new mammalian map kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 213:715-724.
- Lenmyr F, Karlsson S, Gerwins P, Ata KA, Terent A (2002) Activation of mitogen-activated protein kinases in experimental cerebral ischemia. *Acta Neurol Scand* 106:333-340.
- Li J, Li Z, Mo BQ (2006) [Effects of ERK5 MAPK signaling transduction pathway on the inhibition of genistein to breast cancer cells]. *Wei Sheng Yan Jiu* 35:184-186.
- Liu L, Cavanaugh JE, Wang Y, Sakagami H, Mao Z, Xia Z (2003) ERK5 activation of MEF2-mediated gene expression plays a critical role in BDNF-promoted survival of developing but not mature cortical neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8532-8537.
- Liu L, Cundiff P, Abel G, Wang Y, Faigle R, Sakagami H, Xu M, Xia Z (2006a) Extracellular signal-regulated kinase (ERK) 5 is necessary and sufficient to specify cortical neuronal fate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:9697-9702.
- Liu S, Sun JP, Zhou B, Zhang ZY (2006b) Structural basis of docking interactions between ERK2 and MAP kinase phosphatase 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:5326-5331.
- Majno G, Joris I (1995) Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146:3-15.
- Malagelada C (2003) Paper de l'apoptosi en el dany cel·lular per isquèmia cerebral: mecanismes moleculars implicats i neuroprotecció. Tesis Doctoral. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Malagelada C, Xifro X, Minano A, Sabria J, Rodriguez-Alvarez J (2005) Contribution of caspase-mediated apoptosis to the cell death caused by oxygen-glucose deprivation in cortical cell cultures. *Neurobiol Dis* 20:27-37.

- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298:1912-1934.
- Markgraf CG, Velayo NL, Johnson MP, McCarty DR, Medhi S, Koehl JR, Chmielewski PA, Linnik MD (1998) Six-hour window of opportunity for calpain inhibition in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 29:152-158.
- Martin LJ, Al-Abdulla NA, Brambrink AM, Kirsch JR, Sieber FE, Portera-Cailliau C (1998) Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res Bull* 46:281-309.
- McCaw BJ, Chow SY, Wong ES, Tan KL, Guo H, Guy GR (2005) Identification and characterization of mErk5-T, a novel Erk5/Bmk1 splice variant. *Gene* 345:183-190.
- McCracken SR, Ramsay A, Heer R, Mathers ME, Jenkins BL, Edwards J, Robson CN, Marquez R, Cohen P, Leung HY (2008) Aberrant expression of extracellular signal-regulated kinase 5 in human prostate cancer. *Oncogene* 27:2978-2988.
- Mehta PB, Jenkins BL, McCarthy L, Thilak L, Robson CN, Neal DE, Leung HY (2003) MEK5 overexpression is associated with metastatic prostate cancer, and stimulates proliferation, MMP-9 expression and invasion. *Oncogene* 22:1381-1389.
- Miloso M, Scuteri A, Foudah D, Tredici G (2008) MAPKs as Mediators of Cell Fate Determination: an Approach to Neurodegenerative Diseases. *Curr Med Chem* 15:538-548.
- Mody N, Campbell DG, Morrice N, Peggie M, Cohen P (2003) An analysis of the phosphorylation and activation of extracellular-signal-regulated protein kinase 5 (ERK5) by mitogen-activated protein kinase kinase 5 (MKK5) in vitro. *Biochem J* 372:567-575.
- Mody N, Leitch J, Armstrong C, Dixon J, Cohen P (2001) Effects of MAP kinase cascade inhibitors on the MKK5/ERK5 pathway. *FEBS Lett* 502:21-24.
- Morimoto H, Kondoh K, Nishimoto S, Terasawa K, Nishida E (2007) Activation of a C-terminal transcriptional activation domain of ERK5 by autophosphorylation. *J Biol Chem* ..
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63.
- Mulloy R, Salinas S, Philips A, Hipskind RA (2003) Activation of cyclin D1 expression by the ERK5 cascade. *Oncogene* 22:5387-5398.
- Naldini L, Blomer U, Gage FH, Trono D, Verma IM (1996) Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11382-11388.
- Namura S, Iihara K, Takami S, Nagata I, Kikuchi H, Matsushita K, Moskowitz MA, Bonventre JV, Alessandrini A (2001) Intravenous administration of MEK inhibitor U0126 affords brain protection against forebrain ischemia and focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11569-11574.
- Nishimoto S, Nishida E (2006) MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2. *EMBO Rep* 7:782-786.
- Nomura M, Nomura N, Yamashita J (2005) Geldanamycin-induced degradation of Chk1 is mediated by proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* 335:900-905.
- Olsen JV, Blagoev B, Gnad F, Macek B, Kumar C, Mortensen P, Mann M (2006) Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* 127:635-648.

- Ostrander JH, Daniel AR, Lofgren K, Kleer CG, Lange CA (2007) Breast tumor kinase (protein tyrosine kinase 6) regulates heregulin-induced activation of ERK5 and p38 MAP kinases in breast cancer cells. *Cancer Res* 67:4199-4209.
- Ozawa H, Shioda K, Dohi H, Marsumoto H, Mizushima H, Zhou H, Funahashi Y, Nakai Y, Matsumoto K (1999) Delayed neuronal cell death in the rat hippocampus is mediated by the mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Neurosci Lett* 262:57-60.
- Pearl LH, Prodromou C (2006) Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu Rev Biochem* 75:271-94.:271-294.
- Pereira DB, Carvalho AP, Duarte CB (2002) Non-specific effects of the MEK inhibitors PD098,059 and U0126 on glutamate release from hippocampal synaptosomes. *Neuropharmacology* 42:9-19.
- Persson A, Fan X, Salford LG, Widegren B, Englund E (2007) Neuroblastomas and medulloblastomas exhibit more Cocksackie adenovirus receptor expression than gliomas and other brain tumors. *Neuropathology* 27:233-236.
- Pfizner E, Kliem S, Baus D, Litterst CM (2004) The role of STATs in inflammation and inflammatory diseases. *Curr Pharm Des* 10:2839-2850.
- Pi X, Garin G, Xie L, Zheng Q, Wei H, Abe J, Yan C, Berk BC (2005) BMK1/ERK5 is a novel regulator of angiogenesis by destabilizing hypoxia inducible factor 1alpha. *Circ Res* 96:1145-1151.
- Pi X, Yan C, Berk BC (2004) Big mitogen-activated protein kinase (BMK1)/ERK5 protects endothelial cells from apoptosis. *Circ Res* %20;94:362-369.
- Piper PW, Truman AW, Millson SH, Nuttall J (2006) Hsp90 chaperone control over transcriptional regulation by the yeast Slf2(Mpk1)p and human ERK5 mitogen-activated protein kinases (MAPKs). *Biochem Soc Trans* 34:783-785.
- Pirk1 F, Buchner J (2001) Functional analysis of the Hsp90-associated human peptidyl prolyl cis/trans isomerases FKBP51, FKBP52 and Cyp40. *J Mol Biol* 308:795-806.
- Pluchino S, Zanotti L, Rossi B, Brambilla E, Ottoboni L, Salani G, Martinello M, Cattalini A, Bergami A, Furlan R, Comi G, Constantin G, Martino G (2005) Neurosphere-derived multipotent precursors promote neuroprotection by an immunomodulatory mechanism. *Nature* 436:266-271.
- Potthoff MJ, Olson EN (2007) MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. *Development* 134:4131-4140.
- Puig O, Caspary F, Rigaut G, Rutz B, Bouveret E, Bragado-Nilsson E, Wilm M, Seraphin B (2001) The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* 24:218-229.
- Ranganathan A, Pearson GW, Chrestensen CA, Sturgill TW, Cobb MH (2006) The MAP kinase ERK5 binds to and phosphorylates p90 RSK. *Arch Biochem Biophys* ..
- Raviv Z, Kalie E, Seger R (2004) MEK5 and ERK5 are localized in the nuclei of resting as well as stimulated cells, while MEKK2 translocates from the cytosol to the nucleus upon stimulation. *J Cell Sci* 117:1773-1784.
- Regan CP, Li W, Boucher DM, Spatz S, Su MS, Kuida K (2002) Erk5 null mice display multiple extraembryonic vascular and embryonic cardiovascular defects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:9248-9253.

- Repici M, Borsello T (2006) JNK pathway as therapeutic target to prevent degeneration in the central nervous system. *Adv Exp Med Biol* 588:145-55.:145-155.
- Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, Seraphin B (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* 17:1030-1032.
- Roda JM, Carceller F, Pascual JM, Herguido MJ, González-Llanos F, Alonso de Leciana M, Avendaño C, Diez-Tejedor E (1998) Modelos animales experimentales en isquemia cerebral. *Neurología* 13.
- Roe SM, Ali MM, Meyer P, Vaughan CK, Panaretou B, Piper PW, Prodromou C, Pearl LH (2004) The Mechanism of Hsp90 regulation by the protein kinase-specific cochaperone p50(cdc37). *Cell* 116:87-98.
- Rosenberger G, Gal A, Kutsche K (2005) AlphaPIX associates with calpain 4, the small subunit of calpain, and has a dual role in integrin-mediated cell spreading. *J Biol Chem* 280:6879-6889.
- Roux PP, Blenis J (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 68:320-344.
- Rubin GM (2001) The draft sequences. Comparing species. *Nature* 409:820-821.
- Savart M, Letard P, Bultel S, Ducastaing A (1992) Induction of protein kinase C down-regulation by the phorbol ester TPA in a calpain/protein kinase C complex. *Int J Cancer* 52:399-403.
- Schad E, Farkas A, Jekely G, Tompa P, Friedrich P (2002) A novel human small subunit of calpains. *Biochem J* 362:383-388.
- Schwab BL, Guerini D, Didszun C, Bano D, Ferrando-May E, Fava E, Tam J, Xu D, Xanthoudakis S, Nicholson DW, Carafoli E, Nicotera P (2002) Cleavage of plasma membrane calcium pumps by caspases: a link between apoptosis and necrosis. *Cell Death Differ* 9:818-831.
- Seyfried J, Wang X, Kharebava G, Tournier C (2005) A novel mitogen-activated protein kinase docking site in the N terminus of MEK5alpha organizes the components of the extracellular signal-regulated kinase 5 signaling pathway. *Mol Cell Biol* 25:9820-9828.
- Shalizi A, Lehtinen M, Gaudilliere B, Donovan N, Han J, Konishi Y, Bonni A (2003) Characterization of a neurotrophin signaling mechanism that mediates neuron survival in a temporally specific pattern. *J Neurosci* 23:7326-7336.
- Sharp FR, Ran R, Lu A, Tang Y, Strauss KI, Glass T, Ardizzone T, Bernaudin M (2004) Hypoxic preconditioning protects against ischemic brain injury. *NeuroRx* 1:26-35.
- Shevchenko A, Schafit D, Roguev A, Pijnappel WW, Stewart AF, Shevchenko A (2002) Deciphering protein complexes and protein interaction networks by tandem affinity purification and mass spectrometry: analytical perspective. *Mol Cell Proteomics* 1:204-212.
- Shimada M, Mahon MJ, Greer PA, Segre GV (2005) The receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide is hydrolyzed and its signaling properties are altered by directly binding the calpain small subunit. *Endocrinology* 146:2336-2344.
- Shiraha H, Glading A, Chou J, Jia Z, Wells A (2002a) Activation of m-calpain (calpain II) by epidermal growth factor is limited by protein kinase A phosphorylation of m-calpain. *Mol Cell Biol* 22:2716-2727.

- Shiraha H, Glading A, Chou J, Jia Z, Wells A (2002b) Activation of m-calpain (calpain II) by epidermal growth factor is limited by protein kinase A phosphorylation of m-calpain. *Mol Cell Biol* 22:2716-2727.
- Siesjo BK (1992a) Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. *J Neurosurg* 77:169-184.
- Siesjo BK (1992b) Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part II: Mechanisms of damage and treatment. *J Neurosurg* 77:337-354.
- Sohn SJ, Lewis GM, Winoto A (2008) Non-redundant function of the MEK5-ERK5 pathway in thymocyte apoptosis. *EMBO J* 27:1896-1906.
- Sohn SJ, Sarvis BK, Cado D, Winoto A (2002) ERK5 MAPK regulates embryonic angiogenesis and acts as a hypoxia-sensitive repressor of vascular endothelial growth factor expression. *J Biol Chem* 277:43344-43351.
- Solé S. (2005) Les metal.loproteinasas de matriu extracel.lular en la isquèmia cerebral. Tesis Doctoral. Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer. Univeridad de Barcelona.
- Soriano MA, Sanz O, Ferrer I, Planas AM (1997) Cortical infarct volume is dependent on the ischemic reduction of perifocal cerebral blood flow in a three-vessel intraluminal MCA occlusion/reperfusion model in the rat. *Brain Res* 747:273-278.
- Soudais C, Laplace-Builhe C, Kissa K, Kremer EJ (2001) Preferential transduction of neurons by canine adenovirus vectors and their efficient retrograde transport in vivo. *FASEB J* 15:2283-2285.
- Steiger HJ, Hanggi D (2006) Ischaemic preconditioning of the brain, mechanisms and applications. *Acta Neurochir (Wien)* ..
- Sticht C, Freier K, Knopfle K, Flechtenmacher C, Pungs S, Hofele C, Hahn M, Joos S, Lichter P (2008) Activation of MAP kinase signaling through ERK5 but not ERK1 expression is associated with lymph node metastases in oral squamous cell carcinoma (OSCC). *Neoplasia* 10:462-470.
- Sturla LM, Cowan CW, Guenther L, Castellino RC, Kim JY, Pomeroy SL (2005) A novel role for extracellular signal-regulated kinase 5 and myocyte enhancer factor 2 in medulloblastoma cell death. *Cancer Res* 65:5683-5689.
- Sun W, Kesavan K, Schaefer BC, Garrington TP, Ware M, Johnson NL, Gelfand EW, Johnson GL (2001) MEKK2 associates with the adapter protein Lad/RIBP and regulates the MEK5-BMK1/ERK5 pathway. *J Biol Chem* 276:5093-5100.
- Suzaki Y, Yoshizumi M, Kagami S, Koyama AH, Taketani Y, Houchi H, Tsuchiya K, Takeda E, Tamaki T (2002) Hydrogen peroxide stimulates c-Src-mediated big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) and the MEF2C signaling pathway in PC12 cells: potential role in cell survival following oxidative insults. *J Biol Chem* 277:9614-9621.
- Takeda K, Ichijo H (2002) Neuronal p38 MAPK signalling: an emerging regulator of cell fate and function in the nervous system. *Genes Cells* 7:1099-1111.
- Tanoue T, Adachi M, Moriguchi T, Nishida E (2000) A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nat Cell Biol* 2:110-116.
- Tanoue T, Maeda R, Adachi M, Nishida E (2001) Identification of a docking groove on ERK and p38 MAP kinases that regulates the specificity of docking interactions. *EMBO J* 20:466-479.

- Tatake RJ, O'Neill MM, Kennedy CA, Wayne AL, Jakes S, Wu D, Kugler SZ, Jr., Kashem MA, Kaplita P, Snow RJ (2008) Identification of pharmacological inhibitors of the MEK5/ERK5 pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 377:120-125.
- Terasawa K, Okazaki K, Nishida E (2003) Regulation of c-Fos and Fra-1 by the MEK5-ERK5 pathway. *Genes Cells* 8:263-273.
- Tompa P, Buzder-Lantos P, Tantos A, Farkas A, Szilagyi A, Banoczi Z, Hudecz F, Friedrich P (2004) On the sequential determinants of calpain cleavage. *J Biol Chem* 279:20775-20785.
- Tournier C, Hess P, Yang DD, Xu J, Turner TK, Nimnual A, Bar-Sagi D, Jones SN, Flavell RA, Davis RJ (2000) Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 288:870-874.
- Touyz RM, Cruzado M, Tabet F, Yao G, Salomon S, Schiffrin EL (2003) Redox-dependent MAP kinase signaling by Ang II in vascular smooth muscle cells: role of receptor tyrosine kinase transactivation. *Can J Physiol Pharmacol* 81:159-167.
- Truman AW, Millson SH, Nuttall JM, King V, Mollapour M, Prodromou C, Pearl LH, Piper PW (2006) Expressed in yeast, human ERK5 is a client of the Hsp90 chaperone and complements loss of the Slt2(Mpk1)p cell integrity stress-activated protein kinase. *Eukaryot Cell* ..
- van der WL, Lythgoe MF, Badin RA, Valentim LM, Akbar MT, de Bellerocche JS, Latchman DS, Gadian DG (2005) Neuroprotective effects of HSP70 overexpression after cerebral ischaemia--an MRI study. *Exp Neurol* 195:257-266.
- Wang RM, Yang F, Zhang YX (2006) Preconditioning-induced activation of ERK5 is dependent on moderate Ca(2+) influx via NMDA receptors and contributes to ischemic tolerance in the hippocampal CA1 region of rats. *Life Sci* ..
- Wang RM, Zhang QG, Li CH, Zhang GY (2005a) Activation of extracellular signal-regulated kinase 5 may play a neuroprotective role in hippocampal CA3/DG region after cerebral ischemia. *J Neurosci Res* 80:391-399.
- Wang RM, Zhang QG, Li J, Yang LC, Yang F, Brann DW (2008) The ERK5-MEF2C transcription factor pathway contributes to anti-apoptotic effect of cerebral ischemia preconditioning in the hippocampal CA1 region of rats. *Brain Res*.
- Wang RM, Zhang QG, Zhang GY (2004) Activation of ERK5 is mediated by N-methyl-D-aspartate receptor and L-type voltage-gated calcium channel via Src involving oxidative stress after cerebral ischemia in rat hippocampus. *Neurosci Lett* 357:13-16.
- Wang X (2001) The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 15:2922-2933.
- Wang X, Merritt AJ, Seyfried J, Guo C, Papadakis ES, Finegan KG, Kayahara M, Dixon J, Boot-Handford RP, Cartwright EJ, Mayer U, Tournier C (2005b) Targeted deletion of mek5 causes early embryonic death and defects in the extracellular signal-regulated kinase 5/myocyte enhancer factor 2 cell survival pathway. *Mol Cell Biol* 25:336-345.
- Wang X, Tournier C (2006) Regulation of cellular functions by the ERK5 signalling pathway. *Cell Signal* 18:753-760.
- Wang Y (2003) Fill a Gab(1) in cardiac hypertrophy signaling: search a missing link between gp130 and ERK5 in hypertrophic remodeling in heart. *Circ Res* 93:186-188.
- Warburg O (1956) On the origin of cancer cells. *Science* 123:309-314.

- Watson FL, Heerssen HM, Bhattacharyya A, Klesse L, Lin MZ, Segal RA (2001) Neurotrophins use the Erk5 pathway to mediate a retrograde survival response. *Nat Neurosci* 4:981-988.
- Weston CR, Lambright DG, Davis RJ (2002) Signal transduction. MAP kinase signaling specificity. *Science* 296:2345-2347.
- Winn RA, Van SM, Hammond M, Rodriguez K, Crossno JT, Jr., Heasley LE, Nemenoff RA (2006) Antitumorogenic effect of Wnt 7a and Fzd 9 in non-small cell lung cancer cells is mediated through ERK-5-dependent activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* 281:26943-26950.
- Wiznerowicz M, Trono D (2003) Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J Virol* 77:8957-8961.
- Woo CH, Shishido T, McClain C, Lim JH, Li JD, Yang J, Yan C, Abe J (2008) Extracellular signal-regulated kinase 5 SUMOylation antagonizes shear stress-induced antiinflammatory response and endothelial nitric oxide synthase expression in endothelial cells. *Circ Res* 102:538-545.
- Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270:1326-1331.
- Xu L, Deng X (2006) Protein kinase Ciota promotes nicotine-induced migration and invasion of cancer cells via phosphorylation of micro- and m-calpains. *J Biol Chem* 281:4457-4466.
- Yamashima T (2004) Ca²⁺-dependent proteases in ischemic neuronal death: a conserved 'calpain-cathepsin cascade' from nematodes to primates. *Cell Calcium* 36:285-293.
- Yan C, Luo H, Lee JD, Abe J, Berk BC (2001) Molecular cloning of mouse ERK5/BMK1 splice variants and characterization of ERK5 functional domains. *J Biol Chem* 276:10870-10878.
- Yan C, Takahashi M, Okuda M, Lee JD, Berk BC (1999) Fluid shear stress stimulates big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) activity in endothelial cells. Dependence on tyrosine kinases and intracellular calcium. *J Biol Chem* 274:143-150.
- Yan L, Carr J, Ashby PR, Murry-Tait V, Thompson C, Arthur JS (2003) Knockout of ERK5 causes multiple defects in placental and embryonic development. *BMC Dev Biol* 3:11.:11.
- Yang CC, Ornatsky OI, McDermott JC, Cruz TF, Prody CA (1998) Interaction of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) with a mitogen-activated protein kinase, ERK5/BMK1. *Nucleic Acids Res* 26:4771-4777.
- Yang DD, Kuan CY, Whitmarsh AJ, Rincon M, Zheng TS, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA (1997) Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature* 389:865-870.
- Yoon SC, Ahn YM, Jun SJ, Kim Y, Kang UG, Park JB, Kim YS (2005) Region-specific phosphorylation of ERK5-MEF2C in the rat frontal cortex and hippocampus after electroconvulsive shock. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29:749-753.
- Zhang F, Hackett NR, Lam G, Cheng J, Pergolizzi R, Luo L, Shmelkov SV, Edelberg J, Crystal RG, Rafii S (2003) Green fluorescent protein selectively induces HSP70-mediated up-regulation of COX-2 expression in endothelial cells. *Blood* 102:2115-2121.
- Zheng Q, Yin G, Yan C, Cavet M, Berk BC (2004) 14-3-3beta binds to big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1/ERK5) and regulates BMK1 function. *J Biol Chem* 279:8787-8791.

Zhou G, Bao ZQ, Dixon JE (1995) Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 270:12665-12669.

Zhu Y, Jones G, Tsutsui S, Opii W, Liu S, Silva C, Butterfield DA, Power C (2005) Lentivirus infection causes neuroinflammation and neuronal injury in dorsal root ganglia: pathogenic effects of STAT-1 and inducible nitric oxide synthase. *J Immunol* 175:1118-1126.

Webs consultadas:

- Allen Brain Atlas: <http://www.brain-map.org/>
- Diccionario de la lengua española: <http://www.rae.es/rae.html>
- *Human and animal cell lines*:
http://www.dsmz.de/human_and_animal_cell_lines/info.php?dsmz_nr=209&term=ACC%20209&highlight=
- La cascada isquémica: http://escuela.med.puc.cl/publ/Cuadernos/2000/pub_01_2000.html
- Mecanismos celulares y moleculares durante la isquemia cerebral:
http://www.infodoctor.org/neuro/cap5_3.htm
- PEST Finder: <https://emb1.bcc.univie.ac.at/toolbox/pestfind/pestfind-analysis-webtool.htm>
- Scansite: <http://scansite.mit.edu/index.html>