



Estudio de la apoptosis inducida por la inhibición de la vía de la PI3K/AKT

Aurelio Vázquez de la Torre Cervera

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Introducción

“Cuando se desea resolver una dificultad, conviene plantearla correctamente, pues el éxito posterior depende de que se deshaga la dificultad anterior, y no se puede deshacer un nudo sin saber cómo está hecho.”

Aristóteles; Metafísica, Libro II (β).

1. Introducción

La explosión demográfica iniciada en el siglo XIX ha venido acompañada de un envejecimiento de la población que puede considerarse un éxito de las políticas de salud pública y el desarrollo socioeconómico, pero también constituye un reto para la sociedad, que debe adaptarse a esta nueva realidad y lograr mantener la capacidad funcional de las personas de edad avanzada, así como su participación en ella de manera activa y sin renunciar a su seguridad.

Debido al aumento de la esperanza de vida y a la disminución de la tasa de fecundidad, la proporción de personas mayores de 60 años está aumentando más rápidamente que cualquier otro grupo de edad en casi todos los países. En el periodo entre el 2000 y el 2050, la población mundial mayor de 60 años se triplicará y pasará de 600 millones a 2000 millones. La mayor parte de ese aumento se producirá en los países del llamado tercer mundo, donde el número de personas de edad avanzada pasará de 400 millones en el año 2000 a 1700 millones en el 2050.

Este cambio demográfico tiene varias consecuencias para la salud pública. Gozar de una buena salud es fundamental para que las personas mayores puedan mantener su independencia así como tener un lugar en la vida familiar y en su comunidad. Cuidar la salud a lo largo de la vida y prevenir la enfermedad puede evitar o retrasar la aparición de enfermedades crónicas y no transmisibles, como las enfermedades neurológicas, los accidentes cerebrovasculares y muy especialmente las demencias.

Se define como demencia al deterioro global de las funciones intelectuales adquiridas previamente, con preservación del nivel de vigilancia, por efecto de una lesión orgánica cerebral. La pérdida de la memoria y de otras funciones superiores debe interferir, según la definición de demencia de la OMS, con el rendimiento laboral o social del individuo, lo cual, a veces, ocurre en fases relativamente avanzadas. La principal causa de demencia en España es la enfermedad de Alzheimer, que según datos del Ministerio de Sanidad del año 2011 su incidencia fue de 11,19 casos por cada 100.000 habitantes.

En el caso de las enfermedades neurodegenerativas cobra especial importancia su detección precoz y su abordaje a tiempo con el fin de reducir al mínimo sus consecuencias; además, quienes padezcan una enfermedad avanzada necesitarán cuidados y un apoyo adecuados de forma prolongada. La detección precoz de la enfermedad es especialmente importante para este grupo de enfermedades debido a que no se dispone a día de hoy de un tratamiento farmacológico realmente efectivo y tan solo es posible aplicar un tratamiento de tipo sintomático que en ningún caso es capaz de detener el avance de la enfermedad.

Nos encontramos ante un grupo realmente heterogéneo de enfermedades tanto por la diferente etiología, evolución o sintomatología como por la evidencia de predisposición genética que ha podido probarse para algunas patologías o que al menos se sospecha, como es el caso de la Enfermedad de Pick, también para otras como la Enfermedad de Alzheimer donde se ha podido describir al menos un tipo de enfermedad familiar y de la cual se han identificado marcadores bioquímicos específicos, sin embargo, la mayoría de estas enfermedades no son consideradas como hereditarias o ni tan siquiera se ha podido establecer una relación entre historia familiar y predisposición lo que ha dificultado la identificación de factores de riesgo o marcadores específicos. Pese a esta gran variabilidad las enfermedades neurodegenerativas guardan entre ellas algunos puntos comunes ya que todas se caracterizan por cursar con una pérdida progresiva de distintas poblaciones neuronales y existen evidencias crecientes de que esta pérdida neuronal se produce principalmente por apoptosis si bien, el motivo que desencadena esta apoptosis y las poblaciones neuronales afectadas es distinto según la patología.

Así, en la enfermedad de Alzheimer la formación de los ovillos neurofibrilares por hiperfosforilación de la proteína Tau (*microtubule associated protein tau*) y la formación de placas de β amiloide por la proteólisis anómala del péptido APP (*Amyloid precursor protein*) provoca la apoptosis inicialmente en la región hipocampal que progresa hasta afectar al córtex principalmente en las regiones prefrontal y temporal lo que provoca el declive cognitivo de estos pacientes. En la enfermedad de Parkinson parece que un incremento del estrés oxidativo lleva a una muerte selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la *substancia nigra*, que son especialmente sensibles al estrés oxidativo, la muerte de esta población neuronal lleva a la degeneración de la vía nigroestriada que se manifiesta con las alteraciones cinéticas propias de estos pacientes

como acinesia, temblor, rigidez o trastornos posturales. En otras enfermedades neurodegenerativas como en la enfermedad de Huntington la proteína ASK1 fosforila a la huntingtina mutada, lo que impide su degradación y produce su acumulación en el citoplasma de las neuronas y termina induciendo la apoptosis neuronal especialmente en la región del caudado y el putamen, la enfermedad se manifiesta con una aparición de movimientos anormales coreicos o distónicos faciales y de las extremidades a los que se añade una demencia subcortical. En el caso de la ataxia telangiectasia la mutación de la proteína ATM impide una correcta reparación del DNA por lo que los pacientes de esta enfermedad padecen una sensibilidad incrementada a las radiaciones ultravioleta o a las agresiones en el DNA, esto produce, entre otros signos la neurodegeneración, especialmente intensa, en el cerebelo donde se produce una muerte acelerada de las células de Purkinje o de las neuronas granulares que produce la ataxia que constituye el síntoma principal de la enfermedad. Todas estas enfermedades como vemos se caracterizan por la pérdida progresiva de poblaciones neuronales específicas que mayoritariamente mueren mediante procesos apoptóticos. Estudios en pacientes, en modelos animales y cultivos celulares han permitido un considerable avance en la comprensión de los mecanismos moleculares de la disfunción sináptica y de la neurodegeneración en este grupo de desórdenes.

Aunque las causas que llevan a estas enfermedades pueden ser diversas, todas ellas convergen en el hecho de que aparece una muerte celular programada por apoptosis que lleva a una progresiva muerte de poblaciones neuronales más o menos concretas. La inhibición de las rutas bioquímicas que regulan la apoptosis se ha mostrado útil en modelos animales de estas enfermedades, lo que demostraría la importancia que este tipo de muerte celular tiene en las enfermedades neurodegenerativas (Mattson MP et al. 2002). El estudio de los mecanismos implicados en esta apoptosis así como la identificación de nuevas dianas terapéuticas es especialmente acuciante si se quiere avanzar en la consecución de un abordaje terapéutico basado en la etiología de la enfermedad y que nos permita superar los tratamientos meramente sintomáticos de que hoy disponemos.

2. Apoptosis

El concepto apoptosis (del griego “decaer”) fue propuesto por primera vez en 1972 por J.R.F. Kerr, A.H. Wyllie y A.R. Currie y fue descrito como un proceso de muerte celular programada caracterizado por una serie aspectos morfológicos y bioquímicos tales como una retracción citoplasmática, que termina con el fraccionamiento del mismo y la liberación de cuerpos apoptóticos, que contienen en su interior organelas bien conservadas y fragmentos del núcleo. Los cuerpos apoptóticos son rápidamente fagocitados por las células vecinas (Kerr JF et al. 1972; Kerr JF 2002). A nivel nuclear puede observarse una condensación del DNA así como una degradación del mismo en fragmentos de 180-200 pares de bases (bp) que se producen por la acción de las DNAsas en las regiones internucleosomales. Es importante destacar que la apoptosis es un proceso activo que requiere del gasto de energía y que se lleva a cabo sin liberar componentes intracelulares al espacio extracelular ya que estos podrían ser deletéreos para las células vecinas.

Se trata de un mecanismo central y común en todos los organismos pluricelulares, ya que es imprescindible en numerosas facetas de su desarrollo como la organogénesis, la homeóstasis de los tejidos y para la eliminación de células dañadas o infectadas (Wyllie AH et al. 1980). Este se diferencia claramente de la muerte celular que se produce durante la lesión de los tejidos, conocido como necrosis, en la cual no existe un consumo de energía y se produce una liberación de los componentes intracelulares al medio extracelular. Sin embargo, durante los últimos años se ha vinculado un incremento anormal de la apoptosis con un gran número de enfermedades degenerativas, entre las que destacan por su importancia la enfermedad de Alzheimer, el Parkinson y el Huntington donde se produce una pérdida apoptótica de neuronas por diversas causas (Heneka MT, O'Banion MK 2000; Singh S et al. 2007; Johri A, Flint Beal M 2011).

Desde que la apoptosis fue propuesta como un mecanismo común en muchos organismos y que se encuentra evolutivamente muy conservada, muchos grupos de investigación centraron su atención en este fenómeno, en su bioquímica y en su regulación. Actualmente conocemos un número creciente de marcadores bioquímicos

como el fraccionamiento de proteínas estructurales del citoesqueleto como la actina, α -espectrina, o gelsolina, proteínas que forman parte de la estructura nuclear como la lámina A o lámina B, también se ha avanzado en el conocimiento de los mecanismos mediante los cuales se desencadena la apoptosis (Saraste A et al. 2000).

La ruta bioquímica de la apoptosis fue descrita por vez primera en los trabajos de Horvitz y colaboradores en *Caenorhabditis elegans* (Ellis HM, Horvitz HR 1986; Denning DP et al. 2012; Kroemer G et al. 1995). Desde entonces numerosos avances han mostrado que la vía apoptótica puede diferir dependiendo del tipo celular o el estímulo apoptótico. Igualmente las características morfológicas de esta apoptosis no siempre guardan correlación con los aspectos bioquímicos. La distinción entre muerte apoptótica y no apoptótica no siempre es clara y existe un solapamiento considerable con otros tipos de muerte celular. Esta ambigüedad y complejidad caracteriza entre otros, al fenómeno de muerte celular observado en el sistema nervioso central.

A pesar de esto, algunas generalizaciones han llevado a un consenso entre los investigadores para acordar una nomenclatura de la apoptosis y otros tipos de muerte celular programada (Kroemer G et al. 2009). Uno de los puntos de vista en común es el hecho de que no podemos hablar de apoptosis sin que exista activación de las cistein proteasas conocidas como caspasas (Stefanis L et al. 2005).

2.1 Caspasas

La historia de las caspasas comienza con el descubrimiento en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* de la Ced3 (Yuan J et al. 1993), en mamíferos sus homologas son las caspasas, una familia de cistein proteasas que incluyen en su centro catalítico un motivo pentapéptido que contiene cisteína (Gln-Ala-Cys-X-Gly, siendo X Arg, Gln o Gly) y requieren de un residuo de aspartato en el extremo aminoterminal del punto de corte (Love S 2003; Hengartner et al. 2000). Hasta la fecha se han identificado catorce caspasas diferentes, aunque si bien las caspasas 11 y 12 no han sido halladas en humanos el gran número de caspasas descrito en mamíferos ha llevado a plantear la teoría de que se trata de un proceso fuertemente regulado y que dependiendo del estímulo se activa un grupo concreto de caspasas u otro (Troy CM et al. 1997). Las caspasas son sintetizadas en forma de proenzimas (zimógenos o procaspasas).

Estructuralmente, todas las procaspasas comprenden tres dominios, un prodominio que precede a una subunidad larga de 20kDa aproximadamente (p20) y una subunidad corta de 10kDa aproximadamente (p10). Su activación se da por escisión proteolítica de estos tres fragmentos, normalmente por la acción de otras caspasas ya activas. Las caspasas activas son heterotetrámeros que resultan de la unión de dos fragmentos de bajo peso molecular con dos fragmentos de elevado peso molecular (Shi Y 2004).

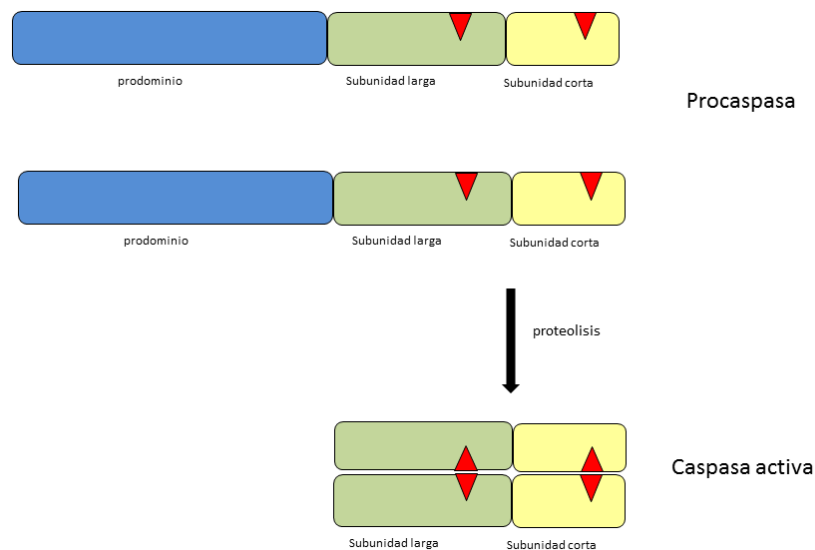


Figura 1: Proceso de activación de las caspasas desde la forma de procaspasa inactiva, la escisión proteolítica de los prodominios permite la formación del tetrámero activo.

Las caspasas pueden ser subdivididas en tres grupos, el primero conocido como enzimas convertidoras de interleucina-1 (caspasa-1, 4, 5, 11, 12 y 14) que están relacionadas con la maduración de las citosinas, el segundo grupo son aquellas caspasas directamente relacionadas con la apoptosis (caspasa-2, 3, 6, 7, 8, 9 y 10). Este último grupo puede a su vez dividirse en dos subgrupos, las caspasas iniciadoras, o apicales (2, 8, 9 y 10) y las caspasas efectoras (3, 6 y 7). Las caspasas iniciadoras tienen largos prodominios y dos regiones de interacción proteína-proteína características: dominios DED (*Death Effector Domain*) y los CARD (*Caspase Activation and Recruitment Domain*), este grupo de caspasas se activan precozmente e inician las cascadas de transducción de señales que llevarán a la activación de las caspasas efectoras.

Las caspasas efectoras por el contrario tienen prodominios cortos y son las responsables directas de la proteólisis de sustratos celulares, esta acción es la responsable de muchas de las características morfológicas propias de la apoptosis. Como la degradación de proteínas del citoesqueleto como la actina, la gelsolina o la α -espectrina.

El proceso de activación y función de las caspasas está fuertemente regulado a diferentes niveles el primero de ellos es la necesidad de transactivación desde su forma de procaspasa hasta la forma de caspasa activa, para lo cual se requiere la escisión proteolítica de su prodominio aminoterminal, pero este no es el único mecanismo de activación de las caspasas ya que se ha descrito una regulación alostérica como en el caso de la activación de la caspasa 9 al unirse a citocromo C y Apaf-1. Es posible también la regulación por fosforilación, como la descrita en el caso de la caspasa 9 que se mantiene inhibida tras ser fosforilada por AKT (Cardone MH et al. 1998), otros mecanismos descritos son la expresión genética, nitrosilación, oxidación y su ubiquitinización (Degterev et al. 2003).

La activación de estas caspasas puede llegar por múltiples mecanismos, dependiendo de los cuales el papel de las caspasas es diferente. Sorprendentemente, estudios recientes han demostrado el papel de las caspasas en el SNC maduro en el que participan en funciones neuronales clave como la remodelación axonal donde las caspasas están implicadas en la eliminación de axones aberrantes o no funcionales así como ramificaciones no necesarias (Williams DW et al. 2006).

Las caspasas también están implicadas en la función sináptica ya que se ha demostrado que son necesarios bajos niveles de activación de caspasa 3 para producir cambios sinápticos relacionados con la memoria. También se han relacionado con distintas patologías como la depresión de larga duración (LTD) donde las sinapsis pasan a ser menos sensibles a estímulos específicos y se produce una mengua de su superficie o una mayor eliminación, estos fenómenos se han relacionado con la activación de la caspasa 3 en las sinapsis, además los inhibidores de las caspasas 9 y 3 son capaces de revertir la sintomatología de este tipo de depresión (Li Z et al. 2010).

Las caspasas también han sido relacionadas con trastornos neurodegenerativos como es el caso de la enfermedad de Alzheimer donde se considera que participan en la

formación de los ovillos neurofibrilares (NFG) ya que parece que es necesario que las caspasas produzcan un fraccionamiento de la proteína tau para que comience la agregación de los mismos (Ayala-Grosso et al. 2003, Cotman CW et al. 2005, Gastard MC et al. 2003; Ávila J 2010; Canu N et al. 1998). Además modelos *in vitro* muestran que los oligómeros de β amiloide producen la activación de las caspasas (Allen JW et al. 2001, D'Amelio M et al. 2011 Reifert J et al. 2011). Igualmente se ha probado el papel de las caspasas en respuestas inflamatorias llevando a cabo el procesamiento de la forma inmadura de la interleucina-1 β (Degterev A et al. 2003), pero las caspasas son más conocidas por su papel mediador en la respuesta a estímulo de muerte que conducen a la apoptosis celular, estos pueden ser de naturaleza muy diversa, sin embargo se han agrupado en dos vías principales no excluyentes entre sí que se conocen como vías extrínseca y vía intrínseca o mitocondrial (Franklin JL 2011).

2.1.1 Vía extrínseca

La vía extrínseca comprende aquellos mecanismos en los cuales se desencadena la apoptosis mediante la unión de un ligando proapoptótico a receptores que se encuentran en la membrana plasmática, estos receptores pertenecen a la superfamilia de los receptores de factor de necrosis tumoral (TNFR) entre los que se incluyen algunos como: TNFR-1, Fas y p75^{NTR}.

La aparición de un estímulo apoptótico puede llevar a la activación de determinados factores de transcripción como los pertenecientes a la familia FOXO que regulan la transcripción de algunos genes como Fas ligando (FasL), que están implicados en esta vía.

FasL inicia la apoptosis por unión a su receptor Fas, desencadenando el reclutamiento de FADD (*Fas-Associated protein with Death Domain*), que forma un complejo con Fas y FasL. FADD es capaz de unirse mediante su extremo aminoterminal a la procaspasa 8, este complejo es conocido como DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*) y una vez ensamblado produce la activación proteolítica de la caspasa 8 que se libera así del DISC al citoplasma y actuará sobre la procaspasa 3 llevándola a su forma activa, igualmente la caspasa 8 activa es capaz de proteolizar a la proteína Bid a su forma activa tBid para

desencadenar la vía intrínseca mitocondrial por liberación del citocromo C (Wei MC et al. 2000; Degli Esposti M et al. 2003).

2.1.2 Vía intrínseca

La mitocondria, es un orgánulo de doble membrana implicado en distintos procesos bioquímicos como en la producción de ATP mediante el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la regulación de los niveles citosólicos de Ca^{2+} y es también un reservorio de proteínas proapoptóticas como el citocromo C, Smac/Diablo, AIF o la endonucleasa G (endo G). A través de la liberación de estas proteínas desde la mitocondria hasta el citosol participa en la regulación de la apoptosis. La idea de que la mitocondria podría jugar un papel importante en la apoptosis fue propuesta por primera vez por Hockenbery y colaboradores, los cuales demostraron que la proteína antiapoptótica Bcl-2 se encontraba localizada mayoritariamente en la membrana externa mitocondrial (Hockenbery D 1990). Hoy sabemos que la mitocondria juega un papel central en la activación de las caspasas que están implicadas en la vía intrínseca o mitocondrial, esta vía en concreto se considera que juega un papel primordial en la apoptosis neuronal (Broughton B et al. 2008; Galluzzi L et al. 2009; Manfredi G et al. 2005).

La vía intrínseca fue propuesta por Kroemer y colaboradores en 1995 (Kroemer G et al. 1995; Jacotot E et al. 1999), según esta teoría, la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, que se manifiesta como una pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), es la responsable de la liberación al citosol de proteínas del espacio intermembrana de la mitocondria, tales como el citocromo C que promueve la activación de las caspasas en el citosol (Kroemer G et al. 2007; Vaux DL et al. 2011; Bobba A et al. 2004), este fenómeno es conocido como MOMP (*Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*). El citocromo C liberado al citosol se une a Apaf-1, que en presencia de dATP, provoca que Apaf-1 oligomerice en un complejo heptamérico conocido como apoptosoma, la procaspasa-9 es reclutada entonces a este apoptosoma donde se activará por autoescisión proteolítica. Una vez activa se disocia del complejo y proteoliza a la procaspasa 3 dando lugar a su forma activa. (Diwakarla S et al. 2009; Shi Y 2002; Würstle LM et al. 2012; Zhou H et al. 1999)

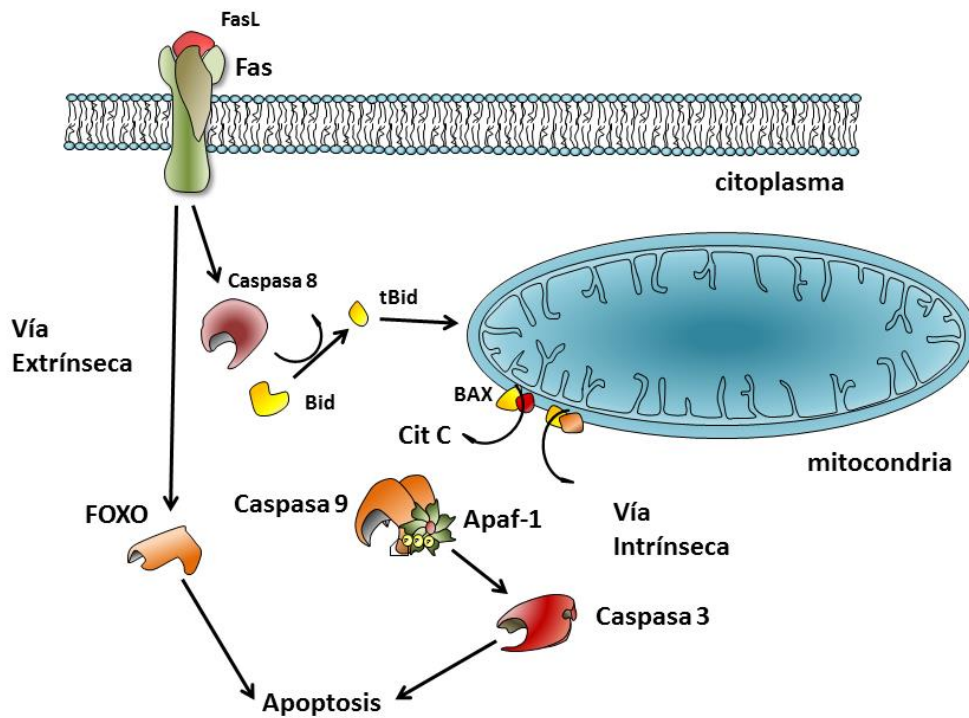


Figura 2: Esquema de las vías extrínseca e intrínseca de activación de las caspasas. En la vía extrínseca la unión del FasL activa la caspasa 8 que lleva a la formación de tBid y este a la liberación del citocromo C. En la vía intrínseca, la permeabilización de la membrana interna mitocondrial produce la liberación del citocromo C y formación del apoptosoma, la caspasa 9 activa.

2.1.2.1 Factores apoptogénicos liberados de la mitocondria

La permeabilización de la mitocondria y su despolarización son seguidas de la liberación de una serie de factores proapoptóticos desde el espacio intermembranoso hasta el citosol. Estos factores son los responsables de la activación de un gran número de dianas que conducen a la apoptosis y que son las causantes de las propiedades morfológicas que diferencian este proceso de muerte celular activo de otros como es la necrosis.

El primero de estos factores mitocondriales identificados fue el citocromo C (Franklin JL 2011), en células sanas se encuentra localizado en el espacio intermembrana donde forma parte de los complejos III y IV de la cadena transportadora de electrones. En el citoplasma el citocromo C lleva a la apoptosis mediante la formación del apoptosoma,

este se forma por la unión del citocromo C a Apaf-1 y dATP, esto induce un cambio conformacional en Apaf-1 que permite el ensamblaje de la caspasa 9 a través del dominio CARD de esta. Este complejo activo conocido como apoptosoma será el responsable de la activación de la caspasa 3.

Otras proteínas apoptóticas liberadas desde el espacio mitocondrial son la Smac/Diablo que produce la liberación de las caspasas 3 y 9 de sus represores XIAP (Shiozaki EN et al. 2004), AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) es un factor altamente conservado del complejo I mitocondrial que tiene actividad oxidorreductasa/NADH oxidasa que es necesaria para el correcto ensamblaje y actividad de la cadena respiratoria, como se demuestra por el hecho de que su deficiencia conduce a la reducción de la fosforilación oxidativa y de los niveles de expresión de los complejos I y III de la cadena respiratoria mitocondrial (Aouacheria A et al. 2007). Por otro lado, ante determinados estímulos proapoptóticos AIF se libera desde el espacio intermembrana al citosol y de este al núcleo donde induce la fragmentación del DNA y la condensación de la cromatina (Sevrioukova IF 2011), sin embargo, AIF no posee actividad DNasa por sí mismo y requiere de la unión con otro factor proapoptótico localizado en el espacio intermembrana, la endonucleasa G (Endo G) con la que formará el dímero activo (Li LY et al. 2001; Cregan SP et al. 2004; Galluzzi L et al. 2009) que una vez liberado se transloca al núcleo donde induce la fragmentación del DNA, un papel semejante en la apoptosis al que cumple la Endonucleasa G.

2.2 Miembros de la familia Bcl-2

La membrana externa mitocondrial es impermeable a numerosos solutos, entre ellos distintas proteínas proapoptóticas que permanecen retenidas en el espacio intermembrana. La integridad de la membrana externa mitocondrial está regulada por una familia de proteínas evolutivamente conservada conocida como Bcl-2 (Westphal D et al. 2011). El gen de Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) fue originalmente descrito como un proto-oncogén del linfoma folicular humano (Tsujiimoto et al. 1984). Desde entonces se han identificado numerosos miembros de esta familia.

Los miembros de la familia de proteínas Bcl-2 están subdivididos en tres grupos basándose en su efecto pro- o antiapoptótico y por la posesión de dominios de

homología Bcl-2 (BH) (Schinzel A et al. 2004; Youle RJ, Strassor A 2008). Las divisiones de esta familia son:

- Antiapoptóticas *Bcl-2-like*
- Proapoptóticas *BAX-like*
- Proapoptóticas *BH3-only proteins*

Cuatro dominios de homología Bcl-2 (BH1-BH4) caracterizan a esta familia. Tanto el grupo de proteínas antiapoptóticas *Bcl-2-like proteins* (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1) como las proapoptóticas *Bax-like proteins* (Bax, Bak, Bok) poseen cuatro dominios BH (Degli Esposti M et al. 2003). Además de cuatro dominios BH estas dos subfamilias se caracterizan por la presencia de un dominio transmembrana. Las proteínas proapoptóticas *BH3-only proteins* (Bid/Bod, Bad, Bmf, Noxa, Puma, Dp5/Hrk) tan solo poseen uno de estos dominios y ningún dominio transmembrana.



Figura 3: Estructura de los miembros de la familia Bcl-2, la familia Bcl-2 está dividida en tres grupos basándose en sus dominios de homología Bcl-2 (BH). Las proteínas pro y antiapoptóticas contienen cuatro dominios BH, mientras que las *BH3-only proteins*, como su propio nombre indica, tan solo muestran el dominio BH3.

2.2.1 Proteínas prosupervivencia

Las proteínas antiapoptóticas *Bcl-2-like proteins* (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 y A1) poseen cuatro dominios BH con semejante estructura tridimensional (Strasser A 2005). Los dominios BH1, BH2 y BH3 interaccionan para formar una región hidrofóbica en la superficie de la proteína. Esta región permite la interacción del dominio BH3 con los miembros proapoptóticos de la familia y es un factor crítico para evitar la acción de las últimas.

2.2.2 Proteínas proapoptóticas

Las proteínas que pertenecen a este grupo se conocen como *BAX-like*. La apoptosis regulada por miembros de la familia Bcl-2 requiere de la presencia de Bax o Bak para la permeabilización de la membrana externa mitocondrial. Estas dos proteínas proapoptóticas contienen los dominios BH1-3 y tienen una estructura tridimensional semejante a otros miembros de la familia (Moldoveanu T et al. 2006). Las estructuras no activas de estas moléculas muestran una semejanza con otros miembros proapoptóticos como Mcl-1. Esencialmente son proteínas globulares que comprenden nueve hélices α . La hélice hidrofóbica $\alpha 5$ se encuentra protegida entre siete hélices anfipáticas. La hélice $\alpha 9$, en el extremo carboxiterminal, actúa como dominio transmembrana que puede anclar a Bax o Bak a la membrana externa mitocondrial. En el caso de Bax su hélice $\alpha 9$ se encuentra bloqueada por la hélice $\alpha 5$ hidrofóbica, por lo que es necesario un cambio de conformación para que Bax pueda anclarse a la membrana externa mitocondrial, lo que explica que Bax sea predominantemente citosólico en estado basal, una vez translocadas a la membrana externa mitocondrial las moléculas de Bax pueden interaccionar entre ellas a través de su dominio BH3 para formar dímeros.

Este grupo de proteínas se consideran efectoras de esta vía apoptótica, cuando están activadas permeabilizan la mitocondria y liberan las proteínas apoptogénicas al citosol. Se postula que esto sucede a través de la formación de poros en la membrana externa mitocondrial (Westphal D et al. 2011).

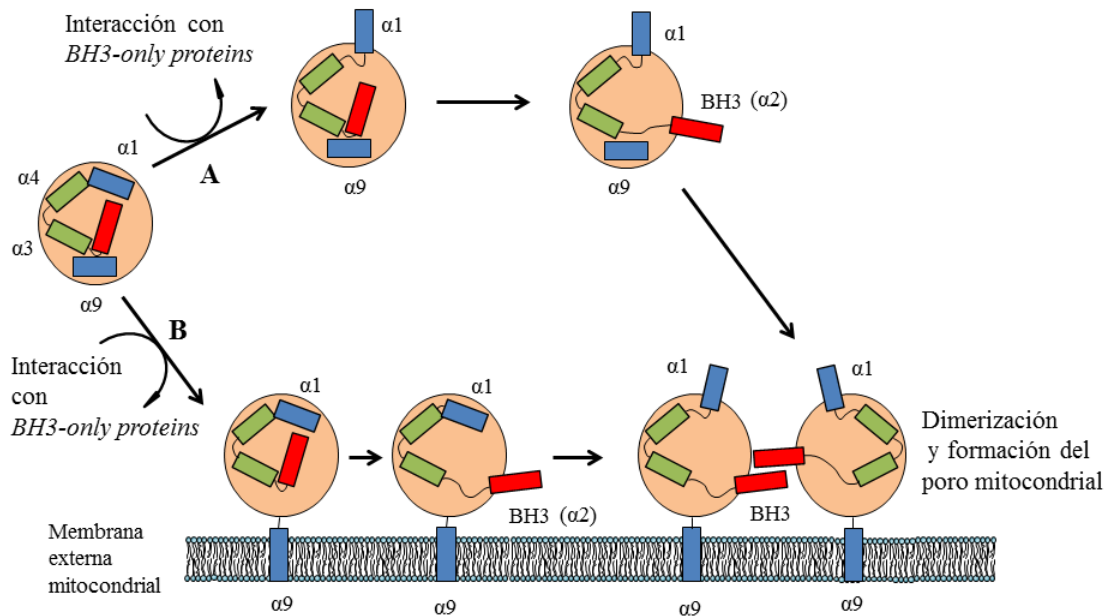


Figura 4: Dos posibles secuencias de cambio conformacional en Bax que llevan a la apoptosis. En el caso A la interacción de una *BH3-only protein* produce un cambio conformacional en $\alpha 1$ que permite la liberación del dominio BH3 ($\alpha 2$), la liberación de este último permite el cambio de conformación en $\alpha 9$ y translocación a la membrana externa mitocondrial. En el caso B la interacción de una *BH3-only protein* en un dominio distinto de Bax produce inicialmente un cambio conformacional en $\alpha 9$ y translocación a la membrana externa mitocondrial que permite la liberación del dominio BH3 ($\alpha 2$), la liberación de este último permite el cambio de conformación de $\alpha 1$ (adaptado de Westphal D et al. 2011).

2.2.3 *BH3-only proteins*

Las *BH3-only proteins* son los homólogos en vertebrados a las Egl-1 en *Caenorhabditis elegans* y desde la descripción de Bad como primer miembro de este subgrupo (Yang Y et al. 1998) se han descrito numerosos miembros más como Bid, Bik, Dp5/Hrk, Bim/Bod, PUMA o NOXA. Estas proteínas cumplen una función proapoptótica y la única región que muestran en común con el resto de miembros de la familia es el dominio BH3 (Giam M et al. 2009).

Estas proteínas contienen una única región en común con el resto de miembros de la familia, el dominio BH3 y todas ellas cumplen una función proapoptótica (Giam M et al. 2009). Todavía no se conoce bien el mecanismo de acción de alguna de estas

proteínas, sin embargo numerosos estudios han mostrado que una sobreexpresión de las *BH3-only proteins* no es suficiente para desencadenar la apoptosis sin la presencia de Bax, Bak u otros miembros de la subfamilia *BAX-like proteins* que son las proteínas efectoras de la respuesta apoptótica. Según estos estudios las *BH3-only proteins* interaccionan con los miembros de la subfamilia *BAX-like proteins* produciendo un cambio conformacional que permite la dimerización de estas últimas, lo que lleva finalmente a la apoptosis (Giam M et al. 2009; Bouillet et al. 1999; Westphal D et al. 2011).

Las *BH3-only proteins* interaccionan los miembros pro-supervivencia de la familia Bcl-2, el dominio BH3 de éstas interacciona con la región hidrofóbica formada por BH1, BH2 y BH3 de las moléculas pro-supervivencia, la selectividad de las *BH3-only proteins* puede variar, dándose casos de proteínas fuertemente selectivas por un miembro de la familia de las *Bcl-2-like*, como sucede con el caso de Bad que es capaz de interaccionar con Bcl-2 o Bcl-xL pero no con Mcl-1 o A1, por el contrario otras *BH3-only proteins* son capaces de interaccionar con varias diferentes como sucede con Bim, PUMA y NOXA.

Las *BH3-only proteins* están fuertemente reguladas a nivel de expresión, transcripción y procesamiento alternativo (Ma C et al. 2007). Por ejemplo, Bim posee tres isoformas diferentes generadas por el procesamiento alternativo conocidas como forma corta (S), larga (L) y extralarga (EL), siendo la forma corta la más potente inductora de apoptosis (O'Connor et al. 1998, Engel T. et al. 2011), además de incrementar su transcripción Bim puede ser regulado por liberación de la cadena ligera dineína LC8 que lo mantiene inactivo (Puthalakath H et al. 1999) y por fosforilación (Putchá GV et al. 2003). Esta regulación tan precisa hace pensar que juegan un papel clave en la regulación de las vías apoptóticas y la formación del poro mitocondrial.

2.2.4 Teoría del poro mitocondrial

La permeabilización de la membrana externa mitocondrial está mediada principalmente por los miembros de la subfamilia *BAX-like proteins* que participan en la formación de

un poro que permite la salida de proteínas proapoptóticas desde el espacio intermembrana al citosol (Jourdain A et al. 2009).

Estas proteínas actúan conjuntamente para formar un poro mitocondrial, en estado basal Bax está principalmente localizado en el citosol con una proporción minoritaria en la mitocondria (Hsu SY et al. 1997). Tras un estímulo apoptótico, algunas *BH3-only proteins* como Bid o Bim inducen cambios conformacionales en Bax que producen que su extremo carboxiterminal hidrofóbico quede expuesto y permita el anclaje de Bax a la membrana externa mitocondrial, finalmente una vez en la membrana se da un nuevo cambio conformacional que produce que las hélices $\alpha 5$ y $\alpha 6$ se inserten igualmente en la membrana (Jourdain A et al. 2009; Makin GW et al. 2001). La proteína Bax en esta conformación puede oligomerizar y permite la liberación del citocromo C (Martinou JC, Youle RJ 2011).

En contraste con Bax, otras proteínas de esta subfamilia como Bak se encuentran constitutivamente insertas en la membrana mitocondrial, donde en estado basal se encuentran unidas a VDAC2, Mcl-1 o Bcl-xL (Willis SN et al. 2005), del mismo modo que sucede con Bax, la activación de Bak requiere de la interacción con las *BH3-only proteins* que inducen un cambio de conformación en Bak (Lindsten T et al. 2005), que lleva a la exposición de su dominio BH3 que interacciona con la región hidrofóbica de otra molécula de Bak (Dewson G et al. 2008) estos homodímeros parecen llevar a cabo la activación final de las moléculas de Bak.

Una vez Bax y Bak inducen la permeabilización de la membrana externa mitocondrial y con ella la liberación de las proteínas del espacio intermembrana hacia el citosol provocando la formación del apoptosoma e iniciando la vía intrínseca.

2.2.4.1 Modelo de activación directa

Existen indicios de que ciertas *BH3-only proteins* podrían desencadenar la activación de Bax y Bak por sí mismas, por ejemplo la forma activa de Bid, su forma trucada (tBid), puede inducir cambios conformacionales tanto en Bax como en Bak que permiten que estos interactúen para homo-oligomerizar y formar poros a través de la interacción de sus dominios BH3 con las regiones hidrofóbicas de otra unidad (Desagher S et al. 1999). Se ha descrito también que Bim y PUMA pueden inducir directamente la

oligomerización de Bax o Bak y llevar a la liberación del citocromo C (Letai A et al. 2002; Kuwana T et al. 2008; Newmeyer DD 2005), este grupo de *BH3-only proteins* se conocen como activadores, ya que son capaces de interactuar directamente con Bax o Bak, mientras que el resto de los miembros de esta subfamilia se denominan sensibilizadores ya que no tienen la capacidad de desencadenar la formación del poro *per se*. Cuando aparece un estímulo apoptótico las *BH3-only proteins* sensibilizadoras son activadas y se unen a proteínas pro-supervivencia, lo que produce la liberación de las *BH3-only proteins* activadoras que son capaces de interactuar con Bax o Bak para inducir la apoptosis (Letai A et al. 2002, Kuwana T et al. 2008).

2.2.4.2 Modelo de activación indirecta

Las *BH3-only proteins* necesitan unirse al menos a algunos miembros pro-supervivencia de las Bcl-2 para tener una acción proapoptótica. En el modelo de activación indirecto (también conocido como modelo de activación por desplazamiento) Bax y Bak se encuentran en una conformación activa pero unidos a miembros pro-supervivencia que los mantienen inhibidos hasta que son liberados de sus represores. Las *BH3-only proteins* activan la apoptosis por unión y neutralización de las proteínas pro-supervivencia lo que permite la homo-oligomerización de Bax o Bak y formación del poro mitocondrial (Willis SN et al. 2005; Newmeyer DD 2005). De acuerdo con este modelo la apoptosis ocurre cuando todas las proteínas pro-supervivencia están neutralizadas.

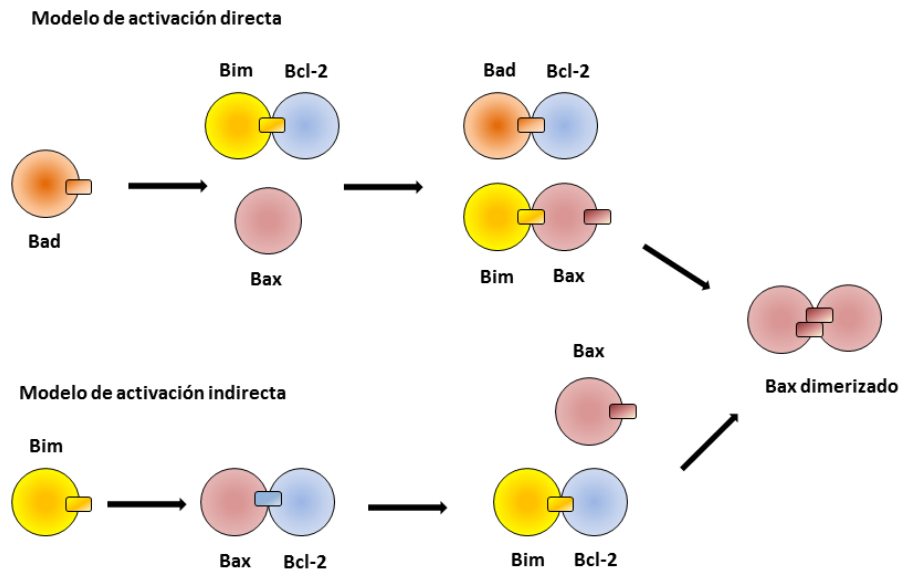


Figura 5: Modelos de activación de Bax/Bak por las *BH3-only proteins*. En el modelo de activación directa, una *BH3-only protein* activadora, como Bim, se encuentra secuestrada por una proteína prosupervivencia como Bcl-2 hasta que es desplazada por una *BH3-only protein* sensibilizadora como Bad. Diferentes activadores libres pueden unirse para activar proteínas efectoras como Bax y llevar a su oligomerización. En el modelo indirecto, una proteína efectora ya se encuentra activada pero oligomeriza con una proteína prosupervivencia hasta que una *BH3-only protein* neutraliza a la prosupervivencia permitiendo la oligomerización de las efectoras (Giam M et al. 2009).

2.3 Ciclo celular y su papel en la apoptosis neuronal

Una de las vías que conducen a la apoptosis en neuronas y que se ha postulado que puede tener una especial significación en las enfermedades neurodegenerativas donde encontramos muerte neuronal por apoptosis, es la que se conoce como reentrada en el ciclo celular. Ante determinados estímulos apoptóticos se desencadenaría una respuesta proliferativa aberrante provocando la muerte de la célula, ya que la neurona altamente especializada no dispone de la maquinaria necesaria para completar este ciclo celular. Esta teoría surge a partir de la observación de alteraciones en proteínas relacionadas con el ciclo celular y expresión ectópica de ciclinas y CDKs en regiones encefálicas

afectadas por patologías como el Parkinson o el Alzheimer (Lopes J, Agostinho P 2011; Bonda DJ et al. 2011; Giardina SF, Beart PM 2002; Hisanaga S, Endo R 2010).

2.3.1 Ciclo celular

Las células se reproducen duplicando su contenido genético y luego dividiéndose en dos en un proceso que conocemos como ciclo de división celular. Este ciclo ha sido dividido en distintas fases conocidas como G_1 , S, G_2 y M. Se conoce como fase S a la fase de síntesis del DNA, la fase G_1 es la fase que se extiende desde el final de una mitosis hasta que la célula vuelve a replicar su material genético, en ella la célula crece, se desarrolla y sintetiza toda una serie de componentes como mRNA, proteínas y otros componentes que le serán necesarios para la fase de división. La fase G_2 es aquella fase en la que se da la mitosis celular y separación de la célula madre en dos células hijas.

Existe también la conocida como fase G_0 en la cual una célula se encuentra en estado quiescente y no se divide ni se prepara para la entrada en mitosis, esta fase es característica de células con escasa actividad divisoria o que no se dividen como es el caso de las neuronas.

La progresión del ciclo celular se encuentra controlada por una serie de puntos de restricción, estos puntos de restricción o de control contienen señales de retraso que frenan la progresión del ciclo celular en caso de detectar elementos anómalos, como errores de copia en el DNA, igualmente evitan que pueda comenzar un determinado proceso sin que el anterior haya concluido, estos puntos de control están regulados por complejos protéicos formados por dos familias de proteínas las CDKs (*Cyclin Dependent Kinases*) las cuales fosforilan diversos sustratos que son necesarios para el avance del ciclo celular, sin embargo, estas CDKs requieren de su asociación a ciclinas para formar complejos activos, las ciclinas son una familia de proteínas que sufren un ciclo de síntesis y degradación a lo largo del ciclo celular. De esta manera cada ciclina se asocia con una o más de una CDK específica, permitiendo superar el punto de restricción concreto en el que se encuentre la célula. Durante la fase G_1 , en la cual la célula se prepara para la división existe el punto de control R, para que la célula sea capaz de superar este punto de control se requiere de la formación del complejo ciclina D1/CDK4-6 ya que este complejo activo será capaz de fosforilar a la proteína del retinoblastoma (Rb), posteriormente esta Rb es también fosforilada por un nuevo

complejo de ciclina E/CDK2. Rb en estado basal se une al factor de transcripción E2F1. La fosforilación de Rb lleva a un cambio de conformación de esta proteína que permite la liberación de E2F1 y su translocación al núcleo, donde activa la síntesis de las proteínas necesarias para la progresión hacia la fase S. En la fase S se da la replicación del genoma celular, al final de esta fase aparece un nuevo punto de restricción regulado por ciclinas y CDKs, concretamente por el complejo ciclina B/CDK1, este complejo permitirá la progresión hacia la fase M gracias a la regulación de cambios en la red de microtúbulos, el citoesqueleto y la lámina nuclear (Kraft C et al. 2003).

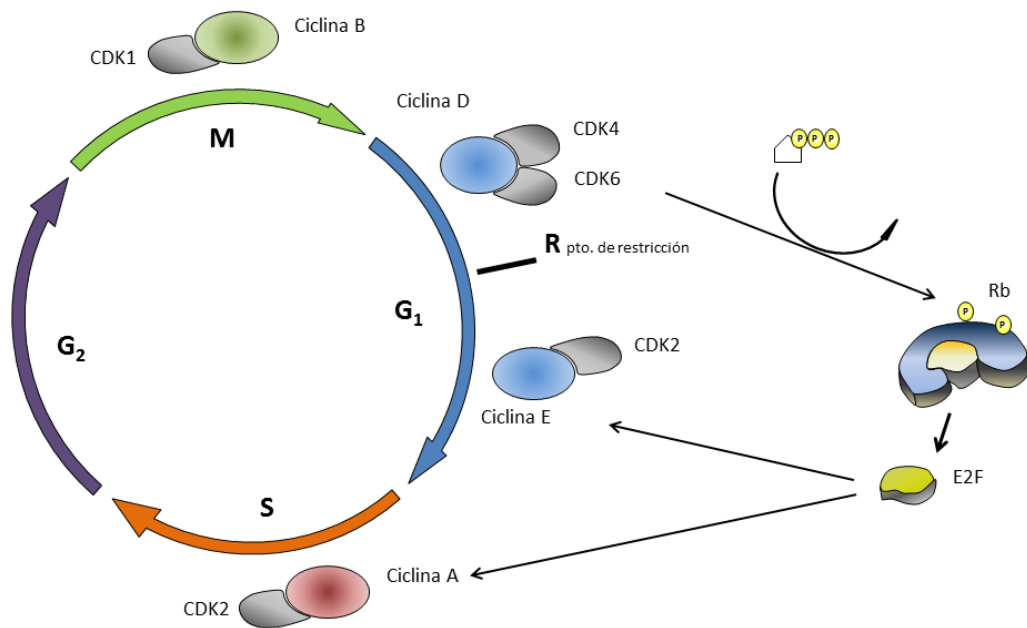


Figura 6: Esquema de las distintas fases del ciclo celular y del papel del Rb y E2F en el control de los complejos de ciclina/CDK que intervienen en cada una de ellas.

2.3.1.1 Regulación del ciclo celular

Como hemos visto la progresión del ciclo celular se encuentra formado por complejos que contienen una subunidad reguladora (la ciclina) y una subunidad catalítica, cinasas dependientes de ciclinas (CDKs), un tercer grupo de proteínas participa en la regulación de estos complejos, los inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CDKI). Hasta la fecha se han identificado trece CDKs diferentes y 25 ciclinas (Monaco EA et al. 2003).

2.3.1.2 Ciclinas

Tras un estímulo mitótico aumenta la expresión de las ciclinas, la expresión de cada una de ellas varía durante el ciclo celular y dado que, cada tipo de ciclina se une selectivamente a su CDK específica para formar el complejo activo, la expresión sincronizada de las ciclinas determina el paso del punto de restricción específico en el que se encuentra la célula. Las ciclinas que intervienen en la regulación de las fases del ciclo celular son la D, E, A y B.

La ciclina D, de la que se conocen distintos subtipos (D1, D2, D3) se expresa durante las primeras fases del desarrollo celular y son necesarias para superar el punto de restricción R. Estas ciclinas se asocian selectivamente a las CDK4/6 para formar los complejos responsables de la fosforilación de Rb.

La ciclina E se asocia con CDK2 para formar el complejo cinasa necesario para poder entrar en la fase S o de síntesis, entre sus sustratos se encuentra también la proteína Rb, que fosforila para llevarlo a un estado totalmente inactivo.

La ciclina A comenzaría su sobreexpresión tras la acción de la ciclina E, justo en el límite entre las fases G₁ y S, esta ciclina forma complejos con CDK2, participa en el control de la replicación del DNA. Por último el complejo formado por la ciclina B con CDK1 se da en la transición entre la fase S y la fase G₂, donde bloquea la replicación del DNA y posteriormente permitirá el paso hacia la fase de mitosis.

2.3.1.3 Cinasas dependientes de ciclinas (CDKs)

Este grupo de proteínas son cinasas de serina/treonina con una estructura caracterizada por un pequeño bucle en su extremo aminoterminal y otro en su extremo carboxiterminal entre los cuales se encuentra el punto de unión al ATP. Estas proteasas se mantienen inactivas en estado basal y necesitan de su unión a ciclinas para formar complejos parcialmente activos. Para la completa activación de estos complejos se requiere de la fosforilación de las CDKs en residuos de treonina, por parte de la CAK (*CDK Activating Kinase*) lo que lleva a un cambio conformacional que deja accesible el punto catalítico al ATP.

Las CDKs están negativamente reguladas por un grupo de proteínas funcionalmente relacionadas conocidas como inhibidores de CDKs, los cuales se clasifican en dos familias: los inhibidores INK4 (p16INK4A, p15INK4B, p19INK4D y p18INK4C) y la familia Cip/Kip (p12Waf1/Cip1, p27Kip1 y p57Kip2). Los miembros de la familia INK4 inhiben específicamente a las CDK4 y CDK6, mientras que los miembros de la familia Cip/Kip pueden inhibir las CDKs durante todas las fases del ciclo celular. Si bien ambas familias juegan un papel inhibitorio durante la fase G1/S del ciclo celular (Vidal A, Koff A 2000).

2.3.2 Proteína del retinoblastoma

La proteína del retinoblastoma (Rb), fue el primer miembro identificado de la familia de proteínas conocidas como *pocket proteins*, que comprende dos miembros relacionados, p107 y p130 (Adams PD 2001). Rb actúa como un supresor tumoral en parte, por su inhibición del ciclo celular (Goodrich DW et al. 1991; Knudsen ES et al. 1998; Delston RB et al. 2011). Esta proteína juega un papel fundamental en la regulación del ciclo celular, apoptosis y diferenciación. Rb es temporalmente inactivado por la CDKs que lo fosforilan en más de 16 residuos de Ser/Thr-Pro distintos, permitiendo la progresión desde la fase G₁ hasta la S (Serrano M et al. 1993). También regula la apoptosis por inhibición de p53 (Wu K et al. 2003).

Las acciones antiproliferativas y antiapoptóticas del Rb pueden ser bioquímicamente independientes y están ambas mediadas por su interacción con los factores de transcripción de la familia E2F (Chau BN et al. 2006) que activan genes relacionados con la división celular y la apoptosis. Rb inhibe a E2F por unión directa que mantiene al factor de transcripción secuestrado en el citoplasma, esta explicación clásica de la función de Rb tiene sin embargo fallos a la hora de explicar cómo la inactivación de Rb puede llevar a la liberación de E2F y evitar que este comience la regulación del ciclo celular sin desencadenar la transcripción de proteínas proapoptóticas. Algunos estudios recientes sugieren que Rb existe no únicamente en un estado activo o inactivo sino que podrían existir múltiples estados fosforilados que permitan a E2F unirse a otras proteínas que modulen su acción (Ma D et al. 2003, Ianari et al. 2009), los diferentes estados de fosforilación del Rb parecen permitirle a la célula un control diferencial de la expresión genética de proteínas proapoptóticas o vinculadas al ciclo celular (Young AP et al. 2003).

Este hecho ha llevado a dirigir distintos estudios a encontrar cuales son las cinasas responsables de la fosforilación de Rb para dar lugar a una respuesta apoptótica. Una de las proteínas que recientemente se ha demostrado que es capaz de fosforilar a Rb es la MAPK p38 (Yeste-Velasco et al. 2009; Delston RB et al. 2011), esta MAPK está implicada en respuestas al estrés celular, se postula que la manera por la que p38 induce una respuesta diferencial de la fosforilación mediada por CDKs es a través de la fosforilación de residuos diferentes donde actúan las CDKs lo que le conferiría a Rb diferentes propiedades bioquímicas y fisiológicas.

Uno de los mecanismos que relacionan la fosforilación de la proteína Rb con la apoptosis es la formación de un complejo con MDM-2 y p53, que produce un incremento de la actividad de p53 y de la apoptosis. Tras la activación de p53 se produce la síntesis de p21 que inhibe el complejo ciclina E-CDK2, el bloqueo del ciclo celular termina por producir la apoptosis en la célula antes de completar la fase S (Verdaguer E et al. 2006).

2.3.3 E2F

La familia de factores de transcripción E2F juega un papel central en la regulación de la proliferación y el ciclo celular. Se han identificado seis miembros de la familia E2F (E2F -1, -2, -3, -4, -5, and -6) cada uno de los cuales pueden heterodimerizar con dos proteínas de unión al DNA (DP1 and DP2) para formar doce complejos diferentes de unión al DNA, cada uno de los cuales tiene afinidad por una región del promotor específica (Cam H, Dynlacht BD 2003). Los miembros de la familia E2F muestran afinidad por la unión a regiones promotoras de genes relacionados con la progresión del ciclo celular y la síntesis de DNA. A pesar de esta similitud la familia se ha subdividido en dos clases: activadores (E2F1, E2F2, y E2F3) y represores (E2F4 y E2F5) de la transcripción. E2F6 es considerado un miembro independiente con algunos dominios funcionales, incluyendo el de unión a ciclina, Rb y el dominio de transactivación.

Esta proteína forma heterodímeros con el factor de transcripción DP y son regulados por la unión a la proteína Rb (DeGregori J 2002; Trimarchi JM, Lees JA 2002). En células proliferativas, la actividad de E2F es necesaria para la inducción de la transcripción de

algunos genes necesarios para la progresión del ciclo celular, incluyendo las ciclinas, CDKs y enzimas implicadas en la replicación del DNA. Además, E2F regula funciones relacionadas con la apoptosis tras un daño al DNA como por ejemplo la regulación de la expresión genética de *apaf-1* y algunas caspasas (DeGregori J 2002; Greene LA et al. 2004). Otro mecanismo alternativo a través del cual E2F regula la apoptosis es a través de la inducción del ARF (*ADP Ribosylation Factor*), esto lleva a un incremento de la estabilidad de p53 posiblemente a través de MDM2 y consecuentemente a un bloqueo del ciclo celular y posterior apoptosis (Verdaguer E et al. 2005; Wu Z et al. 2009; Verdaguer E et al. 2007).

2.4 Papel de las calpaínas en la apoptosis

Las calpaínas fueron inicialmente descritas como enzimas proteolíticas citoplasmáticas dependientes de calcio. Actualmente conocemos más de quince tipos diferentes de calpaínas, aunque sin lugar a dudas las de mayor importancia en mamíferos son la μ -calpaina y la m-calpaina (Yadavalli R et al. 2004). Las calpaínas se encuentran en forma de zimógenos en el citoplasma y para su activación proteolítica requieren de niveles elevados de calcio citoplasmático, aunque la sensibilidad al Ca^{2+} varía según cada isoforma, por ejemplo la μ -calpaina requiere de concentraciones de 2-80 μM mientras que la m-calpaina requiere una concentración mucho mayor que oscila entre 200-800 μM . Las calpaínas activas son heterodímeros formados por una subunidad catalítica de en torno a 80 kDa y una unidad reguladora de pequeño tamaño de 28 kDa (Camins A et al. 2006).

Las unidades de elevado peso molecular se encuentran divididas en cuatro dominios, el dominio I, es un dominio de corte autolítico, el dominio II lo constituye un punto de unión con sus sustratos y que muestra actividad cisteinproteasa, el dominio III es de función desconocida, mientras que el dominio IV es el punto de unión al Ca^{2+} .

El Ca^{2+} es un segundo mensajero que ha sido relacionado con la regulación de importantes funciones fisiológicas entre las que destacan, la actividad sináptica, la excitabilidad de las membranas o regulación enzimática (Biswas S et al. 2004; Neumar RW et al. 2003). Niveles anormalmente elevados de Ca^{2+} citoplasmático se han

relacionado con algunas patologías neuronales como las enfermedades de Parkinson, Huntington o Alzheimer (Surmeier DJ et al. 2011; Giacomello M et al. 2011; Anekonda TS, Quinn JF 2011; Cali T et al. 2012), en esta última se postula que los agregados de β -amiloide producen una entrada de Ca^{2+} por interacción con receptores de la membrana lo que produce la activación de las calpaínas (Villalobos C et al. 2012).

Una vez activas las calpaínas actúan como cistein proteasas y pueden degradar un amplio número de sustratos tales como proteínas del citoesqueleto, entre ellas la α -espectrina, la actina, la proteína Tau, o la proteína p35 que se encuentra en la membrana celular y unida a CDK5, la cual es degradada a p25, y libera a CDK5, una serina/treonina cinasa que fosforila numerosos sustratos citoplasmáticos entre los que destacan la proteína Tau que se agrega para formar los ovillos neurofibrilares propios de la enfermedad de Alzheimer (Hamdane M et al. 2003). Otro de los sustratos recientemente descritos de las calpaínas es el receptor 1,4,5-trifosfato tipo 1 ($\text{InsP}_3\text{R1}$), al proteolizarlo provoca una pérdida de la capacidad del retículo endoplásmico para mantener la homeóstasis del Ca^{2+} citosólico, lo que lleva a un incremento crónico de las concentraciones de Ca^{2+} en el citoplasma y sensibiliza a las células frente a estímulos neurotóxicos (Kopil CM et al. 2012). Además se ha descrito que niveles elevados de Ca^{2+} citoplasmático facilitan la permeabilización mitocondrial y activación de las caspasas (Orrenius S et al. 2003; Taylor RC et al. 2008). La proteólisis de este transportador de Ca^{2+} implica a las calpaínas como una de las responsables de los niveles anormalmente elevados de Ca^{2+} citosólico y con alteraciones de los inosítoles fosfato, dos elementos frecuentemente alterados en las enfermedades neurodegenerativas.

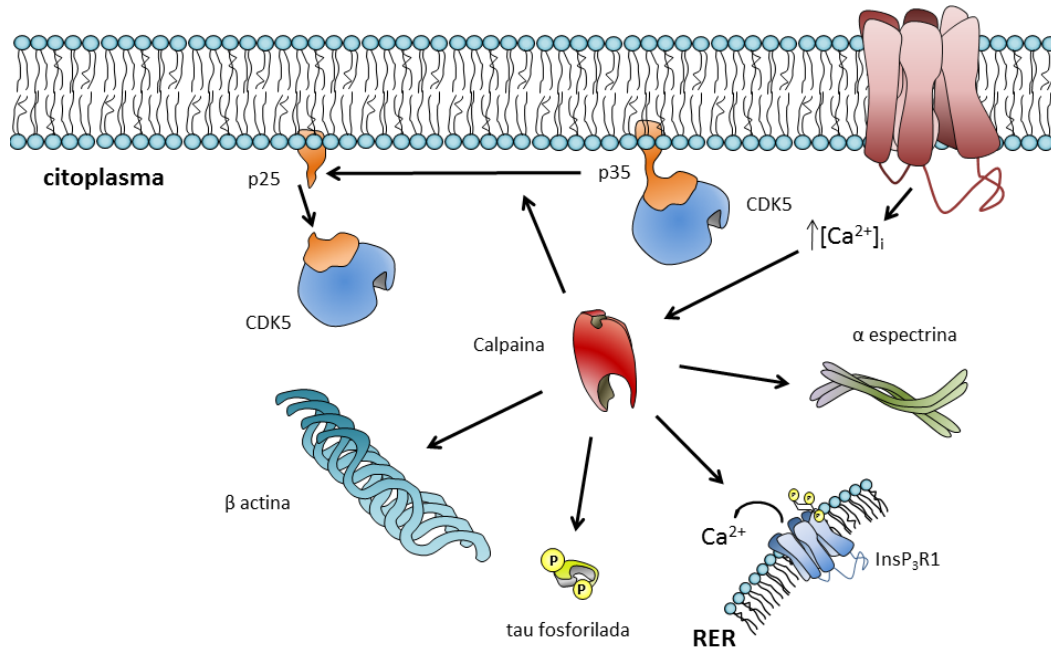


Figura 7: El incremento de las concentraciones de Ca²⁺ citosólico produce la activación de las calpaínas que proteolizan diferentes sustratos que se han relacionado con la apoptosis en neuronas.

3. Vía de los inositoles fosfato

La membrana citoplasmática no debe entenderse como una mera barrera que delimita la célula y la aísla del exterior sino como un orgánulo más que le otorga capacidad de interacción con el medio que la rodea. Son varias las estrategias mediante las cuales las células llevan a cabo esta función. Sin embargo muchas de ellas tienen como punto en común la síntesis de una molécula intermedia entre el estímulo y la respuesta que desencadenan, este tipo de moléculas se conocen como segundos mensajeros.

Los fosfatos de inositol solubles en agua fueron identificados hace ahora sesenta años por Streb y colaboradores (Irvine R 2003) como una familia de moléculas de señalización tipo segundo mensajero que se caracterizan por la presencia de diferentes permutaciones de fosfatos sustituyentes en un anillo de mio-inositol.

El miembro mejor caracterizado de la familia, el inositol 1,4,5-trifosfato regula las concentraciones de Ca²⁺ intracelular y se genera a partir de la hidrólisis mediada por la fosfolipasa C (PLC) del lípido de membrana inositol fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato

[PI(4,5)P₂]. Todos los fosfatos de inositol se generan a partir del ácido fosfatídico (PA) el cual es transformado por la CDP-DAG sintasa (citidina difosfato diacilglicerol sintasa) que sintetiza un liponucleótido intermedio, Citidina Difosfato Diacilglicerol (CDP-DAG). Secuencialmente, el CDP-DAG es el sustrato de la fosfoinositol sintasa que formará el PI(4)P. Este último es el sustrato de la PIP cinasa que dará lugar al PI(4,5)P₂ (Resnick AC et al. 2005).



Figura 8: Esquema de la síntesis del PI4P a partir de su precursor el ácido fosfatídico (PA) mediante la formación de un nucleótido intermedio de citidina (CDG-DAG)

3.1 PI3K

Una de las proteínas que juegan un papel central en la vía de los inositoles es la PI3K (3-fosfoinositido cinasa) que fue identificada en 1988 por Whitman y colaboradores como la responsable de la fosforilación del PI4P y el PI(4,5)P₂ para dar lugar a dos fosfolípidos de membrana abundantes en el SNC, el PI(4,5)P₂ y el PI(3,4,5)P₃ respectivamente. Ambos fosfolípidos de inositol son segundos mensajeros en el sentido clásico de la definición ya que tienen la particularidad de permitir la unión de proteínas con un dominio PH (*Pleckstrin Homology*) a la membrana plasmática lo que provoca la activación de toda una cascada de transducción de señales (Duronio V 2008).

PI3K es un dímero formado por una subunidad catalítica y otra reguladora. Se conocen distintos tipos de cada una de las subunidades, dependiendo de cuál de estos compongan a la PI3K hablamos de distintas isoformas de PI3K.

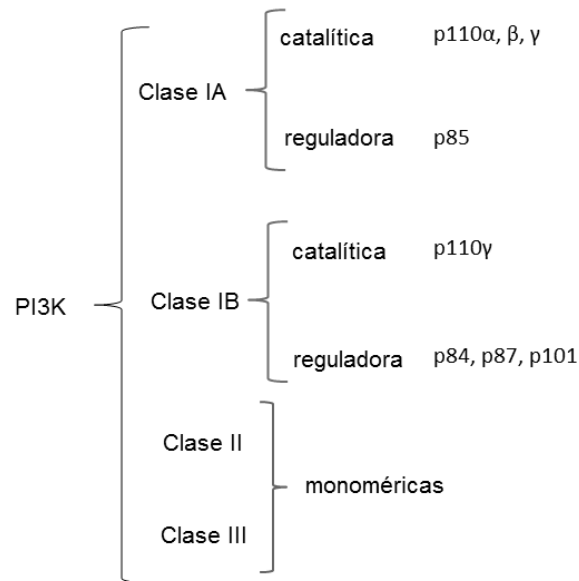


Figura 9: Las diferentes clases de PI3K se clasifican según las subunidades catalíticas y reguladoras que la componen. Las principales clases son de tipo dimérico con la excepción de las clases II y III que se trata de monómeros.

La clase I de la PI3K es la más importante y estudiada hasta la fecha, ya que esta clase es activada por citosinas y factores de crecimiento además de estar implicada en la regulación y supervivencia celular (Oriike N et al. 2001; Vanhaesebroeck B, Waterfield MD 1999). Se cree que tan solo la clase I es la responsable de la síntesis de PI(3,4,5)P₃ *in vivo* (Duronio V 2008; Xia HJ, Yang G 2005).

Las subunidades catalíticas de la PI3K forman heterodímeros con las distintas subunidades reguladoras las cuales relacionan la actividad enzimática con un estímulo concreto. La subunidad p85 contiene dominios SH2 (*Src homology*), cuya presencia permite a la enzima relacionarse con residuos tirosina fosforilados en receptores JAK (*Janus Kinase*) o *Src Steroid Receptor Coactivator9* (Duronio V 2008), mientras que, las subunidades p84, p87 o p101 son estimuladas en cambio por β-γ subunidades derivadas de proteínas G.

Alteraciones en la vía de los inosítoles fosfato producen un amplio número de enfermedades neurodegenerativas entre las que se encuentran desde neuropatías desmielinizantes como la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (Liu Y, Bankaitis VA 2010). Además se postula que también juega un papel destacado en otras enfermedades

neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer donde la inhibición de la vía de los inosítoles fosfato podría ser la responsable de la activación de GSK3 β una de las responsables de la hiperfosforilación de la proteína tau y formación de ovillos neurofibrilares (Lee KY et al. 2007). También regula la apoptosis, la inhibición de la vía de los inosítoles fosfato lleva a la activación de la vía intrínseca mitocondrial ya que regula de manera indirecta proteínas implicadas en el mantenimiento de la integridad mitocondrial, represión de factores de transcripción proapoptóticos o sostenimiento de las concentraciones intracitoplasmáticas de calcio (Kamada H et al. 2007; Datta SR et al. 1997; Li D et al. 2009; Pérez-Navarro E et al. 2005).

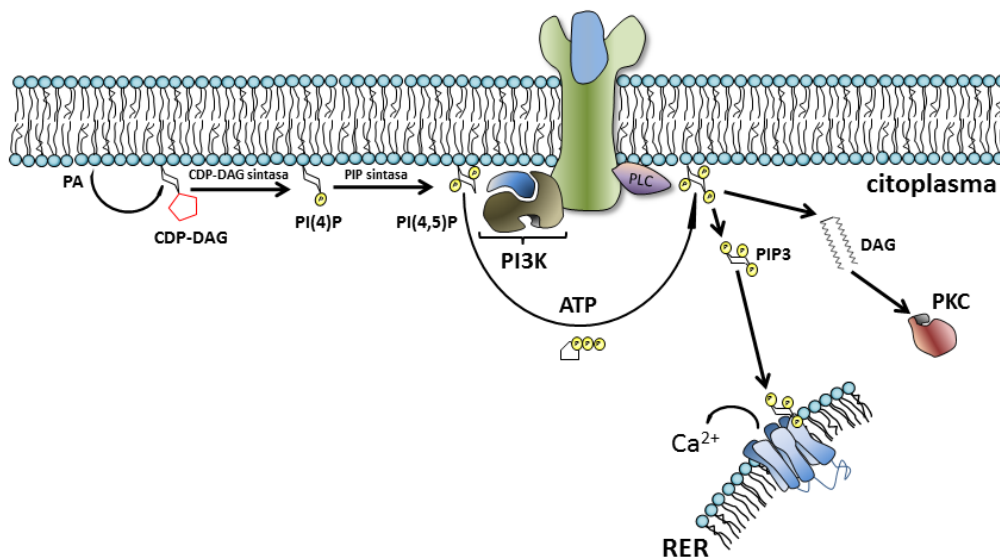


Figura 10: Esquema de la vía de los inosítoles fosfato desde el precursor, ácido fosfatídico (PA) hasta la formación de PIP3 por la PI3K y diacilglicerol (DAG) por acción de las fosfolipasa C (PLC).

3.2 AKT/PKB

Identificada inicialmente en 1977 por Staal y colaboradores como AKT8, la proteína mutada en la leucemia inducida por virus en ratones. (Staal SP et al. 1987; Bellacosa A et al. 1991). AKT/PKB es una serina/treonina cinasa de la que se conocen tres isoformas (AKT 1, 2 y 3) y que pertenece a la familia de las AGC cinasas que se caracteriza por una región central catalítica y una región carboxiterminal reguladora, además AKT contiene una región aminoterminal con dominio PH.

La activación de AKT comienza tras la unión de un factor de crecimiento a su receptor específico de membrana. La unión del ligando induce la autofosforilación de residuos de tirosina en la región citoplasmática del receptor, lo que produce el reclutamiento y activación de la PI3K que fosforila el PI4P y el PI(4,5)P₂ para dar PI(4,5)P₂ y PI(3,4,5)P₃ respectivamente, los cuales permiten la unión de AKT con la superficie interna de la membrana celular a través de sus dominios PH.

Una vez localizada en la membrana celular AKT requiere de su fosforilación en los residuos clave, Thr308 y Ser473. La fosforilación en Thr308 es llevada a cabo por la PDK1 (Wick MJ et al. 2000), otro miembro de la familia AGC cinasas con un dominio PH. Sin embargo, la cinasa responsable de la fosforilación del residuo Ser473 todavía no ha sido caracterizada aunque en los últimos años Sarbassov y colaboradores han aportado evidencias de que esta fosforilación podría deberse a la acción de un complejo formado por mTOR, rictor y *G-protein β-subunit-like protein* (GβL) (Sarbassov DD et al. 2005; Bayascas, Alessi 2005).

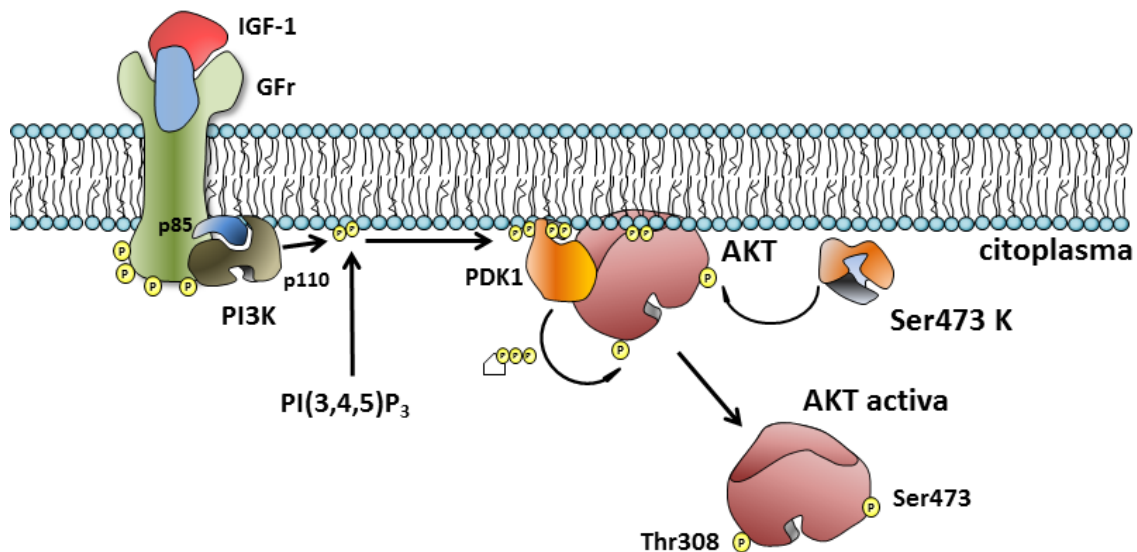


Figura 101 Modelo propuesto para la activación de AKT. La unión de la PDK1 y la AKT al PI(3,4,5)P₃ mediante sus dominios de homología a la pleckstrina permite su localización en la membrana celular. La fosforilación de AKT por PDK1 en Thr308 y en Ser473 por una cinasa no caracterizada (Ser473K) produce su activación.

AKT lleva a cabo diversas funciones relacionadas con el crecimiento, proliferación y la supervivencia celular. El control de estas funciones se lleva a cabo a través de la

regulación de diversos sustratos como: Bad, caspasa 9, CREB, I κ B cinasa γ , c-Jun, GSK3 β (Zeng KW et al. 2011; Levresse V et al. 2000; Coffey J et al. 1998) o los factores de transcripción de la familia FOXO (*Forkhead transcription factor*, FOXO3a, FHKRL1) (Fukunaga K et al. 2005). Por ejemplo, la unión del IGF-1 (*Insulin Growth Factor-1*) a su receptor activa AKT que fosforila a Bad en el residuo Ser136 (Datta SR et al. 1997) y lleva a su unión a la proteína 14-3-3 que mantiene a Bad secuestrado en el citoplasma y evita que migre a la mitocondria donde inhibe la acción de Bcl-xL que cumple una función antiapoptótica (Datta SR et al. 1997; Masters et al. 2001). Los miembros de la familia FOXO también modulan procesos de apoptosis (Brunet A et al. 1999; Shin I et al. 2001; Dijkers PF et al. 2002). La fosforilación inhibitoria de FOXO3a previene la apoptosis, ya que produce su unión a la proteína 14-3-3 que mantiene al FOXO3a inhibido en el citoplasma (Brunet A et al. 1999). AKT también regula la apoptosis por fosforilación directa de la caspasa 9 en Ser196, lo que reduce la actividad proteasa de la caspasa (Cardone MH et al. 1998). En el caso de CREB, este factor de transcripción es fosforilado en Ser133 por AKT, lo que provoca su activación. CREB controla la expresión de genes relacionados con la supervivencia celular (Parcellier A et al. 2007; Walton MR, Dragunow I 2000).

AKT regula indirectamente al factor de transcripción c-Jun a través de distintos mecanismos como la fosforilación inhibitoria en Ser674 de MLK3 (Barthwal MK et al. 2003), lo que produce una reducción de la activación de JNK por MLK3. AKT también media la fosforilación de MKK4 en Ser78 (Park KM et al. 2002), la fosforilación de este residuo inhibe la apoptosis mediada por MKK4. Así mismo, inhibe por fosforilación en Ser83 a ASK1, una MAP3K que activa tanto a JNK como a p38 (Ichijo H et al. 1997; Kim AH et al. 2001). AKT inhibe a GSK3 β mediante la fosforilación en el residuo de Ser9, GSK3 β es otra cinasa que se ha relacionado con numerosas enfermedades neurodegenerativas y ha sido señalada como una de las responsables de la hiperfosforilación de la proteína Tau en la enfermedad de Alzheimer y otras taupatías.

Existen otros muchos procesos fisiopatológicos en los que AKT está implicada, por ejemplo en la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), donde juega un papel prosupervivencia mediando los efectos del IGF-1, también juega un papel neuroprotector en la enfermedad de Huntington donde retrasa la apoptosis de las neuronas estriatales por fosforilación de la Huntingtina mutada. Por el contrario, está

implicada en la apoptosis inducida por la acumulación de ataxina-1 en la ataxia espinocerebelosa tipo 1 (SCA1) ya que AKT es la responsable de la fosforilación de la ataxina-1 mutada, lo que provoca su acumulación citoplasmática (Brazil DP et al. 2004).

En otra vertiente, AKT participa en la regulación de funciones fisiológicas en el SNC como la consolidación de la memoria por modulación de los receptores GABA_AR (Wang Q et al. 2003).

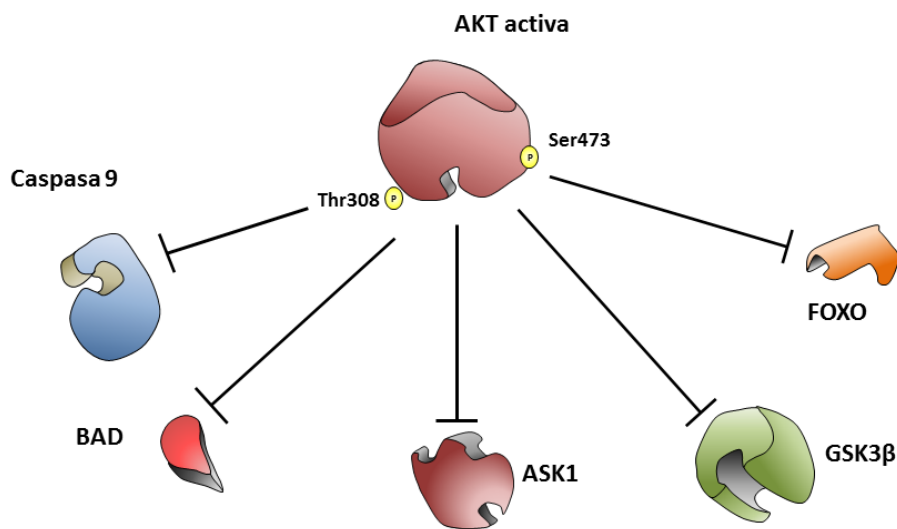


Figura 12: AKT cumple una función global prosupervivencia, parte de este efecto está mediado por la inhibición de proteínas proapoptóticas entre las que destacan las que regulan la integridad mitocondrial, las MAPKs o diversos factores de transcripción así como GSK3β.

3.3 GSK3β

La proteína GSK3 es una cinasa serina/treonina que fue identificada hace más de veinte años como una de las proteínas cinasas que fosforilaban e inactivaban a la glicógeno sintasa (Hur EM, Zhou FQ 2010). También participa en la regulación de la síntesis de proteínas mediante la regulación de eIF2B o la regulación de la citoarquitectura celular mediante la acción sobre proteínas del citoesqueleto. (Etienne-Manneville S 2003; Eickholt B 2002; Frame S, Cohen P 2001). Su clonaje demostró la existencia de dos

isoformas muy relacionadas entre ellas, GSK3 α and GSK3 β , que tienen una expresión ubicua en todos los tejidos de los mamíferos (Bhat R 2003). Sin embargo, la isoforma GSK3 β es la más frecuente en el sistema nervioso (Hur EM, Zhou FQ 2010).

El interés por esta proteína se incrementó notablemente al identificar a GSK3 β como un miembro clave de la vía de la señalización de la insulina y de la Wnt y posteriormente relacionada con la supervivencia celular (Pap M 1998), GSK3 β es la responsable de la degradación de β -catenina, un factor de transcripción nuclear prosupervivencia que al ser fosforilado por GSK3 β queda localizado en el citoplasma y es degradado en el proteosoma (Li C et al. 2011). Existen diversas patologías neurodegenerativas en las que se ha demostrado que GSK3 β está implicada, como es el caso de la enfermedad de Alzheimer donde es una de las proteínas responsables de la fosforilación de la proteína Tau que es el componente principal de los ovillos neurofibrilares, además ha sido demostrada la existencia de una mayor actividad GSK3 β en aquellas células que más adelante formarán ovillos neurofibrilares (NFT) por lo que es considerada una de las dianas claves en esta patología, conjuntamente con estos datos se ha podido demostrar que los pacientes de Alzheimer muestran una mayor expresión de GSK3 β en la región hipocámpal (Blalock EM et al. 2004; Hu S et al. 2008; Jope RS et al. 2007). GSK3 β también está relacionada con la enfermedad de Huntington, donde se asocia la toxicidad producida a la poliglutamina (PoliQ) de la Huntingtina mutada (Wang L et al. 2010). Investigaciones posteriores la han relacionado con la síntesis de proteínas, el control del ciclo celular por acción sobre factores de transcripción como CREB y con la apoptosis regulando p75 entre otras muchas (Jope RS et al. 2004). El hecho de que algunos fármacos neuroprotectores como el Litio tengan como diana a GSK3 β no ha hecho más que incrementar el interés que suscita esta proteína (Tajes M et al. 2009).

Debido al gran número de funciones que cumple, GSK3 β se encuentra fuertemente regulada por distintas vías y mecanismos. Uno de los mecanismos más recientemente descritos pero menos conocidos es la de su localización en distintos compartimentos celulares. Aunque GSK3 β sea considerada una proteína citoplasmática esta puede translocarse al núcleo donde su concentración varía a lo largo del ciclo celular y participa en la fosforilación de sustratos como la ciclina D1, además GSK3 β se transloca rápidamente al núcleo en las primeras fases de la apoptosis. También se ha descrito su localización mitocondrial (Bijur GN, Jope RS 2003; Jope RS, Johnson GV

2004), en cada una de estas localizaciones puede asociarse a distintas proteínas y de esta manera actuar sobre sustratos diferentes por ejemplo, puede ser regulada mediante su unión a la caseína cinasa I, Frat-1 y proteínas armazón (*scaffolding proteins*).

Sin embargo, el más conocido de todos estos mecanismos es su fosforilación por parte de distintas cinasas que actúan sobre diferentes residuos de GSK3 β . La fosforilación en el residuo Ser9 lleva a su inhibición por bloqueo del centro activo de la cinasa, son distintas las vías que pueden llevar a la fosforilación de este residuo, entre ellas destacamos la de AKT, pero también PKA, PKC o la proteína S6K, dependiente de la vía de mTOR, pueden fosforilar el residuo en Ser9 (Jope RS, Johnson GV 2004; Zurashvili et al. 2012). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que estas tan solo fosforilan una fracción determinada de la cantidad total de GSK3 β dependiendo de su localización celular.

La fosforilación de GSK3 β en el residuo Tyr216 lleva a la activación de la proteína, aunque se ha descrito la autofosforilación en este residuo, los mecanismos que la producen no están bien caracterizados. No obstante, algunos estudios indican que tras un daño cerebral o la ausencia de NGF produce la fosforilación de este residuo en neuronas (Frame S, Cohen P 2001).

Además, existe un mecanismo indirecto de regulación por fosforilación de GSK3 β ya que la mayoría de sus sustratos deben estar prefosforilados por otras cinasas para facilitar su acción (Jope RS, Johnson GV 2004) por ejemplo, la fosforilación previa de la proteína Tau por CDK5 facilita su fosforilación posterior por GSK3 β .

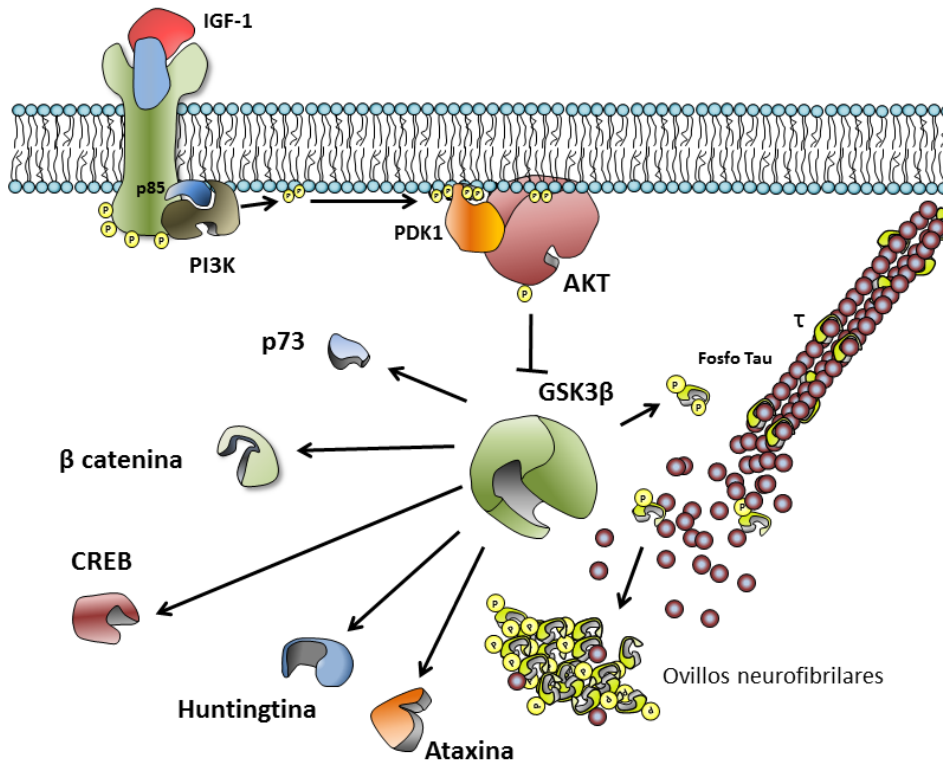


Figura 13: Resumen de las principales dianas fosforiladas por GSK3β relacionadas con distintos procesos patológicos.

4. Vía de las MAPK

Aunque las vías activadas por segundos mensajeros juegan un papel importante en el sistema nervioso (Hozumi Y, Goto K 2012; Bishop A, Anderson JE 2004; Kelly MJ, Rønnekleiv OK 2009) estas no son la única manera de regular las cascadas de transducción de señales. La vía de las MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) constituye un ejemplo clásico de vía regulada mediante fosforilación independiente de segundos mensajeros. Las MAPKs cumplen un papel importante en el crecimiento celular y constituyen un mecanismo adaptativo capaz de generar respuestas intracelulares específicas frente a numerosos estímulos externos como mitógenos, hormonas y estrés entre otros (Keshet Y, Seger R 2010; Whitmarsh AJ 2006), estas respuestas comprenden un amplio rango de funciones como son el arresto del ciclo celular, reparación del DNA, producción de citoquinas o la apoptosis.

La vía de las MAPKs es una cascada de fosforilación evolutivamente conservada que se caracteriza por una fosforilación secuencial de distintas proteínas organizadas jerárquicamente, todos los miembros de la vía se encuentran estructural y funcionalmente relacionados (Kyriakis JM, Avruch J 2012) ya que son proteínas cinasas dirigidas por prolina que llevan a cabo la fosforilación de sustratos en motivos Ser-Pro o bien Thr-Pro.

El esquema general de la vía se compone por una MAPKKK (MAP3K) inicial capaz de reaccionar ante un determinado estímulo ya sea por la interacción con una proteína miembro de la superfamilia de las proteínas G o bien por su activación por parte de una MAPKKK (MAP4K). Las MAP3Ks fosforilan entonces alguna de las MAPKKs (Kyriakis JM 1999). Este segundo grupo de proteínas, son las encargadas de llevar a cabo la fosforilación activadora de las MAPKs que finalmente generan una respuesta fisiológica.

Se han descrito tres MAPKs principales: ERK1/2, JNK y p38, de todas ellas además se conocen distintas isoformas (Pimienta G, Pascual J 2011; Shiizaki S et al. 2012; Obara Y, Nakahata N 2009).

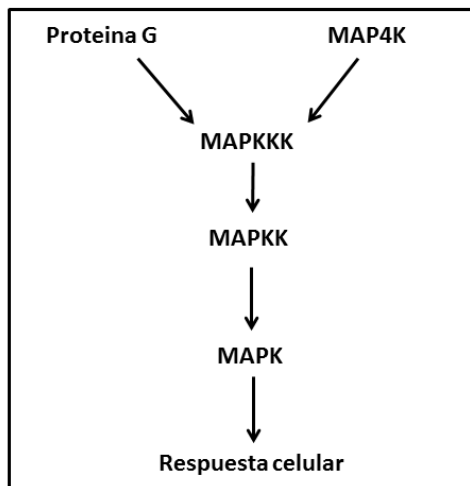


Figura 14: Esquema general de la organización de la vía de las MAPK en orden jerárquico.

4.1 ASK1

ASK1 (*Apoptosis Signal regulated Kinase 1*) es también conocida como MAPKKK5 o MAP3K5, es una más del creciente número de MAPKKKs identificadas hasta la fecha y que son miembros de la vía de JNK (*c-Jun NH₂-terminal Kinase*) y p38 (Ichijo H et al 1997). La ASK1 humana está formada por 1380 a.a y exhibe actividad Ser/Thr cinasa gracias a su región catalítica central. Los extremos amino y carboxiterminales de ASK1 constituyen regiones reguladoras. Esta proteína se ha relacionado con numerosos trastornos como las enfermedades de tipo poliQ como la enfermedad de Huntington donde ASK1 es la responsable de la activación de las MAPKs efectoras, también en la ELA donde las especies reactivas de oxígeno (ROS) son responsables de la activación de ASK1 o en la enfermedad de Alzheimer donde parece que APP y ROS serian causantes de su activación (Hayakawa R et al. 2012).

Se conocen numerosos factores que inducen a la fosforilación activadora de ASK1, aunque todos ellos pueden ser considerados factores de estrés como los LPS (Lipopolisacaridos), el aumento de la concentración de Ca²⁺ citoplasmático o la falta de IGF-1 (*Insulin Grown Factor-1*) (Hayakawa R et al. 2012).

La fosforilación del dominio cinasa central de ASK1 en el residuo Thr838 lleva a un cambio conformacional que permite la formación de la homo-oligomerización por interacción de distintas unidades de ASK1 a través de su extremo carboxiterminal, además a este complejo se le asociarán otras proteínas para formar el complejo activo conocido como ASK1 signalosoma (Noguchi T et al. 2005), la composición final de este complejo dependerá del estímulo que induzca su formación.

ASK1 en estado basal se encuentra asociada a Trx, una proteína sensible a ROS que en su forma reducida se asocia a los complejos de ASK1 y los disocia por bloqueo del extremo amino terminal, pero que al pasar a su forma oxidada se libera y queda libre en el citoplasma lo que permite la interacción de los extremos carboxiterminales de ASK1, a los que además podrá unirse la proteína TRAF2 que induce la actividad del complejo (Hayakawa R et al. 2012). Otros factores pueden incrementar la actividad de este complejo por ejemplo, la pérdida del grupo fosfato de la posición Ser966 induce la disociación de la proteína 14-3-3 del complejo ASK1 lo que lleva a una mayor actividad

del signalosoma (Shiizaki S et al. 2012). El ASK1 signalosoma tiene capacidad para fosforilar a las MAPKKs como MKK4/7 responsables de la fosforilación de JNK o a MKK3/6 que actúan sobre p38 (Ichijo H et al. 1997; Takeda K et al. 2008).

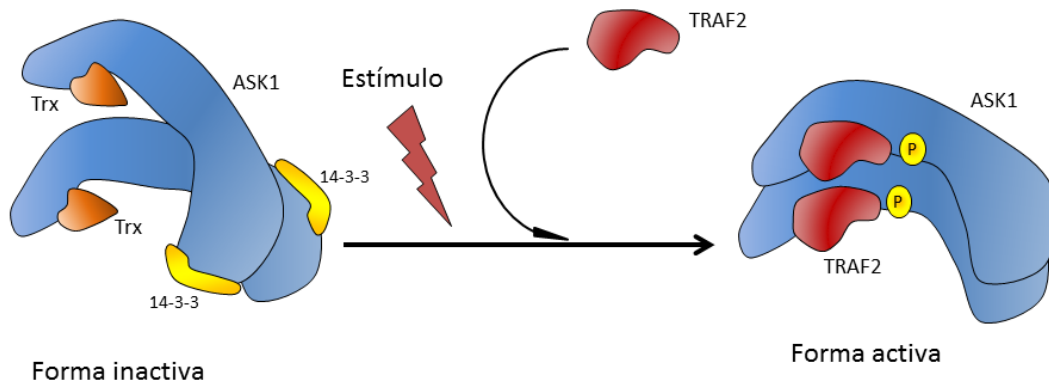


Figura 15: Mecanismo de activación de ASK1, en estado basal Trx y 14-3-3 se encuentran unidas a ASK1 manteniéndolas inactivas. En respuesta a un determinado estímulo Trx y 14-3-3 se disocian de ASK1 y permiten la unión de las TRAF2/6 que activan ASK1.

También han sido descritos mecanismos de fosforilación inhibitoria de ASK1 como su fosforilación en el residuo Ser83 por AKT, una de las proteínas responsables de la fosforilación del residuo (Kim AH et al. 2001; Yamagishi S et al. 2003). Como se comentó anteriormente la fosforilación en Ser966 por una cinasa no caracterizada lleva a la unión de la proteína 14-3-3 y evita la formación de un complejo activo. Otras proteínas como PP5 (*serine/threonine phosphatase 5*) con actividad fosfatasa inhiben a ASK1 ya que eliminan el grupo fosfato del residuo Thr838 que permite la formación del complejo activo.

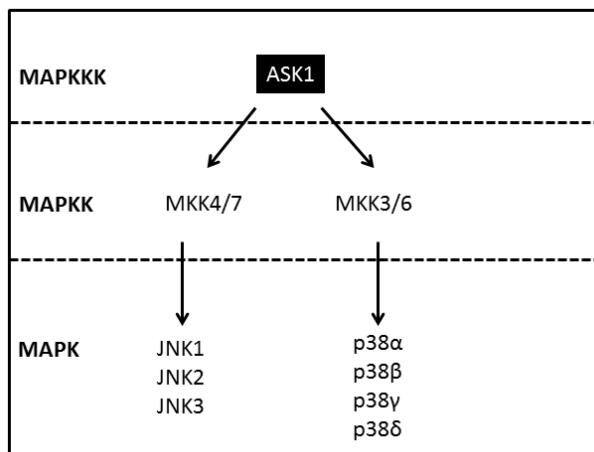


Figura 16: Papel de ASK1 como MAP3K. ASK1 regula las MAPKs JNK y p38 a través de la fosforilación activadora de MKK4/7 y MKK3/6.

4.2 MAPK

Las MAPKs se encuentran al final de la cascada de fosforilación de la vía de las MAPKs y son las encargadas de generar la respuesta fisiológica final frente a un estímulo concreto. Todas ellas muestran un mecanismo similar de activación conocido como fosforilación regulatoria en motivo tripéptido (Thr-x-Tyr) (Davis JR 2000), donde el a.a central varía en función de la MAPK concreta: ERK (Thr-Glu-Tyr), p38 (Thr-Gly-Tyr) y c-Jun amino terminal cinasas (JNK; Thr-Pro.Tyr).

Debido a su papel en las respuestas inflamatorias y estrés ambiental p38 y JNK también se conocen como SAPK (*Stress Activated Protein Kinases*) (Giordano G et al. 2007). A pesar de tener una región consenso (Ser-Pro o Thr-Pro) cada una de las MAPKs muestran especificidad por distintos sustratos. Esta divergencia funcional entre las MAPK es debida a diferencias en los puntos de unión al sustrato y a la regulación de su localización celular mediante proteínas armazón, además de la formación de diferentes complejos de una MAPK concreta con otras proteínas (Morrison DK, Roger JD 2003).

4.2.1 ERK

Se conocen siete isoformas distintas de ERK (*Extracelular Response Kinase*) y se han identificado dos genes codificantes para las dos principales isoformas, ERK1 (MAPK3) y ERK2 (MAPK1) que codifican para las proteínas principales p44 y p42 respectivamente (Keshet Y, Seger R 2010) así como sus variantes ERK1b, ERK1c y ERK2b.

La cascada de ERK es activada a través de una gran cantidad de factores extracelulares como son hormonas, factores de crecimiento y estrés celular, estos a través de distintas vías como los receptores Trk, receptores acoplados a proteína G o canales iónicos producen la activación de las MEK que la fosforilan en los residuos Thr y Tyr en el bucle activador Thr-Glu-Tyr (Thr183, Tyr185). La proteína ERK activa, muestra actividad cinasa sobre residuos de Ser/Thr y se han identificado un gran número de sustratos tanto en el citosol (PLA2 o RSK entre otros) como en el núcleo (Elk1 o CREB).

Sin embargo, a pesar de que ERK1/2 se asociaba con una actividad regulatoria y antiapoptótica, un número creciente de estudios afirman que esta proteína se encuentra

implicada en diversos modelos de muerte neuronal tanto *in vitro* como *in vivo*. También en patologías como el daño neuronal por hiperglicemia o la presencia de agregados de β -amiloide parecen desencadenar una respuesta apoptótica por parte de ERK1/2 (Subramaniam S, Unsicker K 2010).

4.2.2 JNK

La JNK (*c-Jun NH₂ terminal Kinase*) es una cinasa altamente conservada codificada por tres genes que generan por procesamiento alternativo diferentes isoformas. Mientras que la expresión de JNK1 y JNK2 es ubicua, la expresión de JNK3 se encuentra limitada básicamente al sistema nervioso. La transcripción de estos tres genes genera diferentes variantes por procesamiento alternativo que da lugar a isoformas de 46 KDa (conocidas como JNK1 α 1, JNK1 β 1, JNK2 α 1, JNK2 β 1 y JNK3 α 1) o de 54 KDa (JNK1 α 2, JNK1 β 2, JNK2 α 2, JNK2 β 2) a excepción de JNK3 que muestra una variante de 52kDa (Keshet Y, Seger R et al. 2010).

Las distintas isoformas de JNK contienen un motivo de fosforilación Thr-Pro-Tyr en la región del bucle T que regula su activación (Cargnello M, Roux PP 2011). La fosforilación de este motivo es dependiente de las MAPKK MKK4 o MKK7 y más raramente MKK3 o MKK6, todas ellas a su vez dependen de MAP4K, receptores Trk o acoplados a proteínas G que desencadenarán la activación de MAP3K, se conocen un gran número de MAP3K que potencialmente pueden activar a la vía de JNK, entre ellas destacan MEKK (MEKK1-4), MLKs (*Mixed-Lineageprotein Kinase group*) pero también ASK1 (Takeda K et al. 2008; Hayakawa R et al. 2012) entre otras. Además de los mecanismos hasta ahora expuestos, JNK se encuentra regulada a su vez por las JIP1 y JIP2 (*JNK Interacting Proteins*) las cuales se asocian a JNK, MKK4/7 y las MLK (Whitmarsh AJ et al., 1998; Yasuda J et al. 1999). Esta unión permite que todas ellas estén lo bastante próximas como para activarse.

Debido al tipo de estímulos que inducen la activación de la vía de JNK y las respuestas fisiológicas que estas desencadenan, se considera que JNK cumple funciones relacionadas con el estrés y la apoptosis celular. Se han identificado un gran número de sustratos para JNK, tanto nucleares como citoplasmáticos, entre los sustratos nucleares de JNK se encuentran algunos factores de transcripción el más conocido de ellos es c-

Jun que es fosforilado por JNK en los residuos Ser63 y Ser73 en su extremo amino terminal que llevan a su activación (Adler V et al. 1992; Johnson GL, Nakamura K 2007; Besirli CG et al. 2005). Una vez activo, c-Jun homodimeriza con otras moléculas c-Jun o bien forma heterodímeros con miembros de las familias Fos o ATF, para formar el factor de transcripción activo que se une a las secuencias AP-1 (*Activator Protein-1*) pero JNK también puede actuar sobre otros factores de transcripción como ATF-2, Elk, STAT3 o c-Myc (Cargnello M, Roux PP 2011; Mielke K et al. 2000; Borsello T, Forloni G 2007, Davis RJ et al. 2000; Noguchi K et al. 1999). Por otro lado, entre los sustratos citoplasmáticos de JNK encontramos miembros de la familia Bcl-2 (Deng X et al. 2001) como Bim y Bad, este último es fosforilado por JNK en el residuo Ser128, lo que reduce su afinidad por la proteína 14-3-3 e induce su unión a la proteína antiapoptótica Bcl-X_L, la cual queda inhibida (Kamada H et al. 2007; Donovan N et al. 2002), JNK también es responsable de la fosforilación de la proteína Tau (Ploia C et al. 2011; Cao M et al. 2013), la proteína p53, a la que estabiliza por fosforilación, lo que favorece la expresión de *bax* y suprime la acción de *bcl-2* (Keramaris E et al. 2007).

El elevado número de sustratos de JNK refleja diversidad de funciones en las está implicada, tanto en condiciones fisiológicas como en condiciones patológicas (Mielke K et al. 2000). La acción apoptótica de JNK en neuronas se demostró por primera vez al comprobar que ratones *knockout* para *jnk3* mostraban una protección parcial en neuronas hipocampales frente a la excitotoxicidad (Yang DD et al. 1997; Pirianov G et al. 2007). A partir de entonces se ha descrito el papel de JNK en otros modelos como en isquemia, apoptosis por privación de factores tróficos, en procesos neuroinflamatorios o en la enfermedad de Huntington, donde la huntingtina mutada provoca un aumento de la actividad de JNK (Mielke K et al. 2000).

4.2.3 p38

La vía de p38, junto con la de JNK, participa en las respuestas inmunes, inflamatorias o de estrés celular (Cuenda A et al. 2007, McCubrey JA et al. 2000; Pi R et al. 2005). Al igual que JNK se trata de una proteína altamente conservada de la que se conocen distintas isoformas: α , β , γ , δ . Todas las isoformas se activan por fosforilación dual en los residuos Thr180 y Tyr182 del motivo tripéptido Thr-Gly-Tyr. Las distintas isoformas de p38 pueden ser activadas por la familia Rho o de las *small* GTPasas, Rac o

cdc42 y un gran número de vías implicadas en la respuesta a estímulos externos. Todas estas vías conducen a la activación de MAP4K y a un gran número de MAP3K las cuales transmiten sus señales a las MAP2K. Las principales MAP2K responsables de la fosforilación de p38 son MKK3/6 (Corrêa SA, Eales KL 2012; Cargnello M, Roux PP 2011).

P38 actúa de manera sinérgica con JNK, ya que contribuye a la activación del factor AP-1 e induce la expresión de *c-jun* y *c-fos* por la fosforilación de ATF-2 en los residuos de Thr69 y 71, de esta manera AP-1 queda unido a las secuencias de *jun1* y *jun2* en el promotor de *c-jun* (Shaulian E, Karin M 2002). Además p38 puede activar al factor de transcripción AP-1 a través de otros mecanismos como mediante Elk-1 ya que de esta manera induce la expresión de *c-fos* (Takeda K et al. 2002).

El papel de p38 sobre la fosforilación directa de c-Jun ha sido discutido durante los últimos años ya que parece que esta MAPK podría mediar un efecto directo de fosforilación sobre c-Jun (Yamagishi S et al. 2003; Chang KH et al. 2010; Chen RW et al. 2003) en la apoptosis mediada por privación de factores tróficos. Sin embargo otros autores atribuyen esta capacidad de fosforilación directa únicamente en condiciones *in vitro* (Geiger KK et al. 2007).

Otro de los sustratos de p38 que ha venido caracterizándose en los últimos años es la proteína del retinoblastoma (Rb) (Hou ST et al. 2002; Nath et al. 2003). Se ha postulado que bajo condiciones de estrés como lesiones en el material genético y otros estímulos apoptóticos la fosforilación de Rb por parte de p38 induciría una función proapoptótica en lugar de participar en la regulación del ciclo celular (Delston RB et al. 2011).

A parte de estas dianas la proteína p38 puede fosforilar una amplia variedad de sustratos citoplasmáticos entre los que destaca la proteína Tau en el residuo Ser422 que se encuentra fosforilado cuando Tau forma parte de los ovillos neurofibrilares (Ando K et al. 2011), numerosos estudios han relacionado a p38 con la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer, ya que el estudio de cerebros *post mortem* ha revelado una intensa inmunoreactividad de p38, además se ha descrito que la respuesta inflamatoria producida por los agregados de β amiloide provoca activación de p38 en astrocitos y microglia y provoca un efecto apoptótico al activarse en neuronas, igualmente se ha

relacionado a p38 con las alteraciones de la plasticidad sináptica aparecidas en la enfermedad de Alzheimer (Munoz L, Ammit AJ 2010).

Además p38 está implicada en otras enfermedades neurodegenerativas como es el caso de la enfermedad de Parkinson donde la acumulación de α -Sinucleína provoca la activación de p38 en células microgliales, lo que lleva a la producción de IL-1 β y TNF- α como mecanismo proinflamatorio (Kim EK, Choi EJ 2010).

Por otro lado, la expresión aberrante de p38 en motoneuronas y microglia parece estar implicada en la progresión de la ELA (Tortarolo M et al. 2003). Todas estas evidencias apuntan a que p38 puede constituir una diana importante en el estudio de potenciales tratamientos en las enfermedades neurodegenerativas.

4.3 Complejo AP-1

El factor de transcripción AP-1 (*Adaptor Protein 1*) fue uno de los primeros factores de transcripción identificados en mamíferos. Su actividad está regulada por un gran número de estímulos fisiológicos o agresiones externas. Además este factor regula un amplio abanico de funciones biológicas, incluyendo la proliferación celular, apoptosis, y supervivencia (Shaulian E et al. 2002).

La capacidad de un único factor de transcripción para llevar a cabo un número tan elevado de funciones distintas radica en el hecho de que este está formado por una combinación de diferentes subunidades, las cuales además son reguladas de manera específica tanto a nivel de expresión, estabilidad del mRNA, procesamiento alternativo o de fosforilación por diferentes cinasas. AP-1 puede estar constituido por miembros de la familia Jun (c-Jun, JunB, JunD), Fos (c-Fos, FosB, Fra-1 y Fra2), Maf (c-Maf, MafB, MafA, MafG/F/K y Nrl) y ATF (ATF2, LRF1/ATF3, B-ATF, JDP1, JDP2). Estas subunidades se caracterizan por poseer dominios de cremallera de leucina (bZIP) que les permite asociarse entre ellas para formar dímeros, además poseen una región básica que permite la interacción con el DNA en las regiones promotor específicas (van Dam H, Castellazzi M 2001).

C-Jun es quizás el miembro más destacado de los componentes del factor AP-1. A nivel estructural, como todos los miembros de la familia AP-1, la molécula de c-Jun está

compuesta por una región aminoterminal que contiene los puntos de unión y fosforilación de la JNK (aa1-190), una región bisagra (aa191-256), la cremallera de leucina (aa280-308) y finalmente una región carboxiterminal. Los cambios de la activación de c-Jun dependen de modificaciones químicas en estas tres regiones antes citadas.

La fosforilación clásica en la región aminoterminal en los residuos como Ser63 y Ser73 por parte de JNK (Papavassiliou A et al. 1995) causa un incremento de la actividad transcripcional del factor AP-1 (Davis R. et al. 2000; Shaulian E. et al. 2002), si bien el residuo de fosforilación mayoritaria acostumbra a ser Ser73 (Dragunow M et al. 2000), otros residuos como Thr91 y Thr93 son fosforilados también por JNK frente a otros estímulos como el daño del DNA ya que de esta manera se facilita la fosforilación del residuo Thr95 por parte de la ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) (Vinciguerra et al. 2007).

La fosforilación de los residuos Thr239 y Ser243 provoca la degradación de c-Jun, la fosforilación inicial del residuo Ser243 permite que GSK3 β fosforile a c-Jun en Thr239 que finalmente permite la unión de F-box & *WB domain repeat* (FBW7), una ubiquitín ligasa que llevará a la ubiquitinización de c-Jun y su posterior degradación (Wei W et al. 2005),

Además de los aquí enumerados, se han descrito numerosos residuos adicionales que pueden ser fosforilados por otras cinasas (Raivich G 2008).

Otros mecanismos pueden regular a c-Jun como su acetilación en la región carboxiterminal (Vries RG et al. 2001), proteínas como p300 que acetilan los residuos de lisina de su región básica de unión al DNA y lleva a una activación de c-Jun (Vries RG et al. 2001; Wang YN et al. 2006).

Una vez activado c-Jun este se asocia con otras unidades de c-Jun o distintos miembros de la familia Jun, Fos, Maf, ATF (Song B et al. 2011). Lo que le permite formar el dímero activo, los dímeros de AP-1 regulan la transcripción de genes implicados en la diferenciación, respuestas al estrés celular y apoptosis mediante la unión a secuencias consenso del DNA. Dependiendo del tipo de dímero formado, la afinidad hacia las distintas regiones promotoras a las que AP-1 puede unirse cambia, por ejemplo los homodímeros de c-Jun o los heterodímeros de c-Jun/c-Fos se unen a las regiones

consenso TRE (*12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-responsive element*) 5'-TGAGTCA-3', mientras que los homodímeros de ATF o los heterodímeros de ATF/c-Jun favorecen la unión a los promotores CRE (*cAMP responsive element*) 5'-TGACGTCA-3' (Yuan Z et al. 2009).

La actividad de los dímeros de c-Jun/c-Fos o de c-Jun/ATF puede ser regulada además a varios niveles. La abundancia de cada una de las subunidades puede ser controlada por la regulación de la síntesis y de la estabilidad de los respectivos mRNA, la regulación de la estabilidad de la proteína por la ubiquitinización dependiente de un determinado estímulo (Musti AM et al. 1997). Además la unión al DNA y la capacidad de transactivación del complejo AP-1 están controlados por modificación postranslacional (Karin M et al. 1997).

ATF2 es un factor de transcripción de la familia AP-1 constitutivamente expresado en el cerebro que dimeriza con c-Jun para ejercer sus funciones (Yuan Z et al. 2009). Sin embargo el papel que juega ATF-2 ha sido discutido, ya que si bien la mayoría de los estudios afirman que la formación de este dímero y su unión a las secuencias CRE induce la expresión de proteínas proapoptóticas como Dp5/Hrk relacionadas con la vía intrínseca o mitocondrial (Towers E et al. 2009; Young JE et al. 2009), también se han descrito funciones como protector frente a la apoptosis (Leppä S et al. 2001; Walton M et al. 1998). ATF2 es también sustrato de JNK y p38 al que fosforilan en los residuos Thr69/71, este hecho refuerza la idea de que la formación del dímero entre c-Jun y ATF-2 cumple un papel proapoptótico (van Dam H, Castellazzi M 2001).

C-Fos, otro importante componente del factor de transcripción AP-1, su estructura es semejante a la del resto de los miembros de la familia, comprende también una región básica de unión al DNA y una región de cremallera de leucina que le permite interactuar con otros componentes del factor AP-1. Su unión a c-Jun dirige al factor AP-1 resultante a unirse de manera preferente a las secuencias consenso TRE, sin embargo, el papel de c-Fos es variable porque se han descrito funciones propias de respuestas al estrés y muerte celular (Yuan Z et al. 2009), pero también se la ha relacionado con la progresión del ciclo celular, ya que se ha demostrado que cuando c-Fos forma parte del factor AP-1 este está implicado en la transcripción de genes relacionados con el ciclo celular (Shaulian E et al. 2002), este hecho también ha llevado

a algunos autores a postular que la caída de expresión de c-Fos es en realidad la causante de una mayor proporción del factor c-Jun/ATF y que esto facilita de manera indirecta la apoptosis. (Yuan Z et al. 2009).

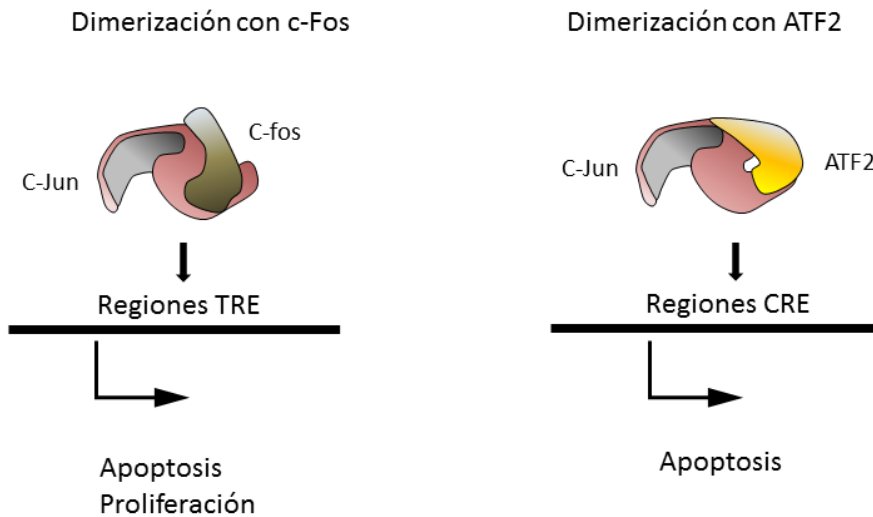


Figura 17: C-Jun dimeriza con C-Fos o ATF2 para formar el factor activo AP-1. La dimerización con c-Fos induce la unión a secuencias TRE y está relacionada tanto con la proliferación como con la apoptosis. La dimerización de c-Jun con ATF2 produce la unión a secuencias CRE, relacionadas con la apoptosis.

5. Otros factores de transcripción

5.1 Egr-1

Egr-1 (*Early growth response 1*) es también conocido como NGFI-A, Krox24, Zif 268 o Tis 8 debido a que fue descubierto simultáneamente en distintos laboratorios que estudiaban genes implicados en el crecimiento, proliferación y desarrollo (Thiel G, Cibelli 2002). Egr-1 es un factor de transcripción implicado en respuestas rápidas a factores de crecimiento y señales extracelulares. Su estructura se compone de tres dominios, uno de unión al DNA de tipo cremallera de leucina que se une a las secuencias consenso 5'- TGGGTG/AGGCGGT-3' (Swirnoff AH, Milbrandt J 1995) y dos dominios reguladores, uno de activación muy poco caracterizado y un dominio inhibitorio que se encuentra entre los dos dominios anteriores. La unión a estos

dominios regula la función de Egr-1, por ejemplo se han identificado represores endógenos como NAB1 y NAB2 que se unen a la región inhibitoria (Thiel G et al. 2000; Thiel G, Cibelli G 2002).

Egr-1 fue relacionado inicialmente con funciones de crecimiento y diferenciación, en neuronas interviene en funciones como la plasticidad sináptica (Jones MW et al. 2001) o el crecimiento de neuritas (Harada T et al. 2001). Sin embargo, estudios posteriores han demostrado la implicación de Egr-1 en la apoptosis neuronal en modelos como la DV de S/K⁺ (Catania MV et al. 1999) igualmente parece estar implicado en otros modelos como la toxicidad por β amiloide (Biswas SC et al. 2007) o en la deprivación de NGF en neuronas simpáticas (Whitfield J et al. 2001). Egr-1 controla la apoptosis en neuronas a través de diferentes dianas como p53, p73, PTEN, Bax o Bim (Nair P et al. 1997; Xie B et al. 2011; Song B et al. 2012).

Además diferentes estudios han podido relacionar a Egr-1 con distintas patologías como la enfermedad de Parkinson o la de Alzheimer. En esta última se han encontrado niveles anormalmente elevados de Egr-1 en las neuronas hipocámpales con elevada cantidad de ovillos neurofibrilares, además se ha descrito que este factor regula la expresión de p35 y por tanto la actividad de CDK5, uno de los responsables de la fosforilación de Tau (Lu Y et al. 2011).

6. Modelo experimental; células granulares de cerebelo de rata

El cerebelo es una estructura prominente en el encéfalo de muchos mamíferos, más del 90% de las neuronas del cerebelo son células granulares de cerebelo cuyos somas se encuentran localizados en la capa más interna de este órgano. Este grupo de neuronas constituyen la población homogénea más grande de todo el sistema nervioso central de los mamíferos.

En algunos casos tales como el ser humano y los roedores el proceso de neurogénesis continúa durante los primeros días postnatales y ocurre a través de una serie de pasos descritos hace ya más de un siglo por Ramón y Cajal y confirmados por los estudios modernos. Este proceso de desarrollo comprende la proliferación en la capa externa del cerebelo a partir de los precursores neuronales de las granulares de cerebelo,

posteriormente estas neuronas inmaduras migran hacia la capa más interna del cerebelo donde desarrollarán sus características fenotípicas y formarán sinapsis.

La neurogénesis postnatal de esta extensa población neuronal ha permitido utilizar estas células para desarrollar un modelo *in vitro* descrito hace ahora cerca de cuarenta años. La mayor parte de las células de estos cultivos lo constituyen las células granulares de cerebelo que representan en torno a un 90% del total, encontramos una pequeña fracción de otros grupos de neuronas como las células de Golgi o las células estrelladas y tan solo un 5% de células no neuronales, principalmente distintos tipos de glía. Sin embargo al igual que en todos los modelos de cultivo neuronal *in vitro* aparecen limitaciones para el estudio de su fisiología respecto a un modelo *in vivo* así, la circuitería propia de estas células se ha perdido y no existe estimulación por parte de las células musgosas y sus conexiones con las células de Purkinje también han desaparecido, esto hace que la actividad sináptica propia de las CGC y la despolarización basal subsiguiente desaparezcan. Dado que la despolarización se comporta como un factor trófico en estas células, se hace necesario su cultivo en condiciones despolarizantes de potasio (25 mM) que mimetizan el efecto de la conexiones *in vitro*, esta despolarización provoca una apertura de los canales de Ca^{2+} voltaje dependientes que permite alcanzar una concentración adecuada de Ca^{2+} que lleva a la activación de una serie de factores de transcripción relacionados con la supervivencia. Las CGCs cultivadas en estas condiciones tienen propiedades electrofisiológicas propias de neuronas maduras, con actividad eléctrica, expresión de receptores y son una población homogénea de neuronas glutamatérgicas que liberan selectivamente L-Glutamato y L-Aspartato (Contestabile A 2002).

El cambio de las concentraciones de K^+ desde 25 mM hasta la concentración fisiológica de 5 mM (que además suele venir acompañada de una eliminación del suero del medio), lleva a este tipo de cultivos a una muerte celular por apoptosis, un modelo conocido como privación de suero y de potasio (DV S/ K^+). Bajo estas condiciones se desarrolla una muerte apoptótica llegando a un punto de no retorno en torno a las 4-8h después del cambio de las condiciones del medio y donde se produce una mortalidad de entre el 30-50% de las CGC a las 16-24h (D'Mello SR et al. 1993; Gallo V et al. 1987).

En estas condiciones se dan alteraciones en ciertas dianas típicamente apoptóticas como la activación de las caspasas, la familia de factores de transcripción FOXO, alteraciones en la vía de PI3K/AKT o de las MAPK, esta última lleva a cambios en la actividad del factor de transcripción AP-1. Todos estos factores desencadenan una muerte por apoptosis donde la mitocondria juega un papel clave provocando la movilización de miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2 hacia la membrana externa mitocondrial y la activación de la caspasa 3. Del mismo modo la sobreexpresión de las Bcl-2 y Bcl-xL también han demostrado un efecto protector lo que corrobora la importancia de la vía intrínseca en la apoptosis en CGC.

Se puede rescatar a las CGC de este proceso apoptótico incrementando la concentración de glutamato hasta un nivel umbral en el que se produzca suficiente entrada de Ca^{2+} en el citoplasma o bien mediante el tratamiento con factores tróficos como BDNF, IGF-1 o NGF.

Todas estas características hacen de las CGC un modelo válido e idóneo para el estudio de la apoptosis inducida por alteraciones en alguna de las vías bioquímicas implicadas en esta apoptosis.

7. Fármacos empleados en el estudio

7.1 LY294002

El fármaco LY294002 se ha desarrollado en los laboratorios de investigación de Lilly research en 1994. Este compuesto es el 2-(4-morfolinil)-8-fenilcromon (2-morfolino-8-fenil-4H-1-benzopiran-4-ona) el cual es un derivado de quercetina.

El LY294002 a diferencia de la quercetina no interactúa con otros miembros de la vía de los inosítoles fosfato. Es una molécula planar de bajo peso molecular que actúa por unión competitiva la PI3K, desplazando al ATP de su punto de unión de la subunidad catalítica p110. Tiene una $\text{IC}_{50} = 0.43 \mu\text{g/mL}$; $1,40 \mu\text{M}$ selectivo únicamente por la PI3K (Vlahos CJ et al. 1994), sin embargo, carece de la potencia y selectividad de fármacos desarrollados posteriormente a partir, en muchos casos, de su grupo farmacóforo por lo que no es capaz de discriminar entre las distintas isoformas de esta

subunidad p110. No obstante, el empleo de esta molécula en modelos experimentales ha permitido avanzar en el conocimiento de las funciones de la vía de los inosítoles fosfato (Crabbe T et al. 2007).

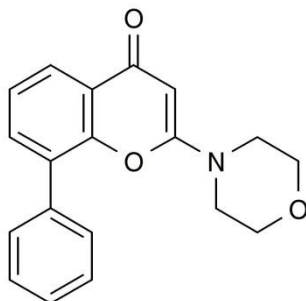


Figura 18: Estructura molecular del LY294002.

7.2 Z-VAD-fmk

El Z-VAD-fmk (carboxibenzoxy-valil-alanil-aspartil-[O-metil]-fluorometilketona) es un péptido inhibidor pan-caspasa permeable a través de la membrana celular. Actúa como inhibidor irreversible por unión al centro catalítico de la enzima. Z-VAD-fmk es utilizado en estudios de apoptosis o de inflamación donde la activación de las caspasas está implicada.

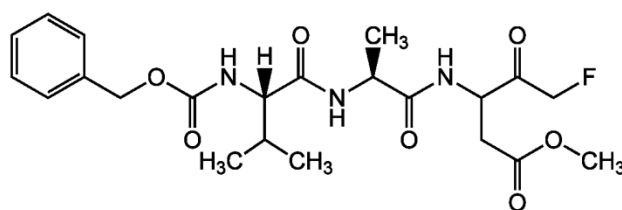


Figura 19: Estructura molecular del Z-VAD-fmk.

7.3 Inhibidor de calpaína III (IC III)

El Carbobenzoxy-valinyl-phenylalaninal, es un péptido con secuencia Z-Val-Phe-CHO, permeable a las membranas celulares potente inhibidor de la calpaína I y II con una

IC50= 8 nM. Muestra una protección frente aquellos tóxicos que actúan a través de una entrada de Ca^{2+} como la capsaicina. Muestra un efecto protector frente a la apoptosis mediada por glutamato.

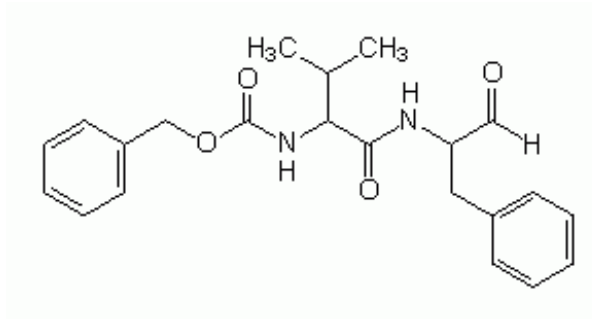


Figura 20: Estructura molecular del Inhibidor de calpaína III (IC III).

7.4 Inhibidores de ciclinas dependientes de cinasas (CDKs)

Numerosas estrategias se han propuesto para modular la actividad de las CDKs, estas estrategias las podemos dividir entre las que optan por una acción directa sobre el centro catalítico de las subunidades de CDKs o bien las que actúan por una regulación indirecta de las vías que regulan la actividad de las CDKs. (Senderowicz AM et al. 2002).

Los inhibidores de pequeño tamaño de CDKs son compuestos que actúan directamente sobre el centro catalítico de las CDKs, muchos de estos compuestos actúan concretamente desplazando al ATP de su punto de unión a las CDKs. (De Azevedo WF et al. 1997, Senderowicz AM et al. 2002). Entre este grupo de moléculas encontramos el Flavopiridol y la Roscovitina.

7.4.1 Flavopiridol

El Flavopiridol es una flavona semisintética derivada de la rohitukina, un alcaloide extraído de la planta *Dysoxylum binectariferum*, cuyo nombre químico es (-)-2-(2-Clorofenil)-5,7-dihidroxi-8-[(3*S*,4*R*)-3-hidroxi-1-metil-4-piperidinil]-4*H*-1-benzopirán-4-ona. Este compuesto actúa en el punto de unión al ATP de las CDKs (CDK1-9) (Schang LM 2005; Senderowicz AM, Sausville EA, 2000) y se comporta como un inhibidor no selectivo de estas moléculas impidiendo así la división celular, y

además la bloquea a concentraciones mucho más bajas de lo que son necesarias para inhibir otras cinasas con las que interacciona (Raju U et al. 2003) como la GSK3 β , PKC, glicógeno fosforilasa.

El flavopiridol induce el arresto del ciclo celular en la fase G₁ *in vivo* e *in vitro*, por inhibición de CDK1 y 2, por lo que es citotóxico para las células en fase de mitosis en las cuales induce apoptosis, motivo por el que ha sido empleado como anticanceroso (Carlson BA et al. 1996).

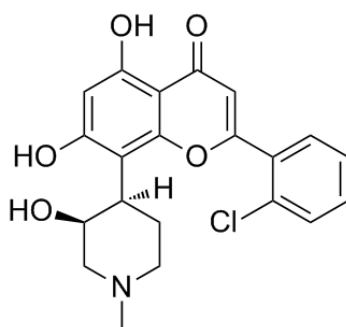


Figura 21: Estructura molecular del Flavopiridol.

7.4.2 Roscovitina

La Roscovitina está formada por el (2-(*R*)-[[9-(1-Methylethyl)-6-[(phenylmethyl)amino]-9H-purin-2-yl]amino]-1-butanol, 6-enzylamino) -2(*R*)-[[1-(hydroxymethyl) propyl]amino]-9-isopropylpurine) el cual es un análogo de purina trisustituido que actúa como un potente inhibidor de CDK 1,2, 5, 7 y 9. La Roscovitina fue uno de los primeros análogos de purina en ser sintetizada y se encuentra entre los más potentes y selectivos. Los estudios cristalográficos han revelado que actúa mediante un mecanismo de unión competitivo con el ATP y ha sido utilizado en ensayos clínicos por su actividad antitumoral (Le Tourneau C et al.2010; Krystof V et al. 2010). Y además se ha descrito en diversos estudios un papel protector frente a la muerte neuronal (Timsit S et al. 2012; Verdaguer E et al. 2003; Liebl J et al. 2011).

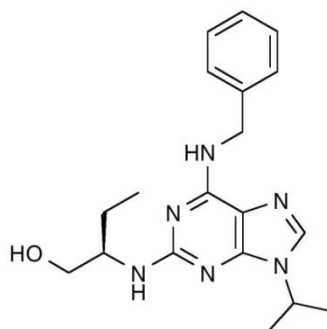


Figura 22: Estructura molecular de la Roscovitina.

7.5 Inhibidores de GSK3 β

7.5.1 SB415286

El, 3-[(3-Cloro-4-hidroxifenil)amino]-4-(2-nitrofenil)-1H-pirrol-2,5-diona, o SB415286 es un derivado de maleimida. Las bisindol maleimidadas son estructuras que fueron originalmente desarrolladas como potentes inhibidores de la PKC, sin embargo se han descrito acciones sobre otras cinasas lo que ha llevado al desarrollo posterior de nuevas estructuras con afinidades diferentes. El SB415286 actúa como un inhibidor competitivo de pequeño peso molecular de GSK3 con una IC_{50} de 78 nM desplazando al ATP de su punto de unión a GSK3 β . La inhibición de ésta mediante fármacos más específicos que los utilizados clásicamente como el Litio de muy baja selectividad tiene una especial importancia para establecer el papel de esta proteína en numerosas enfermedades neurodegenerativas (Meijer L et al. 2004).

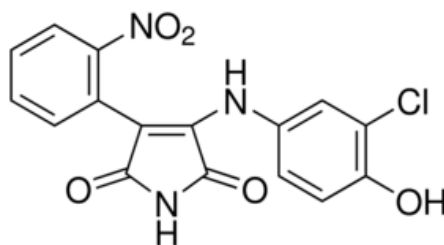


Figura 23: Estructura molecular del SB415286.

7.6 Inhibidores de MAPKs

7.6.1 SB203580

El fármaco SB203580 se ha desarrollado a partir del antiinflamatorio SK&F 86002, y está formado por el (4-(4-fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)-imidazole), que es un inhibidor de p38 que actúa por inhibición competitiva con el ATP. Su selectividad *in vivo* es significativamente menor que en los ensayos de IC_{50} ya que *in vivo* la presencia del anillo de imidazol interacciona con el citocromo P450 (Wagner G, Laufer S 2005) y esto hace que haya que aumentar la concentración para obtener el mismo efecto inhibitorio.

La p38 induce la activación del factor de transcripción AP-1 frente a las denominadas respuestas de estrés celular como son, infecciones bacterianas, citosinas pro-inflamatorias y estrés oxidativo entre otros, y es por ello que existe una amplia bibliografía referente a su uso como inhibidor de p38 en modelos de estrés celular.

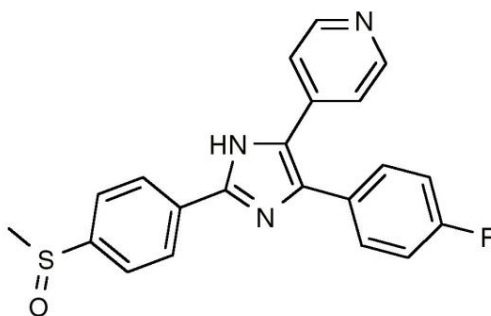


Figura 24: Estructura molecular del SB203580.

7.6.2 SP600125

La antra[1,9-cd]pirazol-6(2H)-ona es conocida como SP600125, este fármaco fue desarrollado en 2001 por el laboratorio Signal Pharmaceuticals/Celgene como un inhibidor de la JNK que actúa por competición en el punto de unión del ATP y no es selectivo de ninguna de las isoformas de JNK, aunque si se une con mayor afinidad a JNK1 y JNK2 más que a JNK3, la IC_{50} para las dos primeras es de 40 nM y para la JNK3 es de 90 nM, sin embargo esta elevada selectividad es menor especialmente en estudios *in vivo*, donde la concentración de ATP es significativamente mayor que la que

encontramos en los ensayos IC_{50} *in vitro*. Su mayor selectividad por JNK que frente a otras MAPKs como ERK1/2, ERK5 o p38 se atribuye a su grupo farmacóforo de antrapirazolona el cual le facilita la interacción con el punto de unión al ATP de JNK, pero no tanto el de otras MAPK, según los estudios de cocrystalización. El SP600125 ha sido empleado para estudiar el papel de la vía de la JNK en las numerosas rutas bioquímicas (Bogoyevitch MA, Arthur PG 2008).

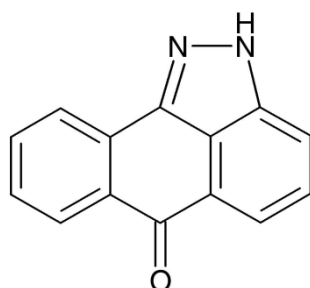


Figura 25: Estructura molecular del SP600125.

7.6.3 UO126

El compuesto 1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(o-aminophenylmercapto)butadiene, o UO126 fue identificado como un inhibidor de la transcripción del factor AP-1, concretamente evitando un incremento de la transcripción de c-Fos y c-Jun, más tarde se identificó como diana de UO126 a las MAPKKs MEK-1 y MEK-2 a las que inhibe de forma no competitiva produciendo un bloqueo de la MAPK ERK1/2. El UO126 es mucho más selectivo que otros compuestos que actúan sobre la misma vía como el PD098059.

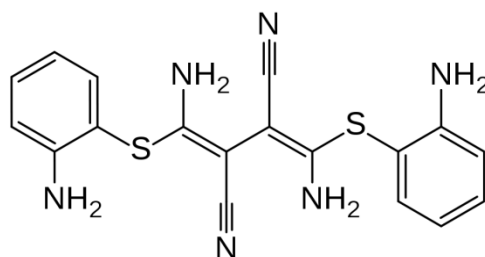


Figura 26: Estructura molecular del UO126.

Objetivos

Objetivos

La falta de tratamientos efectivos para enfermedades neurodegenerativas hace que sea especialmente importante caracterizar nuevas dianas farmacológicas, por lo que es necesario profundizar en el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos implicados en estas enfermedades.

Implicada en la neurodegeneración encontramos la vía de los inosítoles fosfato, la cual se ha relacionado con funciones de supervivencia y proliferación, este papel ha sido descrito tanto en neuronas inmaduras como en neuronas maduras (Dudek H et al. 1997). Numerosos estudios confirman que en algunas de las principales enfermedades neurodegenerativas aparecen alteraciones en esta vía (Lee KY et al. 2007; Kamada H et al. 2007). Por este motivo, es de especial interés la caracterización de la muerte neuronal producida por alteraciones en la vía de los inosítoles fosfato.

- 1.- Caracterizar un modelo *in vitro* de apoptosis inducida por la inhibición de la vía de PI3K/AKT en CGC.
- 2.- Estudiar la posible implicación de proteínas del ciclo celular en la apoptosis por LY294002.
- 3.- Utilizar inhibidores de CDKs y GSK3 β para prevenir la apoptosis inducida por la inhibición de PI3K en CGCs.
- 4.- Estudio de las proteínas implicadas en la vía de las MAPKs que se encuentra regulada por la PI3K.
- 5.- Estudio del papel de c-Jun en la activación de proteínas mitocondriales proapoptóticas como Bax, Dp5/Hrk o Bim.
- 6.- Identificar posibles dianas terapéuticas para prevenir la apoptosis provocada por la inhibición de PI3K.

Métodos

Métodos

1. Cultivo primario de células granulares de cerebelo de rata

Los cultivos primarios de células granulares de cerebelo (CGC) se prepararon a partir de crías de rata Sprague-Dawley de 7 a 8 días postnatal, utilizándose indistintamente machos o hembras.

Soluciones

-Krebs stock (10X)

Componente	Peso (g)
NaCl	17,68 g
KCl	0,9 g
KH₂PO₄	0,415 g
D-Glucosa	6,425 g
NaHCO₃	5,35 g
Rojo Fenol	0,025 g

Solución de MgSO₄ al 3,82 %

Solución de CaCl₂ al 0,18 %

Medio BME (*Basal Medium Eagle*) sin glutamina (Gibco; 41010-026)

Suero bovino fetal (FBS, *Foetal Bovine Serum*, Sigma; F9665)

Potassium Chlorure (Panreac; 131494.1211)

Phenol red sodium salt (Sigma; P4758-5G)

Las soluciones se preparan justo antes de hacer los cultivos, una vez listas, deben filtrarse en la campana de flujo y transferirse a un nuevo tubo estéril empleando un filtro de 0,22 µm.

- Solución A:

300 mg de albúmina sérica bovina (BSA, *Bovine Serum Albumin*, Sigma; A4503-100G)

10 ml de Krebs 10X

800 µl de MgSO₄

Enrasar hasta 100 ml con H₂O MilliQ

- Solución B:

3,12 mg de tripsina (T9201-100MG)

12,5 ml solución A

- Solución C:

1,25 mg de desoxiribonucleasa (D5025-150KU)

3,9 mg de inhibidor de la tripsina (T9003-250MG)

75 µl de MgSO₄ stock

7,5 µl de solución A

- Solución D:

2 ml de la solución C

10,5 ml de la solución A

- Solución E:

6,25 ml de la solución A

50 µl de MgSO₄

50 µl de CaCl₂

- Medio de cultivo:

Las células serán cultivadas en medio Basal Medium Eagle (BME), al cual se suplementa con un 10 % de FBS, L-glutamina 2 mM, KCl 25 mM y sulfato de gentamicina a la concentración de 100 µg/ml.

1.1 Preparación de las placas con Poli-L-lisina:

Para permitir la adherencia de las células a la superficie de la placa, es necesario hacer un pretratamiento de las placas de cultivo con poli-L-lisina (Sigma; P6282-5MG), ya que de otro modo estas no se adhieren a la superficie de la placa y por lo tanto, no se desarrollan. El mismo tratamiento se aplicará igualmente en los casos en que se usen cubreobjetos de vidrio donde tengan que crecer las células.

Todo el procedimiento debe llevarse a cabo en campana de flujo laminar:

- 1.- Preparación de la solución 10X de Poli-L-Lisina, para ello resuspender los 5 mg del liofilizado en 50 ml de H₂O autoclavada
- 2.- Tomar una alícuota de solución 10X y diluirla en una botella autoclavada hasta una concentración final de 1X (concentración final de 0,01 mg/ml)
- 3.- Utilizando una pipeta estéril debe añadirse la poli-L-lisina en una cantidad suficiente para cubrir la superficie de crecimiento de las placas.
- 4.- Transcurridos 30-45 min retirar la solución de Poli-L-lisina y dejar evaporar en la campana de flujo hasta que las placas queden completamente secas.

1.2 Protocolo cultivos primarios de células granulares de cerebelo de rata

Todo el protocolo debe realizarse en condiciones de esterilidad

- 1.- Comenzar la disección de las crías 6-8 postnatales, en grupos de 3, rociar las cabezas con etanol 70 % y extraer los cerebelos, acto seguido depositarlos en una placa de 35 mm con solución A.
- 2.- Limpiar convenientemente las meninges adheridas al cerebelo y pasarlas a otra placa.
- 3.- Repetir la disección con todas las crías
- 4.- Transferir los cerebelos, una vez escurridos, a una superficie dónde sea cómodo manipularlos (como por ejemplo una tapa de una placa de Petri de 100 mm Ø). Cortar con un bisturí o una hoja de afeitar en dos direcciones perpendiculares entre sí. No ser

demasiado enérgico porque se incrementa la liberación de DNA que posteriormente dificultará la disociación de las células.

5.- Transferir el tejido con las pinzas al tubo A. Centrifugar a 1000 rpm durante 2 min.

6.- Decantar el sobrenadante y añadir la solución de tripsina (solución B). Pasar todo a un flascón de 250 ml estéril. Incubar en un baño a 37 °C con agitación suave durante 15 min.

7.- Añadir la solución con tripsina diluida al flascón. Dispersar el eventual coloide que se haya podido formar agitando suavemente. Con una pipeta *pasteur* estéril, transferir todo el contenido y añadirlo al tubo D.

8.- Centrifugar el tubo D a 1000 rpm durante 3 min.

9.- Aspirar el sobrenadante con una pipeta 10 ml estéril (no hacerlo al vacío). Añadir aproximadamente la mitad de la solución de tripsina concentrada, resuspender el precipitado y valiéndose de una *pasteur* estéril dispersarlo mecánicamente, añadir el resto de la solución de tripsina concentrada y continuar dispersando el precipitado mecánicamente hasta conseguir una solución homogénea. Dejar reposar unos 10 min. En caso de que aparezca un precipitado disgregar e igualmente transferirlo al tubo con la solución de Ca^{2+} y Mg^{2+} .

10.- Transferir el sobrenadante al tubo con la solución de Ca^{2+} y Mg^{2+} empleando una *pasteur* estéril, disgregar el precipitado unas diez veces más con ella y volver a dejarlo reposar 10 min.

11.- El sobrenadante se transfiere a un tubo de 50 ml vacío. Centrifugar durante 7 min a 1000 rpm.

12.- Después de la centrifugación aspirar el sobrenadante con cuidado y resuspender en 50 ml de medio de cultivo.

13.- Contar la densidad celular utilizando la cámara de Neubauer, diluir los 50 ml de medio con células en el volumen final de medio de cultivo que sea necesario para alcanzar la concentración final de células. Las placas de 100 y 60 mm Ø se siembran a una concentración de 700.000 cel/ml y las placas de 24 y 96 pozos a la concentración de 500.000 cel/ml.

14.-. Pasadas 24 h del cultivo añadir ARA-C (hidrocloruro de citosín- β -D-arabinofuranósido, Sigma; C6645) a una concentración de 10 μ M. Mantener en el incubador a 37 °C y 5 % de CO₂, las células podrán emplearse para el experimento tras 7 días *in vitro*.

2. Estudios de viabilidad

2.1 Contaje de núcleos pignóticos

La morfología de los núcleos neuronales fue estudiada mediante el empleo de la tinción con yoduro de propidio (P4170-25MG), que se une a los ácidos nucleicos de doble cadena, de esta manera se puede observar la morfología propia de los núcleos apoptóticos, estos aparecen condensados y de mayor brillo que los núcleos control, ocasionalmente aparecen fragmentados o en una morfología característica conocida como “ojo de gato”. Este conjunto de características morfológicas se debe al proceso de fragmentación y condensación de la cromatina que se da durante el proceso apoptótico.

Protocolo

- 1.- Retirar el medio de crecimiento y lavar con PBS las células.
- 2.- Fijar las células, cubriéndolas durante 10 min con una solución de paraformaldehído (PFA) al 4 % en PBS con un 2 % de sacarosa, la placa se mantendrá en hielo mientras incubamos con PFA 4 %.
- 3.- Aspirar la solución con PFA al 4 % y lavar con PBS.

4.- Añadir yoduro de propidio 0,025 mg/ml, se deja incubar durante 5 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se retira el medio y se hace un nuevo lavado con PBS. Debe visualizarse empleando un microscopio de fluorescencia a 200 aumentos (objetivo 20X) (Eclipse TE200, Nikon). Se capturan imágenes mediante una cámara digital acoplada al microscopio empleando el software Kappa Image Base®. Se cuentan 5 campos aleatoriamente escogidos de cada pozo hasta un total de 15.

2.2 Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular de gran versatilidad, ampliamente utilizada y que se basa en el establecimiento de un flujo laminar de una suspensión de células que pasan de manera alineada por delante de un haz de luz de alta intensidad (generalmente una fuente laser) focalizado. La intersección de cada célula con el láser provoca la emisión de dos tipos de radiación electromagnética: una de dispersión (*scattered*) y otra fluorescente, esto produce una señal que será detectada por un fotomultiplicador que recoge la luz concentrada por un sistema de lentes y la transforman en impulsos eléctricos de diferente intensidad en función del número de fotones incidentes.

Protocolo

1.- Para las placas de 96 pozos se añadirá a cada uno triton-X-100 (T9284-100ML) a una concentración final de 0,5 %, y como fluorocromo se empleará el yoduro de propidio, para el marcaje de los núcleos a una concentración final de 0,025 mg/ml.

2.- Dejar incubar la placa durante 30 min a temperatura ambiente protegida de la luz. Este paso es importante ya que la calidad del marcaje depende en gran medida de que el yoduro de propidio haya tenido tiempo de incorporarse hasta saturación en el DNA.

3.- Levantar las células y recuperar el medio de cada uno de los pozos, transferir su contenido en tubos para el citómetro de flujo (Epics XL Beckman Coulter). Mediante

un protocolo adecuado se discrimina la fracción apoptótica de células con DNA fragmentado de aquellas que tienen su DNA íntegro.

3. Estudio proteico

Las proteínas sufren importantes modificaciones postranscripcionales como fosforilación, acetilación o ubiquitinización en respuesta a estímulos externos o internos, estas modificaciones constituyen un mecanismo adaptativo que permite a la célula modular la función proteica en función de las necesidades. Así mismo, la cantidad total de proteína también puede variar según estas necesidades. Gran parte de las técnicas empleadas para el estudio de proteínas son técnicas inmunológicas basadas en el reconocimiento de la proteína que se desea estudiar mediante el empleo de anticuerpos específicos que permitan aislar o identificar la proteína deseada de manera específica.

3.1 Obtención de extractos totales de proteína

Una vez realizados los cultivos y su tratamiento, se procede a obtener el extracto proteico. Se utilizan de dos a tres placas de 60 mm de diámetro para cada uno de los puntos experimentales (en función de la cantidad de proteína necesaria) y a continuación se recupera el extracto proteico total.

Protocolo

- 1.- Todo el proceso debe llevarse a cabo a 4 °C. Retirar el medio de crecimiento y hacer dos lavados con PBS. La cantidad de PBS deberá ser suficiente como para cubrir el fondo de la placa.
- 2.- Retirar el PBS y añadir 150 µl del tampón de lisis para las placas de 60 y 100 mm Ø, lo dejamos actuar unos segundos y, manteniendo la placa con una cierta inclinación para

facilitar que el tampón se acumule en su vértice iniciamos el rascado con un rascador (*scraper*).

3.-Transferir el tampón de lisis a la placa siguiente de la misma condición experimental, que previamente ha sido lavada con PBS.

4.- Repetir el paso número 2 con esta nueva placa y posteriormente transferir el tampón de lisis con las células a un vial, que dejaremos reposar en hielo durante unos 15 min.

5.-Centrifugar los viales obtenidos para cada condición experimental en una ultracentrífuga a 2000 rpm durante 5 min a 4 °C.

7.- Transferir el sobrenadante sin aspirar ni burbujas ni el *pellet* aparecido a un nuevo vial rotulado.

8.- Guardar las muestras y congelarlas a -80 °C

Composición del tampón de lisis

Componente	volumen
Tritón x-100	10 µl
PBS	976 µl
PMSF*	1 µl
Aprotinina	3 µl
Ortovanadato (OVNA)	5 µl
PIC**	5 µl

*PMSF: *phenilmetylsulfonil fluorure*

**PIC: *phosphatase inhibition cocktail*

Phenilmetylsulfonil fluorure, Sigma; P-7626

Aprotinin, from bovine lung (Sigma; A6279-10ML)

Phosphatase inhibitor cocktail 3 (Sigma; P0044-1ML)

3.2 Determinación de la concentración proteica

Para determinar la concentración proteica de las muestras se emplea la técnica de Bradford, (Bradford MM et al. 1976), se trata de una técnica colorimétrica que se basa en la unión a la proteína del colorante Comassie Brilliant Blue G250, la absorbancia de este colorante se desplaza desde 465 nm hasta 595 nm cuando se encuentra unido a proteína. La absorbancia de la muestra es directamente proporcional a la cantidad de proteína de la misma.

Protocolo

- 1.- Utilizar una dilución 1:10 o 1:20 de las muestras de proteína en agua destilada (según sea necesario). Colocar 10 μ l de la dilución en cada pozo de la placa de lectura de 96 w, hacer triplicados por cada una de las muestras.
- 2.- Preparar la recta patrón con BSA a diferentes concentraciones de 1 a 5 μ g/ μ l. A partir de una solución madre de 2 mg BSA/ml. Preparar una recta patrón de concentraciones ascendentes, utilizar agua destilada como blanco, será el punto de referencia con una concentración 0 μ g/ μ l
- 3.- Preparar una dilución 1:5 del colorante de Bradford en H₂O destilada y añadir 190 μ l de esta dilución a cada uno de los pozos con la dilución de proteína, recta patrón y blanco.
- 4.- Dejar incubar la placa a temperatura ambiente durante unos 5 min.
- 5.- Leer la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro (Bio Rad, Benchmark plus).
- 6.- A partir de las concentraciones media de absorbancia de la recta patrón podrán extrapolarse los valores de concentraciones de las muestras problema.

3.3 Western Blot

Esta técnica permite observar los niveles o cambios de estado de una proteína específica. La técnica se basa en las diferencias en la velocidad de migración electroforética en una matriz de acrilamida, al someter a las proteínas a un campo eléctrico, permite separarlas en función de su relación carga/masa. Posteriormente se lleva a cabo la transferencia de las proteínas o *blotting*, a una membrana sintética, que actuará como soporte para llevar a cabo una detección mediante el uso de anticuerpos específicos contra la proteína.

Tampones y soluciones:

Tampón de Laemmli

Componente	Volumen (ml)
Tris 2 M pH 6'5	625 μ l
SDS 40 %	1 ml
Glicerol	1 ml
β mercapto	1 ml
Azul bromofenol	1'2 ml
H ₂ O milliQ	0'175 μ l

Trizma®base (Sigma; T6066-1KG)

Dodecylsulfate sodium salt (AppliChem; A2572,0500)

Bromophenol blue (Sigma; B8026)

Tampón Tris-HCl 1,5 M pH 8,8

Componente	Cantidad
Tris base	18,17 g
H ₂ O destilada	100 ml

Ajustar pH 8,8 con HCl 1 M

Tampón Tris-HCl 1 M pH 6,8

Componente	Cantidad
Tris base	12,1 g
H ₂ O destilada	100 ml

Ajustar pH 6,8 con HCl 1 M

SDS 10 %

Componente	cantidad
SDS	10 g
H ₂ O destilada	100 ml

Tampón de migración

	Conc. 1X	10X
Tris base	25 mM	30,3 g
Glicina	192 mM	144 g
SDS	0.1 %	10 g
H ₂ O destilada	c.s	c.s.p 1 L

Tampón de transferencia

	Conc. 1X	10X
Tris base	25 mM	30,3 g
Glicina	192 mM	144 g
etanol	10 %	-
H ₂ O destilada	c.s	c.s.p 1 L

Tampón TBS

	Conc. 1X	10X
Tris base	50 mM	24,25 g
NaCl	192 mM	80 g
H ₂ O destilada	c.s	c.s.p 1 L

Ajustar a pH 7,5

Tampón TBS-Tween® 0,1 %

	cantidad
Tampón TBS 1X	1 L
Tween®	1 ml

Preparación de geles de poliacrilamida-SDS

Para la preparación de los geles se utiliza el sistema Mini-Protean III de Bio-Rad. Los geles polimerizan entre dos placas de vidrio específicas que mantienen una separación determinada entre ellas. Los geles están compuestos por dos fases, una superior o gel de concentración que permite que las proteínas lleguen en el mismo momento a la fase siguiente y una inferior o gel de separación que resolverá las proteínas en función de su relación carga/masa. Se emplean concentraciones diferentes de acrilamida para los geles de separación en función del tamaño de las proteínas a estudiar.

Geles de separación

Componente	5 %	7'5 %	10 %	12 %	15 %
Acrilamida-bisacrilamida	5'7 ml	2'8 ml	3'8 ml	4'5 ml	5'7 ml
Tris-ClH 1'5 M pH 8'8	3'75 ml	3'75 ml	3'75 ml	3'75 ml	3'75 ml
SDS 10%	170 µl	170 µl	170 µl	170 µl	170 µl
H ₂ O milliQ	9'0 ml	8'15 ml	7'17 ml	6'5 ml	5'3 ml
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
APS*	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl

Para evitar la inclusión de aire en la matriz de acrilamida, el gel se cubre con agua destilada, que se retirará una vez gelifique la acrilamida. A continuación se prepara y vierte sobre el separador, el gel de concentración con Tris-HCl 1 M, pH 6.8.

Geles de concentración

Componente	5 %	4 %
Acrilamida-bisacrilamida	625 µl	500 µl
Tris-ClH 1M pH 6'8	625 µl	625 µl
SDS 10%	50 µl	50 µl
H ₂ O milliQ	3'7 ml	3'8 ml
TEMED	5 µl	5 µl
APS 10%	25 µl	25 µl

Una vez vertido el gel de concentración sobre el espaciador, se coloca el peine que forma los pocillos. Terminada la polimerización, se retira el peine y se lavan los pocillos con tampón de migración.

Preparación de las muestras

La preparación de las muestras para la electroforesis necesitan una dilución en tampón de carga, o tampón de Laemmli que mantiene las proteínas en su estado desnaturalizado, en la cual se conserva únicamente la estructura primaria de la proteína. La cantidad de proteína debe ajustarse a las necesidades de cada experimento pero esta oscila entre 10 y 40 μg . Una vez mezclada con el tampón estas muestras deben colocarse en un baño seco a 100 °C durante 5 min, a continuación se hace un spin para recuperar todo el volumen.

Electroforesis

Una vez los geles están preparados y se cargan las muestras en el gel de acrilamida. Además deben incluirse los marcadores estándares de peso molecular (Bio-Rad, Dual Color; 161-0374).

Los geles se colocan dentro de una cubeta de electroforesis que contenga un volumen suficiente de tampón de migración para que ambos extremos del gel queden en contacto con el tampón y permitir de esta manera cerrar el circuito. Se conecta la cubeta a una fuente de alimentación y se inicia la separación a 90-100 V el tiempo que sea necesario para que la proteína se separe según su relación carga/masa.

Transferencia de las proteínas a la membrana

Terminada la migración, las proteínas deben transferirse a un soporte que permita fijarlas y que luego pueda utilizarse para detectarlas y cuantificarlas. El fundamento es similar al de la electroforesis, pero en este caso, se aplica un campo eléctrico perpendicular al gel que hace que las proteínas migren del gel, hacia la membrana, en este caso se emplean membranas de polivinilideno (PVDF, Bio-Rad; 162-0177).

La transferencia se consigue mediante la preparación de un sandwich en un soporte en el cual se coloca sucesivamente una esponja, papel Whatman®, el gel, la membrana, más papel Whatman® y finalmente otra esponja. Se cierra el sandwich y se coloca en su soporte en la cubeta de transferencia que contiene el tampón de transferencia. Se

dispone de forma que el gel quede hacia el ánodo (-) y la membrana hacia el cátodo (+). Finalmente se aplica una corriente constante de 200 mA durante 100 min.

El proceso provoca un fuerte calentamiento de la solución por lo que se recomienda refrigerar el sistema añadiendo un compartimento de hielo en la cubeta. La transferencia se realiza en frío a 4°C. Este punto es de especial importancia ya que la velocidad y eficiencia de la transferencia son inversamente proporcionales a la temperatura.

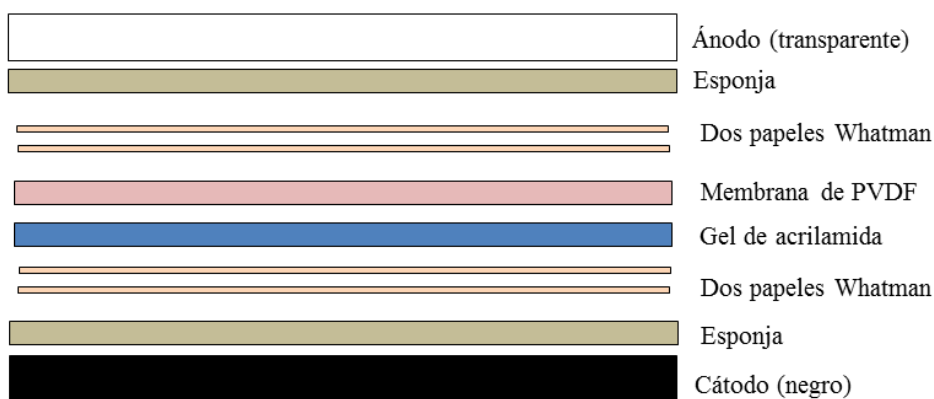


Figura 27: Esquema del orden de colocación de los distintos elementos que componen el sándwich para transferencia.

Inmunodetección

Una vez terminada la transferencia se lavan las membranas con TBS-tween® 0,1 % durante 5-10 min para retirar un posible exceso de metanol. A continuación se incubará la membrana en una dilución adecuada de anticuerpo primario en una solución de BSA al 5 % que actúa como bloqueo de los puntos de unión inespecíficos. Las membranas se mantendrán en incubación durante toda la noche a 4 °C.

A continuación, se procede al lavado de las mismas con TBS-tween® 0,1 % para retirar el exceso de anticuerpo primario, a continuación se incubarán con el anticuerpo secundario adecuado dependiendo de la fuente de nuestro anticuerpo primario.

Anticuerpo	Dilución	fuelle	Casa comercial
β -actina	1:20000	M	Sigma-Aldrich
GAPDH	1:5000	M	Millipore
α -spectrina	1:2000	R	Millipore
AKT Ser473	1:1000	R	Cell Signaling
AKT	1:2000	R	Cell Signaling
GSK3 β Ser9	1:2000	R	Cell Signaling
GSK3 β	1:2000	R	Cell Signaling
P35/p25	1:1000	R	Cell Signaling
β catenina	1:1000	G	Sta.Cruz
pRb	1:1000	R	Cell Signaling
E2F-1	1:1000	R	Cell signaling
Ciclina D1	1:1000	R	Cell Signaling
Ciclina E	1:1000	M	Sta.Cruz
Cdk2	1:1000	M	Sta.Cruz
Cdk4	1:1000	M	Sta.Cruz
ASK1 Ser83	1:1000	M	Sta.Cruz
pJNK Thr180/Tyr182	1:2000	M	Cell Signaling
JNK	1:2000	R	Cell Signaling
pERK1/2 Thr180/Tyr182	1:2000	R	Cell Signaling
ERK1/2	1:2000	R	Cell Signaling
ATF2	1:2000	R	Cell Signaling
c-Jun Ser71	1:1000	R	Cell Signaling
Bim	1:500	R	Millipore
Bax monómero activo	1:1000	M	Enzo

NOTA: R, rabbit; M, mouse; G, goat

Para la reacción de detección quimioluminiscente se mezclan cantidades iguales de solución 1 y 2 del kit de detección (Immobilon Western HRP Substrate Peroxide Solution®) en un soporte plano donde se incubaba la membrana, con la cara de las proteínas en contacto con el reactivo, durante 1 min.

A continuación se elimina el exceso de líquido de la membrana colocándola sobre papel absorbente y se introduce en la máquina para revelar Chemidoc XRS Bio-Rad® situándola sobre la bandeja

Las imágenes son procesadas mediante el empleo de un software específico para capturar imágenes digitales (ImageLab, Bio-Rad®)

3.4 Inmunoprecipitación

La inmunoprecipitación nos permite aislar de manera selectiva una proteína concreta desde un extracto de proteína. Se basa en el empleo de anticuerpos específicos contra la proteína de interés, posteriormente el complejo proteína-anticuerpo formado se precipita mediante la unión a proteína G agarosa que reconoce al primer anticuerpo. El elevado peso molecular de este complejo permite su fácil separación mediante centrifugación y precipitación.

La cantidad de proteína aislada es proporcional a la existente en la muestra y puede determinarse mediante Western Blot e inmunodetección en una membrana.

Protocolo

- 1.- Utilizar 250 µg de proteína, llevarlos a un nuevo vial (excepto en el control negativo).
- 2.- Ajustar el volumen hasta 500 µl con tampón de lisis.
- 3.- Incubar con anticuerpo primario. Añadir directamente a la muestra 10 µg de anticuerpo primario (excepto en el control negativo) e incubar a 4 °C en el agitador orbital durante 4 h.
- 4.- Preparar la proteína G agarosa (Santa Cruz Biotech. Sc-2003), para su uso lavar una cantidad suficiente de proteína G según el número de muestras, teniendo en cuenta que son necesarios 50 µl de proteína G por muestra. Posteriormente hacer dos lavados de la proteína G agarosa con PBS.
- 5.- Añadir 50 µl de proteína G agarosa por muestra.

- 6.- Las muestras pasan a incubarse en el agitador orbital a 4 °C durante toda la noche
- 7.- A continuación centrifugar las muestras a 1000 g a 4 °C, durante 5 min. Descartar el sobrenadante.
- 8.- Lavar el precipitado con 800 µl de tampón de lisis por cada muestra. Finalmente descartar el sobrenadante.
- 9.- Resuspender el precipitado con 60 µl de tampón de Laemmli 4X.
- 10.- Hervir las muestras a 100 °C durante 5 min
- 11.- Centrifugar a 1000 g a temperatura ambiente durante 5 min.
- 12.- Tomar el sobrenadante sin arrastrar el precipitado y pasarlo a un nuevo vial, la muestra queda lista para cargarla en geles de acrilamida-SDS para electroforesis y posterior transferencia a una membrana de PVDF para su inmunodetección.

3.5 Ensayo de actividad caspasa

La actividad de las caspasas ha sido determinada mediante un ensayo colorimétrico basado en la detección por espectrofotometría de un cromóforo liberado por la acción de las caspasas sobre un sustrato específico, los cuales tienen la característica de ser péptidos con un punto de corte característico de una caspasa concreta que al ser proteolizados producen una reacción colorimétrica que tiene una longitud de onda de emisión de 400-405 nm. Se ha empleado un kit comercial con diferentes sustratos para detectar la actividad de las caspasas 3, 6 y 9 (Caspase-3 kit MBL BV-1008-1000; Caspase-6 kit BioVision, K115-25; Caspase-6 kit BioVision, K119-25).

Caspasa	Sustrato
Caspasa 3	DEVD- <i>p</i> NA
Caspasa 6	VEID- <i>p</i> NA
Caspasa 9	LEHD- <i>p</i> NA

Protocolo

- 1.- Colocar las placas de cultivo en hielo.
- 2.- Retirar el medio de cultivo y lavar con PBS.
- 3.- A continuación añadir 50 μ l de tampón de lisis, rascar la placa y transferir el extracto a un vial.
- 4.- Centrifugar a 10000 g durante 1 min y transferir el sobrenadante a un nuevo vial.
- 5.- Determinar la concentración de proteína mediante el método de Bradford tomar 200 μ g de proteína y ajustar el volumen hasta 50-200 μ l con tampón de lisis.
- 6.- Dilución 1:1 con *2X Reaction buffer* al que previamente se le ha añadido una concentración de 10 mM de DTT.
- 7.- Añadir 5 μ l de la madre 4 mM del sustrato (concentración final de 200 μ M).
- 8.- Incubar a 31 °C durante 1-2 h dependiendo de la velocidad de reacción.
- 9.- Hacer la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda entre 400-405 nm (Bio Rad, Benchmark plus).

3.6 Ensayo de la actividad GSK3 β

El ensayo se basa en la inmunoprecipitación de GSK3 β empleando un anticuerpo específico anti-GSK3 β y posterior unión del complejo a la proteína G agarosa. La cinasa inmunoprecipitada se incuba con γ -³²P-ATP y se determina la incorporación de ³²P al sustrato.

Protocolo

Inmunoprecipitación:

- Primero es necesario homogeneizar y estabilizar la proteína G agarosa. En primer lugar, mezclar con cuidado la proteína G hasta obtener una solución homogénea. A continuación, tomar el volumen necesario de proteína G agarosa para todos los puntos experimentales. Para ello cortar la punta de la pipeta hasta un diámetro superior a 1 mm. Seguidamente añadir 300 µL de 1X tampón de lavado, vórtex para homogeneizar. Centrifugar 30 s a 8000 g a 4 °C y eliminar el sobrenadante con cuidado. Los lavados deben repetirse dos veces y dejar la proteína G agarosa en hielo.

Finalmente resuspender de nuevo la proteína G agarosa en tampón de lavado 1X y transferir 30 µL a cada vial. Una vez lista la proteína G puede comenzarse la inmunoprecipitación:

- 1.- Añadir 2 µl de anti-GSK3β a cada vial a excepción del control negativo sin anticuerpo.
- 2.- Añadir 200 µg de lisado de proteínas citoplasmáticas a un volumen entre 300-600 µL por vial (ajustar el volumen según sea necesario).
- 3.- Incubar a 2-8 °C con agitación suave durante 3 h mediante un agitador orbital.
- 4.- Centrifugar los viales con las muestras a 8000 g entre 2-8 °C durante 30 s. Aspirar el sobrenadante con cuidado. Dejar en hielo y repetir los lavados.
- 5.- Aspirar el sobrenadante con cuidado.
- 6.- Lavar el precipitado con 500 µl de tampón de lavado diluido a 1X siempre en frío. Agitación breve con el vórtex e incubar en el agitador orbital durante 1 min a 2-8 °C.
- 7.- Centrifugar los viales a 8000 g a 2-8 °C durante 30 s. Aspirar el sobrenadante con cuidado. Dejar en hielo y repetir los lavados.

8.- En el vial del control negativo para el fármaco, se añaden 10 µl de la solución de SB415286 (inhibidor de GSK3β).

9.- Al resto de vial se añaden 10 µl de DMSO.

10.- Centrifugar unos segundos a 8000 g para llevar toda la mezcla al fondo del vial. Homogeneizar la proteína G agarosa y dejar 5 min a temperatura ambiente.

11.- Añadir el sustrato tomando 5 µl de la solución del sustrato a todos los viales, menos al tercer control negativo sin sustrato, en su lugar añadir 5 µl de H₂O destilada.

12.- Preparar la mezcla de: 125 µl de tampón de ensayo, 75 µl de tampón de lavado y 2,5 µl de γ -³²P-ATP (actividad específica de 10 mCi/ml), ajustar el volumen para cada ensayo manteniendo las proporciones indicadas.

13.- Añadir 20 µl de la mezcla radiactiva a las mezclas obtenidas tras el paso anterior. Mezclar mediante agitación suave.

14.- Incubar los viales 30 min a 37 °C. Mezclar las muestras suavemente cada 5 min a temperatura ambiente.

15.- Centrifugar unos segundos a 8000 g y transferir 25 µl de la fase líquida a un papel de celulosa. Dejar secar durante 1 min.

18.- Sumergir el papel de celulosa en ácido fosfórico (H₃PO₄) 0,5 %, agitar 5 o 6 min. Lavar así cuatro veces.

19.- Lavar en etanol 1 min.

20.- Lavar en acetona 1 min.

21.- Dejar secar a temperatura ambiente.

22.- Leer la actividad específica de radiactividad mediante el lector Bio Rad PMI Molecular imager®.

3.7 Ensayo de actividad p38

El ensayo se basa en la inmunoprecipitación específica de la proteína p38 fosforilada en Thr180/Tyr182, que corresponde a su forma activa, a continuación se mide su capacidad para fosforilar *in vitro* específicamente el residuo Thr71 de ATF-2 mediante la inmunodetección por Western Blot. Se utiliza un kit comercial específico para este procedimiento (Cell signaling; cat. 9820). El protocolo se divide en cuatro partes: Obtención de proteínas, inmunoprecipitación, actividad cinasa y Western Blot.

Protocolo

Obtención del lisado de células.

- 1.- Retirar el medio de cultivo de las CGC.
- 2.- Hacer dos lavados con PBS a 4 °C.
- 3.- Eliminar el PBS y añadir 500 µl de tampón de lisis 1X al que previamente se ajusta la concentración de PMSF a 1 mM, dejar incubar durante unos minutos.
- 4.- Rascar las células y transferirlas a un vial, mantener la muestra en hielo.
- 5.- Sonicar las muestras cinco veces 5 s cada una.
- 6.- Centrifugar la muestra 10 min, 2000 rpm a 4°C y transferir el sobrenadante a un nuevo vial. Conservar a -80 °C.

Inmunoprecipitación:

- 1.- Añadir 20 µl de proteína G agarosa ya unida a anti-p38 Thr180/Tyr182. Ajustar el volumen total de la mezcla hasta 300 µl. Dejar incubar toda la noche a 4°C con agitación suave mediante agitador orbital.

NOTA: Previamente a la utilización de la proteína G esta debe colocarse a 4 °C en hielo para reducir su viscosidad, agitar por inversión.

Ensayo de actividad cinasa:

- 1.- Tras la inmunoprecipitación, se centrifugan los lisados de proteína a 14000 g durante 30 s a 4 °C. El precipitado obtenido se lava en tampón de lisis dos veces y se mantiene en hielo.
- 2.- Seguidamente lavar dos veces con el tampón de actividad cinasa 1X.
- 3.- Resuspender el precipitado en 50 µl de tampón actividad cinasa 1X al que se le añade una concentración de 200 µM de ATP y 1µl de sustrato.
- 4.- Incubar durante 30 min a 30 °C al baño maría.
- 5.- Parar la reacción añadiendo tampón de Laemmli 4X. Mezclar bien el contenido del vial con un vórtex y finalmente se centrifuga a 14000 g durante 30 s.
- 6.- El sobrenadante se transfiere a un nuevo vial, hervir la muestra a 100 °C durante 2-5 min. Y conservar a -80 °C.

Finalmente cargar las muestras en un gel de acrilamida-SDS y mediante la técnica de Western Blot convencional inmunodetectar ATF-2 Thr71, siendo la cantidad de sustrato fosforilado proporcional a la cantidad de p38 activa en la muestra.

3.8 Ensayo de la actividad JNK

El ensayo consiste al igual que el anterior en la inmunoprecipitación de JNK empleando un anticuerpo específico anti-JNK Thr180/Tyr182 que luego será reconocido por la proteína G agarosa. La cinasa inmunoprecipitada es expuesta a un sustrato específico como es ATF-2 y se mide su capacidad para fosforilarlo en Thr71 *in vitro*. El protocolo del ensayo se compone de cuatro partes: Obtención del lisado, inmunoprecipitación, actividad cinasa y Western Blot.

Protocolo

Obtención del lisado de células:

- 1.- Retirar el medio de cultivo de las CGC.
- 2.- Hacer dos lavados con PBS a 4 °C.
- 3.- Eliminar el PBS y añadir 500 µl de tampón de lisis 1X al que previamente se ajusta la concentración de PMSF a 1 mM, dejar incubar durante unos minutos.
- 4.- Rascar las células y transferirlas a un vial, mantener la muestra en hielo.
- 5.- Sonicar las muestras cinco veces 5 s cada una.
- 6.- Centrifugar la muestra 10 min, 2000 rpm a 4 °C y transferir el sobrenadante a un nuevo vial. Conservar a -80 °C.

Inmunoprecipitación:

El proceso de inmunoprecipitación se lleva a cabo siguiendo el mismo procedimiento que el anteriormente indicado en el apartado 3.4

Ensayo de actividad cinasa:

- 1.- Centrifugar el inmunoprecipitado a 14000 g durante 30 s a 4 °C. El precipitado obtenido se lava en tampón de lisis dos veces, mantener en hielo.
- 2.- Lavar dos veces con el tampón de actividad cinasa 1X.
- 3.- Resuspender el precipitado en 50 µl de tampón actividad cinasa 1X, añadir una concentración de 200 µM de ATP y 1 µl de sustrato.
- 4.- Incubar durante 30 min a 30 °C al baño maría.

5.- Añadir tampón de Laemmli 4X para terminar la reacción. Mezclar bien el contenido del vial con un vórtex y finalmente centrifugar a 14000 g durante 30 s.

6.- Tomar el sobrenadante con cuidado de no arrastrar precipitado transferir a un nuevo vial, hervir la muestra a 100 °C durante 2-5 min. Conservar a -80 °C.

Finalmente cargar las muestras en geles de acrilamida-SDS y mediante Western Blot convencional inmunodetectar ATF-2 Thr71, siendo la cantidad de sustrato fosforilado proporcional a la cantidad de JNK activa en la muestra.

4. Extracción de RNA

La transcripción de toda proteína se lleva a cabo a partir del mRNA que es generado a partir de la copia y procesamiento alternativo de genes concretos. Por este motivo, la expresión de un determinado mRNA puede ser de gran interés para conocer aquellos genes implicados en un determinado proceso de respuesta celular.

Para la extracción del RNA total de las muestras se utiliza el reactivo TRIzol® (Ambion; 15596026-100ML), este permite mantener la integridad del RNA a la vez que lisa las células. Se utilizan dos placas de 100 mm de diámetro sembradas a la densidad de 700.000 cel/ml por cada punto experimental.

Protocolo

Todo el material utilizado debe estar autoclavado y libre de RNasas.

1.- Retirar el medio de cultivo de las placas de 100 mm de diámetro.

2.- Lavar con PBS para retirar los restos de medio de cultivo.

3.- Añadir 1ml de TRIzol® en una placa y rascar toda su superficie valiéndonos de un rascador (*scraper*). A continuación, transferir el TRIzol® a la siguiente placa, a la que previamente también se retiró el medio y lavó con PBS.

4.- Pasar el TRIzol® a un vial y lo dejar reposar durante 5 min a temperatura ambiente, a continuación centrifugar a 12000 g durante 7 min a 4-8 °C.

5.- Tomar el sobrenadante y transferirlo a un nuevo vial.

6.- Añadir 200 µl de cloroformo por cada mililitro de TRIzol®, agitar por inversión y dejar reposar durante 5-10 min a temperatura ambiente. Durante este tiempo se forman dos fases, una orgánica de color rosado más densa y una acuosa transparente sobre ella.

7.- Centrifugar las muestras durante 15 min a 12000 g a 4-8 °C.

8.- Tras la centrifugación se forman tres fases, la superior, la acuosa que contiene el RNA, una interfase blanquinosa donde se encuentra el DNA y finalmente la de mayor densidad de las tres, una fase orgánica (con cloroformo) donde se encuentran las proteínas. Tomar la fase acuosa evitando contaminarla con restos de la interfase de DNA y llevarla a un nuevo vial.

8.- Añadir 500 µl de isopropanol anhidro a cada vial, mezclar el contenido de los tubos por inversión y dejar reposar durante unos 10 min a temperatura ambiente.

9.- Centrifugar 10 min a 12000 g a 4-8 °C.

10.- Descartar el sobrenadante y lavar el precipitado con 1 ml de Etanol 75 %.

11.- Centrifugar las muestras durante 5 min a 7500 g a 4-8 °C.

12.- Descartar el sobrenadante y dejar evaporar totalmente los restos de etanol, puede centrifugarse unos segundos para precipitar restos de etanol que hayan podido quedar.

13.- Resuspender en 30 µl de H₂O DEPC.

14.- Colocar los viales durante 10 min a 60 °C.

15.- Una vez resuspendido determinar la concentración y pureza de las muestras mediante su análisis en el nanodroop (ND-1000). Seguir los pasos indicados por el software específico, se utilizará una $\lambda=260$ nm, teniendo en cuenta que la ratio 260/280 ha de ser próxima a 2,00 y la ratio 260/230 superior a 1,70.

La ratio de absorbancia 260/280 se emplea para conocer la pureza del DNA o RNA. Una ratio cercana a ~1.8 es considerada pura para el DNA; una ratio de ~2.0 se acepta

como pura en el caso del RNA. Si la ratio es significativamente menor en ambos casos, es indicativo de contaminantes como proteínas o fenoles. En el caso de la ratio 260/230 también indica la pureza del extracto para contaminantes cuya absorción sea cercana a 230 nm como los carbohidratos.

4.1 Electroforesis de RNA en gel de agarosa

La técnica es empleada para descartar la presencia de DNA genómico contaminante en la muestra así como comprobar la integridad del RNA extraído que no puede ser determinada mediante el empleo del nanodroop.

Composición tampón TBE 1X:

Componente	Cantidad
Tris	27 g
Ácido bórico	13,75 g
EDTA 0,5M pH 8	10 ml
H ₂ O milliQ	500 ml

Protocolo

- 1.- Preparar un gel de agarosa (Sigma; A9539-500MG) 2 % p/v. Para ello pesar 1 mg de agarosa en 50 ml de TBE 1X, calentar la mezcla valiéndonos de una placa calefactora y manteniéndola en agitación constante, retirarla de la placa y añadir 2 µl de Red safe® y homogeneizar.
- 2.- Verter la mezcla en el molde previamente preparado, añadir el peine para formar los pocillos y dejar solidificar.
- 3.- Una vez sólido, retirar las cintas del molde colocar el gel en la cubeta de electroforesis, añadir TBE 1X hasta cubrir totalmente el gel y llenar los pocillos. Teniendo en cuenta que el RNA migrará desde los pocillos hacia el ánodo.

4.- Ajustar el volumen de muestra de RNA necesario para cargar 1µg de RNA en cada pozo, añadir 2 µl de tampón de carga 6X y completar con H₂O DEPC autoclavada hasta un volumen final de 12 µl.

5.- Cargar un volumen de 10 µl de cada muestra con su tampón de carga.

6.- Comenzar la electroforesis de las muestras a 90 V constante a temperatura ambiente.

7.- Una vez separadas las muestras en el gel, se coloca en la bandeja del transiluminador, y mediante luz ultravioleta y utilizando el software específico (Bio-Imaging Systems MiniBIS Pro®) capturar una imagen representativa. Debe poderse observar únicamente la presencia de dos bandas, una más pesada correspondiente al RNA ribosomal 28S y otra más ligera que corresponde al RNA ribosomal 18S.

4.2 Retrotranscripción

Una vez purificadas las muestras y comprobada la pureza e integridad del RNA se sintetiza el DNA complementario (cDNA), esta reacción se conoce como retrotranscripción y se basa en la utilización de la retrotranscriptasa de *Termofilus aquaticus*. La reacción de la polimerasa requiere de una serie de ciclos de temperatura para permitir la unión y apertura sucesiva de las dobles hélices gracias a lo cual se copia el RNA. El paso de RNA a cDNA permite la obtención de una muestra más estable para su posterior manipulación.

Protocolo

Todo el material utilizado debe estar libre de RNasas, las muestras deben conservarse a 4 °C durante el proceso.

1.- Utilizar entre 10-20 ng de RNA para la retrotranscripción, según la expresión basal del gen y transferir a un vial para el termociclador.

2.- Añadir la cantidad de H₂O milliQ necesaria para completar el volumen hasta 10 µl.

3.- Preparar una mezcla de todos los componentes necesarios para la retrotranscripción en una cantidad suficiente para añadir 10 µl a cada una de las muestras.

Composición de la mezcla para una muestra:

Componente	Volumen
Tampón de retrotranscripción	2 µl
dNTPs	0,8 µl
Cebadores (<i>primers</i>)	2 µl
Enzima	1 µl
H ₂ O DEPC	4,8 µl
Volumen total	10,6 µl

4.- Añadir 10 µl de la mezcla a cada uno de los viales.

5.- Colocar las muestras en el termociclador e iniciar el programa específico.

Protocolo termociclador

Desnaturalización: 95 °C durante 5 min, su función es desnaturalizar el DNA que se quiere amplificar.

30 ciclos 94 °C.....30 min

50 °C.....1 min

72 °C.....3 min

Hibridación: 50 °C, su función es alcanzar la temperatura óptima de apareamiento entre los *primers* y la cadena de cDNA.

Extensión: 72 °C, su función es conseguir la temperatura óptima para la activación de *Taq* polimerasa.

4 °C al finalizar la reacción

Una vez obtenido el cDNA tomar cada una de las muestras y hacer una dilución 1:200, en caso de partir de 2 µg de RNA, en el supuesto de partir desde 1 µg de RNA tan solo será necesaria una dilución 1:100 en H₂O DEPC. Congelar las muestras a -80 °C.

4.3 PCR *real time*

Una vez las muestras han sido convertidas en cDNA más estable, podemos llevar a cabo la valoración cuantitativa de la expresión de un gen en concreto mediante la técnica de PCR en tiempo real. Esta técnica se basa en la repetición de ciclos de amplificación de la muestra a partir de una cantidad conocida de cDNA, lo que permite valorar los cambios de expresión de nuestro gen problema. Para la detección de la amplificación se pueden emplear distintos métodos como el caso de la utilización de sondas marcadas (TaqMan®) o bien mediante el empleo de compuestos fluorogénicos como el SYBR Green®. Este compuesto se une al DNA de doble cadena tiene una longitud de onda de absorción de 494 nm y emite fluorescencia a 521 nm, el proceso de amplificación de un gen concreto mediante el empleo de cebadores específicos produce un incremento de la cantidad de fluorescencia con cada ciclo de amplificación lo cual es detectado mediante sensores y queda registrado como una curva de fluorescencia cuya magnitud en cada uno de los ciclos depende del número de copias teóricas existentes de un determinado gen en la muestra inicial.

Protocolo

Partir de las diluciones obtenidas a partir de la retrotranscripción con una concentración de 10 ng/µl.

1.- Preparar una solución madre 100 mM de cebadores específicos para el gen que se desea amplificar, tanto para el *forward* como el *reverse*.

1.1.- A continuación hacer una mezcla de los cebadores *forward* y *reverse* a 100 mM. Debe repetirse esta operación para el gen control interno.

2.- Preparar para cada muestra la mezcla:

Componente	Volumen
SYBR Green®	10 µl
Cebadores (F+R) 100mM	0,4 µl
H ₂ O milliQ autoclavada	5,6 µl

3.- Añadir 4 µl de muestra con una concentración teórica de 10 ng/µl de cDNA en un pozo de la placa para PCR *real time*, hacer triplicados técnicos para cada una de las muestras. Este paso debe obviarse en los controles internos de la placa, sustituyéndose la muestra por 4 µl de H₂O milliQ autoclavada.

4.- Añadir a cada uno de los pozos la mezcla con el resto de los componentes.

4.1.- Repetir la operación para los pozos que contengan el gen control, debe establecerse un número igual de replicados técnicos para el gen control que para el gen problema.

5.- Colocar el film protector para cerrar la placa de PCR *real time*.

6.- Centrifugar con una centrífuga de placas (Selecta Meditronic) a 1600 rpm durante 2 min.

7.- Colocar la placa según especificaciones en el aparato de lectura Applied Biosystems, StepOnePlus® seleccionar el protocolo dentro del software específico StepOne Software® v2.2.2.

Resultados

“La ciencia es respecto del alma lo que es la luz respecto de los ojos, y si las raíces son amargas,
los frutos son muy dulces.”

Diógenes Laercio; Vida de los filósofos ilustres, Aristóteles

Publicación 1

Study of the pathways involved in apoptosis induced by PI3K inhibition in cerebellar granule neurons

Aurelio Vázquez de la Torre, Félix Junyent, Jaume Folch, Carme Pelegrí, Jordi Vilaplana, Carme Auladell, Carlos Beas-Zarate, Mercè Pallàs, Antoni Camins, Ester Verdaguer.
Neurochemistry international 59 (2011) 159-167

Resumen

La utilización de un modelo de apoptosis inducida por la inhibición de la vía de la PI3K/AKT mediante LY294002, un inhibidor farmacológico de la PI3K, produce una muerte por apoptosis dependiente de caspasas e independiente de calpaínas en células granulares de cerebelo (CGC), como muestra el hecho de que un inhibidor de calpaínas no es capaz de revertir la apoptosis inducida por LY294002 pero si lo hace un inhibidor de caspasas como el Z-VAD-fmk, además el estudio del fraccionamiento de p35 o de α -espectrina por parte de las calpaínas confirma esta hipótesis.

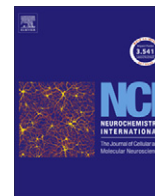
La comparación de este modelo con otros modelos de apoptosis mejor caracterizados para estas células como son la privación de suero y de potasio muestran diferencias claras entre ambos ya que pese a darse una inhibición de la vía de los inosítoles fosfato y de AKT que resulta en una activación de GSK3 β en ambos modelos, existen sin embargo importantes diferencias ya que el patrón de activación de caspasas es diferente dado que la caspasa 3 tan solo se activa en el caso de la DV de S/K+, además de que en este último modelo las calpaínas sí parecen jugar un papel importante por la fragmentación de p35 y consiguiente activación de CDK5 y la degradación de α -espectrina.

Así mismo se puede establecer otra diferencia fundamental entre ambos modelos ya que si bien en la DV de S/K+ se da una activación de proteínas relacionadas con el ciclo celular como la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (Rb) un incremento de los niveles de E2F1, ciclinas y CDKs, esto no sucede en el caso de la apoptosis inducida por LY294002. Estos datos se confirman por los resultados obtenidos en el ensayo de incorporación de BrdU, que muestran una síntesis de material genético en el caso de la DV de S/K+ pero no así en el caso de LY294002.



Contents lists available at ScienceDirect

Neurochemistry International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/nci

Study of the pathways involved in apoptosis induced by PI3K inhibition in cerebellar granule neurons

Aurelio Vazquez de la Torre^a, Felix Junyent^{a,b}, Jaume Folch^b, Carme Pelegrí^c, Jordi Vilaplana^c, Carme Auladell^d, Carlos Beas-Zarate^e, Mercè Pallàs^a, Antoni Camins^{a,*}, Ester Verdaguer^d

^aUnitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Centros de Investigació Biomèdica en Red Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, Nucli Universitari de Pedralbes, 08028 Barcelona, Spain

^bUnitat de Bioquímica, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Centro de Investigació Biomèdica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Universitat Rovira i Virgili, C./St. Llorenç 21, 43201 Reus, Tarragona, Spain

^cDepartament de Fisiologia, Centro de Investigació de Biomedicina en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

^dDepartament de Biologia Cel·lular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

^eDepartamento de Biología Celular y Molecular, CUCBA, Universidad de Guadalajara and División de Neurociencias, Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Sierra Mojada 800, Col. Independencia, Guadalajara, Jalisco 44340, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 February 2011

Received in revised form 28 March 2011

Accepted 30 March 2011

Available online 6 June 2011

Keywords:

CDK5/p25

LY294002

Cell cycle

BrdU

Caspase-6

ABSTRACT

In the present study we focused in the PI3K/Akt pathway which plays a key role in neuronal survival. Here we show that inhibition of PI3K/Akt by means of LY294002 induces apoptosis via a caspase-dependent and calpain-independent pathway in cerebellar granule neurons (CGNs). This finding was confirmed using zVAD-fmk, a widely caspase inhibitor that prevents apoptosis. For this purpose, we compared two models of apoptosis in CGNs, namely inhibition of PI3K/Akt, and serum potassium deprivation (S/K deprivation). In contrast to the S/K deprivation model, caspase-3 was not activated when PI3K is inhibited. Likewise, CDK5 activation was not involved in this apoptotic process, because calpain activation is responsible for the formation of CDK5/p25 neurotoxic form. However, S/K deprivation activated calpain, as it is shown by α -spectrin breakdown, and favoured the formation of CDK5/p25. Moreover, although PI3K/Akt inhibition enhanced pRbser780 phosphorylation, no increase in the expression of cell-cycle proteins, namely: cyclin D, cyclin E, CDK2 or CDK4, was detected. Furthermore, BrdU incorporation assay did not show any increase in DNA synthesis. Likewise, PI3K/Akt inhibition increased GSK3 β activity and c-Jun phosphorylation, which implicates these two pathways in this apoptotic route. Although previous reports suggest that apoptosis induced in CGNs by LY294002 and S/K deprivation causes PI3K inhibition and increases GSK3 β activity and c-Jun phosphorylation activation, our results demonstrate substantial differences between them and point to a key role of GSK3 β in the apoptosis induced in CGNs in the two models tested.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Understanding the regulation of neuronal cell death and survival is crucial for the development of drugs for neurodegenerative disorders. In this context, it is accepted that apoptosis is the main mechanism involved in neuronal loss in diseases such as

Alzheimer's and Parkinson's (Galluzzi et al., 2009a,b; Camins et al., 2010). Thus, inhibition of the intrinsic apoptotic pathway is the object of intense research into strategies to prevent neuronal loss in neurodegenerative diseases (Ribe et al., 2008; Hisatomi et al., 2009; Galluzzi et al., 2009a,b). Key intracellular components are involved in this pathway, including mitochondria, which against apoptotic stimuli respond to a fall in membrane potential by releasing cytochrome c thus activating the caspase cascade (Galluzzi et al., 2009a,b). The release of cytochrome c is an important point in this apoptotic pathway (also called intrinsic pathway) as it constitutes the point of no return in the apoptotic cascade through the recruitment of Apaf-1 and procaspase-9 to form the apoptosome (Ribe et al., 2008). Three caspases are activated in this

Abbreviations: CGNs, cerebellar granule neurons; S/K, serum potassium deprivation; CDK, cyclin-dependent kinase; JNK, c-Jun N-terminal kinase; GSK3 β , glycogen synthase kinase 3 β ; PI3K, phosphatidylinositol-3 kinase; IGF-1, insulin-like growth factor-1.

* Corresponding author. Tel.: +34 934024531; fax: +34 934035982.

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

apoptotic route, namely caspase-9, -6 and -3, the last two being caspase effectors involved in intracellular substrate degradation leading to apoptotic cell death. While considerable effort has been devoted to the synthesis of caspase inhibitors for neuroprotection, such compounds act too late in the pathway to be effective (Camins et al., 2010; Sureda et al., 2011).

Another family of cysteine proteases involved in apoptosis and necrosis are calpains (Camins et al., 2006, 2009; Samantaray et al., 2008). These enzymes are activated in a calcium-dependent manner. Cyclin-dependent kinase 5 (CDK5) is a well characterized substrate of calpains. Given that calpains are activated in Alzheimer's disease and Parkinson's disease, CDK5 has been implicated in several neurodegenerative disorders (Camins et al., 2006, 2009, 2010). Moreover, CDK5 is involved in the regulation of apoptosis through tau phosphorylation in Alzheimer's disease and the regulation of transcription factors, such as p53 and myocyte-inducing factor 2 (Camins et al., 2006; Ikiz and Przedborski, 2008; Kim et al., 2008; Vosler et al., 2008).

In addition, the phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/Akt pathway is a critical transducer for several major survival signals in central nervous system neurons (Miller et al., 1997; Shimoke et al., 1998; Watson et al., 1998; Datta et al., 1999; Bondy and Cheng, 2004; Vasudevan and Garraway, 2010; Miyamoto et al., 2009; Tajés et al., 2009). In these cells, it has been widely demonstrated that this pathway mediates the pro-survival effects of several agents such as neurotrophins, insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-1) and vascular endothelial growth factor (Miller et al., 1997; Shimoke et al., 1998; Bondy and Cheng, 2004). In this context, the PI3K pathway is crucial in neuroprotection in cerebellar granular neurons (CGNs) (Mora et al., 1999; Subramaniam et al., 2003; Cao et al., 2007; Tajés et al., 2009; Yeste-Velasco et al., 2009a,b). For instance, lithium and IGF-1 show anti-apoptotic effects against serum potassium deprivation (S/K deprivation) by the activation of PI3K (Miller et al., 1997). Moreover, PI3K/Akt signalling is involved in the pro-survival effects of *N*-methyl-*D*-aspartate receptor stimulation in CGNs (Bondy and Cheng, 2004). Thus PI3K/Akt activation is a promising strategy to achieve neuronal protection or the prevention of cell death.

In contrast, inhibition of this prosurvival pathway, using LY294002, a reversible and highly specific inhibitor of PI3K, induces apoptosis. The mechanisms involved in the apoptotic process after inhibition of PI3K are not well understood. Previous studies using LY294002 identified two pathways in neuron apoptosis: GSK3 β activation and c-Jun N-terminal kinase (JNK) phosphorylation (Shimoke et al., 1998; Watson et al., 1998; Tajés et al., 2009).

Likewise, glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) is an important regulator of neuronal apoptosis. Pharmacological inhibition of this kinase, for example with lithium, offers protection against S/K deprivation in CGNs, HIV proteins and β -amyloid peptides (Mora et al., 1999; Subramaniam et al., 2003; Cao et al., 2007; Yeste-Velasco et al., 2007; Mendes et al., 2009; Tajés et al., 2009; Yeste-Velasco et al., 2009a,b; Hughes et al., 2010). The activity of GSK3 β is modulated mainly by survival signalling such as Akt, and its inhibition is achieved by phosphorylation at the Ser9 residue (Mora et al., 1999; O'Brien and Klein, 2009; Hughes et al., 2010).

In addition to CDK5, cyclin-dependent kinases associated with cyclins involved in cell cycle regulation, such as CDK4/cyclin D, CDK2/cyclin E, are also involved in neuronal apoptosis (Perry et al., 1998; Zhu et al., 1999; Shimoke et al., 1999; Harris et al., 2002; Hongisto et al., 2003; Kruman et al., 2004; Verdaguer et al., 2005; Bauer and Patterson, 2005; Majd et al., 2008; Thakur et al., 2008; Lopes et al., 2009; Bonda et al., 2010). Thus, aberrant neuronal cell cycle re-entry has also been demonstrated in the brains of patients with Alzheimer's, Parkinson's and other

neurodegenerative disorders (Bauer and Patterson, 2005; Neve and McPhie, 2006; Thakur et al., 2008; Lopes et al., 2009; Bonda et al., 2010).

Here we compare the pathways involved in the apoptosis induced by PI3K/Akt inhibition and S/K deprivation. For this purpose, we used LY294002, which competes with ATP for binding to PI3K as PI3K/Akt inhibitor. Moreover, we demonstrate that although LY294002 and S/K deprivation induced GSK3 β activation, there are significant differences between these apoptotic routes.

2. Material and methods

2.1. Preparation of cell cultures

Primary cultures of cerebellar granule neurons (CGNs) from Sprague–Dawley rats and wild-type mice, and JNK3 Knockout, were prepared from postnatal day 7 rat and mice pups as described elsewhere. Cells were dissociated in the presence of trypsin and DNase I (Sigma–Aldrich) and placed in poly-*L*-lysine (100 μ g/ml)-coated dishes at a density of 5×10^5 cells/ml in basal Eagle's medium supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum, 0.1 mg/ml gentamicin, 2 mM *L*-glutamine and 25 mM KCl. Cytosine-*D*-arabino-furanoside (10 μ M) was added to the culture medium 24 h after plating to prevent the replication of non-neuronal cells. The cultures were maintained at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO₂/95% air and left undisturbed until the experiments were performed at 7–8 days. All procedures involving animals were approved by the Ethics Committee of the University of Barcelona and were conducted in accordance with national (Spanish) regulations.

2.2. Analysis of DNA fragmentation by flow cytometry

DNA fragmentation was measured by flow cytometric analysis of propidium iodide (PI)-stained cellular DNA, as described previously (Verdaguer et al., 2005; Yeste-Velasco et al., 2007). Fragmentation of DNA induced by 30 μ M LY294002 was evaluated in the presence of different concentrations of zVAD-fmk (10–100 μ M) and calpain inhibitor III (1–50 μ M). CGNs were subsequently stained with 10 μ g/ml of PI and DNA fragmentation was analysed using a Beckman Coulter Epics XL flow cytometer (argon laser, excitation wavelength 488 nm). A minimum of 5000 events were acquired in list mode while gating the forward and side scatters to exclude PI-positive cell debris, and analysed in FL-3 for the appearance of the sub-G1 peak.

2.3. Detection of condensed nuclei by microscopic cell counting

PI staining was also used to evaluate morphologic evidence of apoptosis (e.g. condensed nuclei). CGNs were treated with 30 μ M LY294002 in the presence of different concentrations of zVAD-fmk (10–100 μ M) and calpain inhibitor III (1–50 μ M). After the corresponding treatment, cells were fixed in 4% paraformaldehyde PBS solution, pH 7.4, for 15 min at room temperature. After washing in PBS, they were incubated for 3 min with a solution of PI (75 μ g/ml) in PBS. Stained cells were visualised under UV illumination using the 20 \times objective and digitalised images were captured. Apoptotic cells resulted in shrunken, brightly fluorescent nuclei showing high fluorescence.

2.4. Evaluation of DNA synthesis: BrdU labelling

We evaluated cell cycle progression by monitoring the incorporation of BrdU into cells cultured in microtiter plates. Following partial denaturation of double-stranded DNA, BrdU was detected

immunochemically. CGNs were treated with 30 μM LY294002 or subjected to S/K deprivation. After 24 h, BdrU incorporation was measured using a colorimetric-based detection kit and following the manufacturer's guidelines (Oncogene, Darmstadt, Germany).

2.5. GSK3 activity assay

Having immunoprecipitated the GSK3 β protein, we added GSK3 β inhibitor (SB415286 from SIGMA) to one tube as a GSK3 β

inhibition control. Ten microliters of 10% DMSO was added to the rest of the tubes. Briefly, the tubes were centrifuged for several seconds at 8000g. The beads were then suspended by gently tapping on the bottom of the tube. Next, 5 μl of GSK3 β peptide substrate was added to the tubes. Then we added 20 μl of the radioactive reaction mixture (125 μl of assay buffer, 75 μl of 1 \times wash buffer, 2.5 μl of γ -32P-ATP (specific activity 10 mCi/ml) to each tube and the tube contents were mixed by gentle pipetting. The tubes were then incubated for 30 min at 37 $^{\circ}\text{C}$ and the samples were mixed

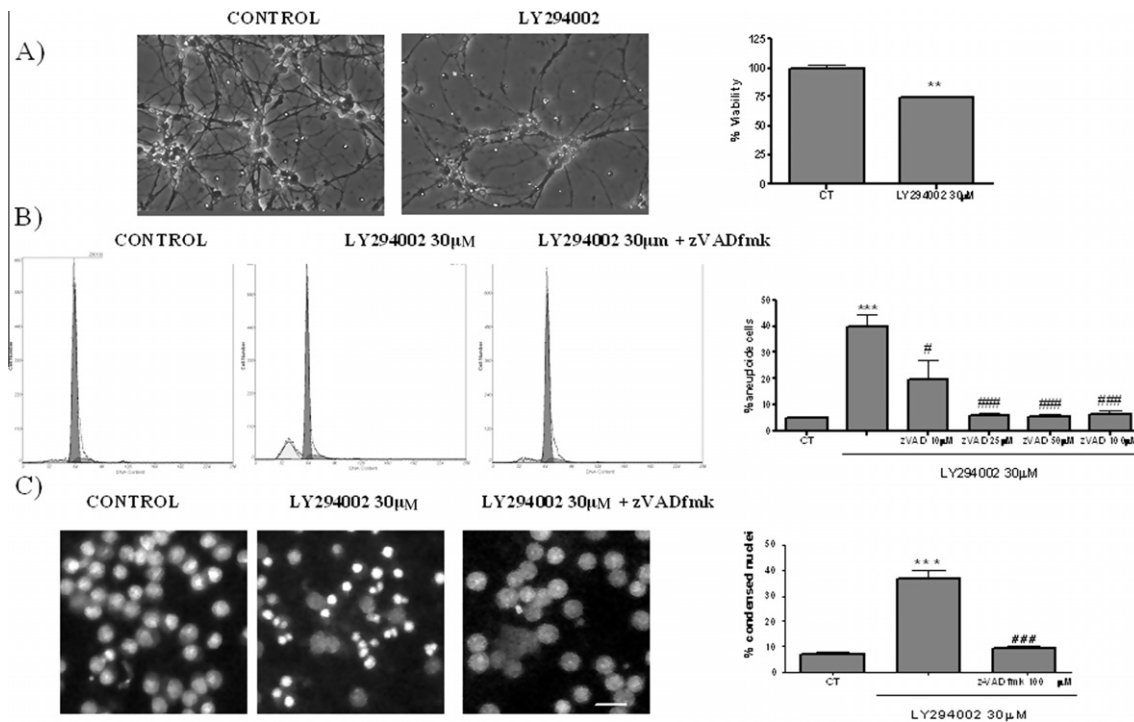


Fig. 1. (A) Representative phase contrast images of CGNs alone (control) and in the presence of 30 μM LY294002. Bar chart showing the percentage effects of LY294002-induced loss of viability measured by MTT assay. (B) Apoptotic cells were measured by flow cytometry analyses using propidium iodide staining under fluorescence illumination. ZVAD-fmk a widely caspase inhibitor completely inhibits LY294002-induced DNA fragmentation and (C) ZVAD-fmk prevented LY294002-induced CGNs nuclear condensation. The nuclei were counted on a fluorescence microscope, distinguishing normal nuclei from the condensed ones following the criteria stated in the Section 2. Columns and bars represent the means \pm S.E.M of four or five separate experiments with four or five different culture preparations ($n = 4$). Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Tukey's tests: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control. ### $p < 0.001$ vs. zVAD-fmk treatment.

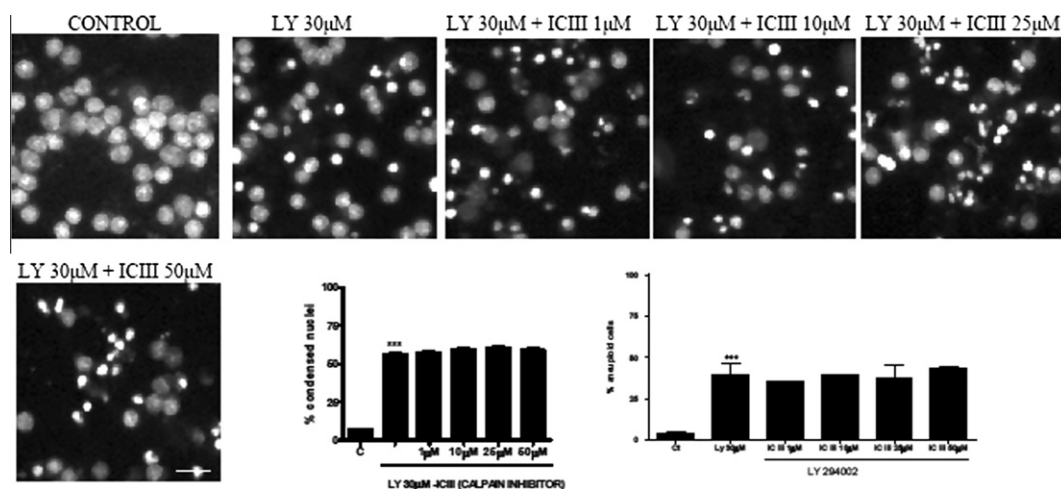


Fig. 2. Representative images of nuclei control sample, LY294002 30 μM treated and LY + calpain inhibitor ICIII (different concentrations), respectively (calibration bar, 10 μM). Bar chart showing the percentage effects of different concentrations of calpain inhibitor ICIII (1–50 μM) on LY294002-induced nuclear condensation and DNA fragmentation in CGNs exposed for 24 h. The nuclei were counted on a fluorescence microscope, distinguishing normal nuclei from the condensed ones following the criteria stated in the Section 2 and DNA fragmentation by flow cytometry. Each point is the mean \pm S.E.M. of four wells of five to six different cultures. When necessary, statistical analyses were carried out using the one-way ANOVA followed by Tukey's tests: *** $p < 0.001$ vs. control.

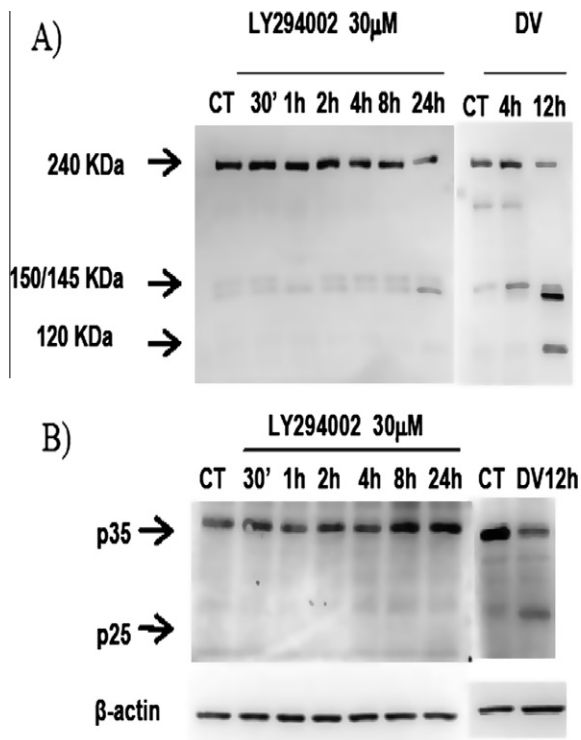


Fig. 3. LY294002 did not induce α -spectrin or p35 breakdown. (A) Immunoblot representative of α -spectrin breakdown of LY294002 30 μ M treatment from 30 min to 24 h. LY294002 did not induce the α -spectrin breakdown products of 150–145 KDa by calpain or the 150 KDa product initially by caspase-3 but it further cleaves in a 120 KDa fragment. Beside we showed a representative western blot of S/K deprivation. (B) Breakdown of p35 to p25 by calpains in CGNs treated with LY294002 or S/K deprivation. β -Actin was used as a loading control.

gently every 5 min. Briefly, the tubes were centrifuged for several seconds at 8000g. Next, 25 μ l of the upper liquid phase of the assay mixture was spotted on a P81 cellulose phosphate square, which was then allowed to air-dry. The squares were then soaked in 0.5% phosphoric acid solution and washed four times by soaking in 0.5% phosphoric acid solution. Next, they were washed once with ethanol for 1 min and with acetone for 1 min and then dried at room temperature. Finally, the squares were subjected to

autoradiography using a PMITM system #170-9400 (Personal Molecular Imaging) from Biorad, and the spots were determined by densitometry using Quantity One[®] Software.

2.6. Assay of caspase-3, -6 and -9 activity

We used colorimetric substrates Ac-DEVD-*p*-nitroaniline for the determination of caspase-3, Ac-VEID-*p*-NA for caspase-6 and Ac-LEHD-*p*-NA for caspase-9 as follows: 24 h after treatments, CGNs were collected in a lysis buffer (50 mM Hepes, 100 mM NaCl, 0.1% CHAPS, 0.1 mM EDTA, pH 7.4) and 0.05–0.1 mg/ml of protein was incubated with 200 mM of colorimetric substrate in assay buffer (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 0.1% CHAPS, 10 mM dithiothreitol, 0.1 mM EDTA, pH 7.4) in 96-well plates at 37 $^{\circ}$ C for 24 h. Absorbance of the cleaved product was measured at 405 nm in a microplate reader (BioRad). Results were expressed as a percentage of sample absorbency over control values.

2.7. Western blot analysis

Lysates of cell homogenate containing 15 μ g of protein per sample were analysed by Western blot. Briefly, samples were placed in sample buffer [0.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glycerol, 2% (*w = v*) SDS, 10% (*v = v*) 2- β -mercaptoethanol, 0.05% bromophenol blue] and denatured by boiling at 95–100 $^{\circ}$ C for 5 min. Samples were separated by electrophoresis on 10% acrylamide gels. Thereafter, proteins were transferred to polyvinylidene difluoride membrane (PVDF) (Millipore Corp., Bedford, MA) sheets using a transblot apparatus. Membranes were blocked overnight with primary monoclonal antibodies against pAKT Ser473, AKT, pGSK3 β Ser9, GSK3 β , pRbSer780 (1:500), pJNKThr182/Tyr184, JNK, pc-JunSer73 and cJun (1:1000) (Cell Signalling Technology, Denvers, MA), and total Rb cyclin D1, cyclin E, CDK4, CDK2 and β -catenin (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). β -Actin 1:20,000 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) was used as a protein loading control. After 16 h of incubation, blots were washed thoroughly in TBS-T buffer (50 mM Tris; 1.5% NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.5) and 5% BSA and incubated for 1 h with a peroxidase-conjugated IgG secondary antibody (1:2000). Immunoreactive protein was visualised using a chemiluminescence-based detection kit. Protein levels were determined by densitometry of the bands using Quantity One[®]. Measurements are expressed as arbitrary units. All results were normalized for β -actin.

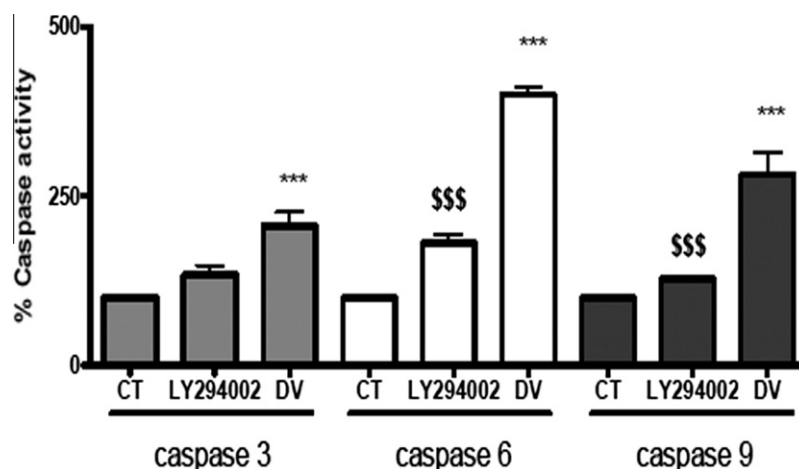


Fig. 4. Apoptosis induced by PI3K inhibition is caspase-3 independent. Bar graphs represent the percentage vs. CT of caspase-3, -6 and -9 activities after treatment with LY294002 at 30 μ M for 24 h or S/K deprivation for 12 h. Values are means \pm S.E.M. (*n* = 3). \$\$\$*p* < 0.001 LY294002 vs. CT; ****p* < 0.001 S/K deprivation vs. CT.

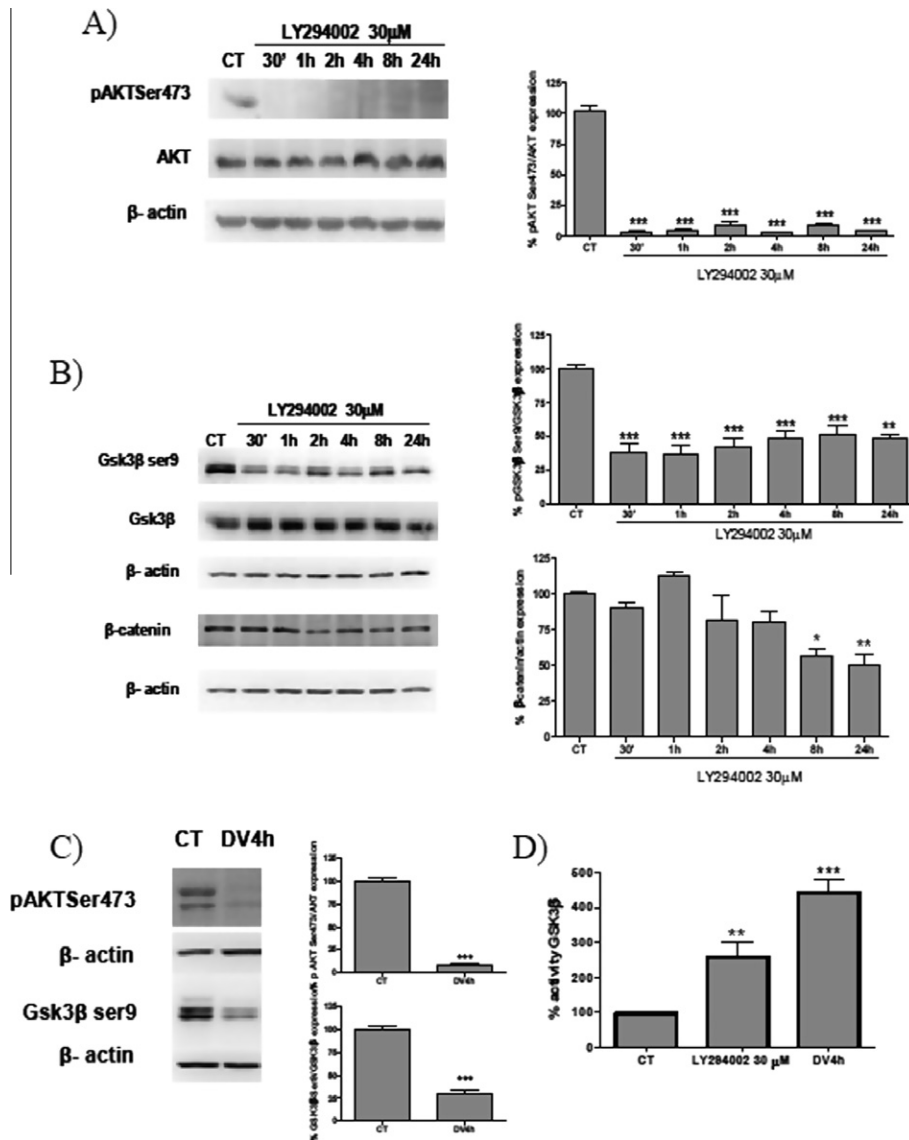


Fig. 5. Inhibition of PI3K or S/K deprivation induced AKT inhibition and GSK3 β activation. (A) Expression levels of pAKT-Ser473, AKT after LY294002 (30 μ M) time-course CGNs treatment. (B) Blots shown the expression levels of pGSK3 β -Ser9, GSK3 β and β -catenin. (C) S/K deprivation also induced AKT inhibition and GSK3 β activation as it is shown in the representative images from the immunoblots. β -Actin was detected as loading control. Immunoblots were representative from $n = 4-5$ experiments. The proteins were quantified and statistically analyzed. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. CT. (D) GSK3 β activity increases after treatment of LY294002 and S/K deprivation. Bar graphs showed a significant increase of GSK3 β activity after treating CGNs with LY294002 or S/K deprivation for 24 h or 4 h, respectively. Data represents means \pm S.E.M $n = 3$ experiments. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

2.8. Statistical analysis

Data are expressed as the mean \pm SEM of at least three experiments. In all the experiments, data were analysed using the Bonferroni post hoc test. P values lower than 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. Inhibition of PI3K by LY294002 and S/K deprivation-induced CGNs apoptosis via different pathways

Inhibition of the PI3K/Akt pathway in CGNs by LY294002 induces apoptosis (Miller et al., 1997) (Fig. 1A). However, the mechanism by which these cells die in this apoptotic model is unclear. Here we studied the implication of cysteine proteases

calpain and caspases in apoptosis. For this purpose CGNs were pretreated with calpain inhibitor III (1–50 μ M), or zVAD-fmk, a caspase inhibitor (10–100 μ M). Our results show that inhibition of caspases prevents the apoptosis induced by LY294002 in these cells while calpains are not involved in this process since they did not exert this effect (Figs. 1B, C, and 2)). In order to confirm our findings, we also used a well characterised apoptotic model in CGNs, namely S/K deprivation. We corroborated that this model induces calpain and caspase activation (Fig. 1B).

Moreover, LY294002 did not induce calpain activation, as measured by a fragmentation of α -spectrin (which measures the specific calpain band at 145 kDa, calpain and caspase activity bands at 150 kDa and a specific caspase band at 120 kDa) (Fig. 3A). Furthermore, this result is corroborated since LY294002 is not able to induce cdk5/p35 fragmentation in cdk5/p25, which is caused by calpain activation (Fig. 3B).

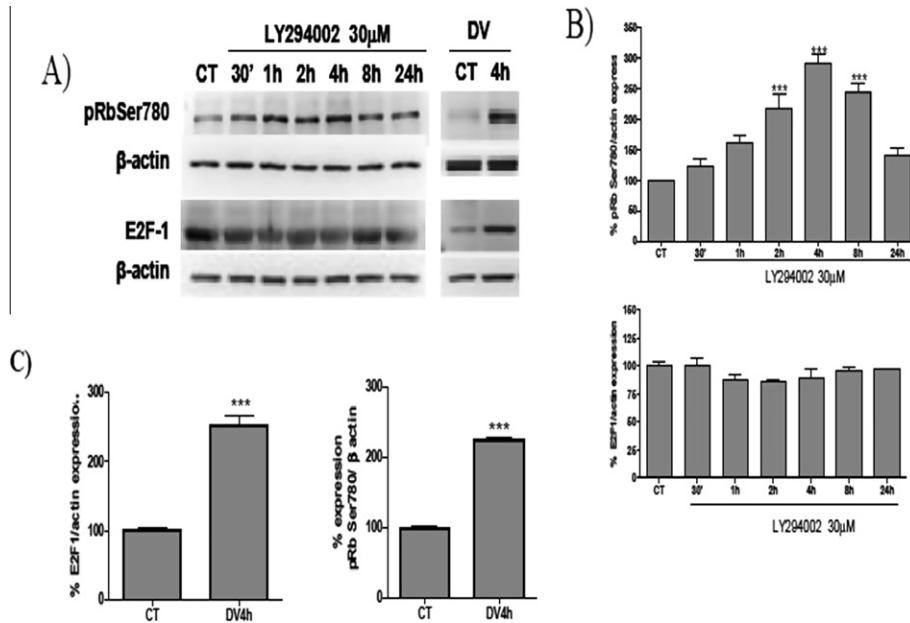


Fig. 6. Western-blot analysis of the levels of pRbSer780 and E2F-1 in CGNs. Cultures were treated with LY294002 (30 μ M) at different times from 30 min to 24 h. At the end of the treatments, cells were lysed and the cell lysates were subjected to immunoblot analysis with an antibody against pRbSer780 and E2F-1 (see Section 2). (A and B) pRbSer780 expression levels were increased significantly from 2 to 8 h after LY294002 treatment and (C) with S/K deprivation for 4 h and 12 h. Whereas expression levels of E2F-1 were also increased in S/K deprivation. Graphs represent quantitative analysis of density relative to β -actin levels (loading control) $n = 4$ independent experiments. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

3.2. Caspase-3 is not involved in LY294002-induced apoptosis in CGNs

Since zVAD-fmk prevented apoptotic neuronal death induced by LY294002, we studied the activity of caspase-3, -6 and -9 after 24 h of PI3K inhibition. A significant increase in caspase-6 and -9 was detected while levels of caspase-3 were not significantly modified. However, S/K deprivation induced a significant $p < 0.001$ increase in all these caspases, as reported in previous studies performed in our laboratory (Verdaguer et al., 2005) (Fig. 4). On the basis of these data, we hypothesised that in our experimental conditions caspase-6 is the main caspase effector involved in the apoptosis induced by PI3K inhibition.

3.3. Role of serine/threonine kinase Akt and GSK3 β in apoptosis induced by PI3K inhibition in CGNs

GSK3 is the main physiological substrate of Akt (also known as protein kinase B) and the activity of GSK3 is inhibited by Akt-mediated phosphorylation in response to trophic stimulation. In agreement with previous studies, we observed that LY294002 induced a decrease in Akt and an activation of GSK3 β , as measured by Ser9-GSK3 β dephosphorylation. Likewise, the levels of β -catenin, a downstream substrate of GSK3 β , were decreased in a time-dependent manner (30 min to 24 h) (Fig. 5). Furthermore, S/K deprivation for a range of times (2, 4, 12 h) caused a decrease in Akt phosphorylated at Ser473, and consequently a reduction in GSK3 β phosphorylated at Ser9, thereby indicating an increase in its activity (Fig. 5C). Moreover, in order to corroborate these results, we performed a GSK3 β activity assay. LY294002 and S/K deprivation treatments led to a significant increase in the activity of GSK3 β , indicating that these apoptotic two models shares this feature (Fig. 5D).

3.4. Cell cycle activation is not involved in apoptosis induced by PI3K inhibition in CGNs

The retinoblastoma protein is an additional target of GSK3 β (Yeste-Velasco, 2007; Yeste-Velasco, 2009). LY294002 significantly

increased the phosphorylation of pRb, suggesting that this compound favours apoptosis through cell cycle re-entry (Fig. 6A–C). Thus we evaluated the expression of two cyclins involved in G₀/G₁ phase, namely cyclins D and E, which are involved in retinoblastoma protein phosphorylation. Treatment of CGNs with 30 μ M LY294002 did not increase the expression of cell cycle proteins; however, an increase was detected in S/K deprivation, as demonstrated in previous studies (Verdaguer et al., 2005; Yeste-Velasco, 2007) (Fig. 6C). In addition, the levels of the proapoptotic E2F-1 did not rise. In order to confirm our hypothesis that LY294002 did not cause cell cycle entry in CGNs, we evaluated DNA synthesis using BrdU incorporation in both apoptotic models (Fig. 7A and B). Although LY294002 increased the expression of p-pRb, it did not induce DNA synthesis. In contrast, S/K deprivation significantly increased the percentage of BrdU incorporation in CGNs (Fig. 7B).

3.5. PI3K inhibition and S/K deprivation favour c-Jun activation in CGNs

The phosphorylation of c-Jun is required for the induction of apoptosis by LY294002 in CGNs (Shimoke et al., 1998). The next sets of experiments were done to corroborate the involvement of c-Jun in PI3K inhibition-induced apoptosis in these cells. Whilst LY294002 significantly induced p-c-Jun expression at 4–6 h (see Fig. 8A), no increase in JNK activation was detected. However, in agreement with previous studies, S/K deprivation increased JNK and c-Jun phosphorylation.

Moreover, we studied whether the activation of the JNK pathway is relevant in LY294002-induced apoptosis in CGNs. For this purpose, we performed several experiments in JNK3 knockout mice in order to determine the contribution of this protein in both apoptotic models. The experiments with primary cultures of CGNs from these mice showed that the JNK pathway did not participate in LY294002-induced apoptosis since CGNs were not rescued from death. However, CGNs apoptosis induced by S/K deprivation in knockout mice decreased significantly with respect to control values (Fig. 8B). All these data indicate that the JNK pathway is not essential in LY294002-induced apoptosis in CGNs.

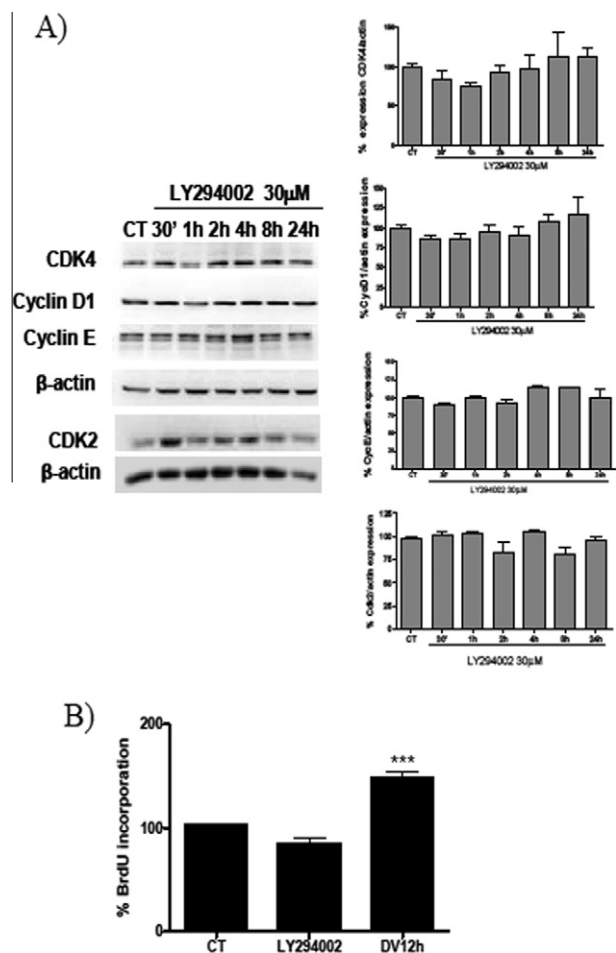


Fig. 7. Western-blot analysis of the levels of cyclin D1, cyclin E, CDK2, CDK4 in CGNs. Cultures were treated with LY294002 (30 μ M) at different times. (A) Expression of cell cycle proteins (CDK4, CycD1, CycE, CDK2) were not modified after LY294002 30 μ M treatment. Graphs represent quantitative analysis of density relative to β -actin levels (loading control) $n = 4$ independent experiments. (B) Analysis of BrdU incorporation demonstrated that LY294002 did not induce an increase in DNA synthesis as it is represented in the bar graph, meanwhile S/K deprivation for 12 h shown a significant increase in BrdU incorporation. Data represents means \pm S.E.M. ($n = 4$) independent experiments compared with untreated cells (CT). *** $p < 0.001$.

4. Discussion

Here we demonstrated that in response to PI3K inhibition in CGNs: (i) calpain activation is not involved in this apoptotic process; however, caspase activation, mainly caspase-6 plays a prominent role in CGN cell death; (ii) although the retinoblastoma protein is phosphorylated, the canonical cell cycle pathway is not activated; and (iii) c-Jun activity is increased after PI3K inhibition but it is not the main pathway involved in this model.

It has been suggested that neuronal death pathways induced in CGNs by LY294002 or S/K deprivation are indistinguishable (Miller et al., 1997). However, here we report that apoptosis by PI3K inhibition by means of LY294002 shows considerable differences to that induced by S/K deprivation.

For instance, although calpain activation has been implicated in CGNs after neurotoxic stimuli, such as potassium deprivation, excitotoxicity, β -amyloid treatment, MPP⁺ and others (Ikeuchi et al., 1998; Verdaguer et al., 2005; Lopes et al., 2009), our results show that the inhibitor of calpains, Calpain inhibitor III, did not protect CGNs from apoptosis induced by PI3K inhibition. Moreover, as we expect, treatment with LY294002 did not induce α -spectrin breakdown. Our observations suggest the involvement of calpain-

independent pathways in PI3K inhibition-induced apoptosis. Furthermore, PI3K inhibition did not induce CDK5/p25 formation while S/K deprivation favoured either breakdown of α -spectrin and CDK5/p35. However, we found another difference between the LY294002 model and S/K deprivation, namely that caspase-3 was not significantly activated in the LY294002 model. Interestingly, caspase-6 was found to be the main effector caspase implicated in PI3K-induced apoptosis, and apoptosis induced by S/K deprivation showed a dramatic increase of caspases-3, -6 and -9 (Orth, 1996; Liu et al., 1996; Allsopp et al., 2000; Jin et al., 2005; LeBlanc, 2005; Yeste-Velasco et al., 2008, 2009a,b). Caspase-6 has also been described as a main effector in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (Allsopp et al., 2000). Moreover, in some apoptotic processes caspase-6 acts upstream of caspase-3 (Orth, 1996; Liu et al., 1996; Allsopp et al., 2000). Furthermore, although previous studies point to the relevance of cell cycle re-entry in neuronal apoptosis *in vivo* and *in vitro* (Verdaguer et al., 2005; Neve and McPhie, 2006; Lopes et al., 2009; Zhang et al., 2010), PI3K inhibition did not increase the expression of classical cyclin proteins. Although we detected that LY294002 favoured the phosphorylation of the retinoblastoma protein at Ser780, no increase in E2F-1 was found. Furthermore, our results indicate that the expression of cyclins D and E are required for cell cycle re-entry in order to promote the expression and release of the transcription factor E2F-1. The retinoblastoma protein can be phosphorylated in multiples sites and not only by GSK3 β or CDK5 (Yeste-Velasco et al., 2007; Thakur et al., 2008). For example, in Alzheimer's disease and also in differentiated PC12 cells treated with 6-OHDA, pRb is phosphorylated by p38 or by the ERK pathway (Thakur et al., 2008; Zhang et al., 2009).

Moreover, BrdU incorporation assays also verify these results, showing that treatment with LY294002 did not induce an increase in BrdU incorporation, as occurs in S/K deprivation. These findings thus confirm the hypothesis that PI3K inhibition-induced apoptosis in CGNs is independent of cell cycle re-entry.

Likewise, GSK3 β is activated by LY294002 and by S/K deprivation. Previously, we and others demonstrated that inhibitors of this enzyme, such as lithium or SB415286 protect CGNs from apoptosis (Mora et al., 1999; Yeste-Velasco, 2007). Therefore, GSK3 β could be a convergent key point for these two apoptotic stimuli.

Finally, we demonstrated that c-Jun is induced by both apoptotic stimuli; however, in the case of PI3K inhibition this process was not accompanied by JNK activation. It has been described that c-Jun phosphorylation is required for apoptosis induced by PI3K inhibition; however, we show that although LY294002 caused an increase in the phosphorylation of this protein, this was not the main pathway involved in this model since primary cultures of JNK3 knockout mice were not protected from apoptosis (Bruckner et al., 2001; Borsello and Forloni, 2007; Raivich, 2008; Tian et al., 2009).

In summary, our data do not confirm the hypothesis that apoptosis induced by PI3K inhibition and S/K deprivation are indistinguishable. We demonstrate that several enzymes and routes are activated in these apoptotic paradigms (Fig. 9). To our knowledge, this is the first report where is described in detail the route by which PI3K inhibition causes apoptosis in CGNs and to point out that the JNK pathway and cell cycle re-entry do not play a key role in the apoptosis induced by PI3K inhibition in CGNs. Furthermore, GSK3 β plays a relevant role in both apoptotic stimuli, thereby indicating that GSK3 β inhibition may provide appropriate strategies for the treatment of neurodegenerative diseases.

Acknowledgments

This study was supported by Grants from the Spanish Ministry of Education and Science SAF-2009-13093, BFU2010-19119

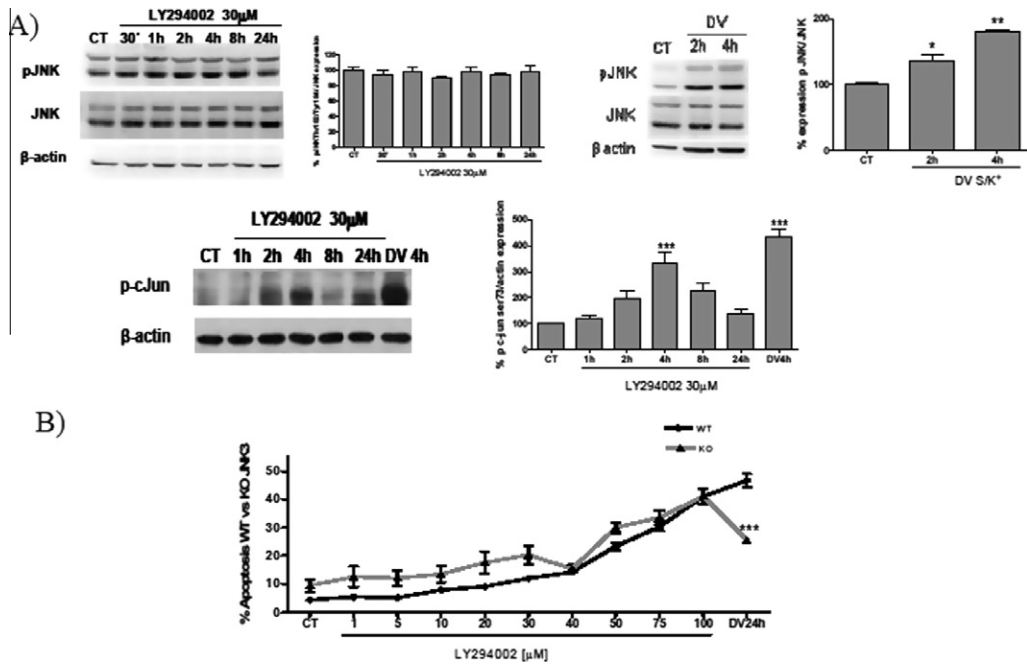


Fig. 8. Western-blot analysis of the levels of p-JNK and p-c-Jun in CGNs. Cultures were treated with LY294002 (30 μM) at different times. Inhibition of PI3K by LY294002 induced c-Jun activation. (A) Representative immunoblots of CGNs after 2 h and 24 h after LY294002 (30 μM) treatment shown a significant increase in p-c-JunSer39 as S/K deprivation. However, inhibition of PI3K did not modify the expression levels of JNK. Densitometry analysis was done from 3 to 4 independent experiments and statistically analyzed. Graphs represent quantitative analysis of density relative to β-actin levels (loading control) *n* = 4 independent experiments. **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001. (B) Graphs represent the percentage of apoptosis induced by LY294002 or S/K deprivation in WT mice vs. JNK3 knockout mice. (*n* = 3) ****p* < 0.001.

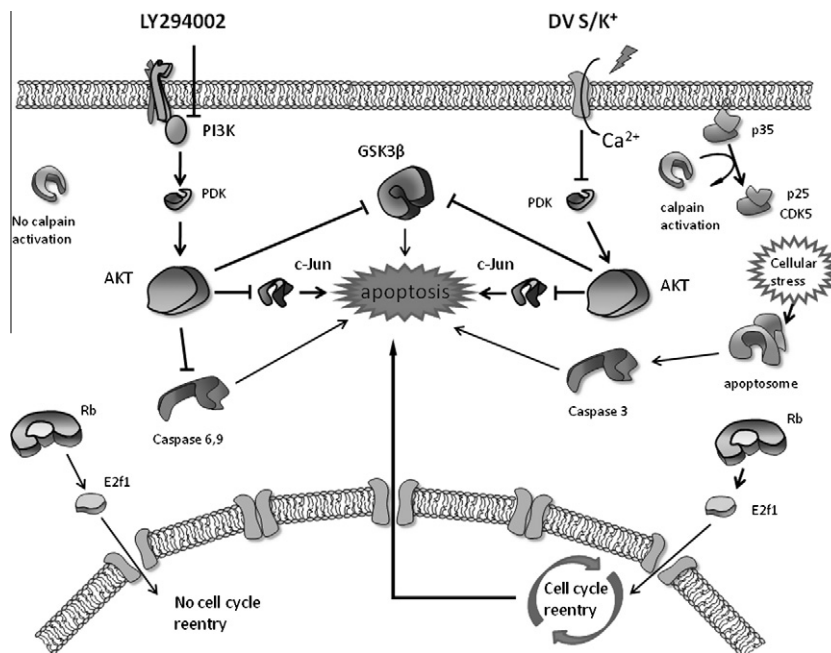


Fig. 9. Intracellular pathways involved in LY294002 or S/K deprivation-induced cell death in CGNs. Whereas in S/K deprivation there is a neuronal cell cycle re-entry, calpain activation and also an increase in CDK5, LY294002-mediated apoptosis does not result in activation of these enzymes. Moreover, both stimuli have in common the activation of GSK3 and c-Jun and the reduction in AKT activity.

and BFU2010-22149 the Fondo de Investigación Sanitaria and the Instituto de Salud Carlos III (PI080400 and PS09/01789) (FEDER FUNDS). We thank the Catalan Government (Generalitat de Catalunya) for supporting the research groups (2009/SGR00853). 610RT0405 from Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). We thank the University of Barcelona Language Services for revising the manuscript.

References

Allsopp, T.E., McLuckie, J., Kerr, L.E., Macleod, M., Sharkey, J., Kelly, J.S., 2000. Caspase 6 activity initiates caspase 3 activation in cerebellar granule cell apoptosis. *Cell Death Differ.* 7, 984–993.
 Bauer, S., Patterson, P.H., 2005. The cell cycle-apoptosis connection revisited in the adult brain. *J. Cell Biol.* 171, 641–650.
 Bonda, D.J., Lee, H.P., Kudo, W., Zhu, X., Smith, M.A., Lee, H.G., 2010. Pathological implications of cell cycle re-entry in Alzheimer disease. *Expert Rev. Mol. Med.* 12, e19.

- Bondy, C.A., Cheng, C.M., 2004. Signaling by insulin-like growth factor 1 in brain. *Eur. J. Pharmacol.* 490, 25–31.
- Borsello, T., Forloni, G., 2007. JNK signalling: a possible target to prevent neurodegeneration. *Curr. Pharm. Des.* 13, 1875–1886.
- Bruckner, S.R., Tammariello, S.P., Kuan, C.Y., Flavell, R.A., Rakic, P., Estus, S., 2001. JNK3 contributes to c-Jun activation and apoptosis but not oxidative stress in nerve growth factor-deprived sympathetic neurons. *J. Neurochem.* 78, 298–303.
- Camins, A., Verdaguer, E., Folch, J., Canudas, A.M., Pallàs, M., 2006. The role of CDK5/P25 formation/inhibition in neurodegeneration. *Drug News Perspect.* 19, 453–460.
- Camins, A., Crespo-Biel, N., Junyent, F., Verdaguer, E., Canudas, A.M., Pallàs, M., 2009. Calpains as a target for therapy of neurodegenerative diseases: putative role of lithium. *Curr. Drug Metab.* 10, 433–447.
- Camins, A., Sureda, F.X., Junyent, F., Verdaguer, E., Folch, J., Beas-Zarate, C., Pallàs, M., 2010. An overview of investigational antiapoptotic drugs with potential application for the treatment of neurodegenerative disorders. *Expert Opin. Invest. Drugs.* 19, 587–604.
- Cao, L., Cao, D.X., Su, X.W., Chen, L.J., Liu, A.L., Jian, W.J., Wu, Y.P., Qiu, P.X., Yan, G.M., 2007. Activation of PI3-K/Akt pathway for thermal preconditioning to protect cultured cerebellar granule neurons against low potassium-induced apoptosis. *Acta Pharmacol. Sin.* 28, 173–179.
- Datta, S.R., Brunet, A., Greenberg, M.E., 1999. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* 13, 2905–2927.
- Galluzzi, L., Blomgren, K., Kroemer, G., 2009a. Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 481–494.
- Galluzzi, L., Morselli, E., Kepp, O., Kroemer, G., 2009b. Targeting post-mitochondrial effectors of apoptosis for neuroprotection. *Biochim. Biophys. Acta* 1787, 402–413.
- Harris, C., Maroney, A.C., Johnson Jr, E.M., 2002. Identification of JNK-dependent and-independent components of cerebellar granule neuron apoptosis. *J. Neurochem.* 83, 992–1001.
- Hisatomi, T., Ishibashi, T., Miller, J.W., Kroemer, G., 2009. Pharmacological inhibition of mitochondrial membrane permeabilization for neuroprotection. *Exp. Neurol.* 218, 347–352.
- Hongisto, V., Smeds, N., Brecht, S., Herdegen, T., Courtney, M.J., Coffey, E.T., 2003. Lithium blocks the c-Jun stress response and protects neurons via its action on glycogen synthase kinase 3. *Mol. Cell. Biol.* 23, 6027–6036.
- Hughes, J.P., Ward, D.R., Facci, L., Richardson, J.C., Skaper, S.D., 2010. Apoptosis-associated tyrosine kinase and neuronal cell death. *Neurochem. Res.* 35, 588–597.
- Ikeuchi, T., Shimoke, K., Kubo, T., Yamada, M., Hatanaka, H., 1998. Apoptosis-inducing and-preventing signal transduction pathways in cultured cerebellar granule neurons. *Hum. Cell* 11, 125–140.
- Ikiz, B., Przedborski, S., 2008. A sequel to the tale of p25/Cdk5 in neurodegeneration. *Neuron* 60 (5), 731–732.
- Jin, N., Kovács, A.D., Sui, Z., Dewhurst, S., Maggirwar, S.B., 2005. Opposite effects of lithium and valproic acid on trophic factor deprivation-induced glycogen synthase kinase-3 activation, c-Jun expression and neuronal cell death. *Neuropharmacology* 48, 576–583.
- Kim, D., Frank, C.L., Dobbin, M.M., Tsunemoto, R.K., Tu, W., Peng, P.L., Guan, J.S., Lee, B.H., Moy, L.Y., Giusti, P., Broddie, N., Mazitschek, R., Delalle, I., Haggarty, S.J., Neve, R.L., Lu, Y., Tsai, L.H., 2008. Deregulation of HDAC1 by p25/Cdk5 in neurotoxicity. *Neuron* 60, 803–817.
- Kruman, I.I., Wersto, R.P., Cardozo-Pelaez, F., Smilenov, L., Chan, S.L., Chrest, F.J., Emokpaie Jr, R., Gorospe, M., Mattson, M.P., 2004. Cell cycle activation linked to neuronal cell death initiated by DNA damage. *Neuron* 41, 549–561.
- LeBlanc, A.C., 2005. The role of apoptotic pathways in Alzheimer's disease neurodegeneration and cell death. *Curr. Alzheimer Res.* 2, 389–402.
- Liu, X., Kim, C.N., Pohl, J., Wang, X., 1996. Purification and characterization of an interleukin-1b-converting enzyme family protease that activates cysteine protease P32 (CPP32). *J. Biol. Chem.* 271, 13371–13376.
- Lopes, J.P., Oliveira, C.R., Agostinho, P., 2009. Cdk5 acts as a mediator of neuronal cell cycle re-entry triggered by amyloid-beta and prion peptides. *Cell Cycle* 8, 97–104.
- Majd, S., Zarifkar, A., Rastegar, K., Takhshid, M.A., 2008. Different fibrillar Abeta 1–42 concentrations induce adult hippocampal neurons to reenter various phases of the cell cycle. *Brain Res.* 1218, 224–229.
- Mendes, C.T., Murry, F.B., de Sá Moreira, E., Alberto, F.L., Forlenza, O.V., Dias-Neto, E., Gattaz, W.F., 2009. Lithium reduces Gsk3b mRNA levels: implications for Alzheimer Disease. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 259, 16–22.
- Miller, T.M., Tansey, M.G., Johnson Jr, E.M., Creedon, D.J., 1997. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity blocks depolarization- and insulin-like growth factor I-mediated survival of cerebellar granule cells. *J. Biol. Chem.* 272, 9847–9853.
- Miyamoto, S., Murphy, A.N., Brown, J.H., 2009. Akt mediated mitochondrial protection in the heart: metabolic and survival pathways to the rescue. *J. Bioenerg. Biomembr.* 41, 169–180.
- Mora, A., González-Polo, R.A., Fuentes, J.M., Soler, G., Centeno, F., 1999. Different mechanisms of protection against apoptosis by valproate and Li⁺. *Eur. J. Biochem.* 266, 886–891.
- Neve, R.L., McPhie, D.L., 2006. The cell cycle as a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Pharmacol. Ther.* 111, 99–113.
- O'Brien, W.T., Klein, P.S., 2009. Validating GSK3 as an in vivo target of lithium action. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 1133–1138.
- Orth, K., O'Rourke, K., Salvesen, G.S., Dixit, V.M., 1996. Molecular ordering of apoptotic mammalian CED-3/ICE-like proteases. *J. Biol. Chem.* 271, 20977–20980.
- Perry, G., Nunomura, A., Smith, M.A., 1998. A suicide note from Alzheimer disease neurons? *Nat. Med.* 4, 897–898.
- Raivich, G., 2008. C-Jun expression, activation and function in neural cell death, inflammation and repair. *J. Neurochem.* 107, 898–906.
- Ribe, E.M., Serrano-Saiz, E., Akpan, N., Troy, C.M., 2008. Mechanisms of neuronal death in disease: defining the models and the players. *Biochem. J.* 415, 165–182.
- Samantaray, S., Ray, S.K., Banik, N.L., 2008. Calpain as a potential therapeutic target in Parkinson's disease. *CNS Neurol. Disord.: Drug Targets* 7, 305–312.
- Shimoke, K., Yamagishi, S., Yamada, M., Ikeuchi, T., Hatanaka, H., 1998. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity elevates c-Jun N-terminal kinase activity in apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *Dev. Brain Res.* 112, 245–253.
- Shimoke, K., Yamagishi, S., Yamada, M., Ikeuchi, T., Hatanaka, H., 1999. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity elevates c-Jun N-terminal kinase activity in apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 112, 245–253.
- Subramaniam, S., Strelau, J., Unsicker, K., 2003. Growth differentiation factor-15 prevents low potassium-induced cell death of cerebellar granule neurons by differential regulation of Akt and ERK pathways. *J. Biol. Chem.* 278, 8904–8912.
- Sureda, F.X., Junyent, F., Verdaguer, E., Auladell, C., Pelegri, C., Vilaplana, J., Folch, J., Canudas, A.M., Zarate, C.B., Pallàs, M., Camins, A., 2011. Antiapoptotic drugs: a therapeutic strategy for the prevention of neurodegenerative diseases. *Curr. Pharm. Des.* 17, 230–245.
- Tajes, M., Yeste-Velasco, M., Zhu, X., Chou, S.P., Smith, M.A., Pallàs, M., Camins, A., Casadesús, G., 2009. Activation of Akt by lithium: pro-survival pathways in aging. *Mech. Ageing Dev.* 130, 253–261.
- Thakur, A., Siedlak, S.L., James, S.L., Bonda, D.J., Rao, A., Webber, K.M., Camins, A., Pallàs, M., Casadesús, G., Lee, H.G., Bowser, R., Raina, A.K., Perry, G., Smith, M.A., Zhu, X., 2008. Retinoblastoma protein phosphorylation at multiple sites is associated with neurofibrillary pathology in Alzheimer disease. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 1, 134–146.
- Tian, B., Yang, Q., Mao, Z., 2009. Phosphorylation of ATM by Cdk5 mediates DNA damage signalling and regulates neuronal death. *Nat. Cell Biol.* 11, 211–218.
- Vasudevan, K.M., Garraway, L.A., 2010. AKT signaling in physiology and disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 347, 105–133.
- Verdaguer, E., Jordà, E.G., Alvira, D., Jiménez, A., Canudas, A.M., Folch, J., Rimbau, V., Pallàs, M., Camins, A., 2005. Inhibition of multiple pathways accounts for the antiapoptotic effects of flavopiridol on potassium withdrawal-induced apoptosis in neurons. *J. Mol. Neurosci.* 26, 71–84.
- Vosler, P.S., Brennan, C.S., Chen, J., 2008. Calpain-mediated signaling mechanisms in neuronal injury and neurodegeneration. *Mol. Neurobiol.* 38, 78–100.
- Watson, A., Eilers, A., Lallemand, D., Kyriakis, J., Rubin Lee, L., Ham, J., 1998. Phosphorylation of c-Jun is necessary for apoptosis induced by survival signal withdrawal in cerebellar granule neurons. *J. Neurosci.* 18, 751–762.
- Yeste-Velasco, M., Folch, J., Trullàs, R., Abad, M.A., Enguita, M., Pallàs, M., Camins, A., 2007. Glycogen synthase kinase-3 is involved in the regulation of the cell cycle in cerebellar granule cells. *Neuropharmacology* 53, 295–307.
- Yeste-Velasco, M., Folch, J., Jiménez, A., Rimbau, V., Pallàs, M., Camins, A., 2008. GSK-3 beta inhibition and prevention of mitochondrial apoptosis inducing factor release are not involved in the antioxidant properties of SB-415286. *Eur. J. Pharmacol.* 588, 239–243.
- Yeste-Velasco, M., Folch, J., Casadesús, G., Smith, M.A., Pallàs, M., Camins, A., 2009a. Neuroprotection by c-Jun NH2-terminal kinase inhibitor SP600125 against potassium deprivation-induced apoptosis involves the Akt pathway and inhibition of cell cycle reentry. *Neuroscience* 159, 1135–1147.
- Yeste-Velasco, M., Folch, J., Pallàs, M., Camins, A., 2009b. The p38(MAPK) signaling pathway regulates neuronal apoptosis through the phosphorylation of the retinoblastoma protein. *Neurochem. Int.* 54, 99–105.
- Zhang, Z., Wang, T., Cao, X., Sun, S., Wang, L., 2009. 6-OHDA induces cycle reentry and apoptosis of PC12 cells through activation of ERK1/2 signaling pathway. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci.* 29, 97–100.
- Zhang, Z., Cao, X., Xiong, N., Wang, H., Huang, J., Sun, S., Liang, Z., Wang, T., 2010. DNA polymerase-beta is required for 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced apoptotic death in neurons. *Apoptosis* 15, 105–115.
- Zhu, X., Raina, A.K., Smith, M.A., 1999. Cell cycle events in neurons. Proliferation or death? *Am. J. Pathol.* 155, 327–329.

Publicación 2

GSK3 β inhibition is involved in the neuroprotective effects of cyclin-dependent kinase inhibitors in neurons

Aurelio Vázquez de la Torre, Félix Junyent, Jaume Folch, Carme Pelegrí, Jordi Vilaplana, Carme Auladell, Carlos Beas-Zarate, Mercè Pallàs, Ester Verdaguer, Antoni Camins.
Pharmacological Research 65 (2012) 66-73

Resumen

Roscovitina y Flavopiridol son dos fármacos catalogados como inhibidores de CDKs, en el caso de la Roscovitina esta es capaz de inhibir las CDK1, 2, 5 y 9. Mientras que Flavopiridol es un potente inhibidor de todas las CDKs. Ambos fármacos han sido empleados como fármacos anticancerosos, sin embargo ha sido descrito que también son capaces de prevenir la apoptosis en números modelos de apoptosis *in vitro*, incluida la toxicidad por β amiloide, privación S/K+ en CGC o modelos donde se de una activación de CDK5 la cual ha podido ser relacionada con la fosforilación de la proteína Tau.

Sin embargo en otros modelos apoptóticos donde ni las CDKs ni otras proteínas relacionadas con el ciclo celular parecen implicadas estos fármacos muestran un efecto neuroprotector, tal es el caso de la apoptosis inducida por la inhibición de la PI3K en CGC. En este modelo, el tratamiento de las CGC con un inhibidor de la PI3K como el LY294002 no induce una expresión de las proteínas del ciclo celular y, sin embargo, ambos inhibidores de CDKs muestran una protección semejante a la que se obtiene mediante la inhibición de GSK3 β .

Nuestros resultados muestran que no solo Flavopiridol sino también otros inhibidores de CDKs como la Roscovitina pueden inhibir GSK3 β , los resultados obtenidos hacen que cobre un especial interés el desarrollo de fármacos capaces de inhibir la expresión de proteínas del ciclo celular, así como la inhibición de GSK3 β que podrían constituir una herramienta útil en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas.



GSK3 β inhibition is involved in the neuroprotective effects of cyclin-dependent kinase inhibitors in neurons

Aurelio Vazquez de la Torre^a, Felix Junyent^{a,b}, Jaume Folch^b, Carme Pelegrí^c, Jordi Vilaplana^c, Carme Auladell^d, Carlos Beas-Zarate^e, Mercè Pallàs^a, Ester Verdaguer^d, Antoni Camins^{a,*}

^a Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Centros de Investigació Biomèdica en Red Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, Nucli Universitari de Pedralbes, 08028 Barcelona, Spain

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

^c Departament de Fisiologia, Centro de Investigación de Biomedicina en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

^d Departament de Biologia Cel·lular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

^e Departamento de Biología Celular y Molecular, C.U.C.B.A., Universidad de Guadalajara and División de Neurociencias, Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Sierra Mojada 800, Col. Independencia, Guadalajara, Jalisco 44340, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 July 2011

Received in revised form 11 August 2011

Accepted 12 August 2011

Keywords:

Flavopiridol

Roscovitine

GSK3 β

Cerebellar granular cells

Apoptosis

ABSTRACT

In the present study, we evaluated the effects of roscovitine (Rosco) and flavopiridol (Flavo), both of which are classified as cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors, on apoptosis induced by the inhibition of PI3K/AKT pathway in cerebellar granule neurons (CGNs).

Our results demonstrate that both CDK inhibitors prevented apoptosis induced by LY294002 (LY), as also occurs with SB415286 (SB4), a selective GSK3 β inhibitor. Our findings also indicate that these CDK inhibitors inhibit GSK3 β , representing a potential pharmacological mechanism involved in their neuroprotective properties. Thus, the increased activity of GSK3 β induced by LY294002 and detected by dephosphorylation at Ser9 was prevented by both compounds. Likewise, GSK3 β activity was measured by a radioactivity assay, revealing that CDK inhibitors and SB415286 prevented the increase in GSK3 β activity induced by PI3K inhibition. In addition, we analysed c-Jun, which is also a mediator of PI3K inhibition-induced apoptosis. However, neither of the CDK inhibitors nor SB415286 prevented the increase in c-Jun phosphorylation induced by PI3K inhibition. Therefore, our data identify GSK3 β as a crucial mediator of CGN apoptosis induced by PI3K inhibition and indicate that the antiapoptotic effects of CDKs are mediated by the inhibition of this pharmacological target.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Roscovitine and flavopiridol are anti-cancer drugs that are currently in clinical trials [1–3]. The main pharmacological and biochemical mechanism proposed for their anti-tumour effects is the inhibition of cyclin-dependent kinases (CDKs), and more specifically, of CDK1, CDK2, CDK5 and CDK9 in the case of roscovitine, and flavopiridol is a pan-inhibitor of CDKs [1]. Thus, both this research team and other groups have reported that CDKs inhibitors efficiently inhibit proliferation and cell cycle progression in neuroblastoma and tumoural cells [4–6].

In addition to their anti-cancer effects, it has been reported that roscovitine and flavopiridol showed evident neuroprotective activity in neuronal cell cultures against β -amyloid, excitotoxicity,

serum and potassium deprivation and other models of neurotoxicity [6–10]. Furthermore, in vivo data confirm these neuroprotective effects, for example in ischemic models and excitotoxicity models [11–14]. In general, CDK inhibitors such as roscovitine, flavopiridol, kenpaullone and indirubin represent interesting candidate drugs for potential application in the treatment of neurodegenerative diseases [15]. There is now evidence that CDK inhibitors have neuroprotective effects, inhibiting essential targets of the apoptotic route [16,17].

Within the apoptotic cascade of events, CDK5 exerts a central role as a key regulator of neuronal death [16–20]. Thus, CDK5 hyperphosphorylates a number of substrates, such as the tau protein involved in Alzheimer's disease (AD), the p53 protein involved in neuronal apoptosis, the ataxia telangiectasia mutated protein (ATM) involved in DNA damage response and the retinoblastoma protein, hence regulating the cell cycle [19,21,22]. Likewise, CDK5 inhibition is associated with neuroprotection in cerebral ischemia, excitotoxicity [17–20]. However, CDKs appear

* Corresponding author. Tel.: +34 934024531; fax: +34 934035982.

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

to have roles beyond cell cycle regulation; for example, it has been shown that CDK5 regulates NMDA receptors, and is implicated in the process of long-term potentiation and neuroplasticity in rat hippocampus [22–24]. Moreover, roscovitine also displays pharmacological effects independent of CDK inhibition properties: it slows voltage-gated calcium currents and blocks the open state of voltage-gated potassium channels [25–27]. Furthermore, roscovitine is involved in the regulation of tonic GABA_A receptor-mediated current in rat hippocampus and interestingly, this effect is independent of CDK inhibition [28]. Likewise, flavopiridol inhibits GSK3 β [29]. Therefore, these studies collectively suggest that roscovitine and flavopiridol target other protein kinases or enzymes that also contribute to their pharmacological properties.

Recently, we reported that the antiapoptotic effects of roscovitine and flavopiridol in CGNs against serum and potassium deprivation were mediated through the inhibition of cell cycle re-entry and of CDK5 [6,9]. However, in another apoptotic model, namely PI3K inhibition, we found that the apoptotic pathways calpain/CDK5 and cell cycle were not activated [30]. Accordingly, this apoptotic stimulus constitutes a useful tool to study additional pharmacological targets involved in CDK antiapoptotic properties. Likewise, in previous studies we and others have demonstrated that LY294002-induced AKT inhibition, and thus apoptosis, was mediated mainly through GSK3 β activation [30–33]. Interestingly, the hypothesis has been proposed that GSK3 β may play a determinant role in the aetiology of AD, providing the link between β -amyloid and tau protein [32–34]. In addition, GSK3 β is involved in the cognitive deficiencies and the inflammatory process of AD. Therefore, GSK3 β is a potential target to prevent the clinical symptoms of AD and other neurodegenerative diseases [35,36].

Consequently, the two-fold aim of the present study was firstly to determine whether CDK inhibitors show neuroprotective effects in an apoptotic model independent of cell cycle activation, and secondly, to identify new pharmacological targets involved in neuroprotection.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Caspase 3, 6 and 9 activity was measured using a colorimetric assay kit obtained from BioVision (Mountain View, CA). BME and heat-inactivated foetal bovine serum (FBS) was obtained from Gibco-BRL Life Technologies (Gaithersburg, MD), and protein ladders from Bio-Rad (Berkeley, CA). The primary antibodies pAKT Ser473, AKT, pGSK3 β Ser9, GSK3 β and pc-Jun Ser73 were purchased from Cell Signalling Technology (Danvers, MA), and GAPDH from Millipore Corp. (Bedford, MA). All other chemicals were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

2.2. Preparation of cell cultures

Primary cultures of cerebellar granule neurons (CGNs) from Sprague-Dawley rats were prepared from postnatal day 7 rats as described elsewhere [37]. Briefly, cells were dissociated in the presence of trypsin and DNase I (Sigma–Aldrich) and placed in poly-L-lysine (100 μ g/mL)-coated dishes at a density of 5×10^5 cells/mL in basal Eagle's medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 0.1 mg/mL gentamicin, 2 mM L-glutamine and 25 mM KCl. Cytosine-D-arabino-furanoside (10 μ M) was added to the culture medium 24 h after plating to prevent the replication of non-neuronal cells. The cultures were maintained at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO₂/95% air for 7 days, and 24 h before the assays were performed the medium was changed to 25 mM potassium supplemented with 1% heat-inactivated foetal

bovine serum (FBS). Flavopiridol, roscovitine and SB415286 were added to the medium 1 h before LY294002 treatment, which was added to neuronal cultures for 4 or 24 h. All procedures involving animals were approved by the Ethics Committee of the University of Barcelona and were conducted in accordance with national (Spanish) regulations.

2.3. Analysis of DNA fragmentation by flow cytometry

DNA fragmentation was measured by flow cytometric analysis of propidium iodide (PI)-stained cellular DNA, as described previously [6]. CGNs were subsequently stained with PI 10 μ g/mL, and DNA fragmentation was analysed using a Beckman Coulter Epics XL flow cytometer (argon laser, excitation wavelength 488 nm). A minimum of 5000 events were acquired in list mode while gating the forward and side scatters to exclude PI-positive cell debris, and analysed in FL-3 for the appearance of the sub-G1 peak.

2.4. Detection of condensed nuclei by microscopic cell counting

PI staining was also used to evaluate morphologic evidence of apoptosis (e.g. condensed nuclei). After the corresponding treatment, cells were fixed in 4% paraformaldehyde PBS solution, pH 7.4, for 15 min at room temperature. After washing in PBS, they were incubated for 3 min with a solution of PI (75 μ g/mL) in PBS. Stained cells were visualised under UV illumination using the 20 \times objective and digitalised images were captured. Apoptotic cells appeared as shrunken, brightly fluorescent nuclei showing high fluorescence. Apoptotic cells were scored by counting at least 500 nuclei for each sample in three different experiments. The percentage of apoptotic cells was calculated as follows: total number of cells with condensed nuclei/total number of cells \times 100.

2.5. GSK3 β activity assay

Having immunoprecipitated the GSK3 β protein, we added GSK3 β inhibitor (SB415286 from SIGMA) to one tube as a GSK3 β inhibition control. 10 μ L of 10% DMSO was added to the remaining tubes. Briefly, the tubes were centrifuged for several seconds at 8000 \times g. The beads were then suspended by gently tapping on the bottom of the tube. Next, 5 μ L of GSK3 β peptide substrate was added to the tubes. Then we added 20 μ L of radioactive reaction mixture (125 μ L of assay buffer, 75 μ L of 1 \times wash buffer, 2.5 μ L of γ -32P-ATP specific activity 10 mCi/mL) to each tube, and the tube contents were mixed by gentle pipetting. The tubes were then incubated for 30 min at 37 °C and the samples were mixed gently every 5 min by centrifuging for several seconds at 8000 \times g. Next, 25 μ L of the upper liquid phase of the assay mixture was spotted on a P81 cellulose phosphate square, which was then allowed to air-dry. The squares were then soaked in 0.5% phosphoric acid solution and washed 4 times by soaking in 0.5% phosphoric acid solution. Next, they were washed once with ethanol for 1 min and with acetone for 1 min and then dried at room temperature. Finally, the squares were subjected to autoradiography using a PMITM system #170-9400 (Personal Molecular Imaging) from Bio-Rad, and the spots were determined by densitometry using Quantity One[®] Software.

2.6. Assay of caspase-3, -6 and -9 activity

We used the colorimetric substrates Ac-DEVD-p-nitroaniline for the determination of caspase-3, Ac-VEID-pNA for caspase-6 and Ac-LEHD-pNA for caspase-9 as follows: 24 h after treatments, CGNs were collected in a lysis buffer (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 0.1% CHAPS, 0.1 mM EDTA, pH 7.4) and 0.05–0.1 mg/mL of protein was incubated with 200 mM of colorimetric substrate in assay buffer (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 0.1% CHAPS, 10 mM dithiothreitol,

0.1 mM EDTA, pH 7.4) in 96-well plates at 37 °C for 24 h. Absorbance of the cleaved product was measured at 405 nm in a microplate reader (Bio-Rad). Results were expressed as a percentage of sample absorbency over control values.

2.7. Western blot analysis

Lysates of cell homogenate containing 15 µg of protein per sample were analysed by Western blot. Briefly, samples were placed in sample buffer [0.5 mM Tris–HCl pH 6.8, 10% glycerol, 2% (w=v) SDS, 10% (v=v) 2-β-mercaptoethanol, 0.05% bromophenol blue and denatured by boiling at 95–100 °C for 5 min. Samples were separated by electrophoresis on 10% acrylamide gels. Thereafter, proteins were transferred to polyvinylidene difluoride membrane (PVDF) sheets (Millipore Corp., Bedford, MA) using a transblot apparatus. Membranes were blocked overnight with primary monoclonal antibodies against pAKT Ser473, AKT, pGSK3β Ser9, GSK3β and pc-Jun Ser73 (1:1000), and GAPDH 1:5000 was used as a protein loading control. After 16 h of incubation, blots were washed thoroughly in TBS-T buffer (50 mM Tris; 1.5% NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.5) and 5% BSA and incubated for 1 h with a peroxidase-conjugated IgG secondary antibody (1:2000). Immunoreactive protein was visualised using a chemiluminescence-based detection kit (Pierce® ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific, USA). Protein levels were determined by densitometry of the bands using ImageLab®. Measurements are expressed as arbitrary units. All results were normalised for GAPDH.

2.8. Statistical analysis

Data are expressed as the mean ± S.E.M. of at least three experiments. In all the experiments, data were analysed using the Bonferroni post hoc test. *p* values lower than 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. PI3K inhibition-induced apoptosis was prevented by CDK inhibitors and SB415286

LY294002 is a reversible inhibitor of PI3-K which competes with ATP, inducing apoptosis in CGNs by a mechanism independent of CDK activation. Fig. 1 shows a representative microscopy image of CGNs treated with DMSO (control) and 30 µM LY294002. Thus, addition of AKT inhibitor to CGNs induced morphological changes characteristic of neuronal degeneration, assessed by phase-contrast microscopy (Fig. 1). Untreated neurons showed round cell bodies with a clear dendritic network; however, incubation with LY294002 (24 h, 30 µM) induced axodendritic disruption. In the presence of roscovitine (25 µM), flavopiridol (5 µM) and SB415286 (25 µM), selective GSK3β inhibitor, neuronal morphology was improved.

Since it has previously been demonstrated that GSK3β is a target activated by AKT inhibition, we evaluated the neuroprotective effects of this specific GSK3β inhibitor on LY294002-induced apoptosis. Accordingly, CGNs were treated with 30 µM LY294002 and aneuploid nuclei were examined by PI staining and measured by flow cytometry. LY294002 increased the percentage of aneuploid nuclei (apoptotic) in $7.9 \pm 0.8\%$ ($n=8$ control cells) vs. $36 \pm 1.7\%$ ($n=5$ treated cells). Our data indicates that SB415286 (10–50 µM) exerts antiapoptotic effects against AKT inhibition-induced neuronal loss as measured by flow cytometry, suggesting that inhibition of GSK3β is a potential target involved in neuroprotection in this model (Fig. 1B). When we added different concentrations of roscovitine (15–25 µM) and flavopiridol (0.1–5 µM) to CGN cell cultures, these compounds prevented LY294002-induced DNA fragmentation (Fig. 1B).

Moreover, after 30 µM LY294002 treatment, 45% of CGNs showed condensed nuclei. Likewise, CDK inhibitors significantly inhibited apoptosis measured by nuclear condensed cell counting. In the presence of roscovitine, the number of condensed nuclei decreased to 18%, and in the presence of flavopiridol, to 13% (Fig. 2A).

In previous studies, we reported that caspase-6 and -9 are the main cysteine proteases activated by PI3K inhibition after 24 h, since a significant increase in caspase-6 and -9 was detected. Thus in the present study we evaluated whether 25 µM roscovitine attenuates the intrinsic (mitochondrial) apoptotic pathway involved in apoptosis. The data obtained indicate that roscovitine significantly decreases ($*p<0.05$) the activity of both caspase-6 and -9, and inhibits the mitochondrial apoptotic pathway (Fig. 3). Experiments could not be performed with flavopiridol because the colouration of this compound interferes with readings of the activity of these enzymes.

3.2. CDK inhibitors promote phosphorylation on serine 9 and inactivation of GSK3β in cerebellar granule neurons

GSK3β is the main physiological substrate of AKT (also known as protein kinase B) and it has been well characterised that GSK3β activity is regulated by AKT-mediated phosphorylation [38]. Thus, treatment of CGNs with 30 µM LY294002 induced a decrease in AKT subsequent to activation of GSK3β, as measured by Ser9-GSK3β dephosphorylation. Furthermore, 4 h of serum and potassium deprivation in CGNs was used as a positive control for Ser9-GSK3β dephosphorylation, and indicated an increase in GSK3β (Fig. 4). We further determined which signalling pathways are involved in the antiapoptotic properties of CDK inhibitors. We found that none of the compounds evaluated, namely, roscovitine, flavopiridol and SB415286, had any effect on 30 µM LY294002-stimulated dephosphorylation of AKT (Fig. 4). Interestingly, CDK inhibitors prevented Ser9-GSK3β dephosphorylation, suggesting that GSK3β is a required target for apoptosis prevention in the AKT inhibition pathway. On the other hand, Western-blot data indicate that 25 µM SB415286 did not prevent Ser9-GSK3β dephosphorylation. However, it is well known, since this compound does not modulate or affect this residue phosphorylation.

In order to conduct an in-depth study of whether GSK3β is the target of roscovitine, an assay of GSK3β activity was performed. As shown in Fig. 5, treatment of CGNs with 30 µM LY294002 (4 h) led to a significant increase in the activity of GSK3β which was significantly ($p<0.05$) attenuated by 25 µM roscovitine, 5 µM flavopiridol and 25 µM SB415286 (positive control of GSK3β inhibition).

These data show that inhibition of GSK3β may be a pharmacological target involved in CDK inhibitor-induced protective effects in CGNs exposed to LY294002 treatment.

3.3. CDK inhibitors did not prevent c-Jun phosphorylation in cerebellar granule neurons

Previous studies have suggested that c-Jun phosphorylation is a critical step in the apoptotic pathway induced by LY294002 in CGNs [39]. Moreover, this apoptotic process is caspase-dependent and c-Jun is activated [32]. AKT pathway is selectively inhibited by treatment with the specific inhibitor LY294002. Our results demonstrate that LY294002 30 µM significantly increases c-Jun phosphorylation (Fig. 4); however, neither CDK inhibitors nor 25 µM SB-415286 attenuates c-Jun phosphorylation. In contrast, it should be noted that SP606125, a JNK inhibitor, completely blocks c-Jun expression (positive control of c-Jun inhibition).

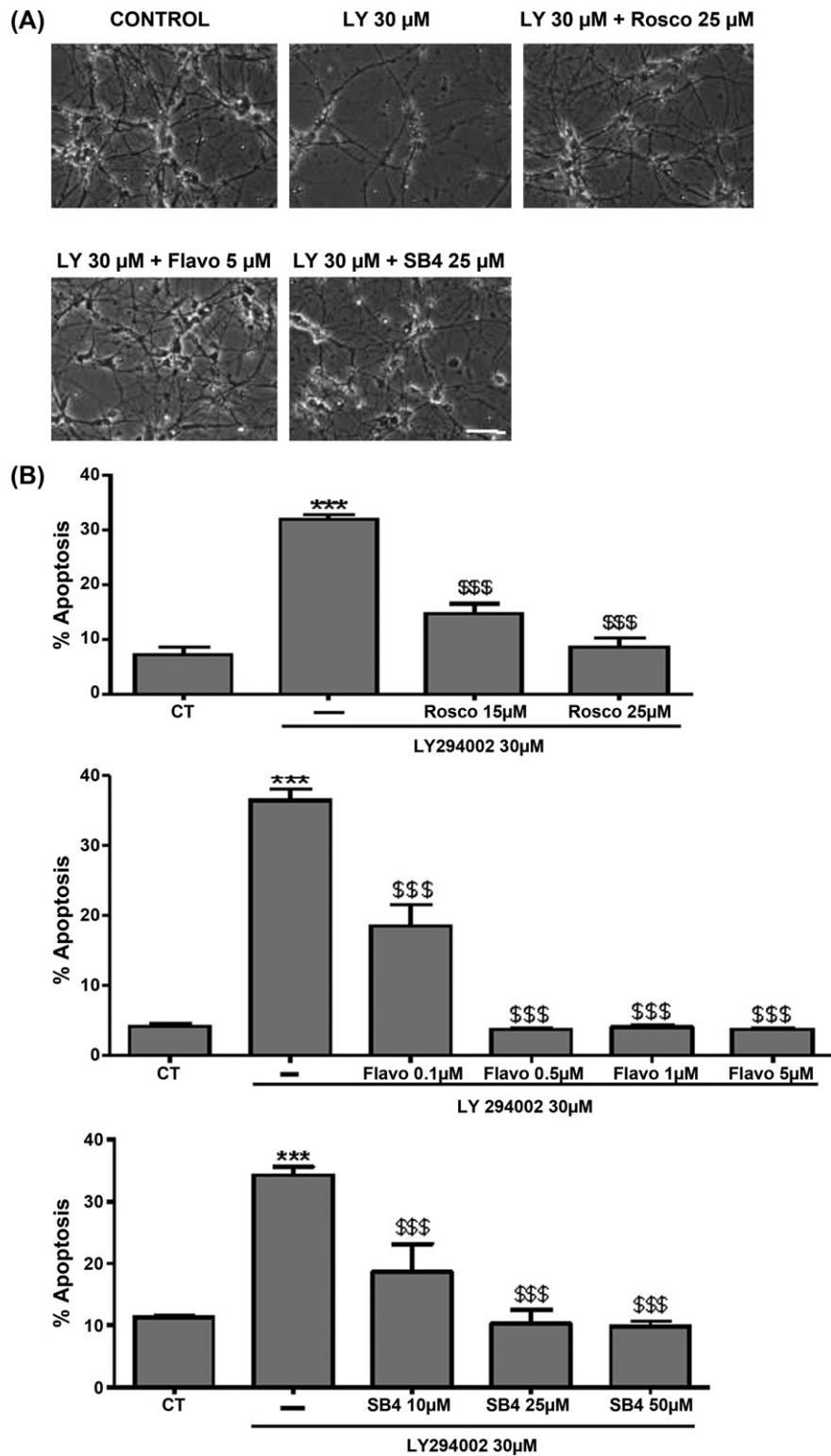


Fig. 1. (A) Representative phase contrast images of control, CGNs treated with 30 μ M LY294002 (LY 30 μ M) and CGNs treated with 30 μ M LY294002 in the presence of 25 μ M roscovitine (Rosco) or 5 μ M flavopiridol (Flavo) or 25 μ M SB-415286 (SB4) (calibration bar, 10 μ m). (B) Bar chart showing the percentage effects of LY294002-induced DNA fragmentation (apoptosis) measured by flow cytometry analyses using propidium iodide staining under fluorescence illumination columns and bars represent the means \pm S.E.M. of four or five separate experiments with four or five different culture preparations ($n=4$). Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Tukey's tests: *** $p < 0.001$ vs. CT; \$\$\$ $p < 0.001$ vs. LY294002 treatment.

4. Discussion

The present study has provided evidence that CDK inhibitors protect CGNs from PI3K inhibition-induced apoptosis through

the inhibition of GSK3 β . Thus, inhibition of GSK3 β is a relevant target in the neuroprotective effects of CDK inhibitors against LY294002-induced apoptosis in CGNs. Our assertion is based on the antiapoptotic effects of the selective GSK3 β inhibitor SB415286

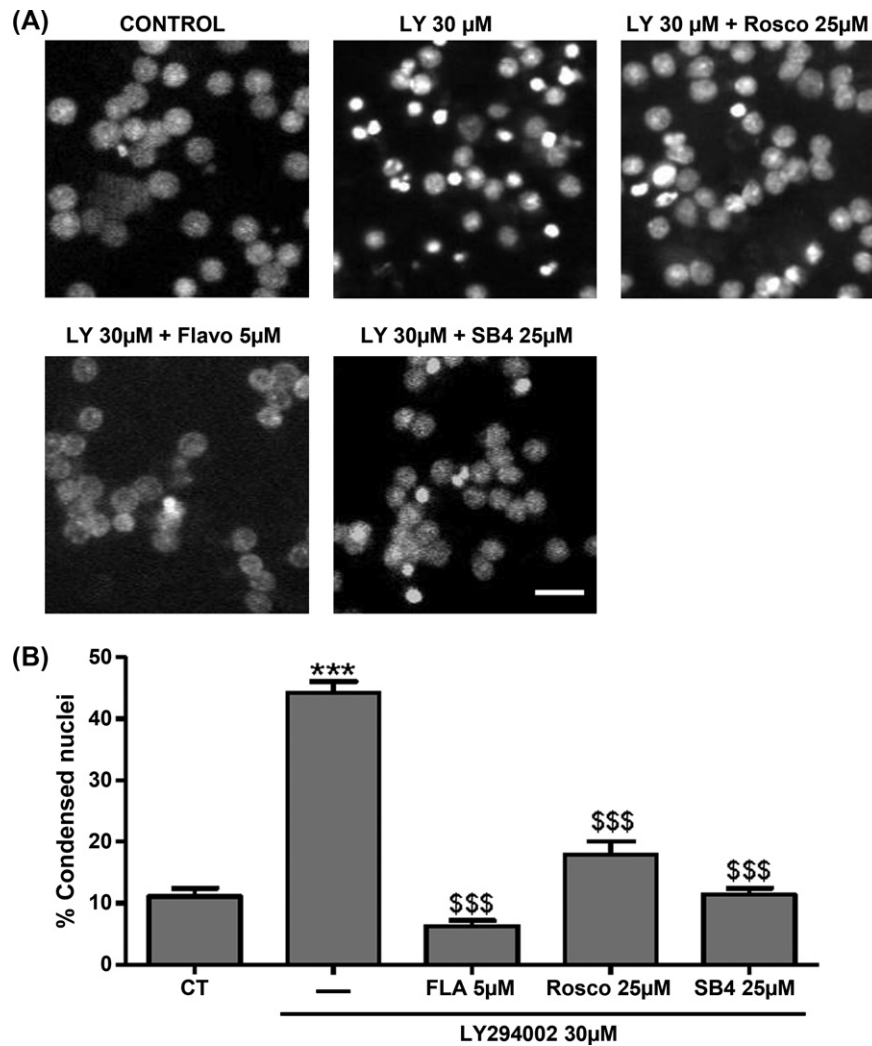


Fig. 2. (A) Representative images of nuclei control samples. The images represent control cells, 30 μM LY294002 and the inhibitors 25 μM roscovitine, 5 μM flavopiridol, and 25 μM SB-415286 respectively plus 30 μM LY294002 (calibration bar, 10 μm). (B) Bar chart showing the percentage of condensed nuclei after the treatment of 25 μM roscovitine, 5 μM flavopiridol and 25 μM SB-415286 to CGNs exposed for 24 h in the presence of 30 μM LY294002. The nuclei were counted on a fluorescence microscope, distinguishing normal nuclei from the condensed ones following the criteria stated in the material and methods. Each point is the mean \pm S.E.M. of four wells of five to six different cultures. When necessary, statistical analyses were carried out using the one-way ANOVA followed by Tukey's tests: *** p < 0.001 vs. CT; \$\$\$ p < 0.001 vs. LY294002.

observed in the present study and of lithium on LY294002-induced apoptosis in CGNs [40].

The role of GSK3 β as a key regulator of the apoptotic process in neurons is supported by a great deal of evidence [30–36]. Indeed, over-activation of this enzyme is linked to apoptotic cell death in several neuronal models [31–35]. Furthermore, different GSK3 β

targets have been reported to be directly related to the apoptotic cascade, such as the retinoblastoma protein involved in cell cycle regulation, Bax, a protein of the intrinsic apoptotic cascade in neurons and also tau phosphorylation [41–43].

It is interesting to consider and highlight the evidence we provide here that the neuroprotective effects of roscovitine and

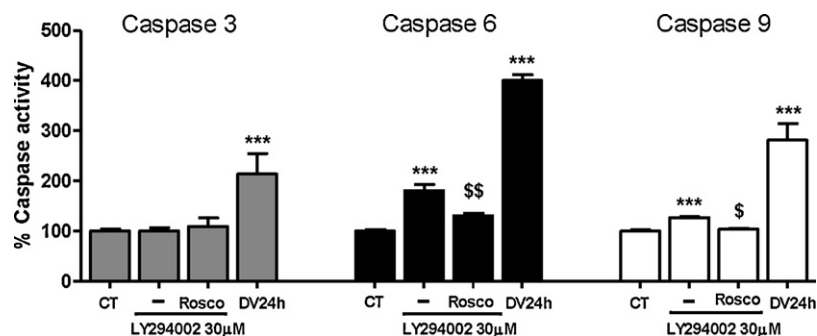


Fig. 3. Apoptosis induced by PI3K inhibition is caspase-3 independent. Bar graphs represent the percentage vs. CT of caspase 3, 6 or 9 activities after treatment with LY294002 at 30 μM alone or in the presence of roscovitine 25 μM for 24 h or DV (serum potassium deprivation) for 24 h (positive control of caspase activation). Values are means \pm S.E.M. ($n = 3$). *** p < 0.001 vs. CT; \$\$ p < 0.01 vs. LY294002; \$ p < 0.05 vs. LY294002.

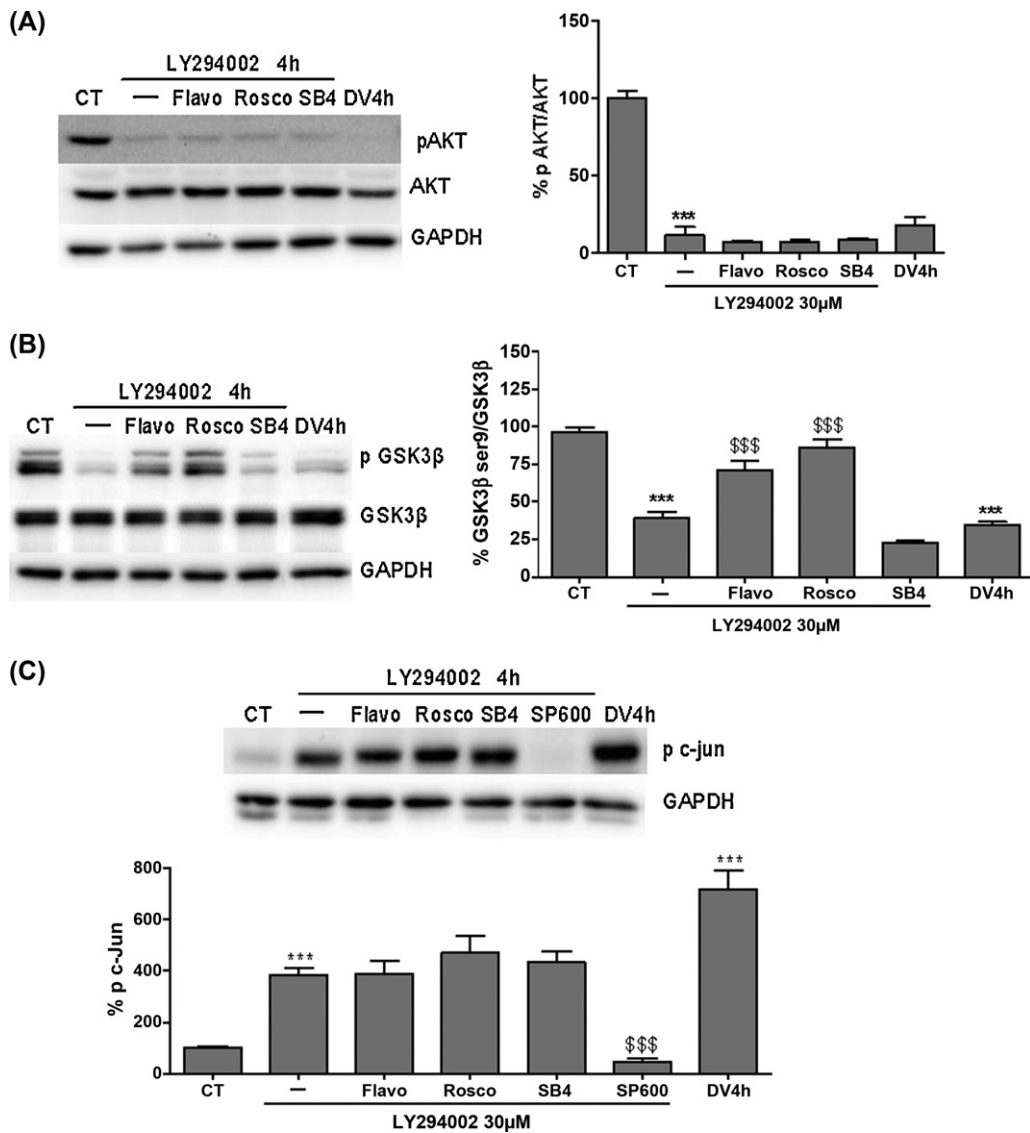


Fig. 4. The PI3K or DV (serum and potassium deprivation) mediates the inhibition of the neuroprotective AKT and the activation of pro-death GSK3β and c-jun. (A) The figure shows changes in the expression levels of pAKT-Ser473, AKT. (B) Representative image of the expression levels of pGSK3β-Ser9 and GSK3β. (C) It is shown the expression level of p-c-Jun. All experiments were carried out after LY294002 (30 μM) treatment alone for 4 h or in the presence of flavopiridol (5 μM), roscovitine (25 μM) and SB-415286 (25 μM) respectively. GAPDH was detected as loading control. Immunoblots were representative from $n=4-5$ experiments. The proteins were quantified and statistically analysed. *** $p < 0.001$ vs. CT; \$\$\$ $p < 0.001$ vs. LY294002.

flavopiridol are not mediated by either CDK5 or cell cycle inhibition [17,19,43–47]. This is an important characteristic, since in previous studies we have demonstrated that PI3K inhibition does not activate CDKs [30].

Although PI3K/AKT pathway is the main target of LY294002, the antiapoptotic effects of roscovitine and flavopiridol do not seem to affect pAKT Ser473 dephosphorylation, a marker of AKT inhibition. Thus, since roscovitine and flavopiridol prevent Ser9-GSK3β dephosphorylation and decrease GSK3β activity, we believe that the neuroprotective effects of roscovitine against PI3K inhibition in CGNs are strongly linked to GSK3β inhibition (Fig. 6). Likewise, to our knowledge, this constitutes the first report to provide evidence of this new mechanism of action of roscovitine. In addition, roscovitine inhibited LY294002-induced caspase-9 and caspase-6 activation, suggesting that GSK3β, and therefore the antiapoptotic effects of this drug, involve this caspase pathway, as we have described previously [30].

Many of the roscovitine and flavopiridol neuroprotective and antiapoptotic actions are attributed to CDK and c-Jun

inhibition [48,49]. Thus, CDK5 and cell cycle inhibition are the main targets involved in the antiapoptotic effects of roscovitine and flavopiridol in CGNs against serum and potassium deprivation [7,9]. β-Amyloid-induced cortical cell death is mediated by CDK5 activation, and roscovitine and flavopiridol protect against the neurotoxicity of this experimental Alzheimer disease model [43]. Likewise, CDK inhibitors showed strong neuroprotective effects in ischemic models in rat through CDK5 inhibition [13]. Indeed, roscovitine prevented degeneration of dopaminergic neurons and favoured dopamine release, suggesting that this drug could potentially have an application in the treatment of disorders associated with dopamine deficiency, such as Parkinson's disease [18].

Although previous studies have suggested that CDK inhibitors prevent c-Jun expression induced by camptothecin (DNA damage), in the present study these compounds were unable to prevent c-Jun expression [48,49]. Furthermore, Hongisto et al. have proposed that GSK3β is responsible for c-Jun phosphorylation; however, our present observation that inhibition of PI3-K by LY294002-increased

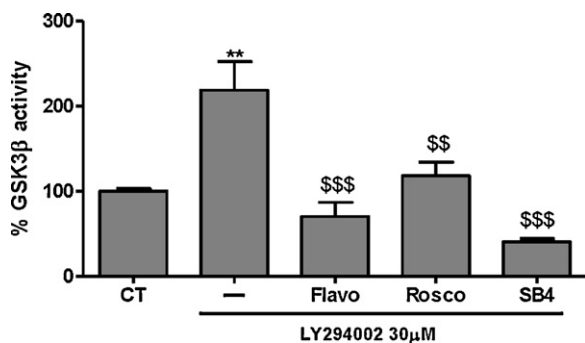


Fig. 5. GSK3 β activity increases after treatment of 30 μ M LY294002. Bar graphs showed a significant increase of GSK3 β activity after treating CGNs with LY294002 and in the presence of 5 μ M flavopiridol, 25 μ M roscovitine and 5 μ M SB-415286 respectively for 4 h. Data represents means \pm S.E.M. $n = 3$ experiments. ** $p < 0.01$ vs. CT; \$\$\$ $p < 0.01$ vs. LY294002; \$\$\$ $p < 0.001$ vs. LY294002.

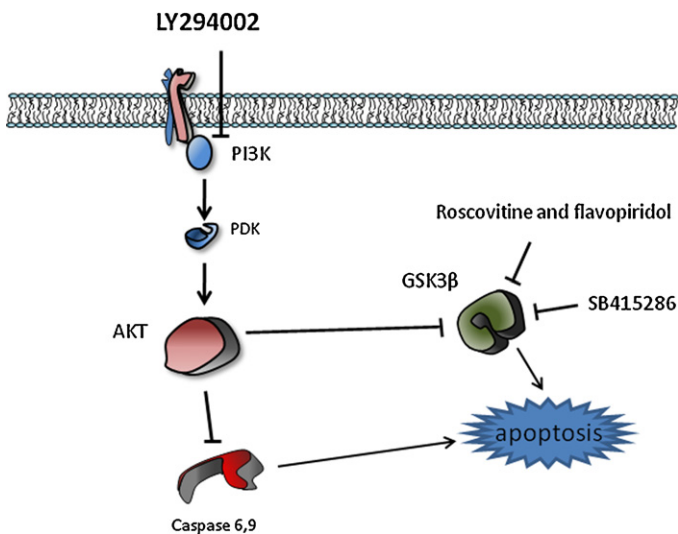


Fig. 6. Intracellular pathways involved in CDKs inhibitors prevents apoptosis-induced by LY294002 in CGNs. Whereas LY294002 was able to activate GSK3 and c-Jun and also decrease AKT activity, flavopiridol and roscovitine specifically inhibits GSK3 activity in this apoptotic model.

c-Jun expression was not attenuated by SB415286 in CGNs is in contradiction with this hypothesis [50].

Therefore, our results strongly suggest that both c-Jun and GSK3 β are involved in the apoptotic route mediated by PI3K inhibition; however, inhibiting only one of these two ways is sufficient to prevent CGN neuronal death. Nevertheless, further studies are required to understand the interactions between the different pathways involved in c-Jun phosphorylation.

Likewise, previous studies have reported pharmacological effects of roscovitine which are independent of CDK inhibition, such as modulation of N-calcium channels in neurons [26–28]. Thus, our present findings provide support for the future study of new CDK-independent pharmacological effects of this drug exclusively related to its previously described anti-tumour effects.

In the present study we demonstrate that both CDK inhibitors act by blocking the activity of GSK3 β . Interestingly, GSK3 β is phylogenetically most closely related to the CDKs, such as CDK1 and CDK2. Moreover, GSK3 β and CDK5 are kinases that share significant similarity in their molecular structures and in their well-known function, for example, in hyperphosphorylating tau [15]. Although previous studies have shown that flavopiridol, a chemical inhibitor that potently inhibits all CDK family members in a micromolar also inhibits GSK3 β , until now roscovitine did not prevents GSK3 β

activation. The exact mechanism by which both CDKs inhibitors modulate GSK3 β activity is uncertain and remains to be studied in deep. A possible explanation on roscovitine GSK3 β inhibitory effects could be, since neither the cell cycle nor calpains are activated, GSK3 β is likely the main target of action of these compounds in this apoptotic model. Noted that other studies have shown that serotonergic activity can regulate the phosphorylation of GSK3 β , thus this enzyme is not regulated exclusively by AKT [51–52].

Accordingly, our data provide evidence that PI3K/AKT/GSK3 β pathway is a critical component of LY294002-induced apoptosis in CGNs. GSK3 β constitutes an important and generalised signalling target for inhibition in order to obtain neuroprotection in experimental models and also in the treatment of neurodegenerative diseases. Because GSK3 β activity is associated with the promotion of tau-associated neuropathologies, our present results could have therapeutic value for new applications of roscovitine and flavopiridol in the treatment of these neurological diseases [53].

Acknowledgments

This study was supported by grants from Spain's "Ministerio de Educación y Ciencia" SAF2009-13093 the "Fondo de Investigación Sanitaria", and the "Instituto de Salud Carlos III" PI080400 and PS09/01789 (FEDER FOUNDS). 610RT0405 from Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). We would like to thank the "Generalitat de Catalunya" for supporting the research groups (2009/SGR00853) and the "Fundació la Marató TV3" (063230). We wish to thank the Language Assessment Service of the University of Barcelona for revising the manuscript.

References

- [1] Wang LM, Ren DM. Flavopiridol, the first cyclin-dependent kinase inhibitor: recent advances in combination chemotherapy. *Mini Rev Med Chem* 2010;10:1058–70.
- [2] Rizzolio F, Tuccinardi T, Caligiuri I, Lucchetti C, Giordano A. CDK inhibitors: from the bench to clinical trials. *Curr Drug Targets* 2010;11:279–90.
- [3] Węsierska-Gądek J, Maurer M. Promotion of apoptosis in cancer cells by selective purine-derived pharmacological CDK inhibitors: one outcome, many mechanisms. *Curr Pharm Des* 2011;17:256–71.
- [4] Wojciechowski J, Horky M, Gueorguieva M, Węsierska-Gądek J. Rapid onset of nucleolar disintegration preceding cell cycle arrest in roscovitine-induced apoptosis of human MCF-7 breast cancer cells. *Int J Cancer* 2003;106:486–95.
- [5] Węsierska-Gądek J, Borza A, Komina O, Maurer M. Impact of roscovitine, a selective CDK inhibitor, on cancer cells: bi-functionality increases its therapeutic potential. *Acta Biochim Pol* 2009;56(3):495–501.
- [6] Verdaguer E, Jordà EG, Canudas AM, Jiménez A, Pubill D, Escubedo E, Camarasa J, Pallàs M, Camins A. Antiapoptotic effects of roscovitine in cerebellar granule cells deprived of serum and potassium: a cell cycle-related mechanism. *Neurochem Int* 2004;44:251–61.
- [7] Giovanni A, Wirtz-Brugger F, Keramaris E, Slack R, Park DS. Involvement of cell cycle elements, cyclin-dependent kinases, pRb, and E2F x DP, in B-amyloid-induced neuronal death. *J Biol Chem* 1999;274:19011–6.
- [8] Padmanabhan J, Park DS, Greene LA, Shelanski ML. Role of cell cycle regulatory proteins in cerebellar granule neuron apoptosis. *J Neurosci* 1999;19:8747–56.
- [9] Mirjany M, Ho L, Pasinetti GM. Role of cyclooxygenase-2 in neuronal cell cycle activity and glutamate-mediated excitotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;301:494–500.
- [10] Verdaguer E, Jiménez A, Canudas AM, Jordà EG, Sureda FX, Pallàs M, Camins A. Inhibition of cell cycle pathway by flavopiridol promotes survival of cerebellar granule cells after an excitotoxic treatment. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;308:609–16.
- [11] Zhang Z, Cao X, Xiong N, Wang H, Huang J, Sun S, Liang Z, and DNA polymerase-beta is required for 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced apoptotic death in neurons. *Apoptosis* 2010;15:105–15.
- [12] Hilton GD, Stoica BA, Byrnes KR, Faden AI. Roscovitine reduces neuronal loss, glial activation, and neurologic deficits after brain trauma. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008;28:1845–59.
- [13] Wang F, Corbett D, Osuga H, Osuga S, Ikeda JE, Slack RS, Hogan MJ, Hakim AM, Park DS. Inhibition of cyclin-dependent kinases improves CA1 neuronal survival and behavioral performance after global ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002;22:171–82.
- [14] Smith RA, Walker T, Xie X, Hou ST. Involvement of the transcription factor E2F1/Rb in kainic acid-induced death of murine cerebellar granule cells. *Brain Res Mol Brain Res* 2003;116:70–9.

- [15] Leclerc S, Garnier M, Hoessel R, Marko D, Bibb JA, Snyder GL, Greengard P, Biernat J, Wu YZ, Mandelkow EM, Eisenbrand G, Meijer LJ. Indirubins inhibit glycogen synthase kinase-3 β and CDK5/P25, two protein kinases involved in abnormal tau phosphorylation in Alzheimer's disease: a property common to most cyclin-dependent kinase inhibitors? *Biol Chem* 2001;276:251–60.
- [16] Iyirihario GO, Brust TB, Rashidian J, Galehdar Z, Osman A, Phillips M, Slack RS, Macvicar BA, Park DS. Delayed combinatorial treatment with flavopiridol and minocycline provides longer term protection for neuronal soma but not dendrites following global ischemia. *J Neurochem* 2008;105:703–13.
- [17] Camins A, Verdaguier E, Folch J, Canudas AM, Pallàs M. The role of CDK5/P25 formation/inhibition in neurodegeneration. *Drug News Perspect* 2006;19:453–60.
- [18] Kim SH, Ryan TA. CDK5 serves as a major control point in neurotransmitter release. *Neuron* 2010;67:797–809.
- [19] Menn B, Bach S, Blevins TL, Campbell M, Meijer L, Timsit S. Delayed treatment with systemic (S)-roscovitine provides neuroprotection and inhibits in vivo CDK5 activity increase in animal stroke models. *PLoS One* 2010;5:e12117.
- [20] Rashidian J, Rousseaux MW, Venderova K, Qu D, Callaghan SM, Phillips M, Bland RJ, Daring MJ, Mao Z, Slack RS, Park DS. Essential role of cytoplasmic cdk5 and Prx2 in multiple ischemic injury models, in vivo. *J Neurosci* 2009;29:12497–505.
- [21] Hamdane M, Bretteville A, Sambo AV, Schindowski K, Bégard S, Delacourte A, Bertrand P, Buée L. p25/Cdk5-mediated retinoblastoma phosphorylation is an early event in neuronal cell death. *J Cell Sci* 2005;118:1291–8.
- [22] Tian B, Yang Q, Mao Z. Phosphorylation of ATM by Cdk5 mediates DNA damage signalling and regulates neuronal death. *Nat Cell Biol* 2009;11:211–8.
- [23] Chergui K, Svenningsson P, Greengard P. Cyclin-dependent kinase 5 regulates dopaminergic and glutamatergic transmission in the striatum. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:2191–6.
- [24] Tomizawa K, Ohta J, Matsushita M, Moriwaki A, Li ST, Takei K, Matsui H. Cdk5/p35 regulates neurotransmitter release through phosphorylation and downregulation of P/Q-type voltage-dependent calcium channel activity. *J Neurosci* 2002;22:2590–7.
- [25] Li BS, Sun MK, Zhang L, Takahashi S, Ma W, Vinade L, Kulkarni AB, Brady RO, Pant HC. Regulation of NMDA receptors by cyclin-dependent kinase-5. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:12742–7.
- [26] Buraei Z, Schofield G, Elmslie KS. Roscovitine differentially affects CaV2 and Kv channels by binding to the open state. *Neuropharmacology* 2007;52:883–94.
- [27] Yan Z, Chi P, Bibb JA, Ryan TA, Greengard P. Roscovitine: a novel regulator of P/Q-type calcium channels and transmitter release in central neurons. *J Physiol* 2002;540:761–70.
- [28] Ivanov A, Tyzio R, Zilberter Y, Ben-Ari Y. (R)-roscovitine, a cyclin-dependent kinase inhibitor, enhances tonic GABA inhibition in rat hippocampus. *Neuroscience* 2008;156:277–88.
- [29] Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie CJ, McLauchlan H, Klevernic I, Arthur JS, Alessi DR, Cohen P. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J* 2007;408:297–315.
- [30] De la Torre AV, Junyent F, Folch J, Pelegrí C, Vilaplana J, Auladell C, Beas-Zarate C, Pallàs M, Camins A, Verdaguier E. Study of the pathways involved in apoptosis induced by PI3K inhibition in cerebellar granule neurons. *Neurochem Int* 2011;59:159–67.
- [31] Cross DA, Culbert AA, Chalmers KA, Facci L, Skaper SD, Reith AD. Selective small-molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity protect primary neurones from death. *J Neurochem* 2001;77:94–102.
- [32] Miller TM, Tansey MG, Johnson Jr EM, Creedon DJ. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity blocks depolarization- and insulin-like growth factor I-mediated survival of cerebellar granule cells. *J Biol Chem* 1997;272:9847–53.
- [33] Chin PC, Majdzadeh N, D'Mello SR. Inhibition of GSK3 β is a common event in neuroprotection by different survival factors. *Brain Res Mol Brain Res* 2005;137:193–201.
- [34] Facci L, Stevens DA, Skaper SD. Glycogen synthase kinase-3 inhibitors protect central neurons against excitotoxicity. *Neuroreport* 2003;14:1467–70.
- [35] Medina M, Avila J. Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des* 2010;16:2790–8.
- [36] Avila J, Wandosell F, Hernández F. Role of glycogen synthase kinase-3 in Alzheimer's disease pathogenesis and glycogen synthase kinase-3 inhibitors. *Expert Rev Neurother* 2010;10:703–10.
- [37] Kråmer D, Minichiello L. Cell culture of primary cerebellar granule cells. *Methods Mol Biol* 2010;633:233–9.
- [38] Rameh LE, Chen C, Cantley LC. Phosphatidylinositol(3,4,5)P3 interacts with SH2 Domains and modulates PI 3-kinase association with tyrosine-phosphorylated proteins. *Cell* 1995;83:821–30.
- [39] Shimoke K, Yamagishi S, Yamada M, Ikeuchi T, Hatanaka H. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity elevates c-Jun N-terminal kinase activity in apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *Brain Res Dev Brain Res* 1999;112:245–53.
- [40] Tajés M, Yeste-Velasco M, Zhu X, Chou SP, Smith MA, Pallàs M, Camins A, Casadesús G. Activation of Akt by lithium: pro-survival pathways in aging. *Mech Ageing Dev* 2009;130:253–61.
- [41] Eldar-Finkelman H, Licht-Murava A, Pietrokovski S, Eisenstein M. Substrate competitive GSK-3 inhibitors—strategy and implications. *Biochim Biophys Acta* 2010;1804:598–603.
- [42] Quiroz JA, Machado-Vieira R, Zarate Jr CA, Manji HK. Novel insights into lithium's mechanism of action: neurotrophic and neuroprotective effects. *Neuropsychobiology* 2010;62:50–60.
- [43] Lopes JP, Oliveira CR, Agostinho P. Cdk5 acts as a mediator of neuronal cell cycle re-entry triggered by amyloid-beta and prion peptides. *Cell Cycle* 2009;8:97–104.
- [44] Ago K, Saegusa Y, Nishimura J, Dewa Y, Kemmochi S, Kawai M, Harada T, Mitsumori K, Shibutani M. Involvement of glycogen synthase kinase-3 β signaling and aberrant nucleocytoplasmic localization of retinoblastoma protein in tumor promotion in a rat two-stage thyroid carcinogenesis model. *Exp Toxicol Pathol* 2010;62:269–80.
- [45] Smith PD, Crocker SJ, Jackson-Lewis V, Jordan-Sciutto KL, Hayley S, Mount MP, O'Hare MJ, Callaghan S, Slack RS, Przedborski S, Anisman H, Park DS. Cyclin-dependent kinase 5 is a mediator of dopaminergic neuron loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:13650–5.
- [46] Alvira D, Tajés M, Verdaguier E, de Arriba SG, Allgaier C, Matute C, Trullas R, Jiménez A, Pallàs M, Camins A. Inhibition of cyclin-dependent kinases is neuroprotective in 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced apoptosis in neurons. *Neuroscience* 2007;146:350–65.
- [47] Verdaguier E, Susana Gde A, Clemens A, Pallàs M, Camins A. Implication of the transcription factor E2F-1 in the modulation of neuronal apoptosis. *Biomed Pharmacother* 2007;61:390–9.
- [48] Besirli CG, Johnson Jr EM. JNK-independent activation of c-Jun during neuronal apoptosis induced by multiple DNA-damaging agents. *J Biol Chem* 2003;278:22357–66.
- [49] Ghahremani MH, Keramaris E, Shree T, Xia Z, Davis RJ, Flavell R, Slack RS, Park DS. Interaction of the c-Jun/JNK pathway and cyclin-dependent kinases in death of embryonic cortical neurons evoked by DNA damage. *J Biol Chem* 2002;277:35586–96.
- [50] Hongisto V, Smeds N, Brecht S, Herdegen T, Courtney MJ, Coffey ET. Lithium blocks the c-Jun stress response and protects neurons via its action on glycogen synthase kinase 3. *Mol Cell Biol* 2003;23:6027–36.
- [51] Beaulieu JM, Gainetdinov RR, Caron MG. Akt/GSK3 signaling in the action of psychotropic drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2009;49:327–47.
- [52] Li X, Zhu W, Roh MS, Friedman AB, Rosborough K, Joje RS. In vivo regulation of glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β) by serotonergic activity in mouse brain. *Neuropsychopharmacology* 2004;29:1426–31.
- [53] Cernak I, Stoica B, Byrnes KR, Di Giovanni S, Faden AI. Role of the cell cycle in the pathobiology of central nervous system trauma. *Cell Cycle* 2005;4:1286–93.

Publicación 3

PI3K/AKT inhibition induces apoptosis through p38 activation in neurons

Aurelio Vázquez de la Torre, Félix Junyent, Jaume Folch, Carme Pelegrí, Jordi Vilaplana, Carme Auladell, Carlos Beas-Zarate, Mercè Pallàs, Ester Verdaguer, Antoni Camins.
Pharmacological Research 59 (2012) 159-167.

Resumen

La fosforilación del factor de transcripción c-Jun se ha descrito como un elemento clave en la apoptosis en modelos neuronales, numerosos estudios han destacado su importancia en distintos modelos apoptóticos como el modelo del ácido kaínico o la privación de S/K⁺ entre otros. El factor de transcripción c-Jun es uno de los efectores de la apoptosis inducida por la vía de las MAPKs, esta vía es regulada por la vía de PI3K/AKT, ya que AKT regula la función de ASK1.

En este estudio se han descrito los mecanismos implicados en la fosforilación de c-Jun en el modelo de apoptosis inducida por inhibición de la vía de PI3K/AKT. Nuestros resultados muestran que el tratamiento con LY294002 no produce un incremento de la actividad de JNK pero si de p38, que es responsable de la fosforilación de c-Jun, la cual una vez activada conduce a la expresión de Dp5/Hrk que se encuentra relacionada con la permeabilización de la membrana externa mitocondrial y activación de la vía intrínseca.

Los inhibidores SB203580 y SP600125 inhibidores de p38 y de JNK respectivamente, producen una protección de la apoptosis mediada por LY294002 en CGC, sin embargo los efectos de SP600125 se deben a su capacidad de inhibición de p38 a las mismas dosis que las empleadas para la inhibición de JNK. El tratamiento con ambos inhibidores reduce la fosforilación de c-Jun y los niveles de expresión de mRNA *dp5/Hrk*, una diana directa de c-Jun. Todos estos resultados muestran que la inhibición de la vía de PI3K/AKT induce apoptosis neuronal, a través de la activación de p38/c-Jun/Dp5/Hrk. El aumento de los niveles de expresión de otras proteínas proapoptóticas de la misma familia como Bim, cuya expresión depende de otros factores como Egr-1, no parece ser suficiente para producir la apoptosis en este modelo ya que esto requiere de la acción orquestada de distintas proteínas proapoptóticas.



PI3 k/akt inhibition induces apoptosis through p38 activation in neurons

Aurelio Vázquez de la Torre^a, Felix Junyent^{a,b}, Jaume Folch^b, Carme Pelegrí^c, Jordi Vilaplana^c, Carme Auladell^d, Carlos Beas-Zarate^e, Mercè Pallàs^a, Ester Verdaguer^d, Antoni Camins^{a,*}

^a Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia Facultat de Farmàcia, Centros de Investigació Biomèdica en Red Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, Nucli Universitari de Pedralbes., 08028 Barcelona, Spain

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

^c Departament de Fisiologia, Centro de Investigación de Biomedicina en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED) Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

^d Departament de Biologia Cel·lular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

^e Departamento de Biología Celular y Molecular, C.U.C.B.A, Universidad de Guadalajara and División de Neurociencias, Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Sierra Mojada 800, Col. Independencia, Guadalajara, Jalisco 44340, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 November 2012

Received in revised form 15 January 2013

Accepted 16 January 2013

Keywords:

AKT

LY294002

p38 MAPK

BH3 only proteins

Dp5

Bim

Neurons

ABSTRACT

Accumulating evidence suggests that the PI3 K/AKT pathway is a pro-survival signalling system in neurons. Therefore, the inhibition of this pathway may be implicated in the degeneration of neurons in Parkinson's disease (PD), Alzheimer's disease (AD), and other neurological disorders. Here we study the participation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway on apoptosis induced by PI3 K/AKT inhibition in cultured cerebellar granule cells (CGCs).

LY294002, a specific PI3 K/AKT inhibitor, selectively activated the p38 MAPK kinase pathway and enhanced c-Jun phosphorylation, but did not activate JNK. The pharmacological inhibitors SB203580 (p38 inhibitor) and SP600125 (a JNK inhibitor) protected primary cultures of rat CGCs from LY294002-induced apoptosis. Furthermore, both compounds decreased the phosphorylation of c-Jun and lowered mRNA levels of the pro-apoptotic gene dp5, a direct target of c-Jun. Taken together, our data demonstrate that PI3 K/AKT inhibition induces neuronal apoptosis, a process that is mediated by the activation of p38 MAPK/c-Jun/dp5.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Neuronal apoptosis involves multiple tightly regulated mechanisms. In addition, several pathways modulate a number of proteins that participate in this programmed cell death [1]. Finally, these pathways converge on mitochondria, which become altered and release various proteins, including cytochrome c, a molecule that induces apoptosis formation and triggers caspase activation [2–4]. Cytochrome c and caspases are possibly the main proteins that orchestrate apoptosis [3–6].

Furthermore, neurotoxic stimuli activate many death pathways, to which the cell responds via the induction of survival mechanisms [3]. Therefore, there is a balance between the activation of cell-death and survival pathways in neuronal loss. Knowledge of

these pathways is important for the development of drugs for the treatment of neurodegenerative disorders [4–6].

One such pathway is the pro-survival phosphoinositol 3-kinase (PI3 K)/AKT (also called protein kinase B) signalling cascade. This pathway promotes cell survival by downregulating a number of major pro-apoptotic proteins [7–10]. Recent studies suggest that this pro-survival mechanism is inhibited in most neurological disorders [8–11]. Therefore, it is relevant to identify the molecular mechanisms involved in the apoptosis triggered by PI3 K/AKT inhibition.

AKT activation requires the recruitment of PI3 K to the cell membrane. Once PI3 K is activated, it can phosphorylate PIP₂ to produce PIP₃ (phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate), which recruits PDKs (3-phosphoinositide dependent protein kinase) [12]. PDK1 phosphorylates AKT at Thr308 and possibly Ser473 residues, resulting in its activation. In addition, PDK1 triggers a variety of intracellular pathways, such as the mitogen-activated protein kinase (MAPK), GSK3β (Glycogen Synthase Kinase β) and NF-κB cascades [11–14].

LY294002 is a PI3 K inhibitor that is widely used to study the mechanisms involved in the apoptosis induced by AKT inhibition. In

* Corresponding author at: Centros de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Institut de Biomedicina (IBUB), Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Nucli Universitari de Pedralbes, 08028 Barcelona, Spain. Tel.: +34 934024531; fax: +34 934035982.

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

previous studies, we and others demonstrated the prominent role of GSK3 β and MAPK family activation in the signal transduction of apoptosis in neurons after PI3 K/AKT inhibition [15–18]. Apoptosis-signal Regulated Kinase-1 (ASK1) is a serine/threonine MAP kinase kinase (MAPKKK) that is inactivated upon the phosphorylation of its Ser83 residue by AKT [19–24]. The downstream targets of ASK1 include MAPK kinases (MAPKKs) MKK4/7 and MKK3/6 [19]. Consequently, these MAPKKs lead to the induction of three MAPKs that can activate c-Jun – namely ERK1/2, JNK and p38 [20–22]. The latter molecules, in turn, phosphorylate several transcription factors required for cell death, such as c-Jun, junB and ATF-2. Although in previous studies we ruled out the participation of JNK in apoptosis mediated by PI3 K/AKT inhibition, the question remains as to why JNK inhibitors show neuroprotective and anti-apoptotic properties following AKT inhibition. Furthermore, BH3-only proteins, including Dp5/HRK, Bim, Bid, Bad, Puma and Noxa, are critical initiators of apoptosis [25–35]. Indeed, recent work showed that c-Jun pathway activation results in up-regulation of several genes, including *dp5* and *bim*, both of which play a key role in neuronal cell death [26,29]. Here we describe the effects of PI3 K/AKT inhibition by LY294002 on CGCs.

We demonstrate that AKT blockade by the PI3K inhibitor LY294002 induces apoptosis as a consequence of p38 activation. In contrast to other apoptotic models, JNK does not appear to make a significant contribution to the phosphorylation of c-Jun.

2. Materials and methods

2.1. Materials

BME was purchased from Gibco-BRL Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA), heat-inactivated foetal bovine serum (FBS) and propidium iodide (PI) were from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA), and protein ladders from BioRad (Berkeley, CA, USA). The primary antibodies pERK 1/2 Thr202/Tyr204, ERK 1/2, c-Jun ser73 were purchased from Cell Signalling Technology, (Danvers, MA, USA). pASK1 at Ser83 was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) and β actin from Sigma–Aldrich. (St. Louis, MO, USA). SB203580 and SP600126 were supplied by Calbiochem (Darmstadt, GER) and Enzo Biochem (New York, NY, USA) respectively. All other chemicals were from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.2. Preparation of cell cultures

Primary cultures of cerebellar granule cells (CGCs) from Sprague-Dawley rats were prepared from day 7 postnatal animals, as described elsewhere. Briefly, cells were dissociated in the presence of trypsin and DNase I (Sigma–Aldrich) and placed in poly-L-lysine-coated dishes (100 μ g/mL) at a density of 6×10^5 cells/mL in basal Eagle's medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 0.1 mg/mL gentamicin, 2 mM L-glutamine and 25 mM KCl. Cytosine- β -arabino-furanoside (10 μ M) was added to the culture medium 24 h after plating to prevent the replication of non-neuronal cells. The cultures were maintained at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO₂/95% air for 7 days. One hour before the assays were performed, the medium was changed to 25 mM potassium supplemented with 1% heat-inactivated FBS. MAPK inhibitors, namely SB203580 and SP600125, were added to the medium 1 h before LY294002, which was added to neuronal cultures for between 4 and 24 h. All procedures involving animals were approved by the Ethics Committee of the University of Barcelona and were conducted in accordance with national (Spanish) regulations.

2.3. Analysis of DNA fragmentation by flow cytometry

DNA fragmentation was measured by flow cytometric analysis of propidium iodide (PI)-stained cellular DNA, as described previously [36] CGCs were subsequently stained with 10 μ g/ml PI, and DNA fragmentation was analysed using a Beckman Coulter Epics XL flow cytometer (argon laser, excitation wavelength 488 nm). A minimum of 5,000 events were acquired in list mode while gating the forward and side scatters to exclude PI-positive cell debris. These events were then analysed in FL-3 for the appearance of the sub-G1 peak.

2.4. Detection of condensed nuclei by PI stain

PI staining was also used to evaluate morphological evidence of apoptosis (e.g. condensed nuclei). After the corresponding treatment, cells were fixed in 4% paraformaldehyde PBS solution, pH 7.4, for 15 min at room temperature. They were then washed in PBS and incubated for 3 min with a solution of PI (75 μ g/mL) in PBS. Stained cells were observed under UV illumination using a 20 \times objective, and digitalised images were taken. Apoptotic cells appeared shrunken with nuclei showing high fluorescence. Apoptotic cells were scored by counting at least 500 nuclei for each sample in three separate experiments.

2.5. GSK3 β activity assay

Having immunoprecipitated the GSK3 β protein, we added GSK3 β inhibitor (SB415286 from SIGMA) to one tube as a GSK3 β inhibition control. We added 10 μ L of 10% DMSO to the remaining tubes. Briefly, the tubes were centrifuged for several seconds at 8000 \times g. The beads were then suspended by gently tapping the bottom of the tube. Next, 5 μ L of GSK3 β peptide substrate was added to the tubes. We then added 20 μ L of radioactive reaction mixture (125 μ L of assay buffer, 75 μ L of 1 \times wash buffer, 2.5 μ L of γ -32P-ATP specific activity 10 mCi/mL) to each tube, and the tube contents were mixed by gentle pipetting. The tubes were then incubated for 30 min at 37 °C, and the samples were mixed gently every 5 min by centrifuging for several seconds at 8000 \times g. Next, we spotted 25 μ L of the upper liquid phase of the assay mixture on a P81 cellulose phosphate square, which was then left to air-dry.

Next, the squares were soaked in 0.5% phosphoric acid solution 4 times. They were then washed once with ethanol for 1 min and with acetone for 1 min and then dried at room temperature. Finally, the squares were subjected to autoradiography using a PMITM system #170-9400 (Personal Molecular Imaging) from Bio-Rad. The spots were determined by densitometry using Quantity One[®] Software.

2.6. p38 and JNK cell activity assay

Specific antibodies that recognise the phosphorylated forms of p38 Thr180/Tyr182 or JNK Thr183/Tyr185 were immunoprecipitated from 200 μ g of total protein extract with protein G agarose beads for 4 h at 4 °C with rocking (Santa Cruz biotech). After overnight incubation with gentle rocking, the tubes were centrifuged at 14 000 \times g for 30 sec at 4 °C, and the pellet was then washed twice with 500 μ L of 1 \times cell lysis buffer. The tubes were kept on ice during the washes. Afterwards, the samples were washed again with 1 \times Kinase buffer and resuspended in 50 μ L of 1 \times Kinase buffer supplemented with 200 μ M ATP and an appropriate amount of kinase substrate, namely ATF-2 Fusion Protein. The samples were incubated for 30 min at 30 °C. We next added

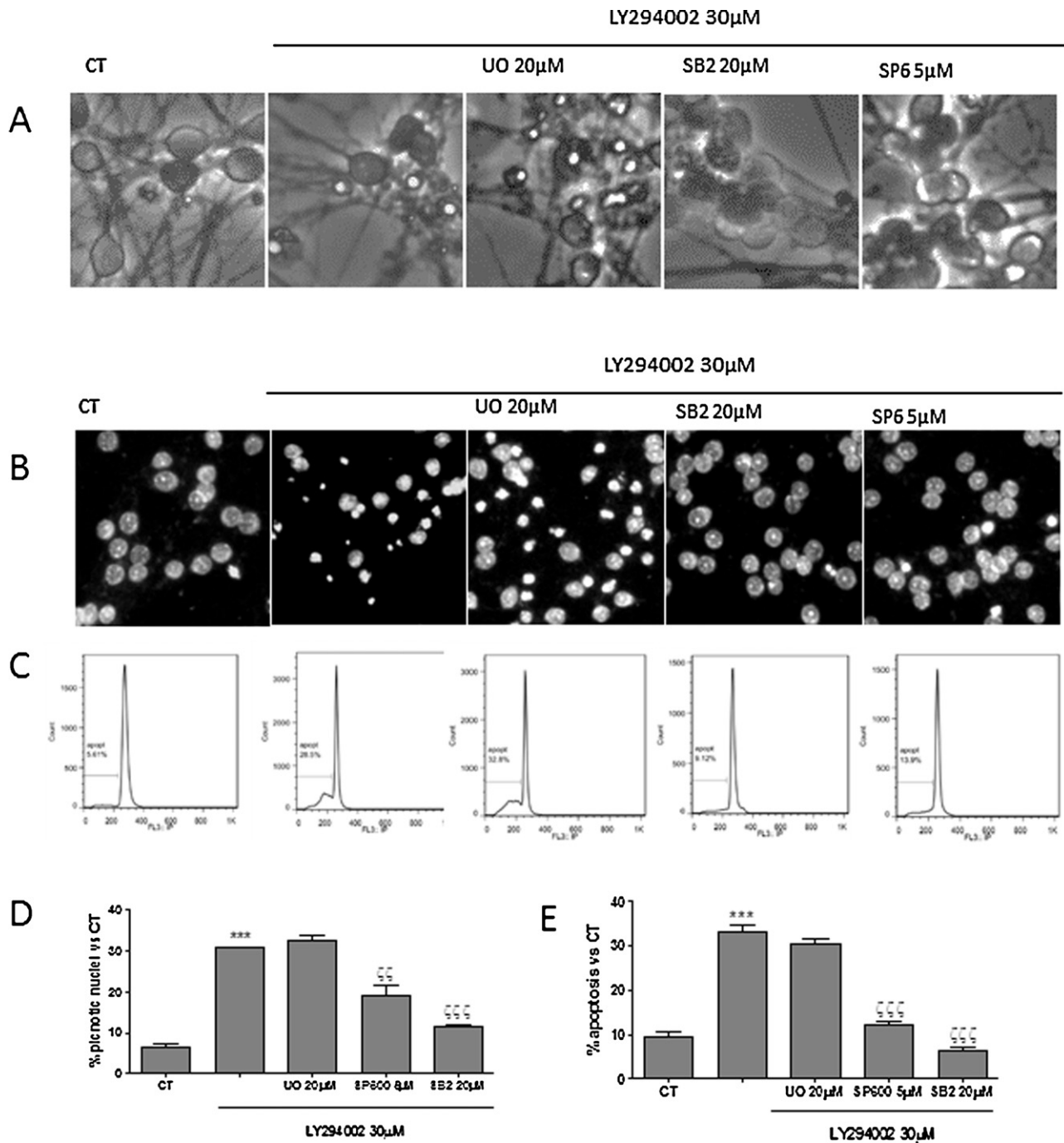


Fig. 1. (A) Representative phase contrast images of control (CT), CGCs treated with LY294002 for 24 h or pretreated UO126, SB203580 or SP600125. (B) Representative images of apoptotic nuclei of CGCs after 24 h of LY294002 treatment and pretreated with UO126, SB203580 or SP600125 (calibration bar, 10 μm). (C) Diagrams showing the peak of aneuploid cells obtained by flow cytometry of CGCs treated with 30 μM LY294002 for 24 h in the presence of UO126, SB203580 or SP600125. (D) Graph bars represent the percentage of picnotic nuclei after the pretreatment of CGCs with UO126, SP600125 and SB203580 exposed to LY294002 for 24 h. (E) Graph bars represent the percentage of apoptotic cells determined by flow cytometry after the pretreatment of CGCs with UO126, SP600125 and SB203580 exposed to LY294002 for 24 h. Each bar shows the mean ± S.E.M. of four wells of five independent cultures. Statistical analyses were carried out using the one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc tests: ****p* < 0.001 vs. CT; \$\$\$*p* < 0.001; \$\$*p* < 0.01 vs. LY294002.

25 μL of 4× SDS sample buffer to the samples and mixed them. The beads were removed by centrifugation for 30 s at 14000 × *g*. Finally, the samples were boiled at 100 °C for 5 min and loaded on SDS-PAGE gel. When the electrophoresis was finished, the proteins were transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (PVDF) membrane and incubated with an antibody against phospho-ATF-2 at Thr71.

2.7. Western blot analysis

Lysates of cell homogenate containing 15 μg of protein per sample were analysed by Western blot. Briefly, samples were placed in sample buffer (0.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glycerol, 2% (w=v) SDS, 10% (v/v) 2-β-mercaptoethanol, 0.05% bromophenol blue) and denatured by boiling from 95 to 100 °C for 5 min.

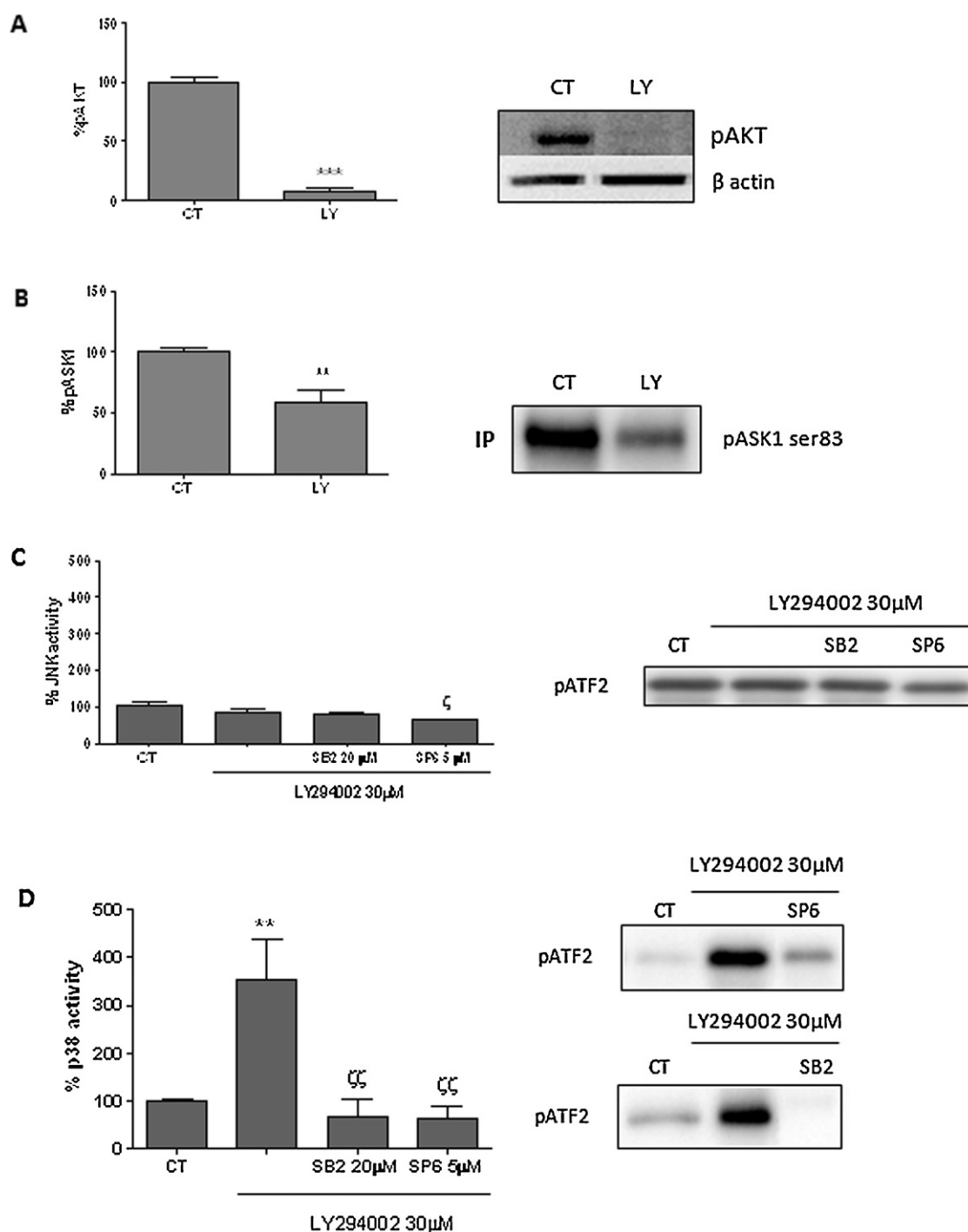


Fig. 2. (A) Representative image showing changes in the protein levels of AKT phosphorylated at Ser473 after 4 h of treatment with LY294002. (B) Levels of ASK1 phosphorylated at Ser83 versus CT (C) JNK activity in CGCs pretreated with SB203580 and SP600125 exposed to LY294002 for 4 h. (D) p-ATF2 Thr71 immunoblot indirectly representing the activity of immunoprecipitated p38. Bars represent the percentage of p38 activity versus CT in CGCs treated with LY294002 and pretreated with SB203580 or SP600125. Representative immunoblots from three independent experiments. *** $p < 0.001$ vs. CT; $\zeta p < 0.01$; $\zeta p < 0.05$ vs. LY294002.

Samples were separated by electrophoresis on 10% acrylamide gels. Thereafter, proteins were transferred to PVDF sheets (Millipore Corp., Bedford, MA) using a transblot apparatus. Membranes were incubated overnight with primary monoclonal antibodies against pERK 1/2 Thr202/Tyr204, ERK 1/2, and pc-Jun Ser73 (1:1000). We used β actin 1:20000 as a protein loading control. Afterwards, blots were washed thoroughly in $1 \times$ TBS-Tween[®] 0.1% buffer (50 mM Tris; 1.5% NaCl, 0.05% Tween[®] 20, pH 7.5) and incubated for 1 h with a peroxidase-conjugated IgG secondary antibody (1:2000). Immunoreactive protein was visualised using

a chemiluminescence-based detection kit (Pierce[®] ECL Western Blotting substrate, Thermo Scientific, USA). Protein levels were determined by densitometry of the bands using ImageLab[®]. Measurements are expressed as arbitrary units. All results were normalised for β actin.

Immunoprecipitation assays were performed using 250 μ g of total protein mixed with 5 μ g of p-ASK1 at Ser83. The volume was adjusted to 300 μ L with cell lysis buffer (PBS, PMSF 1 μ M, orthovanadate 0.1 M, aprotinin 3.6 μ g/mL, phosphatase inhibitor cocktail (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) 1 μ L, 10% Triton-100)

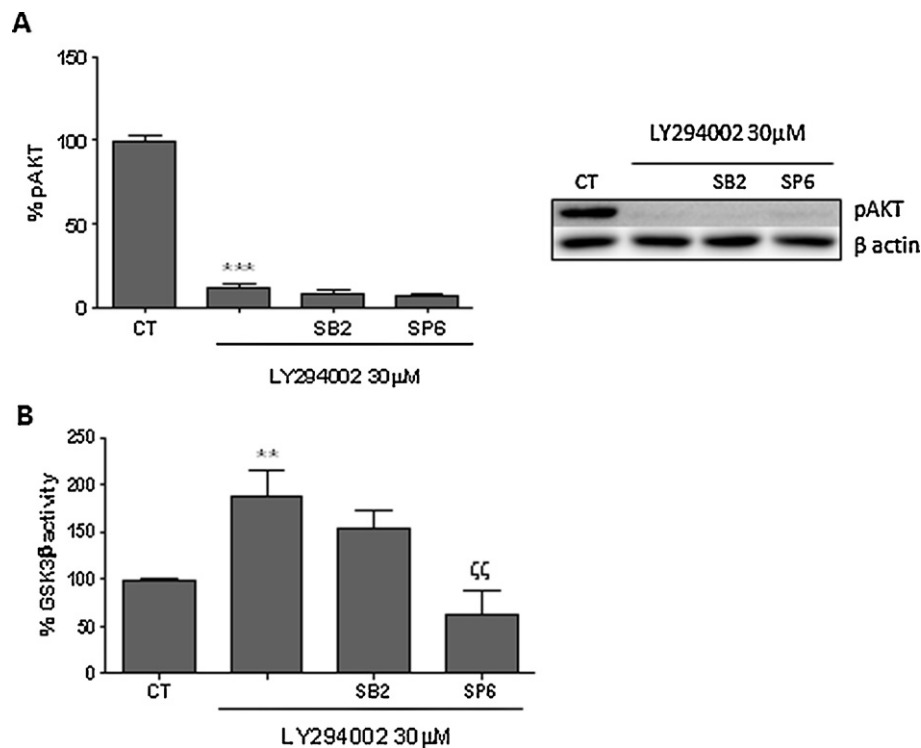


Fig. 3. (A) AKT protein levels in CGCs treated with LY294002 and pre-treated with SB203580 or SP600125. β -Actin was used as a loading control. The graph represents the percentage of p-AKT Ser473 protein levels versus CT. (B) GSK3 β activity following SP600125 treatment. *** $p < 0.001$ vs. CT; ** $p < 0.01$; $\zeta\zeta p < 0.05$ vs. LY294002.

for 4 h at 4 °C. Cell extracts were immunoprecipitated adding 50 μ L of protein G agarose (Santa Cruz Biotechnology) to each tube and then incubated overnight at 4 °C. Afterwards, immunocomplexes were washed three times with 800 μ L of cell lysis buffer. Finally, the tubes were centrifuged at 1000 \times g at room temperature, and the supernatants were mixed with loading sample buffer for loading onto SDS-PAGE gel.

2.8. Reverse transcription and semi-quantitative Real time PCR

Total RNA was isolated from CGCs using TRIzol[®] reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Chloroform was added and the RNA was precipitated from the aqueous phase with isopropanol. RNA was reconstituted in RNase-free water, and RNA concentration was determined using a nanodrop ND-1000. First-strand cDNA was reverse-transcribed from 1 μ g of mRNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, Carlsbad,

CA, USA). The same amount of cDNA was subsequently used for qPCR, and each sample was analysed in triplicate for each gene. Optical density was measured using a StepOnePlus from Applied Biosystems[®] and normalised to β actin. The primers used are shown in Table 1.

Table 1
List of sequence of primers for RT-PCR.

Primers (5'→3')	sequence
ATF2 forward	ACCCAGGCACCATCTCTAA
ATF2 reverse	AAATGGGCTGGTACAGGAAC
BAX forward	AGGCGAATTGGCGATGA
BAX reverse	GAGTCTGTATCCACATCAGCAATCA
Bim forward	CTACCAGATCCCCACTTTTC
Bim reverse	GCCCTCCTCGTGAAGTCTC
C-fos forward	GTCGACCTAGGGAGGACCTTC
C-fos reverse	CATCTCTGGAAGAGGTGAGGAC
Dp5 forward	ATAGCACTGAGGTGGCTATC
Dp5 reverse	ACCCAGGCACCATCTCTAA
Erg1 forward	CCGTACCCAGCAGCCTTCGC
Erg1 reverse	CCGTACCCAGCAGCCTTCGC
β actin forward	TCCGTGACGTCTCCGCACG
β actin reverse	ATGGATGACGATATCGTGGC

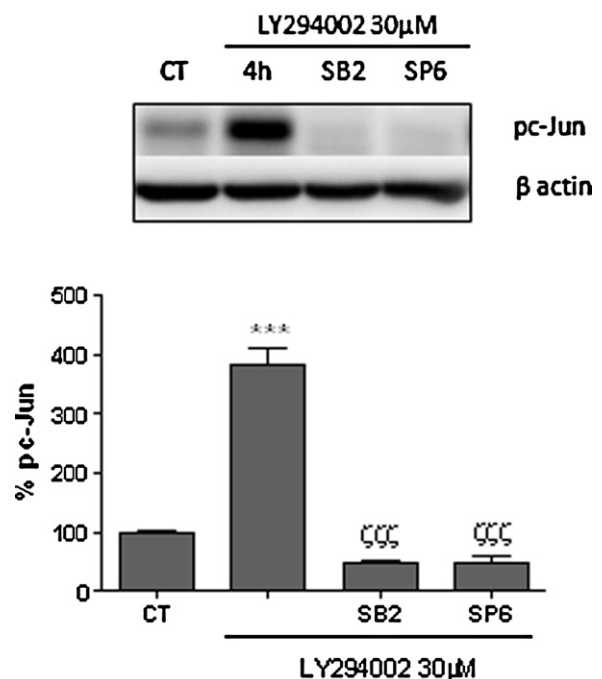


Fig. 4. Representative western blot image of c-Jun phosphorylated at Ser73 in CGCs treated with LY294002 for 4 h and pre-treated with SB203580 or SP600125. β -Actin was used as a loading control. *** $p < 0.001$ vs. CT; $\zeta\zeta p < 0.05$ vs. LY294002.

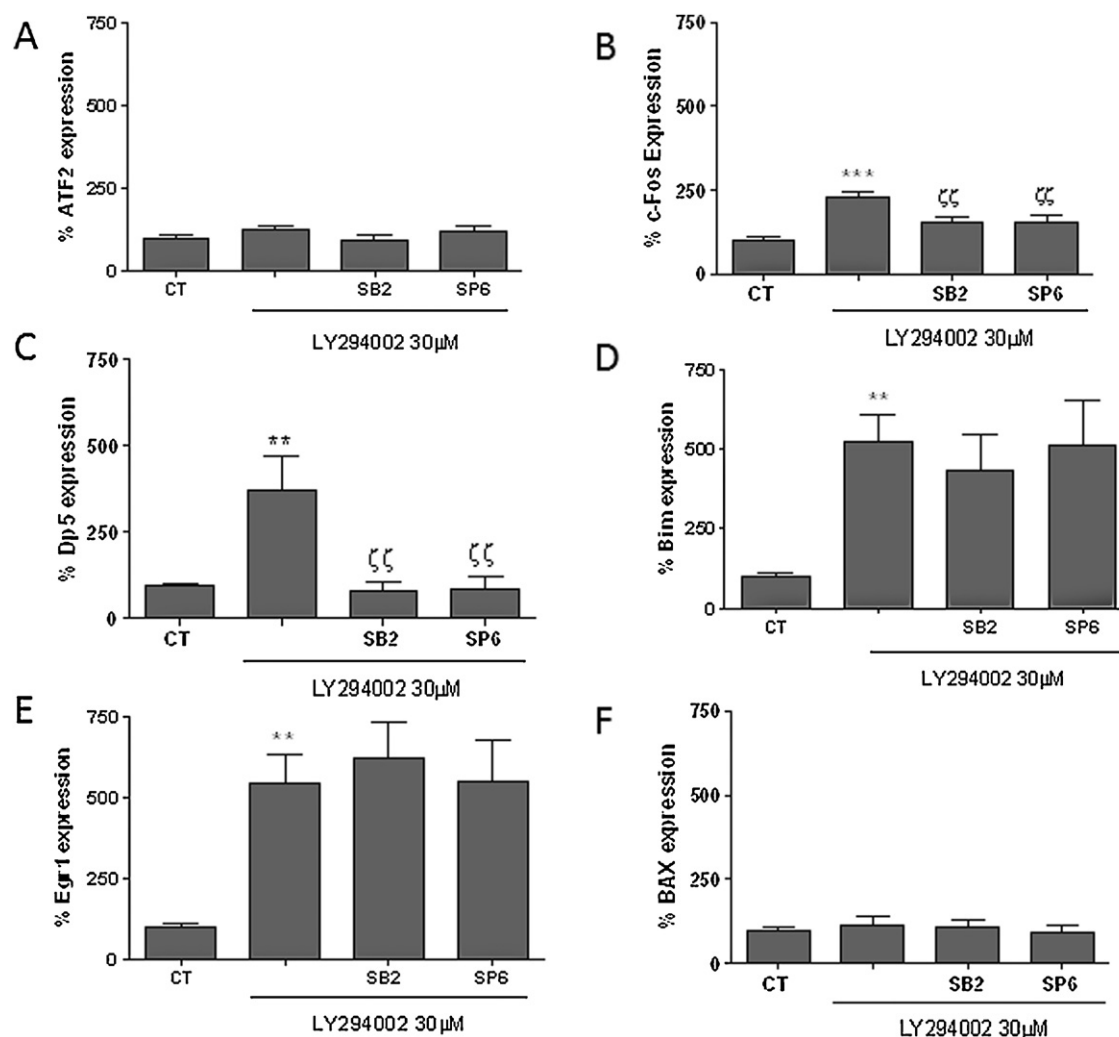


Fig. 5. mRNA expression levels of *atf2* (A), *c-fos* (B), *dp5* (C), *bim* (D), *egr1* (E) and *bax* (F) in CGCs treated with LY294002 for 4 h and pretreated with SB203580 and SP600125. Statistical analyses were carried out using one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc tests. *** $p < 0.001$ vs. CT; ζζ $p < 0.01$; ζ $p < 0.05$ vs. LY294002.

2.9. Statistical analysis

Data are expressed as the mean \pm SEM of at least three experiments. In all experiments, data were analysed using the Bonferroni post hoc test. P values lower than 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. p38 and JNK inhibition attenuates LY294002-induced apoptosis in cerebellar granule cells

CGCs were exposed to 30 μ M of LY294002 for 24 h, and dose-response curves were generated with three inhibitors (see supplementary data). Cultured cells were pre-treated for 1 h with UO126 (10 μ M to 20 μ M), SB203580 (10 μ M to 20 μ M) or SP600125 (1 μ M to 10 μ M), ERK1/2, p38 and JNK inhibitors respectively. In order to identify the MAPK pathways involved in the apoptosis induced by LY294002, we analysed programmed cell death by phase contrast microscopy, picnotic nuclei by PI uptake, and DNA fragmentation by flow cytometry.

Phase contrast microscopy revealed that LY294002 induced loss of the neuronal dendritic network. This effect was prevented by SB203580 and SP600125, but not by UO126 (Fig. 1A). Using condensed nuclei counting, we confirmed these findings, observing that UO126 exerted no effect on LY294002 treatment while

SB203580 and SP600125 reduced picnotic nuclei from 30% to 11.5% and 19% respectively (Fig. 1B–D). Flow cytometry showed reductions in DNA fragmentation from 33.14% to 6.45% and 12.5% respectively (Fig. 1C–E).

Although in previous studies we reported that LY294002 does not induce JNK activation [16], here SP600125 exerted an anti-apoptotic effect on LY294002-induced apoptosis. This observation suggests that there may be another mechanism of action by which LY294002-mediated apoptosis may be prevented.

3.2. PI3K/AKT inhibition induced p38 activation

Treatment with 30 μ M LY294002 for 4 h led to a reduction of the protein levels of p-AKT at Ser473 (Fig. 2A). AKT regulates ASK1 by phosphorylating at Ser83. Immunoprecipitation assays were performed to study the effect of LY294002 treatment on ASK1 protein. The results showed a significant decrease in the phosphorylation state of ASK1 at Ser83 (Fig. 2B).

Given that SB203580 and SP600125 inhibited the apoptosis induced by LY294002 (Fig. 1), we measured JNK and p38 activity. JNK activity was not affected by LY294002 (Fig. 2C) after 4 h of treatment. In contrast, a significant increase in p38 activity was detected, and this increase was prevented by 20 μ M SB203580. Surprisingly 5 μ M SP600125 diminished p38 activity (Fig. 2D).

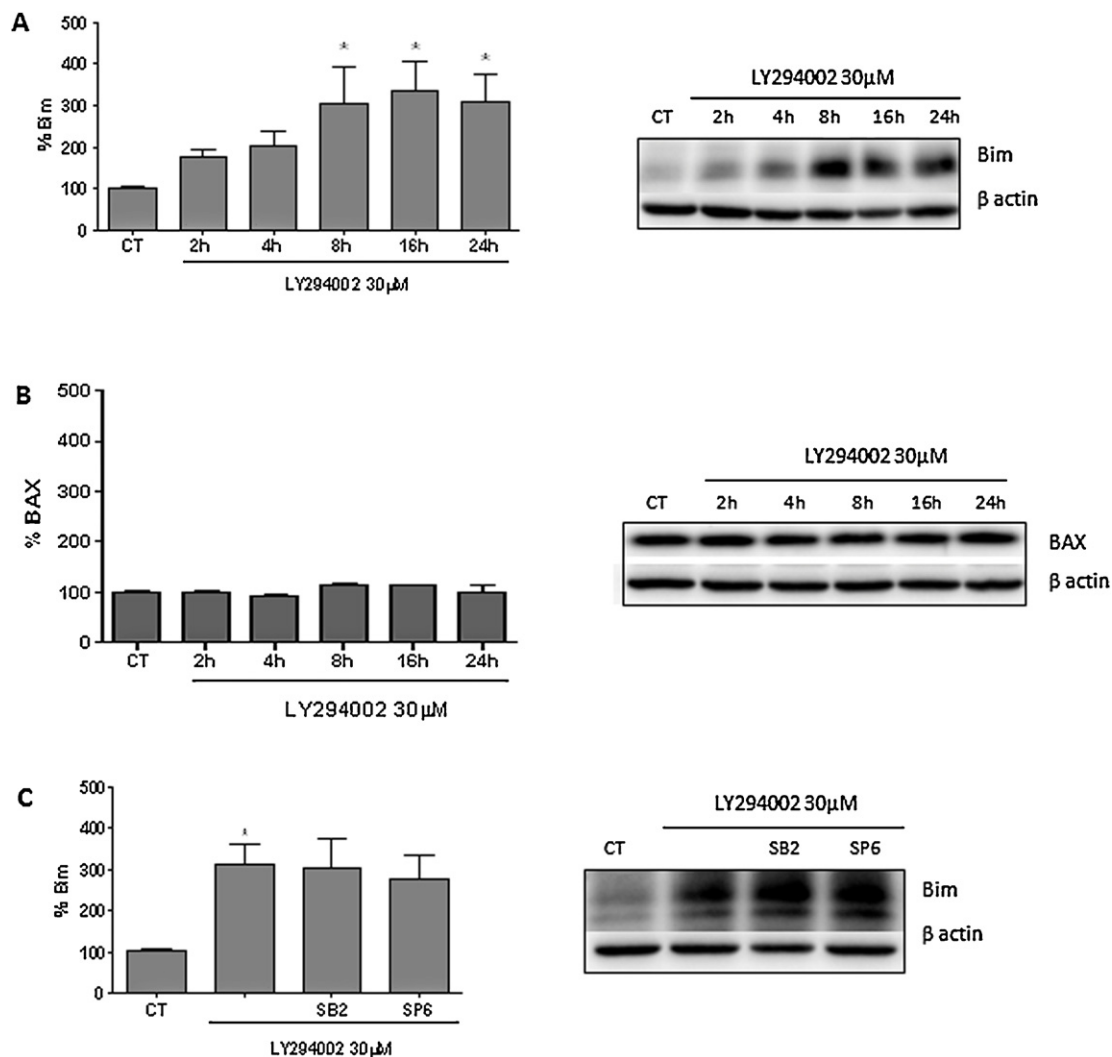


Fig. 6. Representative image of Bim (A) and BAX (B) protein levels after LY294002 treatment at different time points. (C) Protein levels of Bim in CGCs treated with LY294002 for 8 h and pretreated with SB203580 or SP600125. β -Actin was used as loading control. * $p < 0.05$ vs. CT.

These results suggest that the activation of p38 occurs in the early stages of apoptosis and that p38 is the main MAPK involved in LY294002-induced apoptosis in CGCs.

3.3. AKT inhibition is not involved in the neuroprotective effects of MAPK inhibitors

Using Western blot analysis, we studied the phosphorylation levels of AKT at Ser473 (active form of AKT). Neither SB203580 nor SP600125 treatment resulted in an increase in AKT phosphorylation (Fig. 3A).

Taking into account that GSK3 β is involved in LY294002-induced apoptosis and this enzyme is regulated by AKT, we examined whether the anti-apoptotic effects of SB203580 or SP600125 are partly caused by the inhibition of this enzyme. While SB203580 did not modify GSK3 β activity, SP600125 at 5 μ M was able to inhibit it (Fig. 3B). Therefore, these data demonstrate that the anti-apoptotic properties of SP600125 are due to blockade of two downstream pro-apoptotic AKT targets, namely p38 and GSK3 β .

3.4. Inhibition of p38 prevents the c-Jun stress response induced by LY294002 in cerebellar granule cells

LY294002 induced an increase in p-c-Jun Ser73 (Fig. 3C). We next addressed whether the induction of p-c-Jun was produced by

p38 stress response. For this purpose, we examined the effects of SB203580 and SP600125 on c-Jun phosphorylation after a 4 h exposure to LY294002. Both inhibitors blocked the induction of p-c-Jun (Fig. 4). These results suggest that p38 is the MAPK that regulates c-Jun phosphorylation in this apoptotic model.

3.5. Evaluation of the potential targets of c-Jun activation

After LY294002 treatment of CGCs for 4 h, we determined the gene expression of potential targets of c-Jun and members of AP1 family of proteins. ATF2 and c-fos belong to the AP1 family, and are able to dimerize with c-Jun to become active transcription factors. c-fos levels were significantly augmented by LY294002, an increase which was partially blocked by SB203580 and SP600125 (Fig. 5B). Furthermore, we also evaluated two potential targets of c-Jun, Dp5 and Bim. dp5 mRNA levels were significantly increased 4 h after the LY294002 treatment, an effect which was reversed upon p38 inhibition by SB203580 and SP600125 (Fig. 5C). Interestingly, while LY294002 treatment also significantly increased bim mRNA levels, p38 inhibitors did not prevent this increase (Fig. 5D). Similar results were obtained with the mRNA levels of Egr-1, an upstream regulator of bim (Fig. 5E). Thus, our data indicates that c-Jun regulates the transcription of dp5, but not of bim, in LY294002-mediated apoptosis in CGCs.

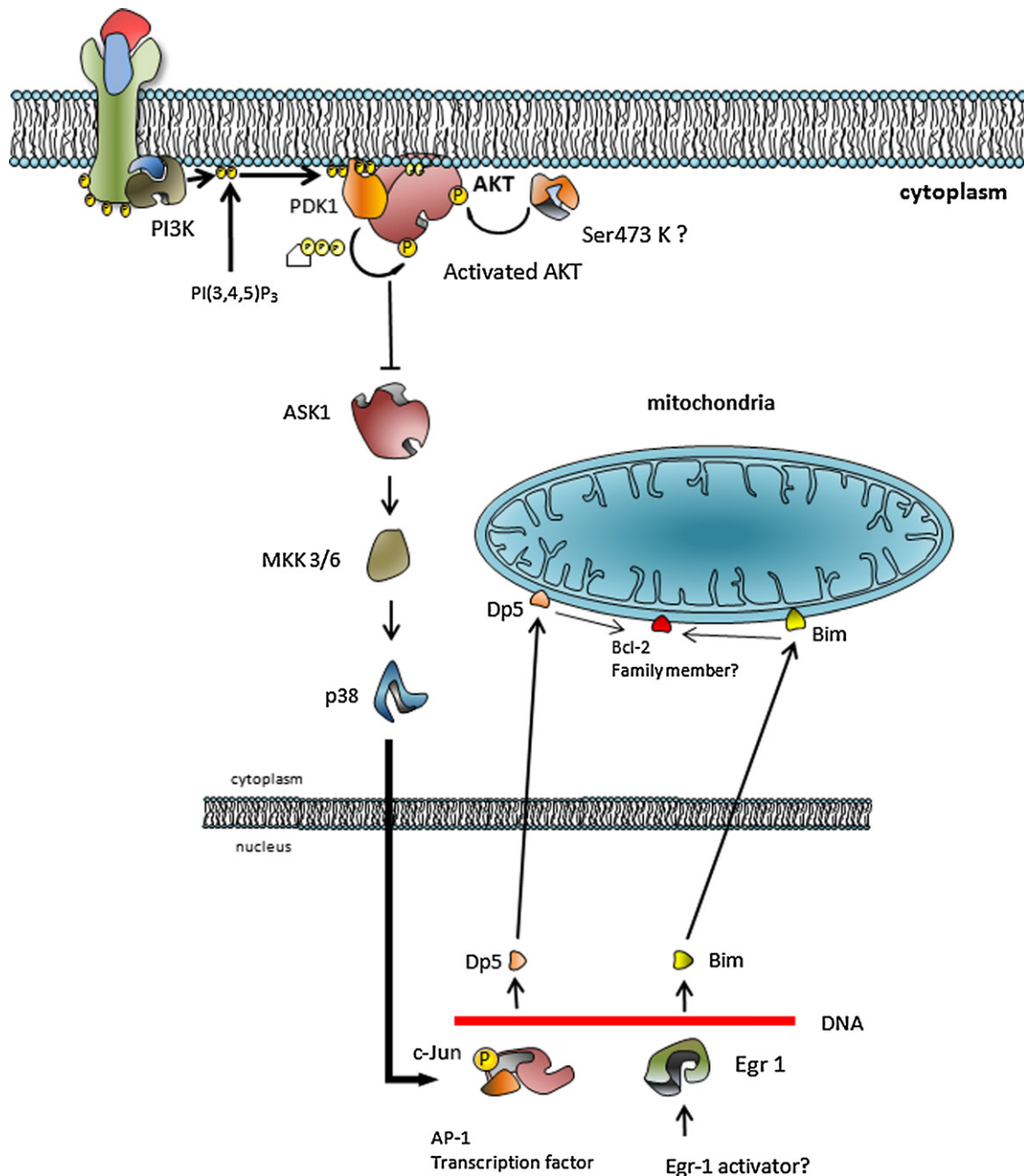


Fig. 7. Proposed mechanism of PI3/AKT inhibition-induced apoptosis. p38/c-Jun activation promotes the induction of *dp5* that may regulates the apoptotic process via the mitochondrial alteration.

BAX, another member of BH3-only family proteins, may play a role in the apoptosis induced by AKT inhibition. In fact, it was previously reported that CGCs cultures of *bax*^{-/-} mice were protected from apoptosis mediated by LY294002 [37]. However, our data indicates that the mRNA levels of Bax were unchanged in CGCs after LY294002 treatment (Fig. 5F).

3.6. BH3-only protein expression after LY294002-induced apoptosis in cerebellar granule cells

To study Bim and BAX protein levels, we subjected CGCs to a time course of LY294002 treatment. Bim expression rose from 8 h to 24 h (Fig. 6A), although this increase was not prevented by the pre-treatment of neurons with p38 inhibitors (Fig. 6B). In addition, we did not detect any change in BAX protein levels (Fig. 6C). These

observations suggest that neither Bim nor BAX are the principle targets in this apoptotic model (Fig. 7).

4. Discussion

The objectives of this study were to characterise the role of the MAPK signal transduction pathways underlying PI3 K/AKT inhibition-induced CGCs apoptosis and to identify the molecular mechanisms involved in this neuronal loss.

We demonstrate the following:

- The apoptotic process triggered by PI3 K/AKT inhibition is mediated by the p38/c-Jun/*dp5* mRNA signalling pathway. Neither JNK nor ERK1/2 are activated in this apoptotic model.

- (b) The anti-apoptotic effects of SP600125 are not mediated by JNK. This compound inhibited both p38 and GSK3 β .
- (c) No increase in BAX mRNA or protein expression or mitochondrial BAX translocation occurred after CGCs treatment with LY294002 (data not shown).

LY294002 induces apoptosis in neurons via a caspase-dependent process [15,16]. However, the mechanisms by which this PI3 K/AKT inhibitor induces CGCs apoptosis remain elusive. To the best of our knowledge, this study is the first to demonstrate a prominent role of p38 MAPK in LY294002-induced apoptosis in CGCs.

The activation of the MAPK apoptotic route in neurons has been demonstrated in other models, such as CGCs exposure to potassium deprivation, oxidative stress, as well as glutamate stimulation [23–30,37–42]. In contrast, here we show that p38 is the main MAPK involved in PI3 K inhibition-induced neuronal loss. Activation of p38 increased the phosphorylation of c-Jun protein and the mRNA expression of pro-apoptotic c-Jun targets, whereas inhibition of this MAPK using a specific inhibitor SB203580, led to a significant increase in cell survival. Compared to other experimental models involving MAPK activation, the activation of JNK seems to be irrelevant in LY294002-induced apoptosis. These findings suggest that the regulation of MAPK pathways differs depending on the cell type and possibly on environmental conditions.

In addition, we observed that the anti-apoptotic properties of SP600125, an inhibitor of all JNK isoforms, are mediated by the inhibition of p38 and GSK3 β activities. We studied possible mechanisms involved in SB203580 and SP600125 neuroprotection and examined the levels of phosphorylated AKT at Ser473 residue. Western blot data indicated that the neuroprotective effects of these compounds are not dependent on AKT, since neither inhibitor prevented the dephosphorylation of this enzyme. Moreover, our data demonstrate that UO126, an inhibitor of ERK1/2, did not have the capacity to block apoptosis following PI3 K inhibition. These data, together with the Western blot analysis showing no change in the ERK1/2 signalling pathway after LY294002 treatment (see [supplementary data](#)), allows us to discard the participation of ERK1/2 in this apoptotic model.

Next, we considered the genes regulated by c-Jun, as they are the targets of the MAPK pathway. c-Jun is a transcription factor that participates in apoptosis by regulating several pro-apoptotic genes, most notably the BH3-only Bcl-2 family members [43–54]. Moreover, c-Jun is a well-characterised member of the AP1 family of transcription factors, which also include c-Fos and ATF2 [44,47,48]. We found that the phosphorylation levels of c-Jun at Ser73 were increased after the treatment of CGCs by LY294002, and that both SB203580 and SP600125 prevented c-Jun phosphorylation. Likewise, LY294002 treatment resulted in an increase of c-Fos mRNA, whereas the two p38 inhibitors blocked this increase. In contrast, ATF2 mRNA levels were not affected by LY294002.

Two genes, *dp5* and *bim*, have AP1 binding sites on their promoters, and transcription appears to be regulated by c-Jun [29,41,44,47–53]. Our results show that although LY294002 enhances *bim* mRNA and protein expression, neither of the two p38 inhibitors are able to block *bim* mRNA transcription. These data are in agreement with *Egr-1* mRNA transcription, suggesting that *Egr-1*, and not c-Jun, is involved in *Bim* regulation, as described previously [53]. Therefore, we conclude that the BH3-only protein Bim does not play a key role in this apoptotic model.

Thus, in the models of sympathetic neurons deprived of Nerve Growth Factor, CGCs deprived of potassium, cortical neurons exposed to β -amyloid protein, and in spinal cord injury triggered by trauma, *dp5* is induced in a JNK pathway-dependent manner [35,38,44,45]. However, our study is the first one to show a specific

p38-mediated regulation of *dp5*, as demonstrated by abrogation of *dp5* mRNA expression by p38 pharmacological inhibitors.

Another important question regards the mechanisms by which the BH3-only proteins, such as Dp5, mediate CGCs death. It has been proposed that Dp5 binding to Bax may induce conformational changes in Bax, thus allowing Bax dimer formation [35,43,44]. Another potential mechanism of dimerization is the sequestration of anti-apoptotic family members such as Bcl-2. Additionally, Dp5 could mediate apoptosis directly, by releasing pro-apoptotic mitochondrial proteins [29,35,44]. Bax is another Bcl-2 protein related to CGCs apoptosis; however, our results suggest that Bax protein expression in CGCs is not affected by treatment with LY294002. Thus, our results do not necessarily support earlier reports showing that LY294002-induced neuronal apoptosis in CGCs occurs in a Bax-dependent manner [37]. Therefore, how *dp5* induces programmed cell death remains to be clarified.

5. Conclusions

Taken together, our findings demonstrate that p38 MAPK is activated in rat CGC cultures exposed to LY294002, while JNK and ERK1/2 are not. Specific inhibition of p38 with SB203580 exerts a significant neuroprotective effect, which is associated with a decrease in c-Jun phosphorylation and in the mRNA expression of downstream pro-apoptotic target *dp5*. Therefore, *dp5* may link c-Jun transactivation and neuronal apoptosis [29,35,43]. Our data suggest that *dp5* could be a direct target of c-Jun and that it may play an important role in the induction of apoptosis by LY294002 in CGCs. We hypothesize that targeting of p38 signalling in rat neurons could be of therapeutic benefit in the prevention of apoptosis in neurological disorders.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Acknowledgments

This study was funded by grant 2009/SGR00853 from the *Generalitat de Catalunya* (Autonomous Government of Catalonia), by grants BFU/2009-08352, BFU2010-19119/BFI, SAF2011-23631 and SAF2009-13093 from the Spanish *Ministerio de Ciencia e Innovación*, grant PI080400 and PS09/01789 from the *Instituto de Salud Carlos III*. SEP-CONACYT grant 000177594 (CBZ) and grant 610RT0405 from the *Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo* (CYTED).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2013.01.007>.

References

- [1] Rugarli EI, Langer T. Mitochondrial quality control: a matter of life and death for neurons. *EMBO Journal* 2012;31:1336–49.
- [2] Alberio T, Lopiano L, Fasano M. Cellular models to investigate biochemical pathways in Parkinson's disease. *FEBS Journal* 2012;279:1146–55.
- [3] Diwakarla S, Nagley P, Hughes ML, Chen B, Beart PM. Differential insult-dependent recruitment of the intrinsic mitochondrial pathway during neuronal programmed cell death. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2009;66:156–72.
- [4] Chang KH, de Pablo Y, Lee HP, Lee HG, Smith MA, Shah K. Cdk5 is a major regulator of p38 cascade: relevance to neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry* 2010;113:1221–9.
- [5] Sureda FX, Junyent F, Verdaguer E, Auladell C, Pelegri C, Vilaplana J, et al. Anti-apoptotic drugs: a therapeutic strategy for the prevention of neurodegenerative diseases. *Current Pharmaceutical Design* 2011;17:230–45.

- [6] Pezzino S, Paratore S, Cavallaro S. Systems biology of apoptosis and survival: implications for drug development. *Current Pharmaceutical Design* 2011;17:190–203.
- [7] Chan CB, Ye K. Phosphoinositide 3-kinase enhancer (PIKE) in the brain: is it simply a phosphoinositide 3-kinase/Akt enhancer? *Reviews in the Neurosciences* 2012;23:153–61.
- [8] Wang G, Pan J, Chen SD. Kinases and kinase signaling pathways: potential therapeutic targets in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology* 2012;98:207–21.
- [9] Emamian ES. AKT/GSK3 signaling pathway and schizophrenia. *Front Molecular Neuroscience* 2012;5:33.
- [10] Shioda N, Han F, Fukunaga K. Role of Akt and ERK signaling in the neurogenesis following brain ischemia. *International Review of Neurobiology* 2009;85:375–438.
- [11] Endersby R, Baker SJ. PTEN signaling in brain: neuropathology and tumorigenesis. *Oncogene* 2008;27:5416–30.
- [12] Knight ZA. Small molecule inhibitors of the PI3-kinase family. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 2010;347:263–78.
- [13] Djordjevic S, Driscoll PC. Structural insight into substrate specificity and regulatory mechanisms of phosphoinositide 3-kinases. *Trends in Biochemical Sciences* 2002;27:426–32.
- [14] Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Ahmadi K, Timms J, Katso R, Driscoll PC, et al. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annual Review of Biochemistry* 2001;70:535–602.
- [15] de la Torre AV, Junyent F, Folch J, Pelegrí C, Vilaplana J, Auladell C, et al. GSK3 β inhibition is involved in the neuroprotective effects of cyclin-dependent kinase inhibitors in neurons. *Pharmacological Research* 2012;65:66–73.
- [16] Vazquez de la Torre A, Junyent F, Folch J, Pelegrí C, Vilaplana J, Auladell C, et al. Study of the pathways involved in apoptosis induced by PI3K inhibition in cerebellar granule neurons. *Neurochemistry International* 2011;59:159–67.
- [17] Shimoke K, Yamagishi S, Yamada M, Ikeuchi T, Hatanaka H. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity elevates c-Jun N-terminal kinase activity in apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *Brain Research Developmental Brain Research* 1999;112:245–53.
- [18] Miller TM, Tansey MG, Johnson Jr EM, Creedon DJ. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity blocks depolarization- and insulin-like growth factor I-mediated survival of cerebellar granule cells. *Journal of Biological Chemistry* 1997;272:9847–53.
- [19] Davies C, Tournier C. Exploring the function of the JNK (c-Jun N-terminal kinase) signalling pathway in physiological and pathological processes to design novel therapeutic strategies. *Biochemical Society Transactions* 2012;40:85–9.
- [20] Miloso M, Scuteri A, Foudah D, Tredici G. MAPKs as mediators of cell fate determination: an approach to neurodegenerative diseases. *Current Medicinal Chemistry* 2008;15:538–48.
- [21] Borsello T, Forloni G. JNK signalling: a possible target to prevent neurodegeneration. *Current Pharmaceutical Design* 2007;13:1875–86.
- [22] Antoniou X, Falconi M, Di Marino D, Borsello T. JNK3 as a therapeutic target for neurodegenerative diseases. *Journal of Alzheimers Disease* 2011;24:633–42.
- [23] Ramiro-Cortés Y, Morán J. Role of oxidative stress and JNK pathway in apoptotic death induced by potassium deprivation and staurosporine in cerebellar granule neurons. *Neurochemistry International* 2009;55:581–92.
- [24] Repici M, Mare L, Colombo A, Ploia C, Sclip A, Bonny C, et al. c-Jun N-terminal kinase binding domain-dependent phosphorylation of mitogen-activated protein kinase kinase 4 and mitogen-activated protein kinase kinase 7 and balancing cross-talk between c-Jun N-terminal kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways in cortical neurons. *Neuroscience* 2009;159:94–103.
- [25] Le SS, Loucks FA, Udo H, Richardson-Burns S, Phelps RA, Bouchard RJ, et al. Inhibition of Rac GTPase triggers a c-Jun- and Bim-dependent mitochondrial apoptotic cascade in cerebellar granule neurons. *Journal of Neurochemistry* 2005;94:1025–39.
- [26] Shi L, Gong S, Yuan Z, Ma C, Liu Y, Wang C, et al. Activity deprivation-dependent induction of the proapoptotic BH3-only protein Bim is independent of JNK/c-Jun activation during apoptosis in cerebellar granule neurons. *Neuroscience Letters* 2005;375:7–12.
- [27] Enguita M, DeGregorio-Rocasolano N, Abad A, Trullas R. Glycogen synthase kinase 3 activity mediates neuronal pentraxin 1 expression and cell death induced by potassium deprivation in cerebellar granule cells. *Molecular Pharmacology* 2005;67:1237–46.
- [28] Berra E, Diaz-Meco MT, Moscat J. The activation of p38 and apoptosis by the inhibition of Erk is antagonized by the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Journal of Biological Chemistry* 1998;273:10792–7.
- [29] Ma C, Ying C, Yuan Z, Song B, Li D, Liu Y, et al. dp5/HRK is a c-Jun target gene and required for apoptosis induced by potassium deprivation in cerebellar granule neurons. *Journal of Biological Chemistry* 2007;282:30901–9.
- [30] Yamagishi S, Matsumoto T, Yokomaku D, Hatanaka H, Shimoke K, Yamada M, et al. Comparison of inhibitory effects of brain-derived neurotrophic factor and insulin-like growth factor on low potassium-induced apoptosis and activation of p38 MAPK and c-Jun in cultured cerebellar granule neurons. *Brain Research Molecular Brain Research* 2003;119:184–91.
- [31] Zhao LZ, Su XW, Huang YJ, Qiu PX, Yan GM. Activation of c-Jun and suppression of phospho-p44/42 were involved in diphenylhydantoin-induced apoptosis of cultured rat cerebellar granule neurons. *Acta Pharmacologica Sinica* 2003;24:539–48.
- [32] Chen L, Liu L, Yin J, Luo Y, Huang S. Hydrogen peroxide-induced neuronal apoptosis is associated with inhibition of protein phosphatase 2A and 5, leading to activation of MAPK pathway. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2009;41:1284–95.
- [33] Giordano G, Klintworth HM, Kavanagh TJ, Costa LG. Apoptosis induced by domoic acid in mouse cerebellar granule neurons involves activation of p38 and JNK MAP kinases. *Neurochemistry International* 2008;52:1100–5.
- [34] Chen RW, Qin ZH, Ren M, Kanai H, Chalecka-Franaszek E, Leeds P, et al. Regulation of c-Jun N-terminal kinase, p38 kinase and AP-1 DNA binding in cultured brain neurons: roles in glutamate excitotoxicity and lithium neuroprotection. *Journal of Neurochemistry* 2003;84:566–75.
- [35] Hoppo L, Strasser A, Cory S. BH3-only proteins in apoptosis at a glance. *Journal of Cell Science* 2012;125:1081–7.
- [36] Jordà EG, Jiménez A, Verdaguier E, Canudas AM, Folch J, Sureda FX, et al. Evidence in favour of a role for peripheral-type benzodiazepine receptor ligands in amplification of neuronal apoptosis. *Apoptosis* 2005;10:91–104.
- [37] Miller TM, Moulder KL, Knudson CM, Creedon DJ, Deshmukh M, Korsmeyer SJ, et al. Bax deletion further orders the cell death pathway in cerebellar granule cells and suggests a caspase-independent pathway to cell death. *Journal of Cell Biology* 1997;139:205–17.
- [38] Müller GJ, Geist MA, Veng LM, Willesen MG, Johansen FF, Leist M, et al. A role for mixed lineage kinases in granule cell apoptosis induced by cytoskeletal disruption. *Journal of Neurochemistry* 2006;96:1242–52.
- [39] Ginham R, Harrison DC, Facci L, Skaper S, Philpott KL. Upregulation of death pathway molecules in rat cerebellar granule neurons undergoing apoptosis. *Neuroscience Letters* 2001;302:113–6.
- [40] Yamagishi S, Yamada M, Ishikawa Y, Matsumoto T, Ikeuchi T, Hatanaka H. p38 mitogen-activated protein kinase regulates low potassium-induced c-Jun phosphorylation and apoptosis in cultured cerebellar granule neurons. *Journal of Biological Chemistry* 2001;276:5129–33.
- [41] Subramaniam S, Strelau J, Unsicker K. Growth differentiation factor-15 prevents low potassium-induced cell death of cerebellar granule neurons by differential regulation of Akt and ERK pathways. *Journal of Biological Chemistry* 2003;278:8904–12.
- [42] Ham J, Eilers A, Whitfield J, Neame SJ, Shah B. c-Jun and the transcriptional control of neuronal apoptosis. *Biochemical Pharmacology* 2000;60:1015–21.
- [43] Towers E, Gilley J, Randall R, Hughes R, Kristiansen M, Ham J. The proapoptotic dp5 gene is a direct target of the MLK-JNK-c-Jun pathway in sympathetic neurons. *Nucleic Acids Research* 2009;37:3044–60.
- [44] Harris CA, Johnson Jr EM. BH3-only Bcl-2 family members are coordinately regulated by the JNK pathway and require Bax to induce apoptosis in neurons. *Journal of Biological Chemistry* 2001;276:37754–43760.
- [45] Young JE, Garden GA, Martinez RA, Tanaka F, Sandoval CM, Smith AC, et al. Polyglutamine-expanded androgen receptor truncation fragments activate a Bax-dependent apoptotic cascade mediated by DP5/Hrk. *Journal of Neuroscience* 2009;29:1987–97.
- [46] Harris CA, Maroney AC, Johnson Jr EM. Identification of JNK-dependent and -independent components of cerebellar granule neuron apoptosis. *Journal of Neurochemistry* 2002;83:992–1001.
- [47] Putcha GV, Harris CA, Moulder KL, Easton RM, Thompson CB, Johnson Jr EM. Intrinsic and extrinsic pathway signaling during neuronal apoptosis: lessons from the analysis of mutant mice. *Journal of Cell Biology* 2002;157:441–53.
- [48] Putcha GV, Moulder KL, Golden JP, Bouillet P, Adams JA, Strasser A, et al. Induction of BIM, a proapoptotic BH3-only BCL-2 family member, is critical for neuronal apoptosis. *Neuron* 2001;29:615–28.
- [49] Ren D, Tu HC, Kim H, Wang GX, Bean GR, Takeuchi O, et al. BID, BIM, and PUMA are essential for activation of the BAX- and BAK-dependent cell death program. *Science* 2010;330:1390–3.
- [50] Biswas SC, Shi Y, Vonsattel JP, Leung CL, Troy CM, Greene LA. Bim is elevated in Alzheimer's disease neurons and is required for beta-amyloid-induced neuronal apoptosis. *Journal of Neuroscience* 2007;27:893–900.
- [51] Becker EB, Howell J, Kodama Y, Barker PA, Bonni A. Characterization of the c-Jun N-terminal kinase-BimEL signaling pathway in neuronal apoptosis. *Journal of Neuroscience* 2004;24:8762–70.
- [52] Putcha GV, Le S, Frank S, Besirli CG, Clark K, Chu B, et al. JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis. *Neuron* 2003;38:899–914.
- [53] Xie B, Wang C, Zheng Z, Song B, Ma C, Thiel G, et al. Egr-1 transactivates Bim gene expression to promote neuronal apoptosis. *Journal of Neuroscience* 2011;31:5032–44.
- [54] Song B, Xie B, Wang C, Li M. c-Jun induction is independent of early growth response factor during cerebellar granule neuron apoptosis. *Neuroreport* 2012;23:67–72.

Discusión

“Los límites del alma no los hallarás andando, cualquier camino que recorras; tan profundo es su fundamento”

Heráclito de Éfeso; Los límites del alma

Discusión

La apoptosis es el principal mecanismo de muerte neuronal en las enfermedades neurodegenerativas (Fuchs Y, Steller H 2011) es por ello que es especialmente importante profundizar en el conocimiento de las vías implicadas en la apoptosis neuronal. Las alteraciones en la vía de los inositoles fosfato se han descrito como uno de los posibles desencadenantes de la apoptosis en enfermedades como el Parkinson, Huntington o el Alzheimer (Caragounis A et al. 2007; Duronio V 2008; Saavedra A et al. 2010; Mattson MP 2000).

Para el estudio de esta vía se ha utilizado el LY2940002 como inhibidor farmacológico de la PI3K, la inhibición de la PI3K produce una muerte celular por apoptosis en cultivos de CGCs tal y como muestran los resultados obtenidos por nuestro grupo así como otros grupos (Kamada H et al. 2007; Hirai K et al. 2004).

Según Miller y colaboradores la apoptosis inducida por LY294002 u otros inhibidores de la PI3K como la Wortmanina, desencadenarían el mismo mecanismo apoptótico que el producido por la deprivación de S/K^+ , ya que las concentraciones despolarizantes de potasio o los factores neurotróficos producirían sus efectos prosupervivencia por la activación de la PI3K (Miller TM et al. 1997).

Aunque nuestros resultados muestran que en ambos modelos existen algunos elementos comunes como la inhibición de la PI3K que conduce a la inactivación de AKT y por tanto a una desfosforilación de GSK3 β en Ser9, una proteína que está frecuentemente relacionada con la apoptosis en numerosos modelos neuronales (Pap M, Cooper GM 1998; Ferrer I et al. 2002; Enguita M et al. 2005). Los resultados obtenidos mediante el ensayo de actividad de GSK3 β así como la degradación de β catenina confirman el papel de GSK3 β en ambos modelos. A pesar de estas similitudes nuestros estudios muestran que existen importantes diferencias bioquímicas en el proceso apoptótico desencadenado en ellos.

En primer lugar encontramos diferencias en el patrón de activación de caspasas, si bien la caspasa 9 se encuentra activa en ambos modelos el incremento de la actividad es muy superior en el caso de la deprivación de S/K^+ respecto al producido por LY294002. Zhou H y colaboradores demostraron que AKT regula la activación de la caspasa 9 tanto a nivel pre como postmitocondrial, por ejemplo a través de la fosforilación de Bad que participa en la inhibición de Bcl-2, proteína proapoptótica (Kamada H et al. 2007; Datta SR et al. 1997; Gleichmann M et al. 2000), además AKT participa directamente en la regulación de la formación del apoptosoma a través de dos mecanismos, el primero mediante la fosforilación de Apaf-1 lo que dificulta su oligomerización para formar el apoptosoma (Zhou H et al. 2000) el segundo a través de la fosforilación directa de la caspasa 9 dificultando igualmente la formación del apoptosoma (Cardone MH et al. 1998). Es posible que la inhibición de AKT producida por LY294002 sea suficiente para producir una cierta activación de la caspasa 9 pero que esta se dé de manera más gradual que en el caso de la deprivación de S/K^+ donde la intervención de distintas rutas bioquímicas como la vía intrínseca o la producción de ROS potencian la liberación del citocromo C al citoplasma y la consiguiente activación de la caspasa 9 (Galluzzi L et al. 2009).

En el caso de las caspasas efectoras nuestros resultados indican diferencias entre el modelo de deprivación de S/K^+ y el de LY294002 ya que si bien encontramos una activación de la caspasa 6 en los dos casos no sucede lo mismo con respecto a la caspasa 3 que no participa en la apoptosis inducida por LY294002, como claramente muestran los ensayos de actividad caspasa y de degradación de la α -espectrina, donde no encontramos la aparición del fragmento de 120 KDa que se asocia a la actividad casapa 3. Estos resultados son coherentes con los anteriormente comentados acerca de la caspasa 9 en el modelo de LY294002, los bajos niveles de actividad de esta caspasa podrían no ser suficientes para producir una activación de caspasa 3 en el tiempo de exposición estudiado (24h), además se ha demostrado que otros mecanismos como el mediado por la activación de Fas, que lleva a su vez a la activación de caspasa 8 tienen un papel clave en la activación de la caspasa 3 (Kuramoto N et al. 2011), este mecanismo presumiblemente no se encuentra implicado en la apoptosis inducida por LY294002 ya que la inhibición de la PI3K no interfiere con los receptores asociados a la vía extrínseca como el Fas (Beier CP et al. 2005). Por otro lado la caspasa 6 se ha descrito como la principal caspasa efectora en algunos trastornos neurodegenerativos

(Allsopp TE et al. 2000; Graham RK et al. 2011) y una de las responsables de la degradación de las estructuras nucleares y condensación de la cromatina (Eguchi R et al. 2009).

También existen diferencias con respecto a las calpaínas, otro grupo de proteasas dependientes de Ca^{2+} , relacionadas con la degradación de distintos elementos celulares durante el proceso apoptótico en modelos de excitotoxicidad por ácido kaínico (Verdaguer E et al. 2005) o la deprivación de S/K^+ (Nath R et al. 1996). En el caso de la deprivación de S/K^+ se evidencia la participación de las calpaínas en la degradación de α -espectrina donde aparece el fragmento de 145 KDa, o la degradación de la proteína p35 a p25, hecho indicador de la liberación de CDK5 al citoplasma y que resulta en la fosforilación de sustratos relacionados con la apoptosis y la muerte neuronal como la fosforilación de la proteína Tau, entre otros (Lopes JP et al. 2007). En el modelo de apoptosis por LY294002 no se observa el fragmento de 145 KDa de α -espectrina ni el fragmento p25 indicador de la liberación de CDK5 al citoplasma. Esto se correlacionaría con los resultados obtenidos por Miller y colaboradores según los cuales LY294002 no produce cambios en la concentración de Ca^{2+} citoplasmáticos en CGC (Miller TM et al. 1997). Dado que la actividad de las calpains está controlada por la presencia de Ca^{2+} citoplasmático (Volbracht C et al. 2005), sería necesaria la existencia de algún mecanismo mediante el cual se pudiera producir una movilización de Ca^{2+} en las fases iniciales de la apoptosis desde los reservorios intracelulares, como son el retículo endoplásmico o la mitocondria. Sin embargo, la inhibición de la PI3K produce un descenso en los niveles de $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$, que es el sustrato de la fosfolipasa C (PLC) y lo hidroliza liberando inositol trifosfato (IP_3). Este induce el paso de Ca^{2+} desde el RER (retículo endoplasmático) hasta el citoplasma (Kopil CM et al. 2012), este hecho puede constituir una explicación para la ausencia de activación de las calpaínas en el modelo de apoptosis por LY294002.

Otro de los elementos implicados en la apoptosis neuronal y que más se ha relacionado con el mecanismo fisiopatológico de muchas enfermedades neurodegenerativas es la reentrada en el ciclo celular de las neuronas (Copani A et al. 2002; Bonda DJ et al. 2010; Yang Y et al. 2003). Según esta hipótesis, el estrés oxidativo o los procesos inflamatorios crónicos son causantes del daño en el material genético, esto produce una entrada ectópica en el ciclo celular como mecanismo de reparación del DNA (Zhang Z et al. 2010; Copani A et al. 2008). Sin embargo, las neuronas postmitóticas altamente

diferenciadas carecen de la maquinaria celular necesaria para completar el ciclo, lo que las lleva a la apoptosis (Herrup K et al 2004).

En el modelo de la deprivación de S/K^+ se observa un incremento en los niveles de fosforilación de la proteína del retinoblastoma (Rb) en el residuo Ser780 que produce la liberación e incremento de expresión del factor de transcripción E2F1 (Verdaguer E et al. 2005; Chau BN et al. 2006), este factor forma parte de la maquinaria de control del ciclo celular y es un primer paso básico para superar el punto de restricción de la fase G_1 y permitir la progresión hacia la fase de síntesis (fase S) del ciclo (Serrano M et al. 1993). Además la deprivación de S/K^+ produce un aumento de la expresión de las ciclinas, como ciclina D1 o E, así como la de CDKs como CDK2 y 4 (Verdaguer E et al. 2003; Sakai K et al. 1999). Este hecho viene acompañado por un incremento en la síntesis de DNA como muestran los resultados de la prueba de incorporación de la BrdU. Todos estos datos en conjunto, unidos al hecho que inhibidores de CDKs como Roscovitina y Flavopiridol muestran una clara protección de la apoptosis en la deprivación de S/K^+ (Verdaguer E et al. 2004; Appert-Collin A et al. 2006) confirman la implicación del ciclo celular en este modelo apoptótico.

Por el contrario, si bien la fosforilación de Rb en Ser780 aparece en ambos modelos, tanto en la deprivación de S/K^+ como con el tratamiento con LY294002, lo cierto es que las similitudes respecto a las proteínas implicadas en el ciclo celular terminan en este punto, ya que la inhibición de la PI3K por LY294002 no conduce a cambios en la expresión de ciclinas ni de CDKs así como tampoco a un incremento en la incorporación de la BrdU. Una posible explicación a porqué se produce una fosforilación de Rb con el tratamiento con LY294002, podría ser que en este modelo la MAPK p38 mediase la fosforilación de Rb, cuya activación también ha sido descrita en la apoptosis inducida por LY294002 (Yamagishi S et al. 2003). Esta proteína se ha postulado que fosforila a Rb en enfermedades neurodegenerativas. Algunos autores sostienen que la fosforilación de Rb en diferentes residuos es la que modula el tipo de respuesta que desencadena, pudiendo ser apoptótica o de división celular según la proteína que lo fosforile (Yeste-Velasco M et al. 2009; Delston RB et al. 2011). Sin embargo, no deja de ser sorprendente que pese a las importantes diferencias existentes entre ambos respecto al ciclo celular, los inhibidores de CDKs como el Flavopiridol y

Roscovitina sean capaces de revertir de manera significativa la apoptosis inducida por LY294002 al igual que sucede al compararlo con el modelo de la deprivación de S/K⁺. A pesar de producirse esta fosforilación de Rb nuestros resultados indican que esta fosforilación tiene un papel claramente distinto en ambos modelos, ya que la implicación del ciclo celular en la apoptosis inducida por LY294002 puede ser descartada.

Por otro lado, se ha descrito que el Flavopiridol es capaz también de inhibir, a dosis más elevadas que las necesarias para inhibir a CDKs a la proteína GSK3 β , implicada en la apoptosis neuronal (Cohen-Solal KA et al. 2011) y que podría constituir un mecanismo común de apoptosis, ya que en ambos modelos se produce una desfosforilación del residuo Ser9. El empleo de inhibidores de CDKs en ensayos clínicos se ha centrado hasta ahora en pacientes afectados por distintos tipos de cáncer (Cicenas J, Valius M 2011). Sin embargo, su uso también está documentado en numerosos modelos *in vitro* de muerte neuronal (Hilton GD et al. 2008; Johnson K et al. 2005; Malumbres M et al. 2007).

Los resultados obtenidos por Western Blot muestran que, tanto Flavopiridol como Roscovitina logran revertir significativamente la desfosforilación en el residuo Ser9 y por consiguiente reducir la actividad GSK3 β . Para confirmar estos resultados se llevaron a cabo ensayos de actividad de GSK3 β que confirman que no solo Flavopiridol sino también otros inhibidores de CDKs como la Roscovitina son capaces de inhibir GSK3 β , si bien esta inhibición no es tan potente como la producida por el inhibidor específico SB415286. La existencia previa de referencias respecto a este mecanismo de acción en el caso del Flavopiridol y los resultados obtenidos con la Roscovitina hacen que cobre especial interés el estudio y desarrollo de fármacos con esta doble función ya que tanto la expresión ectópica de proteínas del ciclo celular como el papel apoptótico de GSK3 β en las enfermedades neurodegenerativas ha sido ampliamente descrito durante los últimos años (Hooper C et al. 2008; Linseman DA et al. 2004; Copani A et al. 2008).

Además, nuestros resultados muestran que estos fármacos no producen una reversión de la desfosforilación de AKT en Ser473 por lo que no ejercen ningún efecto directo sobre

AKT ni la cinasa responsable de esta fosforilación. Este resultado coincide con la bibliografía previa según la cual la inhibición de las vías apoptóticas reguladas por AKT es suficiente para obtener un efecto neuroprotector sin que sea necesaria la activación de AKT (Dudek H et al. 1997). Igualmente se puede descartar un efecto sobre c-Jun, este factor de transcripción juega un papel central en la apoptosis en CGC en numerosos modelos entre ellos la excitotoxicidad por NMDA, ácido kaínico, glutamato o por el modelo de privación de S/K^+ (Spigolon G et al. 2010; Fan J et al. 2012; Ahn YM et al. 2009; Eminel S et al. 2008; Harris C et al. 2002), sin embargo, a pesar de que el tratamiento con LY294002 si induce un incremento en los niveles de fosforilación de c-Jun, los resultados indican que ni Flavopiridol ni Roscovitina median sus efectos a través de él, ya que el pretatamiento de CGCs con estos inhibidores de CDKs no previene la fosforilación de c-Jun en Ser73, que corresponde a la forma activa de c-Jun (Ham J 2000; Raivic G 2008).

La vía de la PI3K/AKT regula a la vía de las MAPKs mediante su acción sobre MAP3Ks, la activación de estas últimas termina con la fosforilación de las MAPKs entre las que se encuentran las conocidas como SAPK, JNK y p38 (Manning BD, Kim AH et al. 2001; Park KM et al. 2002). El tratamiento con BDNF o con IGF-1 entre otros, lleva a la activación de PI3K y de AKT que es la responsable de la fosforilación de ASK1 en su residuo Ser83 (Kim AH et al. 2001) la pérdida de esta fosforilación permite, junto con otros eventos, la formación del signalosoma activo que conduce a la activación de las MAPKs (Noguchi T et al. 2005). Nuestros resultados de inmunoprecipitación de ASK1 muestran que, tras el tratamiento con LY294002 se produce una rápida pérdida de la fosforilación de ASK1 en Ser83, lo que demuestra la relación entre la inhibición de la vía de los inositoles fosfato con la de las MAPKs y tiene una especial importancia a la hora de relacionar el mecanismo apoptótico que se produce con el tratamiento con LY294002, con el que se desencadena en algunas enfermedades neurodegenerativas donde se considera que ASK1 juega un papel importante en respuesta a especies reactivas de oxígeno (ROS), inflamación o en la enfermedad de Huntington, dónde está implicada en la toxicidad producida por la huntingtina mutada. También se ha descrito en la enfermedad de Alzheimer, donde parece ser que la toxicidad de las placas de β amiloide está, al menos en parte, mediada por la capacidad del β amiloide para activar ASK1, la cual actuará sobre MKK6 y finalmente sobre p38 (Hayakawa R et al. 2012). ASK1 regula las repuestas al estrés a

través de las MAPKs JNK y p38, ambas proteínas son potenciales activadores de c-Jun (Ichijo H et al. 1997; Takeda K et al. 2008).

Estudios previos apuntan a la importancia de p38 en la fosforilación de c-Jun en la apoptosis inducida por la deprivación de S/K⁺ (Yamagishi S et al 2001; Chang KH et al. 2010; Chen RW et al. 2003), los mismos autores afirman que p38 no está implicada en la apoptosis inducida por LY294002 (Shimoke K et al. 1999) y que es JNK la MAPK responsable de la fosforilación de c-Jun en este modelo. Posteriores publicaciones apuntan en la dirección contraria, afirmando que en condiciones de deprivación de S/K⁺ o con LY294002 si se produce un incremento de la fosforilación de p38 mediado por ASK1 (Yamagishi S et al. 2003). Estos estudios no llegan a concluir el mecanismo por el cual la fosforilación de p38 lleva a la apoptosis, pues no se muestran dianas transcritas por c-Jun. Así pues, resulta de interés clarificar el papel de p38 en la fosforilación de c-Jun en CGCs.

El ensayo de ambas SAPK (JNK y p38), mostró un incremento significativo de la actividad p38 tras 2h de tratamiento con LY294002. Sin embargo, nuestros resultados no muestran un incremento de la actividad ni cambios en la fosforilación de JNK en la respuesta inducida por LY294002, además, los cultivos de CGCs knockout para *jnk3*, la isoforma mayoritaria de la familia de JNK en el cerebro (Keshet Y, Seger R et al. 2010), no muestran protección frente a la apoptosis inducida por LY294002 pero si frente a la deprivación de S/K⁺. Este resultado apoya el hecho que JNK está implicada en la apoptosis inducida por la deprivación de S/K⁺, descrito por otros autores (Shi L et al. 2005; Xifró X et al. 2006) pero no en el tratamiento con LY294002.

Referente a si p38 tiene un papel en la fosforilación de c-Jun, cabe destacar que el uso de un inhibidor de p38, el SB203580, es capaz de prevenir la fosforilación de c-Jun, este efecto se repite también con un inhibidor de JNK como es el SP600125. Sin embargo, este fármaco muestra una actividad inhibitoria sobre p38 a las mismas dosis a las que es capaz de inhibir JNK. Además, dado que el tratamiento con LY294002 no induce una activación de JNK, se puede afirmar que la proteína p38 es la única MAPK responsable de la fosforilación de c-Jun. Esta afirmación está reforzada con los resultados obtenidos por el patrón de activación de caspasas, así como la fosforilación de la proteína Rb ya que, como se ha comentado anteriormente p38 puede ser la responsable de la activación

de la caspasa 6, así como de inducir la fosforilación del Rb en determinados modelos. Estudios *in vivo* sugieren que p38 solo es capaz de fosforilar ATF-2 y que su papel sobre la fosforilación de c-Jun solo se observa en condiciones *in vitro* (Cao J et al. 2004), es por ello que estos resultados deben ser tomados con cautela de cara a nuevas aproximaciones y que deberían ser comprobados mediante nuevos métodos e incluir experimentos *in vivo*.

Los resultados obtenidos, como ya hemos comentado, muestran un incremento en la fosforilación de c-Jun dependiente de p38, que alcanza su nivel máximo tras 4h de tratamiento. La fosforilación de c-Jun es un suceso relevante en la apoptosis en CGC ya que es un paso previo necesario para su la dimerización o bien para formar dímeros con miembros de otras familias de proteínas como c-Fos o ATF2 y dar lugar al factor activo AP-1 que regula la transcripción de genes proapoptóticos (Shaulian E, Karin M 2002). El tratamiento con LY294002 conduce a un incremento de expresión de genes proapoptóticos. En los resultados obtenidos por PCR en tiempo real se han identificado miembros de la familia *BH3-only proteins* las cuales se relacionan con la facilitación de la formación del poro mitocondrial y activación de la vía intrínseca de las caspasas. Así pues, se observa que Dp5/Hrk experimenta un incremento significativo de su expresión con el tratamiento con LY294002 y esta expresión es dependiente de c-Jun ya que un inhibidor de esta reduce sus niveles a condiciones basales.

Otras proteínas proapoptóticas de la misma familia mostraron incrementos significativos como Bim tanto su expresión génica como en los niveles de proteína al tratar las CGCs con LY294002, este resultado apunta que Bim podría tener un papel importante en este modelo apoptótico, y su regulación por parte de c-Jun como ya han afirmado algunos autores (Levkovitz Y et al. 2003). Sin embargo, los resultados obtenidos en nuestro trabajo, apoyan a la hipótesis planteada por Bo Xie y colaboradores según la cual, la regulación de Bim es independiente de c-Jun ya que la inhibición de c-Jun no conduce a una reducción ni de los niveles de proteína ni de mRNA.

Según estos autores, *bim* es regulado en la apoptosis inducida por la deprivación de S/K⁺ por el factor de transcripción Egr-1 el cual es independiente de c-Jun (Xie B et al. 2011). Nuestro estudio muestra que el LY294002 produce un incremento de la

expresión de *egr-1*, el cual no es revertido por la inhibición de p38 y por tanto de c-Jun, lo que permite afirmar que la expresión de *egr-1* es independiente de c-Jun, sin embargo son necesarios nuevos estudios para confirmar que *bim* se encuentra regulado por Egr-1 en la apoptosis inducida por LY294002.

Una posible justificación para el hecho de que Bim pueda mantenerse incrementado pese al aumento de la supervivencia celular al utilizar inhibidores de p38, sería considerar que la acción aislada de una proteína proapoptótica no es suficiente para producir la permeabilización de la membrana externa mitocondrial ya que este fenómeno requiere la acción orquestada de más de una proteína proapoptótica para producir simultáneamente la inhibición de los miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2 como la activación de los miembros proapoptóticos efectores de la misma familia como Bax, en caso contrario el estímulo no sería suficiente para inducir la formación del poro mitocondrial (Shamas-Din et al. 2011; Harris CA et al. 2001; Jourdain A, Martinou JC 2009). Nuestros resultados muestran que en nuestro modelo no existe un incremento de la transcripción de *bax* ni tampoco una mayor expresión de proteína, sin embargo no puede descartarse la participación de Bax ya que numerosos estudios apuntan a que la translocación y el cambio de conformación de Bax desde el citosol hasta la membrana externa mitocondrial, es en realidad, el suceso crítico para la permeabilización mitocondrial (Westphal D et al. 2011).

Analizando conjuntamente estos resultados podemos decir que la inhibición de la vía de la PI3K/AKT mediante LY294002 conduce a una muerte de las CGCs por apoptosis, donde se da una inhibición de AKT que resulta en una activación de GSK3 β . Sin embargo, y a diferencia de la apoptosis inducida por la deprivación de S/K⁺, al inhibir la PI3K no existe un implicación del ciclo celular y los efectos protectores de los inhibidores de CDKs Flavopiridol y Roscovitina son debidos a su capacidad para bloquear GSK3 β .

Por otro lado, la inhibición de AKT produce una activación de la vía de las MAPKs a través de la activación de la MAP3K ASK1, que conduce a su vez a la activación de p38, responsable de la fosforilación de c-Jun la cual activa la transcripción de genes proapoptóticos relacionados con la vía intrínseca mitocondrial como Dp5/Hrk. Otras proteínas proapoptóticas relacionadas con esta vía intrínseca, como Bim, son reguladas

por Egr-1. Así pues, nuevos estudios serían necesarios para elucidar el mecanismo exacto a través del cual actúan las *BH3-only proteins* y para identificar las proteínas efectoras implicadas en la formación del poro mitocondrial. Asimismo, sería de interés conocer el mecanismo regulatorio a través del cual se produce la activación del factor de transcripción Egr-1.

La inhibición la vía de la PI3K/AKT activa GSK3 β y p38. Estas proteínas pueden constituir dos dianas farmacológicas en el abordaje terapéutico de las enfermedades en las que la vía de PI3K/AKT esté implicada, por este motivo sería importante el diseño de nuevas moléculas que puedan ser administradas en el tratamiento de estas enfermedades.

Conclusiones

¿Y porque nuestro espíritu arde apasionado
buscando las secretas huellas de la verdad?

¿Conoce ya lo que tan ansiosamente quiere
saber?

Pero ¿quién se afana por conocer lo que ya
sabe?

Y si no lo sabe, ¿qué es lo que busca en la oscuridad?

¿puede desearse lo que no se conoce?

Pues ¿quién podría buscar algo que
desconoce?

¿Y dónde podría encontrarlo?

¿Y una vez encontrado, podría reconocerlo?

Boecio, La consolación de la filosofía, libro V, cántico III

Conclusiones

Las conclusiones obtenidas en esta tesis son:

1. La inhibición de la vía de los inositoles fosfato por el LY294002 induce una muerte neuronal por apoptosis en CGC que está mediada por las caspasas 6 y 9 pero no por la caspasa 3 ni por las calpaínas.
2. No existe una implicación de las proteínas del ciclo celular ni un incremento de la síntesis de DNA en la apoptosis inducida por LY294002, a diferencia de lo que ocurre con la deprivación de S/K⁺. Los inhibidores de CDKs, Flavopiridol y Roscovitina, previenen la apoptosis inducida por LY294002 a través del bloqueo de GSK3 β .
3. La inhibición de la PI3K mediante LY294002 induce un incremento de la fosforilación del Rb pero no un incremento de los niveles de E2F1 como sucede en el modelo de la DV de S/K⁺
4. LY294002 provoca la desfosforilación de ASK1 en el residuo Ser83, induciendo la activación de las MAPKs.
5. JNK y ERK no están implicadas en la apoptosis inducida por LY294002. La principal MAPK responsable de la fosforilación de c-Jun es p38.
6. La fosforilación de c-Jun en Ser73 produce su activación, que induce la expresión génica de *dp5*, principal factor responsable de la activación de la vía intrínseca.
7. La inhibición tanto de GSK3 β como de p38 muestra efectos neuroprotectores en los cultivos de CGCs y pueden constituir dos dianas farmacológicas en la apoptosis por inhibición de la PI3K/AKT.

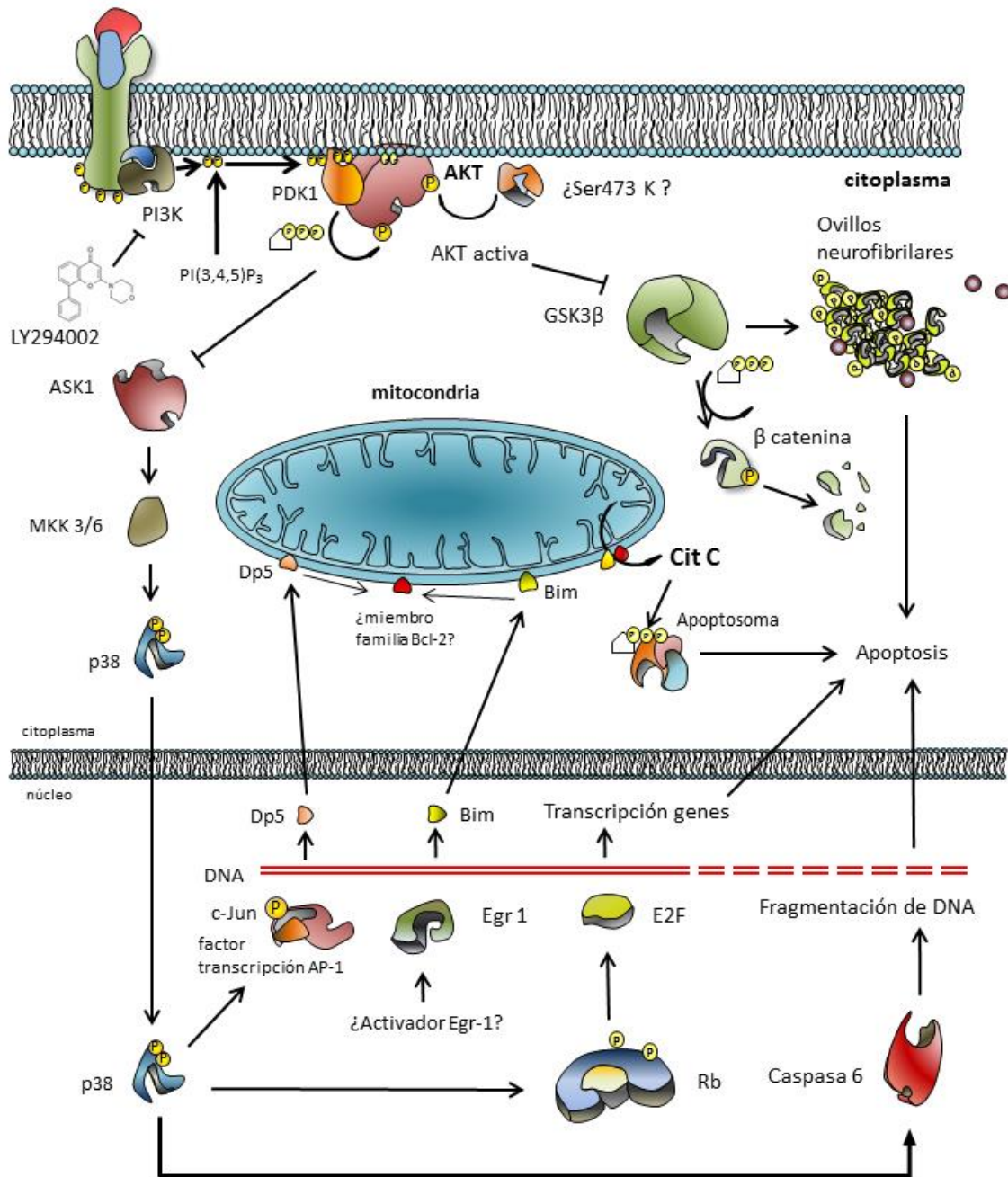


Figura 28: Esquema propuesto de las vías implicadas en la apoptosis inducida por la inhibición de la PI3K.

Bibliografía

A

Adams PD. Regulation of the retinoblastoma tumor suppressor protein by cyclin/cdks. *Biochim Biophys Acta*. 2001 Mar 21; 1471(3):M123-33. Review.

Adler V, Polotskaya A, Wagner F, Kraft AS. Affinity-purified c-Jun amino-terminal protein kinase requires serine/threonine phosphorylation for activity. *J Biol Chem*. 1992 Aug 25; 267(24):17001-5.

Ahn YM, Seo MS, Kim SH, Jeon WJ, Kim Y, Kang UG, Juhn YS, Kim YS. Reduction in the protein level of c-Jun and phosphorylation of Ser73-c-Jun in rat frontal cortex after repeated MK-801 treatment. *Psychiatry Res*. 2009 May 15; 167(1-2):80-7. doi: 10.1016/j.psychres.2007.12.013. Epub 2009 Apr 1.

Allen JW, Eldadah BA, Huang X, Knoblach SM, Faden AI. Multiple caspases are involved in beta-amyloid-induced neuronal apoptosis. *J Neurosci Res*. 2001 Jul 1; 65(1):45-53.

Allsopp TE, McLuckie J, Kerr LE, Macleod M, Sharkey J, Kelly JS. Caspase 6 activity initiates caspase 3 activation in cerebellar granule cell apoptosis. *Cell Death Differ*. 2000 Oct; 7(10):984-93.

Ando K, Uemura K, Kuzuya A, Maesako M, Asada-Utsugi M, Kubota M, Aoyagi N, Yoshioka K, Okawa K, Inoue H, Kawamata J, Shimohama S, Arai T, Takahashi R, Kinoshita A. N-cadherin regulates p38 MAPK signaling via association with JNK-associated leucine zipper protein: implications for neurodegeneration in Alzheimer disease. *J Biol Chem*. 2011 Mar 4; 286(9):7619-28. doi: 10.1074/jbc.M110.158477. Epub 2010 Dec 22.

Anekonda TS, Quinn JF. Calcium channel blocking as a therapeutic strategy for Alzheimer's disease: the case for isradipine. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Dec;1812(12):1584-90. doi: 10.1016/j.bbadis.2011.08.013. Epub 2011 Sep 8. Review.

Aouacheria A, Cibiel A, Guillemin Y, Gillet G, Lalle P. Modulating mitochondria-mediated apoptotic cell death through targeting of Bcl-2 family proteins. *Recent Pat DNA Gene Seq.* 2007; 1(1):43-61. Review.

Appert-Collin A, Hugel B, Levy R, Niederhoffer N, Coupin G, Lombard Y, André P, Poindron P, Gies JP. Cyclin dependent kinase inhibitors prevent apoptosis of postmitotic mouse motoneurons. *Life Sci.* 2006 Jun 27; 79(5):484-90. Epub 2006 Mar 10.

Avila J. Alzheimer disease: caspases first. *Nat Rev Neurol.* 2010 Nov;6(11):587-8. doi: 10.1038/nrneurol.2010.157

Ayala-Grosso C, Ng G, Roy S, Robertson GS. Caspase-cleaved amyloid precursor Cotmanprotein in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 2002 Oct; 12(4):430-41.

B

Barthwal MK, Sathyanarayana P, Kundu CN, Rana B, Pradeep A, Sharma C, Woodgett JR, Rana A. Negative regulation of mixed lineage kinase 3 by protein kinase B/AKT leads to cell survival. *J Biol Chem.* 2003 Feb 7; 278(6):3897-902. Epub 2002 Nov 27.

Bayascas JR, Alessi DR. Regulation of Akt/PKB Ser473 phosphorylation. *Mol Cell.* 2005 Apr 15; 18(2):143-5.

Bellacosa A, Testa JR, Staal SP, Tsichlis PN. A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science.* 1991 Oct 11; 254(5029):274-7.

Beier CP, Wischhusen J, Gleichmann M, Gerhardt E, Pekanovic A, Krueger A, Taylor V, Suter U, Krammer PH, Endres M, Weller M, Schulz JB. FasL

(CD95L/APO-1L) resistance of neurons mediated by phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/protein kinase B-dependent expression of lifeguard/neuronal membrane protein 35. *J Neurosci*. 2005 Jul 20; 25(29):6765-74.

Besirli CG, Wagner EF, Johnson EM Jr. The limited role of NH₂-terminal c-Jun phosphorylation in neuronal apoptosis: identification of the nuclear pore complex as a potential target of the JNK pathway. *J Cell Biol*. 2005 Aug 1; 170(3):401-11.

Bijur GN, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3 beta is highly activated in nuclei and mitochondria. *Neuroreport*. 2003 Dec 19; 14(18):2415-9.

Bishop A, Anderson JE. NO signaling in the CNS: from the physiological to the pathological. *Toxicology*. 2005 Mar 15; 208(2):193-205. Review.

Biswas S, Harris F, Dennison S, Singh J, Phoenix DA. Calpains: targets of cataract prevention? *Trends Mol Med*. 2004 Feb; 10(2):78-84. Review.

Biswas SC, Shi Y, Sproul A, Greene LA. Pro-apoptotic Bim induction in response to nerve growth factor deprivation requires simultaneous activation of three different death signaling pathways. *J Biol Chem*. 2007 Oct 5; 282(40):29368-74. Epub 2007 Aug 16.

Blalock EM, Geddes JW, Chen KC, Porter NM, Markesbery WR, Landfield PW. Incipient Alzheimer's disease: microarray correlation analyses reveal major transcriptional and tumor suppressor responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Feb 17; 101(7):2173-8. Epub 2004 Feb 9.

Bobba A, Atlante A, de Bari L, Passarella S, Marra E. Apoptosis and cytochrome c release in cerebellar granule cells. *In Vivo*. 2004 May-Jun; 18(3):335-44. Review.

Bogoyevitch MA, Arthur PG. Inhibitors of c-Jun N-terminal kinases: JunK no more? *Biochim Biophys Acta*. 2008 Jan; 1784(1):76-93. Epub 2007 Oct 11. Review.

Bonda DJ, Lee HP, Kudo W, Zhu X, Smith MA, Lee HG. Pathological implications of cell cycle re-entry in Alzheimer disease. *Expert Rev Mol Med*. 2010 Jun 29; 12:e19. doi: 10.1017/S146239941000150X. Review.

Borsello T, Forloni G. JNK signalling: a possible target to prevent neurodegeneration. *Curr Pharm Des*. 2007; 13(18):1875-86. Review.

Bouillet P, Metcalf D, Huang DC, Tarlinton DM, Kay TW, Köntgen F, Adams JM, Strasser A. Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science*. 1999 Nov 26; 286(5445):1735-8.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7; 72:248-54.

Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke*. 2009 May; 40(5):e331-9. doi:10.1161/STROKEAHA.108.531632. Epub 2009 Jan 29. Review.

Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. 1999 Mar 19; 96(6):857-68.

C

Calì T, Ottolini D, Brini M. Mitochondrial Ca (2+) and neurodegeneration. *Cell Calcium*. 2012 Jul; 52(1):73-85. doi: 10.1016/j.ceca.2012.04.015. Epub 2012 May 18. Review.

Cam H, Dynlacht BD. Emerging roles for E2F: beyond the G1/S transition and DNA replication. *Cancer Cell*. 2003 Apr;3(4):311-6. Review.

Camins A, Verdaguer E, Folch J, Pallàs M. Involvement of calpain activation in neurodegenerative processes. *CNS Drug Rev.* 2006 Summer;12(2):135-48. Review.

Canu N, Dus L, Barbato C, Ciotti MT, Brancolini C, Rinaldi AM, Novak M, Cattaneo A, Bradbury A, Calissano P. Tau cleavage and dephosphorylation in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis. *J Neurosci.* 1998 Sep 15;18(18):7061-74.

Cao J, Semenova MM, Solovyan VT, Han J, Coffey ET, Courtney MJ. Distinct requirements for p38alpha and c-Jun N-terminal kinase stress-activated protein kinases in different forms of apoptotic neuronal death. *J Biol Chem.* 2004 Aug 20; 279(34):35903-13. Epub 2004 Jun 10.

Cao M, Liu F, Ji F, Liang J, Liu L, Wu Q, Wang T. Effect of c-Jun N-terminal kinase (JNK)/p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) in morphine-induced tau protein hyperphosphorylation. *Behav Brain Res.* 2013 Jan 15; 237:249-55. doi:10.1016/j.bbr.2012.09.040. Epub 2012 Sep 28.

Caragounis A, Du T, Filiz G, Laughton KM, Volitakis I, Sharples RA, Cherny RA, Masters CL, Drew SC, Hill AF, Li QX, Crouch PJ, Barnham KJ, White AR. Differential modulation of Alzheimer's disease amyloid beta-peptide accumulation by diverse classes of metal ligands. *Biochem J.* 2007 Nov 1; 407(3):435-50.

Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science.* 1998 Nov 13; 282(5392):1318-21.

Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2011 Mar; 75(1):50-83. doi: 10.1128/MMBR.00031-10. Review. Erratum in: *Microbiol Mol Biol Rev.* 2012 Jun; 76(2):496.

Carlson B, Lahusen T, Singh S, Loaiza-Perez A, Worland PJ, Pestell R, Albanese C, Sausville EA, Senderowicz AM. Down-regulation of cyclin D1 by transcriptional

repression in MCF-7 human breast carcinoma cells induced by flavopiridol. *Cancer Res.* 1999 Sep 15; 59(18):4634-41.

Carlson BA, Dubay MM, Sausville EA, Brizuela L, Worland PJ. Flavopiridol induces G1 arrest with inhibition of cyclin-dependent kinase (CDK) 2 and CDK4 in human breast carcinoma cells. *Cancer Res.* 1996 Jul 1; 56(13):2973-8.

Catania MV, Copani A, Calogero A, Ragonese GI, Condorelli DF, Nicoletti F. An enhanced expression of the immediate early gene, Egr-1, is associated with neuronal apoptosis in culture. *Neuroscience.* 1999; 91(4):1529-38.

Chang KH, de Pablo Y, Lee HP, Lee HG, Smith MA, Shah K. Cdk5 is a major regulator of p38 cascade: relevance to neurotoxicity in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2010 Jun; 113(5):1221-9. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.06687.x. Epub 2010 Mar 14.

Chau BN, Pan CW, Wang JY. Separation of anti-proliferation and anti-apoptotic functions of retinoblastoma protein through targeted mutations of its A/B domain. *PLoS One.* 2006 Dec 20; 1:e82.

Chen RW, Qin ZH, Ren M, Kanai H, Chalecka-Franaszek E, Leeds P, Chuang DM. Regulation of c-Jun N-terminal kinase, p38 kinase and AP-1 DNA binding in cultured brain neurons: roles in glutamate excitotoxicity and lithium neuroprotection. *J Neurochem.* 2003 Feb; 84(3):566-75.

Cicenas J, Valius M. The CDK inhibitors in cancer research and therapy. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2011 Oct; 137(10):1409-18. doi: 10.1007/s00432-011-1039-4. Epub 2011 Aug 30. Review.

Coffer PJ, Jin J, Woodgett JR. Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem J.* 1998 Oct 1; 335 (Pt 1):1-13. Review.

Cohen-Solal KA, Merrigan KT, Chan JL, Goydos JS, Chen W, Foran DJ, Liu F, Lasfar A, Reiss M. Constitutive Smad linker phosphorylation in melanoma: a mechanism of resistance to transforming growth factor- β -mediated growth inhibition. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011 Jun; 24(3):512-24. doi: 10.1111/j.1755-148X.2011.00858.x. Epub 2011 Apr 28.

Contestabile A. Cerebellar granule cells as a model to study mechanisms of neuronal apoptosis or survival in vivo and in vitro. *Cerebellum.* 2002 Jan-Mar; 1(1):41-55. Review.

Copani A, Guccione S, Giurato L, Caraci F, Calafiore M, Sortino MA, Nicoletti F. The cell cycle molecules behind neurodegeneration in Alzheimer's disease: perspectives for drug development. *Curr Med Chem.* 2008; 15(24):2420-32. Review.

Copani A, Sortino MA, Caricasole A, Chiechio S, Chisari M, Battaglia G, Giuffrida-Stella AM, Vancheri C, Nicoletti F. Erratic expression of DNA polymerases by beta-amyloid causes neuronal death. *FASEB J.* 2002 Dec; 16(14):2006-8. Epub 2002 Oct 18.

Corrêa SA, Eales KL. The Role of p38 MAPK and Its Substrates in Neuronal Plasticity and Neurodegenerative Disease. *J Signal Transduct.* 2012; 2012:649079. doi: 10.1155/2012/649079. Epub 2012 Jun 25.

Cotman CW, Poon WW, Rissman RA, Blurton-Jones M. The role of caspase cleavage of tau in Alzheimer disease neuropathology. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005 Feb; 64(2):104-12. Review.

Crabbe T, Welham MJ, Ward SG. The PI3K inhibitor arsenal: choose your weapon! *Trends Biochem Sci.* 2007 Oct; 32(10):450-6.

Cregan SP, Dawson VL, Slack RS. Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene.* 2004 Apr 12; 23(16):2785-96. Review.

Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Aug; 1773(8):1358-75. Epub 2007 Mar 24. Review.

D

D'Amelio M, Cavallucci V, Middei S, Marchetti C, Pacioni S, Ferri A, Diamantini A, De Zio D, Carrara P, Battistini L, Moreno S, Bacci A, Ammassari-Teule M, Marie H, Cecconi F. Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci*. 2011 Jan; 14(1):69-76. doi: 10.1038/nn.2709. Epub 2010 Dec 12.

Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*. 1997 Oct 17; 91(2):231-41.

Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*. 2000 Oct 13; 103(2):239-52. Review.

De Azevedo WF, Leclerc S, Meijer L, Havlicek L, Strnad M, Kim SH. Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues: crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. *Eur J Biochem*. 1997 Jan 15; 243(1-2):518-26.

Degli Esposti M, Dive C. Mitochondrial membrane permeabilisation by Bax/Bak. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 May 9; 304(3):455-61. Review.

Degli Esposti M, Ferry G, Masdehors P, Boutin JA, Hickman JA, Dive C. Post-translational modification of Bid has differential effects on its susceptibility to cleavage by caspase 8 or caspase 3. *J Biol Chem*. 2003 May 2; 278(18):15749-57. Epub 2003 Feb 21.

DeGregori J. The genetics of the E2F family of transcription factors: shared functions and unique roles. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Jun 21; 1602(2):131-50. Review.

Degtarev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. *Oncogene*. 2003 Nov 24; 22(53):8543-67. Review.

Delston RB, Matatall KA, Sun Y, Onken MD, Harbour JW. p38 phosphorylates Rb on Ser567 by a novel, cell cycle-independent mechanism that triggers Rb-Hdm2 interaction and apoptosis. *Oncogene*. 2011 Feb 3; 30(5):588-99. doi: 10.1038/onc.2010.442. Epub 2010 Sep 27.

Deng X, Xiao L, Lang W, Gao F, Ruvolo P, May WS Jr. Novel role for JNK as a stress-activated Bcl2 kinase. *J Biol Chem*. 2001 Jun 29; 276(26):23681-8. Epub 2001 Apr 25.

Denning DP, Hatch V, Horvitz HR. Programmed elimination of cells by caspase-independent cell extrusion in *C. elegans*. *Nature*. 2012 Aug 9; 488(7410):226-30. doi: 10.1038/nature11240.

Desagher S, Osen-Sand A, Nichols A, Eskes R, Montessuit S, Lauper S, Maundrell K, Antonsson B, Martinou JC. Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol*. 1999 Mar 8; 144(5):891-901.

Dewson G, Kratina T, Sim HW, Puthalakath H, Adams JM, Colman PM, Kluck RM. To trigger apoptosis, Bak exposes its BH3 domain and homodimerizes via BH3: groove interactions. *Mol Cell*. 2008 May 9; 30(3):369-80. doi: 10.1016/j.molcel.2008.04.005.

Dijkers PF, Birkenkamp KU, Lam EW, Thomas NS, Lammers JW, Koenderman L, Coffey. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell*. 2002 Sep; 2(3):183-92.

Dijkers PF, Birkenkamp KU, Lam EW, Thomas NS, Lammers JW, Koenderman L, Coffey PJ. FKHR-L1 can act as a critical effector of cell death induced by cytokine withdrawal: protein kinase B-enhanced cell survival through maintenance of mitochondrial integrity. *J Cell Biol.* 2002 Feb 4; 156(3):531-42. Epub 2002 Jan 28.

Diwakarla S, Nagley P, Hughes ML, Chen B, Beart PM. Differential insult-dependent recruitment of the intrinsic mitochondrial pathway during neuronal programmed cell death. *Cell Mol Life Sci.* 2009 Jan; 66(1):156-72. doi:10.1007/s00018-008-8490-7.

D'Mello SR, Galli C, Ciotti T, Calissano P. Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Dec 1; 90(23):10989-93.

Donovan N, Becker EB, Konishi Y, Bonni A. JNK phosphorylation and activation of BAD couples the stress-activated signaling pathway to the cell death machinery. *J Biol Chem.* 2002 Oct 25; 277(43):40944-9. Epub 2002 Aug 19.

Dragunow M, Xu R, Walton M, Woodgate A, Lawlor P, MacGibbon GA, Young D, Gibbons H, Lipski J, Muravlev A, Pearson A, During M. c-Jun promotes neurite outgrowth and survival in PC12 cells. *Brain Res Mol Brain Res.* 2000 Nov 10; 83(1-2):20-33.

Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, Segal RA, Kaplan DR, Greenberg ME. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science.* 1997 Jan 31; 275(5300):661-5.

Duronio V. The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway. *Biochem J.* 2008 Nov 1; 415(3):333-44. doi: 10.1042/BJ20081056. Review.

E

Eguchi R, Toné S, Suzuki A, Fujimori Y, Nakano T, Kaji K, Ohta T. Possible involvement of caspase-6 and -7 but not caspase-3 in the regulation of hypoxia-induced apoptosis in tube-forming endothelial cells. *Exp Cell Res.* 2009 Jan 15; 315(2):327-35. doi: 10.1016/j.yexcr.2008.10.041. Epub 2008 Nov 7.

Ellis HM, Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell.* 1986 Mar 28;44(6):817-29.

Eminel S, Roemer L, Waetzig V, Herdegen T. c-Jun N-terminal kinases trigger both degeneration and neurite outgrowth in primary hippocampal and cortical neurons. *J Neurochem.* 2008 Feb; 104(4):957-69. Epub 2007 Dec 4.

Engel T, Plesnila N, Prehn JH, Henshall DC. In vivo contributions of BH3-only proteins to neuronal death following seizures, ischemia, and traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2011 May; 31(5):1196-210. doi: 10.1038/jcbfm.2011.26. Epub 2011 Mar 2. Review.

Enguita M, DeGregorio-Rocasolano N, Abad A, Trullas R. Glycogen synthase kinase 3 activity mediates neuronal pentraxin 1 expression and cell death induced by potassium deprivation in cerebellar granule cells. *Mol Pharmacol.* 2005 Apr;67(4):1237-46. Epub 2005 Jan 3.

Etienne-Manneville S, Hall A. Cdc42 regulates GSK-3 β and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature.* 2003 Feb 13; 421(6924):753-6. Epub 2003 Jan 29.

F

Fan J, Gladding CM, Wang L, Zhang LY, Kaufman AM, Milnerwood AJ, Raymond LA. P38 MAPK is involved in enhanced NMDA receptor-dependent excitotoxicity in YAC transgenic mouse model of Huntington disease. *Neurobiol Dis.* 2012 Mar; 45(3):999-1009. doi: 10.1016/j.nbd.2011.12.019. Epub 2011 Dec 14.

Ferrer I, Barrachina M, Puig B. Glycogen synthase kinase-3 is associated with neuronal and glial hyperphosphorylated tau deposits in Alzheimer's disease, Pick's disease, progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *Acta Neuropathol.* 2002 Dec; 104(6):583-91. Epub 2002 Jul 13.

Frame S, Cohen P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J.* 2001 Oct 1; 359(Pt 1):1-16. Review.

Franklin JL. Redox regulation of the intrinsic pathway in neuronal apoptosis. *Antioxid Redox Signal.* 2011 Apr 15; 14(8):1437-48. doi: 10.1089/ars.2010.3596. Epub 2011 Jan 8. Review.

Fuchs Y, Steller H. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell.* 2011 Nov 11; 147(4):742-58. doi: 10.1016/j.cell.2011.10.033. Review. Erratum in: *Cell.* 2011 Dec 23; 147(7):1640.

Fukunaga K, Ishigami T, Kawano T. Transcriptional regulation of neuronal genes and its effect on neural functions: expression and function of forkhead transcription factors in neurons. *J Pharmacol Sci.* 2005 Jul; 98(3):205-11. Epub 2005 Jul 9. Review.

G

Gallo V, Kingsbury A, Balázs R, Jørgensen OS. The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J Neurosci.* 1987 Jul; 7(7):2203-13.

Galluzzi L, Blomgren K, Kroemer G. Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. *Nat Rev Neurosci.* 2009 Jul; 10(7):481-94. doi: 10.1038/nrn2665. Review.

Gastard MC, Troncoso JC, Koliatsos VE. Caspase activation in the limbic cortex of subjects with early Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 2003 Sep; 54(3):393-8.

Geiger KK, Pannen BH. The mitogen-activated protein kinase p38 regulates activator protein 1 by direct phosphorylation of c-Jun. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39(12):2278-88. Epub 2007 Jul 1.

Giacomello M, Hudec R, Lopreiato R. Huntington's disease, calcium, and mitochondria. *Biofactors.* 2011 May-Jun; 37(3):206-18. doi: 10.1002/biof.162. Epub 2011 Jun 14. Review.

Giam M, Huang DC, Bouillet P. BH3-only proteins and their roles in programmed cell death. *Oncogene.* 2008 Dec; 27 Suppl 1:S128-36. doi: 10.1038/onc.2009.50. Review.

Giardina SF, Beart PM. Kainate receptor-mediated apoptosis in primary cultures of cerebellar granule cells is attenuated by mitogen-activated protein and cyclin-dependent kinase inhibitors. *Br J Pharmacol.* 2002 Apr; 135(7):1733-42.

Giordano G, Klintworth HM, Kavanagh TJ, Costa LG. Apoptosis induced by domoic acid in mouse cerebellar granule neurons involves activation of p38 and JNK MAP kinases. *Neurochem Int.* 2008 May; 52(6):1100-5. doi: 10.1016/j.neuint.2007.11.004. Epub 2007 Nov 24.

Gleichmann M, Beinroth S, Reed JC, Krajewski S, Schulz JB, Wüllner U, Klockgether T, Weller M. Potassium deprivation-induced apoptosis of cerebellar granule neurons: cytochrome c release in the absence of altered expression of Bcl-2 family proteins. *Cell Physiol Biochem.* 1998; 8(4):194-201.

Goodrich DW, Wang NP, Qian YW, Lee EY, Lee WH. The retinoblastoma gene product regulates progression through the G1 phase of the cell cycle. *Cell.* 1991 Oct 18; 67(2):293-302.

Graham RK, Ehrnhoefer DE, Hayden MR. Caspase-6 and neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 2011 Dec; 34(12):646-56. doi: 10.1016/j.tins.2011.09.001. Epub 2011 Oct 22. Review.

Greene LA, Biswas SC, Liu DX. Cell cycle molecules and vertebrate neuron death: E2F at the hub. *Cell Death Differ.* 2004 Jan; 11(1):49-60. Review.

H

Ham J, Eilers A, Whitfield J, Neame SJ, Shah B. c-Jun and the transcriptional control of neuronal apoptosis. *Biochem Pharmacol.* 2000 Oct 15;60(8):1015-21. Review.

Hamdane M, Delobel P, Sambo AV, Smet C, Bégard S, Violleau A, Landrieu I, Delacourte A, Lippens G, Flament S, Buée L. Neurofibrillary degeneration of the Alzheimer-type: an alternate pathway to neuronal apoptosis? *Biochem Pharmacol.* 2003 Oct 15; 66(8):1619-25. Review.

Harada T, Morooka T, Ogawa S, Nishida E. ERK induces p35, a neuron-specific activator of Cdk5, through induction of Egr1. *Nat Cell Biol.* 2001 May; 3(5):453-9.

Harris C, Maroney AC, Johnson EM Jr. Identification of JNK-dependent and -independent components of cerebellar granule neuron apoptosis. *J Neurochem.* 2002 Nov; 83(4):992-1001.

Harris CA, Johnson EM Jr. BH3-only Bcl-2 family members are coordinately regulated by the JNK pathway and require Bax to induce apoptosis in neurons. *J Biol Chem.* 2001 Oct 12; 276(41):37754-60. Epub 2001 Aug 8.

Hayakawa R, Hayakawa T, Takeda K, Ichijo H. Therapeutic targets in the ASK1-dependent stress signaling pathways. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2012; 88(8):434-53.

Heneka MT, O'Banion MK. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol.* 2007 Mar;184(1-2):69-91. Epub 2007 Jan 12. Review.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000 Oct 12; 407(6805):770-6. Review.

Herrup K, Neve R, Ackerman SL, Copani A. Divide and die: cell cycle events as triggers of nerve cell death. *J Neurosci*. 2004 Oct 20; 24(42):9232-9. Review.

Hilton GD, Stoica BA, Byrnes KR, Faden AI. Roscovitine reduces neuronal loss, glial activation, and neurologic deficits after brain trauma. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2008 Nov; 28(11):1845-59. doi: 10.1038/jcbfm.2008.75. Epub 2008 Jul 9.

Hirai K, Hayashi T, Chan PH, Zeng J, Yang GY, Basus VJ, James TL, Litt L. PI3K inhibition in neonatal rat brain slices during and after hypoxia reduces phospho-Akt and increases cytosolic cytochrome c and apoptosis. *Brain Res Mol Brain Res*. 2004 Apr 29; 124(1):51-61.

Hisanaga S, Endo R. Regulation and role of cyclin-dependent kinase activity in neuronal survival and death. *J Neurochem*. 2010 Dec; 115(6):1309-21. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.07050.x. Epub 2010 Nov 4. Review.

Hockenbery D, Nuñez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*. 1990 Nov 22; 348(6299):334-6.

Hooper C, Killick R, Lovestone S. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2008 Mar; 104(6):1433-9. Epub 2007 Dec 18. Review.

Hou ST, Xie X, Baggley A, Park DS, Chen G, Walker T. Activation of the Rb/E2F1 pathway by the nonproliferative p38 MAPK during Fas (APO1/CD95)-mediated neuronal apoptosis. *J Biol Chem*. 2002 Dec 13; 277(50):48764-70. Epub 2002 Sep 25.

Hozumi Y, Goto K. Diacylglycerol kinase β in neurons: functional implications at the synapse and in disease. *Adv Biol Regul*. 2012 May; 52(2):315-25. doi:10.1016/j.jbior.2012.03.003. Epub 2012 Mar 30. Review.

Hsu SY, Kaipia A, Zhu L, Hsueh AJ. Interference of BAD (Bcl-xL/Bcl-2-associated death promoter)-induced apoptosis in mammalian cells by 14-3-3 isoforms and P11. *Mol Endocrinol*. 1997 Nov; 11(12):1858-67.

Hu S, Begum AN, Jones MR, Oh MS, Beech WK, Beech BH, Yang F, Chen P, Ubeda OJ, Kim PC, Davies P, Ma Q, Cole GM, Frautschy SA. GSK3 inhibitors show benefits in an Alzheimer's disease (AD) model of neurodegeneration but adverse effects in control animals. *Neurobiol Dis*. 2009 Feb; 33(2):193-206. doi: 10.1016/j.nbd.2008.10.007. Epub 2008 Nov 5.

Hur EM, Zhou FQ. GSK3 signalling in neural development. *Nat Rev Neurosci*. 2010 Aug; 11(8):539-51. doi: 10.1038/nrn2870. Review.

I

Ianari A, Natale T, Calo E, Ferretti E, Alesse E, Screpanti I, Haigis K, Gulino A, Lees JA. Proapoptotic function of the retinoblastoma tumor suppressor protein. *Cancer Cell*. 2009 Mar 3; 15(3):184-94. doi: 10.1016/j.ccr.2009.01.026.

Ichijo H, Nishida E, Irie K, ten Dijke P, Saitoh M, Moriguchi T, Takagi M, Matsumoto K, Miyazono K, Gotoh Y. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science*. 1997 Jan 3; 275(5296):90-4.

Irvine RF. 20 years of Ins(1,4,5)P₃, and 40 years before. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Jul; 4(7):586-90. Review.

Irvine RF. Nuclear lipid signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 May; 4(5):349-60. Review.

J

Jacotot E, Costantini P, Laboureau E, Zamzami N, Susin SA, Kroemer G. Mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; 887:18-30. Review.

JM, Brazil DP, Yang ZZ, Hemmings BA. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci.* 2004 May; 29(5):233-42. Review.

Johnson GL, Nakamura K. The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Aug; 1773(8):1341-8. Epub 2007 Jan 4. Review.

Johnson K, Liu L, Majdzadeh N, Chavez C, Chin PC, Morrison B, Wang L, Park J, Chugh P, Chen HM, D'Mello SR. Inhibition of neuronal apoptosis by the cyclin-dependent kinase inhibitor GW8510: identification of 3' substituted indolones as a scaffold for the development of neuroprotective drugs. *J Neurochem.* 2005 May; 93(3):538-48.

Johri A, Beal MF. Antioxidants in Huntington's disease. *Biochim Biophys Acta.* 2012 May; 1822(5):664-74. doi: 10.1016/j.bbadis.2011.11.014. Epub 2011 Nov 23. Review.

Jones MW, Errington ML, French PJ, Fine A, Bliss TV, Garel S, Charnay P, Bozon B, Laroche S, Davis S. A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories. *Nat Neurosci.* 2001 Mar; 4(3):289-96.

Jope RS, Johnson GV. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci.* 2004 Feb; 29(2):95-102. Review.

Jope RS, Yuskaitis CJ, Beurel E. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics. *Neurochem Res.* 2007 Apr-May; 32(4-5):577-95. Epub 2006 Aug 30. Review.

Jourdain A, Martinou JC. Mitochondrial outer-membrane permeabilization and remodelling in apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009 Oct; 41(10):1884-9. doi: 10.1016/j.biocel.2009.05.001. Epub 2009 May 9. Review.

K

Kamada H, Nito C, Endo H, Chan PH. Bad as a converging signaling molecule between survival PI3-K/Akt and death JNK in neurons after transient focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007 Mar; 27(3):521-33. Epub 2006 Jul 5.

Karin M, Liu Zg, Zandi E. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 1997 Apr; 9(2):240-6. Review.

Kelly MJ, Rønnekleiv OK. Control of CNS neuronal excitability by estrogens via membrane-initiated signaling. *Mol Cell Endocrinol.* 2009 Sep 24; 308(1-2):17-25. doi: 10.1016/j.mce.2009.03.008. Epub 2009 Mar 25. Review.

Keramaris E, Ruzhynsky VA, Callaghan SM, Wong E, Davis RJ, Flavell R, Slack RS, Park DS. Required roles of Bax and JNKs in central and peripheral nervous system death of retinoblastoma-deficient mice. *J Biol Chem.* 2008 Jan 4; 283(1):405-15. Epub 2007 Nov 5.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972 Aug; 26(4):239-57. Review.

Kerr JF. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology.* 2002 Dec 27; 181-182:471-4. Review.

Keshet Y, Seger R. The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods Mol Biol.* 2010; 661:3-38. doi: 10.1007/978-1-60761-795-2_1. Review.

Kim AH, Khursigara G, Sun X, Franke TF, Chao MV. Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol.* 2001 Feb; 21(3):893-901.

Kim EK, Choi EJ. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Apr; 1802(4):396-405. doi: 10.1016/j.bbadis.2009.12.009. Epub 2010 Jan 14. Review.

Knudsen ES, Buckmaster C, Chen TT, Feramisco JR, Wang JY. Inhibition of DNA synthesis by RB: effects on G1/S transition and S-phase progression. *Genes Dev.* 1998 Aug 1; 12(15):2278-92.

Kopil CM, Siebert AP, Foskett JK, Neumar RW. Calpain-cleaved type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor impairs ER Ca(2+) buffering and causes neurodegeneration in primary cortical neurons. *J Neurochem.* 2012 Oct; 123(1):147-58. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07859.x. Epub 2012 Aug 14.

Kraft C, Herzog F, Gieffers C, Mechtler K, Hagting A, Pines J, Peters JM. Mitotic regulation of the human anaphase-promoting complex by phosphorylation. *EMBO J.* 2003 Dec 15; 22(24):6598-609.

Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev.* 2007 Jan; 87(1):99-163. Review.

Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G; Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 2009 Jan; 16(1):3-11. doi: 10.1038/cdd.2008.150. Epub 2008 Oct 10.

Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssière JL, Mignotte B. The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J*. 1995 Oct; 9(13):1277-87. Review.

Krystof V, Uldrijan S. Cyclin-dependent kinase inhibitors as anticancer drugs. *Curr Drug Targets*. 2010 Mar; 11(3):291-302. Review.

Kuramoto N, Seko K, Sugiyama C, Shuto M, Ogita K. Trimethyltin initially activates the caspase 8/caspase 3 pathway for damaging the primary cultured cortical neurons derived from embryonic mice. *J Neurosci Res*. 2011 Apr; 89(4):552-61. doi: 10.1002/jnr.22588. Epub 2011 Feb 2.

Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, Bonzon C, Sullivan BA, Green DR, Kivansakul M, Yang H, Fairlie WD, Czabotar PE, Fischer SF, Perugini MA, Huang DC, Colman PM. Vaccinia virus anti-apoptotic F1L is a novel Bcl-2-like domain-swapped dimer that binds a highly selective subset of BH3-containing death ligands. *Cell Death Differ*. 2008 Oct; 15(10):1564-71. doi: 10.1038/cdd.2008.83. Epub 2008 Jun 13.

Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiol Rev*. 2012 Apr; 92(2):689-737. doi: 10.1152/physrev.00028.2011. Review.

Kyriakis JM. Signaling by the germinal center kinase family of protein kinases. *J Biol Chem*. 1999 Feb 26; 274(9):5259-62. Review.

L

Le Tourneau C, Faivre S, Laurence V, Delbaldo C, Vera K, Girre V, Chiao J, Armour S, Frame S, Green SR, Gianella-Borradori A, Diéras V, Raymond E. Phase I evaluation of seliciclib (R-roscovitine), a novel oral cyclin-dependent kinase inhibitor, in patients with advanced malignancies. *Eur J Cancer*. 2010 Dec; 46(18):3243-50. doi: 10.1016/j.ejca.2010.08.001. Epub 2010 Sep 6.

Lee KY, Koh SH, Noh MY, Kim SH, Lee YJ. Phosphatidylinositol-3-kinase activation blocks amyloid beta-induced neurotoxicity. *Toxicology*. 2008 Jan 14; 243(1-2):43-50. Epub 2007 Sep 26.

Leppä S, Eriksson M, Saffrich R, Ansorge W, Bohmann D. Complex functions of AP-1 transcription factors in differentiation and survival of PC12 cells. *Mol Cell Biol*. 2001 Jul; 21(13):4369-78.

Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell*. 2002 Sep; 2(3):183-92.

Levkovitz Y, Baraban JM. A dominant negative Egr inhibitor blocks nerve growth factor-induced neurite outgrowth by suppressing c-Jun activation: role of an Egr/c-Jun complex. *J Neurosci*. 2002 May 15; 22(10):3845-54.

Levrresse V, Butterfield L, Zentrich E, Heasley LE. Akt negatively regulates the cJun N-terminal kinase pathway in PC12 cells. *J Neurosci Res*. 2000 Dec 15; 62(6):799-808.

Li C, Zhou C, Wang S, Feng Y, Lin W, Lin S, Wang Y, Huang H, Liu P, Mu YG, Shen X. Sensitization of glioma cells to tamoxifen-induced apoptosis by PI3-kinase inhibitor through the GSK-3 β / β -catenin signaling pathway. *PLoS One*. 2011; 6(10):e27053. doi: 10.1371/journal.pone.0027053. Epub 2011 Oct 27.

Li D, Qu Y, Mao M, Zhang X, Li J, Ferriero D, Mu D. Involvement of the PTEN-AKT-FOXO3a pathway in neuronal apoptosis in developing rat brain after hypoxia-ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2009 Dec; 29(12):1903-13. doi:10.1038/jcbfm.2009.102. Epub 2009 Jul 22.

Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*. 2001 Jul 5; 412(6842):95-9.

Li Z, Jo J, Jia JM, Lo SC, Whitcomb DJ, Jiao S, Cho K, Sheng M. Caspase-3 activation via mitochondria is required for long-term depression and AMPA receptor internalization. *Cell*. 2010 May 28; 141(5):859-71. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.053.

Liebl J, Fürst R, Vollmar AM, Zahler S. Twice switched at birth: cell cycle-independent roles of the "neuron-specific" cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) in non-neuronal cells. *Cell Signal*. 2011 Nov; 23(11):1698-707. doi: 10.1016/j.cellsig.2011.06.020. Epub 2011 Jun 30. Review.

Lindsten T, Zong WX, Thompson CB. Defining the role of the Bcl-2 family of proteins in the nervous system. *Neuroscientist*. 2005 Feb; 11(1):10-5. Review.

Linseman DA, Butts BD, Precht TA, Phelps RA, Le SS, Laessig TA, Bouchard RJ, Florez-McClure ML, Heidenreich KA. Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylates Bax and promotes its mitochondrial localization during neuronal apoptosis. *J Neurosci*. 2004 Nov 3.

Liu Y, Bankaitis VA. Phosphoinositide phosphatases in cell biology and disease. *Prog Lipid Res*. 2010 Jul; 49(3):201-17. doi: 10.1016/j.plipres.2009.12.001. Epub 2010 Jan 5. Review.

Lopes JP, Agostinho P. Cdk5: multitasking between physiological and pathological conditions. *Prog Neurobiol*. 2011 Jun; 94(1):49-63. doi: 10.1016/j.pneurobio.2011.03.006. Epub 2011 Apr 5. Review.

Lopes JP, Oliveira CR, Agostinho P. Role of cyclin-dependent kinase 5 in the neurodegenerative process triggered by amyloid-Beta and prion peptides: implications for Alzheimer's disease and prion-related encephalopathies. *Cell Mol Neurobiol*. 2007 Nov; 27(7):943-57. Epub 2007 Oct 27.

Love S. Apoptosis and brain ischaemia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003 Apr; 27(2):267-82. Review.

Lu Y, Li T, Qureshi HY, Han D, Paudel HK. Early growth response 1 (Egr-1) regulates phosphorylation of microtubule-associated protein tau in mammalian brain. *J Biol Chem.* 2011 Jun 10; 286(23):20569-81. doi: 10.1074/jbc.M111.220962. Epub 2011 Apr 13.

M

Ma C, Ying C, Yuan Z, Song B, Li D, Liu Y, Lai B, Li W, Chen R, Ching YP, Li M. dp5/HRK is a c-Jun target gene and required for apoptosis induced by potassium deprivation in cerebellar granule neurons. *J Biol Chem.* 2007 Oct 19; 282(42):30901-9. Epub 2007 Apr 11.

Ma D, Zhou P, Harbour JW. Distinct mechanisms for regulating the tumor suppressor and antiapoptotic functions of Rb. *J Biol Chem.* 2003 May 23; 278(21):19358-66. Epub 2003 Mar 19.

Makin GW, Corfe BM, Griffiths GJ, Thistlethwaite A, Hickman JA, Dive C. Damage-induced Bax N-terminal change, translocation to mitochondria and formation of Bax dimers/complexes occur regardless of cell fate. *EMBO J.* 2001 Nov 15; 20(22):6306-15.

Malumbres M, Pevarello P, Barbacid M, Bischoff JR. CDK inhibitors in cancer therapy: what is next? *Trends Pharmacol Sci.* 2008 Jan; 29(1):16-21. Epub 2007 Dec 4.

Manfredi G, Xu Z. Mitochondrial dysfunction and its role in motor neuron degeneration in ALS. *Mitochondrion.* 2005 Apr; 5(2):77-87. Review.

Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell.* 2007 Jun 29; 129(7):1261-74. Review.

Martinou JC, Youle RJ. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Dev Cell.* 2011 Jul 19; 21(1):92-101. doi: 10.1016/j.devcel.2011.06.017. Review.

Masters SC, Yang H, Datta SR, Greenberg ME, Fu H. 14-3-3 inhibits Bad-induced cell death through interaction with serine-136. *Mol Pharmacol*. 2001 Dec; 60(6):1325-31.

Mattson MP, Duan W, Chan SL, Cheng A, Haughey N, Gary DS, Guo Z, Lee J, Furukawa K. Neuroprotective and neurorestorative signal transduction mechanisms in brain aging: modification by genes, diet and behavior. *Neurobiol Aging*. 2002

Mattson MP. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000 Nov; 1(2):120-9. Review.

McCubrey JA, May WS, Duronio V, Mufson A. Serine/threonine phosphorylation in cytokine signal transduction. *Leukemia*. 2000 Jan; 14(1):9-21. Review.

Meijer L, Flajolet M, Greengard P. Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3. *Trends Pharmacol Sci*. 2004 Sep; 25(9):471-80. Review.

Mielke K, Herdegen T. JNK and p38 stresskinases--degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. *Prog Neurobiol*. 2000 May; 61(1):45-60. Review.

Miller TM, Tansey MG, Johnson EM Jr, Creedon DJ. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity blocks depolarization- and insulin-like growth factor I-mediated survival of cerebellar granule cells. *J Biol Chem*. 1997 Apr 11; 272(15):9847-53.

Moldoveanu T, Liu Q, Tocilj A, Watson M, Shore G, Gehring K. The X-ray structure of a BAK homodimer reveals an inhibitory zinc binding site. *Mol Cell*. 2006 Dec 8; 24(5):677-88.

Monaco EA 3rd, Vallano ML. Cyclin-dependent kinase inhibitors: cancer killers to neuronal guardians. *Curr Med Chem*. 2003 Mar; 10(5):367-79. Review.

Morrison DK, Davis RJ. Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2003;19:91-118. Review.

Morton S, Davis RJ, McLaren A, Cohen P. A reinvestigation of the multisite phosphorylation of the transcription factor c-Jun. *EMBO J.* 2003 Aug 1; 22(15):3876-86.

Munoz L, Ammit AJ. Targeting p38 MAPK pathway for the treatment of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology.* 2010 Mar; 58(3):561-8. doi: 10.1016/j.neuropharm.2009.11.010. Epub 2009 Dec 4. Review.

Musti AM, Treier M, Bohmann D. Reduced ubiquitin-dependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAP kinases. *Science.* 1997 Jan 17; 275(5298):400-2.

Nair P, Muthukkumar S, Sells SF, Han SS, Sukhatme VP, Rangnekar VM. Early growth response-1-dependent apoptosis is mediated by p53. *J Biol Chem.* 1997 Aug 8; 272(32):20131-8.

N

Nath N, Wang S, Betts V, Knudsen E, Chellappan S. Apoptotic and mitogenic stimuli inactivate Rb by differential utilization of p38 and cyclin-dependent kinases. *Oncogene.* 2003 Sep 4; 22(38):5986-94.

Nath R, Raser KJ, Stafford D, Hajimohammadreza I, Posner A, Allen H, Talanian RV, Yuen P, Gilbertsen RB, Wang KK. Non-erythroid alpha-spectrin breakdown by calpain and interleukin 1 beta-converting-enzyme-like protease(s) in apoptotic cells: contributory roles of both protease families in neuronal apoptosis. *Biochem J.* 1996 Nov 1; 319 (Pt 3):683-90.

Neumar RW, Xu YA, Gada H, Guttmann RP, Siman R. Cross-talk between calpain and caspase proteolytic systems during neuronal apoptosis. *J Biol Chem.* 2003 Apr 18; 278(16):14162-7. Epub 2003 Feb 7.

Newmeyer DD. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell*. 2005 Feb 18; 17(4):525-35.

Noguchi K, Kitanaka C, Yamana H, Kokubu A, Mochizuki T, Kuchino Y. Regulation of c-Myc through phosphorylation at Ser-62 and Ser-71 by c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem*. 1999 Nov 12;274(46):32580-7.

Noguchi T, Takeda K, Matsuzawa A, Saegusa K, Nakano H, Gohda J, Inoue J, Ichijo H. Recruitment of tumor necrosis factor receptor-associated factor family proteins to apoptosis signal-regulating kinase 1 signalosome is essential for oxidative stress-induced cell death. *J Biol Chem*. 2005 Nov 4; 280(44):37033-40. Epub 2005 Aug 29.

Nusse R. Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res*. 2005 Jan; 15(1):28-32. Review.

O

Obara Y, Nakahata N. The signaling pathway leading to extracellular signal-regulated kinase 5 (ERK5) activation via G-proteins and ERK5-dependent neurotrophic effects. *Mol Pharmacol*. 2010 Jan; 77(1):10-6. doi: 10.1124/mol.109.060236. Epub 2009 Oct 26. Review.

O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, Hausmann G, Adams JM, Cory S, Huang DC. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J*. 1998 Jan 15; 17(2):384-95.

Orike N, Middleton G, Borthwick E, Buchman V, Cowen T, Davies AM. Role of PI 3-kinase, Akt and Bcl-2-related proteins in sustaining the survival of neurotrophic factor-independent adult sympathetic neurons. *J Cell Biol*. 2001 Sep 3; 154(5):995-1005. Epub 2001 Aug 27.

Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Jul;4(7):552-65. Review.

P

Pap M, Cooper GM. Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem*. 1998 Aug 7; 273(32):19929-32.

Papavassiliou AG, Treier M, Bohmann D. Intramolecular signal transduction in Jun. *EMBO J*. 1995 May 1;14(9):2014-9.

Parcellier A, Tintignac LA, Zhuravleva E, Hemmings BA. PKB and the mitochondria: AKTing on apoptosis. *Cell Signal*. 2008 Jan;20(1):21-30. Epub 2007 Jul 25. Review.

Park KM, Kramers C, Vayssier-Taussat M, Chen A, Bonventre JV. Prevention of kidney ischemia/reperfusion-induced functional injury, MAPK and MAPK kinase activation, and inflammation by remote transient ureteral obstruction. *J Biol Chem*. 2002 Jan 18;277(3):2040-9. Epub 2001 Nov 5.

Pérez-Navarro E, Gavaldà N, Gratacòs E, Alberch J. Brain-derived neurotrophic factor prevents changes in Bcl-2 family members and caspase-3 activation induced by excitotoxicity in the striatum. *J Neurochem*. 2005 Feb; 92(3):678-91.

Pi R, Li W, Lee NT, Chan HH, Pu Y, Chan LN, Sucher NJ, Chang DC, Li M, Han Y. Minocycline prevents glutamate-induced apoptosis of cerebellar granule neurons by differential regulation of p38 and Akt pathways. *J Neurochem*. 2004 Dec; 91(5):1219-30.

Pimienta G, Pascual J. Canonical and alternative MAPK signaling. *Cell Cycle*. 2007 Nov 1;6(21):2628-32. Epub 2007 Aug 22. Review.

Pirianov G, Brywe KG, Mallard C, Edwards AD, Flavell RA, Hagberg H, Mehmet H. Deletion of the c-Jun N-terminal kinase 3 gene protects neonatal mice against

cerebral hypoxic-ischaemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007 May; 27(5):1022-32. Epub 2006 Oct 25.

Ploia C, Antoniou X, Sclip A, Grande V, Cardinetti D, Colombo A, Canu N, Benussi L, Ghidoni R, Forloni G, Borsello T. JNK plays a key role in tau hyperphosphorylation in Alzheimer's disease models. *J Alzheimers Dis.* 2011; 26(2):315-29. doi: 10.3233/JAD-2011-110320.

Putcha GV, Le S, Frank S, Besirli CG, Clark K, Chu B, Alix S, Youle RJ, LaMarche A, Maroney AC, Johnson EM Jr. JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis. *Neuron.* 2003 Jun 19;38(6):899-914.

Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM, Strasser A. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell.* 1999 Mar; 3(3):287-96.

R

Raivich G. c-Jun expression, activation and function in neural cell death, inflammation and repair. *J Neurochem.* 2008 Nov;107(4):898-906. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05684.x. Epub 2008 Sep 13. Review.

Raju U, Nakata E, Mason KA, Ang KK, Milas L. Flavopiridol, a cyclin-dependent kinase inhibitor, enhances radiosensitivity of ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.* 2003 Jun 15;63(12):3263-7.

Reifert J, Hartung-Cranston D, Feinstein SC. Amyloid beta-mediated cell death of cultured hippocampal neurons reveals extensive Tau fragmentation without increased full-length tau phosphorylation. *J Biol Chem.* 2011 Jun 10;286(23):20797-811. doi: 10.1074/jbc.M111.234674. Epub 2011 Apr 11.

Resnick AC, Snowman AM, Kang BN, Hurt KJ, Snyder SH, Saiardi A. Inositol polyphosphate multikinase is a nuclear PI3-kinase with transcriptional regulatory

activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Sep 6;102(36):12783-8. Epub 2005 Aug 25.

S

Saavedra A, García-Martínez JM, Xifró X, Giralt A, Torres-Peraza JF, Canals JM, Díaz-Hernández M, Lucas JJ, Alberch J, Pérez-Navarro E. PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase 1 contributes to maintain the activation of the PI3K/Akt pro-survival pathway in Huntington's disease striatum. *Cell Death Differ*. 2010 Feb;17(2):324-35. doi: 10.1038/cdd.2009.127. Epub 2009 Sep 11.

Sakai K, Suzuki K, Tanaka S, Koike T. Up-regulation of cyclin D1 occurs in apoptosis of immature but not mature cerebellar granule neurons in culture. *J Neurosci Res*. 1999 Nov 1; 58(3):396-406.

Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res*. 2000 Feb;45(3):528-37. Review.

Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*. 2005 Feb 18; 307(5712):1098-101.

Schang LM, Coccaro E, Lacasse JJ. Cdk inhibitory nucleoside analogs prevent transcription from viral genomes. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2005; 24(5-7):829-37. Review.

Schinzl A, Kaufmann T, Borner C. Bcl-2 family members: integrators of survival and death signals in physiology and pathology [corrected]. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Mar 1; 1644(2-3):95-105. Review. Erratum in: *Biochim Biophys Acta*. 2004 May 28; 1692(1):45.

Senderowicz AM, Sausville EA. RESPONSE: re: preclinical and clinical development of cyclin-dependent kinase modulators. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Jul 19; 92(14):1185.

Senderowicz AM. Cyclin-dependent kinases as new targets for the prevention and treatment of cancer. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2002 Oct; 16(5):1229-53. Review.

Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature.* 1993 Dec 16; 366(6456):704-7.

Sevrioukova IF. Apoptosis-inducing factor: structure, function, and redox regulation. *Antioxid Redox Signal.* 2011 Jun 15; 14(12):2545-79. doi:10.1089/ars.2010.3445. Epub 2011 Mar 10. Review.

Shamas-Din A, Brahmhatt H, Leber B, Andrews DW. BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 2011 pr; 1813(4):508-20. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.11.024. Epub 2010 Dec 10. Review.

Shaulian E, Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol.* 2002 May; 4(5):E131-6. Review.

Shi L, Gong S, Yuan Z, Ma C, Liu Y, Wang C, Li W, Pi R, Huang S, Chen R, Han Y, Mao Z, Li M. Activity deprivation-dependent induction of the proapoptotic BH3-only protein Bim is independent of JNK/c-Jun activation during apoptosis in cerebellar granule neurons. *Neurosci Lett.* 2005 Feb 25; 375(1):7-12. Epub 2004 Nov 24.

Shi Y. Apoptosome: the cellular engine for the activation of caspase-9. *Structure.* 2002 Mar; 10(3):285-8. Review.

Shi Y. Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view. *Protein Sci.* 2004 Aug; 13(8):1979-87. Review.

Shiizaki S, Naguro I, Ichijo H. Activation mechanisms of ASK1 in response to various stresses and its significance in intracellular signaling. *Adv Biol Regul.* 2012 Sep 13.

Shimoke K, Yamagishi S, Yamada M, Ikeuchi T, Hatanaka H. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity elevates c-Jun N-terminal kinase activity in apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *Brain Res Dev Brain Res.* 1999 Feb 5; 112(2):245-53.

Shin I, Bakin AV, Rodeck U, Brunet A, Arteaga CL. Transforming growth factor beta enhances epithelial cell survival via Akt-dependent regulation of FKHRL1. *Mol Biol Cell.* 2001 Nov; 12(11):3328-39.

Singh S, Dikshit M. Apoptotic neuronal death in Parkinson's disease: involvement of nitric oxide. *Brain Res Rev.* 2007 un; 54(2):233-50. Epub 2007 Feb 7. Review.

Shiozaki EN, Shi Y. Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology. *Trends Biochem Sci.* 2004 Sep; 29(9):486-94. Review.

Song B, Xie B, Wang C, Li M. Caspase-3 is a target gene of c-Jun: ATF2 heterodimers during apoptosis induced by activity deprivation in cerebellar granule neurons. *Neurosci Lett.* 2011 Nov 14; 505(2):76-81. doi:10.1016/j.neulet.2011.09.060. Epub 2011 Oct 1.

Song B, Xie B, Wang C, Li M. c-Jun induction is independent of early growth response factor during cerebellar granule neuron apoptosis. *Neuroreport.* 2012 Jan 25; 23(2):67-72. doi:10.1097/WNR.0b013e32834e7d69.

Spigolon G, Veronesi C, Bonny C, Vercelli A. c-Jun N-terminal kinase signaling pathway in excitotoxic cell death following kainic acid-induced status epilepticus. *Eur J Neurosci.* 2010 Apr; 31(7):1261-72. doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07158.x. Epub 2010 Mar 24.

Staal SP, Hartley JW, Rowe WP. Isolation of transforming murine leukemia viruses from mice with a high incidence of spontaneous lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Jul; 74(7):3065-7.

Stefanis L. Caspase-dependent and -independent neuronal death: two distinct pathways to neuronal injury. *Neuroscientist*. 2005 Feb; 11(1):50-62. Review.

Strasser A. The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2005 Mar; 5(3):189-200. Review.

Subramaniam S, Unsicker K. ERK and cell death: ERK1/2 in neuronal death. *FEBS J*. 2010 Jan; 277(1):22-9. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07367.x. Epub 2009 Oct 16. Review.

Surmeier DJ, Guzman JN, Sanchez-Padilla J, Schumacker PT. The role of calcium and mitochondrial oxidant stress in the loss of substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Neuroscience*. 2011 Dec 15; 198:221-31. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.08.045. Epub 2011 Aug 25. Review.

Swirnoff AH, Milbrandt J. DNA-binding specificity of NGFI-A and related zinc finger transcription factors. *Mol Cell Biol*. 1995 Apr; 15(4):2275-87.

T

Tajes M, Yeste-Velasco M, Zhu X, Chou SP, Smith MA, Pallàs M, Camins A, Casadesús G. Activation of Akt by lithium: pro-survival pathways in aging. *Mech Ageing Dev*. 2009 Apr; 130(4):253-61. doi: 10.1016/j.mad.2008.12.006. Epub 2009 Jan 3.

Takeda K, Ichijo H. Neuronal p38 MAPK signalling: an emerging regulator of cell fate and function in the nervous system. *Genes Cells*. 2002 Nov;7(11):1099-111. Review.

Takeda K, Noguchi T, Naguro I, Ichijo H. Apoptosis signal-regulating kinase 1 in stress and immune response. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2008; 48:199-225. Review.

Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Mar; 9(3):231-41. Review.

Thiel G, Cibelli G. Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1. *J Cell Physiol.* 2002 Dec; 193(3):287-92. Review.

Thiel G, Kaufmann K, Magin A, Lietz M, Bach K, Cramer M. The human transcriptional repressor protein NAB1: expression and biological activity. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Oct 2; 1493(3):289-301.

Timsit S, Menn B. Cyclin-dependent kinase inhibition with roscovitine: neuroprotection in acute ischemic stroke. *Clin Pharmacol Ther.* 2012 Feb; 91(2):327-32. doi: 10.1038/clpt.2011.312. Epub 2012 Jan 4.

Tortarolo M, Veglianese P, Calvaresi N, Botturi A, Rossi C, Giorgini A, Migheli A, Bendotti C. Persistent activation of p38 mitogen-activated protein kinase in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis correlates with disease progression. *Mol Cell Neurosci.* 2003 Jun; 23(2):180-92.

Towers E, Gilley J, Randall R, Hughes R, Kristiansen M, Ham J. The proapoptotic dp5 gene is a direct target of the MLK-JNK-c-Jun pathway in sympathetic neurons. *Nucleic Acids Res.* 2009 May; 37(9):3044-60. doi:10.1093/nar/gkp175. Epub 2009 Mar 20.

Trimarchi JM, Lees JA. Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 Jan; 3(1):11-20. Review.

Troy CM, Stefanis L, Greene LA, Shelanski ML. Mechanisms of neuronal degeneration: a final common pathway? *Adv Neurol.* 1997; 72:103-11. Review.

Tsujimoto Y, Yunis J, Onorato-Showe L, Erikson J, Nowell PC, Croce CM. Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation. *Science*. 1984 Jun 29; 224(4656):1403-6.

V

van Dam H, Castellazzi M. Distinct roles of Jun : Fos and Jun : ATF dimers in oncogenesis. *Oncogene*. 2001 Apr 30;20(19):2453-64. Review.

Vanhaesebroeck B, Waterfield MD. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp Cell Res*. 1999 Nov 25; 253(1):239-54. Review.

Vaux DL. Apoptogenic factors released from mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Apr; 1813(4):546-50. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.08.002. Epub 2010 Aug 14. Review.

Verdaguer E, Jiménez A, Canudas AM, Jordà EG, Sureda FX, Pallàs M, Camins A. Inhibition of cell cycle pathway by flavopiridol promotes survival of cerebellar granule cells after an excitotoxic treatment. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004 Feb; 308(2):609-16. Epub 2003 Nov 10.

Verdaguer E, Jordà EG, Alvira D, Jiménez A, Canudas AM, Folch J, Rimbau V, Pallàs M, Camins A. Inhibition of multiple pathways accounts for the antiapoptotic effects of flavopiridol on potassium withdrawal-induced apoptosis in neurons. *J Mol Neurosci*. 2005; 26(1):71-84.

Verdaguer E, Jordà EG, Canudas AM, Jiménez A, Pubill D, Escubedo E, Camarasa J, Pallàs M, Camins A. Antiapoptotic effects of roscovitine in cerebellar granule cells deprived of serum and potassium: a cell cycle-related mechanism. *Neurochem Int*. 2004 Mar; 44(4):251-61.

Verdaguer E, Susana Gde A, Clemens A, Pallàs M, Camins A. Implication of the transcription factor E2F-1 in the modulation of neuronal apoptosis. *Biomed Pharmacother.* 2007 Aug; 61(7):390-9. Epub 2006 Nov 29. Review.

Vidal A, Koff A. Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene.* 2000 Apr 18; 247(1-2):1-15. Review.

Villalobos C, Caballero E, Sanz-Blasco S, Núñez L. Study of neurotoxic intracellular calcium signalling triggered by amyloids. *Methods Mol Biol.* 2012; 849:289-302. doi: 10.1007/978-1-61779-551-0_20.

Vinciguerra M, Esposito I, Salzano S, Madeo A, Nagel G, Maggiolini M, Gallo A, Musti AM. Negative charged threonine 95 of c-Jun is essential for c-Jun N-terminal kinase-dependent phosphorylation of threonine 91/93 and stress-induced c-Jun biological activity. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008; 40(2):307-16.

Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem.* 1994 Feb 18; 269(7):5241-8.

Volbracht C, Chua BT, Ng CP, Bahr BA, Hong W, Li P. The critical role of calpain versus caspase activation in excitotoxic injury induced by nitric oxide. *J Neurochem.* 2005 Jun; 93(5):1280-92. Erratum in: *J Neurochem.* 2005 Sep; 94(5):1471.

Vries RG, Prudenziati M, Zwartjes C, Verlaan M, Kalkhoven E, Zantema A. A specific lysine in c-Jun is required for transcriptional repression by E1A and is acetylated by p300. *EMBO J.* 2001 Nov 1;20(21):6095-103.

W

Wagner G, Laufer S. Small molecular anti-cytokine agents. *Med Res Rev.* 2006 Jan; 26(1):1-62. Review.

Walton MR, Dragunow I. Is CREB a key to neuronal survival? *Trends Neurosci.* 2000 Feb; 23(2):48-53. Review.

Walton M, Woodgate AM, Sirimanne E, Gluckman P, Dragunow M. ATF-2 phosphorylation in apoptotic neuronal death. *Brain Res Mol Brain Res.* 1998 Dec 10; 63(1):198-204.

Wang L, Ankati H, Akubathini SK, Balderamos M, Storey CA, Patel AV, Price V, Kretschmar D, Biehl ER, D'Mello SR. Identification of novel 1,4-benzoxazine compounds that are protective in tissue culture and in vivo models of neurodegeneration. *J Neurosci Res.* 2010 Jul;88(9):1970-84. doi: 10.1002/jnr.22352.

Wang Q, Liu L, Pei L, Ju W, Ahmadian G, Lu J, Wang Y, Liu F, Wang YT. Control of synaptic strength, a novel function of Akt. *Neuron.* 2003 Jun 19; 38(6):915-28.

Wang YN, Chen YJ, Chang WC. Activation of extracellular signal-regulated kinase signaling by epidermal growth factor mediates c-Jun activation and p300 recruitment in keratin 16 gene expression. *Mol Pharmacol.* 2006 Jan;69(1):85-98. Epub 2005 Oct 7.

Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, Thompson CB, Korsmeyer SJ. tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev.* 2000 Aug 15;14(16):2060-71.

Westphal D, Dewson G, Czabotar PE, Kluck RM. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Apr; 1813(4):521-31. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.12.019. Epub 2010 Dec 30. Review.

Whitfield J, Neame SJ, Paquet L, Bernard O, Ham J. Dominant-negative c-Jun promotes neuronal survival by reducing BIM expression and inhibiting mitochondrial cytochrome c release. *Neuron.* 2001 Mar; 29(3):629-43.

Whitmarsh AJ, Davis RJ. Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends Biochem Sci.* 1998 Dec; 23(12):481-5. Review.

Whitmarsh AJ. Regulation of gene transcription by mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Aug; 1773(8):1285-98. Epub 2006 Nov 17. Review.

Wick MJ, Dong LQ, Riojas RA, Ramos FJ, Liu F. Mechanism of phosphorylation of protein kinase B/Akt by a constitutively active 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1. *J Biol Chem.* 2000 Dec 22; 275(51):40400-6.

Williams DW, Kondo S, Krzyzanowska A, Hiromi Y, Truman JW. Local caspase activity directs engulfment of dendrites during pruning. *Nat Neurosci.* 2006 Oct; 9(10):1234-6. Epub 2006 Sep 17.

Willis SN, Adams JM. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol.* 2005 Dec; 17(6):617-25. Epub 2005 Oct 21. Review.

Willis SN, Chen L, Dewson G, Wei A, Naik E, Fletcher JI, Adams JM, Huang DC. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev.* 2005 Jun 1; 19(11):1294-305. Epub 2005 May 18.

Wu K, Jiang SW, Couch FJ. p53 mediates repression of the BRCA2 promoter and down-regulation of BRCA2 mRNA and protein levels in response to DNA damage. *J Biol Chem.* 2003 May 2; 278(18):15652-60. Epub 2003 Feb 18.

Wu Z, Zheng S, Yu Q. The E2F family and the role of E2F1 in apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009 Dec; 41(12):2389-97. doi: 10.1016/j.biocel.2009.06.004. Epub 2009 Jun 17.

Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 1980; 68:251-306. Review.

Würstle ML, Laussmann MA, Rehm M. The central role of initiator caspase-9 in apoptosis signal transduction and the regulation of its activation and activity on the apoptosome. *Exp Cell Res.* 2012 Jul 1; 318(11):1213-20. doi: 10.1016/j.yexcr.2012.02.013. Epub 2012 Feb 28. Review.

X

Xia HJ, Yang G. Inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinases: functions and regulations. *Cell Res.* 2005 Feb; 15(2):83-91. Review.

Xie B, Wang C, Zheng Z, Song B, Ma C, Thiel G, Li M. Egr-1 transactivates Bim gene expression to promote neuronal apoptosis. *J Neurosci.* 2011 Mar 30; 31(13):5032-44. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5504-10.2011.

Xifró X, Falluel-Morel A, Miñano A, Aubert N, Fadó R, Malagelada C, Vaudry D, Vaudry H, Gonzalez B, Rodríguez-Alvarez J. N-methyl-D-aspartate blocks activation of JNK and mitochondrial apoptotic pathway induced by potassium deprivation in cerebellar granule cells. *J Biol Chem.* 2006 Mar 10; 281(10):6801-12. Epub 2005 Dec 27.

Y

Yamagishi S, Matsumoto T, Yokomaku D, Hatanaka H, Shimoke K, Yamada M, Ikeuchi T. Comparison of inhibitory effects of brain-derived neurotrophic factor and insulin-like growth factor on low potassium-induced apoptosis and activation of p38 MAPK and c-Jun in cultured cerebellar granule neurons. *Brain Res Mol Brain Res.* 2003 Nov 26; 119(2):184-91.

Yamagishi S, Yamada M, Ishikawa Y, Matsumoto T, Ikeuchi T, Hatanaka H. p38 mitogen-activated protein kinase regulates low potassium-induced c-Jun

phosphorylation and apoptosis in cultured cerebellar granule neurons. *J Biol Chem*. 2001 Feb 16; 276(7):5129-33. Epub 2000 Nov 16.

Yamagishi S, Yamada M, Koshimizu H, Takai S, Hatanaka H, Takeda K, Ichijo H, Shimoke K, Ikeuchi T. Apoptosis-signal regulating kinase-1 is involved in the low potassium-induced activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun in cultured cerebellar granule neurons. *J Biochem*. 2003 Jun; 133(6):719-24. Erratum in: *J Biochem (Tokyo)*. 2003 Jul; 134(1):173.

Yang DD, Kuan CY, Whitmarsh AJ, Rincón M, Zheng TS, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA. Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature*. 1997 Oct 23; 389(6653):865-70.

Yang Y, Kim D, Fathman CG. Regulation of programmed cell death following T cell activation in vivo. *Int Immunol*. 1998 Feb; 10(2):175-83.

Yang Y, Mufson EJ, Herrup K. Neuronal cell death is preceded by cell cycle events at all stages of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2003 Apr 1; 23(7):2557-63.

Yasuda J, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sharma M, Davis RJ. The JIP group of mitogen-activated protein kinase scaffold proteins. *Mol Cell Biol*. 1999 Oct; 19(10):7245-54.

Ye H, Cande C, Stephanou NC, Jiang S, Gurbuxani S, Larochette N, Daugas E, Garrido C, Kroemer G, Wu H. DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat Struct Biol*. 2002 Sep; 9(9):680-4.

Yeste-Velasco M, Folch J, Pallàs M, Camins A. The p38(MAPK) signaling pathway regulates neuronal apoptosis through the phosphorylation of the retinoblastoma protein. *Neurochem Int*. 2009 Feb;54(2):99-105. doi: 10.1016/j.neuint.2008.10.004. Epub 2008 Oct 21.

Yeste-Velasco M, Folch J, Pallàs M, Camins A. The p38(MAPK) signaling pathway regulates neuronal apoptosis through the phosphorylation of the retinoblastoma

protein. *Neurochem Int.* 2009 Feb;54(2):99-105. doi: 10.1016/j.neuint.2008.10.004. Epub 2008 Oct 21.

Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Jan;9(1):47-59. Review.

Young AP, Nagarajan R, Longmore GD. Mechanisms of transcriptional regulation by Rb-E2F segregate by biological pathway. *Oncogene.* 2003 Oct 16;22(46):7209-17.

Young JE, Garden GA, Martinez RA, Tanaka F, Sandoval CM, Smith AC, Sopher BL, Lin A, Fischbeck KH, Ellerby LM, Morrison RS, Taylor JP, La Spada AR. Polyglutamine-expanded androgen receptor truncation fragments activate a Bax-dependent apoptotic cascade mediated by DP5/Hrk. *J Neurosci.* 2009 Feb 18; 29(7):1987-97. doi:10.1523/JNEUROSCI.4072-08.2009.

Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell.* 1993 Nov 19; 75(4):641-52.

Yuan Z, Gong S, Luo J, Zheng Z, Song B, Ma S, Guo J, Hu C, Thiel G, Vinson C, Hu CD, Wang Y, Li M. Opposing roles for ATF2 and c-Fos in c-Jun-mediated neuronal apoptosis. *Mol Cell Biol.* 2009 May;29(9):2431-42. doi: 10.1128/MCB.01344-08. Epub 2009 Mar 2.

Z

Zhang Z, Cao X, Xiong N, Wang H, Huang J, Sun S, Liang Z, Wang T. DNA polymerase-beta is required for 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced apoptotic death in neurons. *Apoptosis.* 2010 Jan; 15(1):105-15. doi: 10.1007/s10495-009-0425-8.

Zeng KW, Wang XM, Ko H, Kwon HC, Cha JW, Yang HO. Hyperoside protects primary rat cortical neurons from neurotoxicity induced by amyloid β -protein via the PI3K/Akt/Bad/Bcl(XL)-regulated mitochondrial apoptotic pathway. *Eur J Pharmacol.* 2011 Dec 15; 672(1-3):45-55. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.09.177. Epub 2011 Sep 29.

Zhou H, Li XM, Meinkoth J, Pittman RN. Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level. *J Cell Biol.* 2000 Oct 30;151(3):483-94.

Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem.* 1999 Apr 23; 274(17):11549-56.

Zurashvili T, Cerdón-Barris L, Ruiz-Babot G, Zhou X, Lizcano JM, Gómez N, Giménez-Llort L, Bayascas JR. Interaction of PDK1 with phosphoinositides is essential for neuronal differentiation, but dispensable for neuronal survival. *Mol Cell Biol.* 2012 Dec 28.

