



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



Función del complejo Cdk1- ciclina B1 en la excitotoxicidad

-TESIS DOCTORAL-

MIGUEL VEAS-PÉREZ DE TUDELA RODRÍGUEZ

Salamanca, 2015



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



Función del complejo Cdk1- ciclina B1 en la excitotoxicidad

MIGUEL VEAS-PÉREZ DE TUDELA RODRÍGUEZ

Directoras:

Prof^ª. Dra. D^a. Ángeles Almeida Parra

Prof^ª. Dra. D^a María Delgado Esteban

Salamanca, 2015

Ángeles Almeida Parra, Investigadora del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca, Hospital Universitario de Salamanca y Profesora Asociada del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca, y María Delgado Esteban, Investigadora del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca y Hospital Universitario de Salamanca

AUTORIZAN:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “**Función del complejo Cdk1-ciclina B1 en la excitotoxicidad**”, que ha sido realizada bajo su dirección por el Licenciado en Farmacia, Miguel Veas-Pérez de Tudela Rodríguez, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y en el Instituto de Biología Funcional y Genómica de la Universidad de Salamanca.



Salamanca, a 14 de junio de 2015.

Fdo.: Ángeles Almeida Parra

Fdo.: María Delgado Esteban

INTRODUCCIÓN.....	1
PARTE I. CICLO CELULAR.....	3
1. FASES DEL CICLO CELULAR.....	3
2. REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR.....	4
2.1. Puntos de control o <i>checkpoints</i>	4
2.1.1. <i>Checkpoint de daño al ADN</i>	5
2.1.2. <i>Checkpoint de huso mitótico</i>	6
2.1.3. <i>Checkpoint de antefase</i>	6
2.2. Quinasas dependientes de ciclinas (<i>Cdks</i>).....	6
2.2.1. <i>Reguladores positivos de las Cdks</i>	8
2.2.2. <i>Ciclinas B</i>	9
2.2.3. <i>Reguladores negativos de las Cdks</i>	11
2.3. Sistema ubiquitina proteasoma.....	12
PARTE II. APC/C.....	14
1. ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN.....	14
2. COFACTORES.....	17
3. RECONOCIMIENTO DE SUSTRATOS.....	19
4. APC/C Y SU RELEVANCIA EN EL CICLO CELULAR.....	20
4.1. Progresión de la mitosis.....	21
4.2. Mantenimiento de G_0/G_1	23
4.3. Acoplamiento con la fase <i>S</i>	24
4.4. Activación de APC/C en respuesta a daño en el ADN.....	24
5. REGULACIÓN DE APC/Cdh1.....	25
5.1. Regulación de la cantidad de proteína de Cdh1.....	25
5.2. Regulación por fosforilación de Cdh1.....	25
5.3. Principales inhibidores.....	26
5.3.1. <i>E_{mi}1</i>	26
5.3.2. <i>Rassf1a</i>	27
5.3.3. <i>Rae1-Nup98</i>	27
5.4. Principales activadores.....	28

6. FUNCIONES DE APC/C EN EL SISTEMA NERVIOSO.....	28
6.1. Diferenciación neuronal.....	28
6.2. Supervivencia neuronal.....	29
6.3. Glucólisis.....	31
6.4. Sinapsis, memoria y aprendizaje.....	32
PARTE III. MITOCONDRIA.....	33
1. SISTEMA DE FOSFORILACIÓN OXIDATIVA (OXPHOS).....	33
1.1. Cadena transportadora de electrones.....	34
1.1.1. NADH: Ubiquinona oxidoreductasa (Complejo I).....	34
1.1.2. Succinato: Ubiquinona oxidoreductasa (Complejo II).....	36
1.1.3. Ubiquinol-citocromo C oxidoreductasa (Complejo III).....	37
1.1.4. Citocromo C oxidasa (Complejo IV).....	37
1.2. ATP sintasa (Complejo V).....	38
2. FAMILIA BCL-2.....	40
2.1. Bcl-xL.....	41
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	43
1. HIPÓTESIS.....	43
2. OBJETIVOS.....	46
MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
1. CULTIVOS CELULARES.....	49
1.1. Especies ensayadas y condiciones del animalario.....	49
1.2. Cultivo primario de neuronas corticales.....	50
1.3. Línea celular HEK-293T.....	52
2. TRANSFECCIÓN TRANSITORIA DE CÉLULAS DE MAMÍFERO.....	52
2.1. Construcción de los plásmidos.....	52
2.2. "Small interfering RNA" (siRNA).....	53
2.3. "Small hairpin RNA" (shRNA).....	53
2.4. Sobreexpresión de proteínas.....	54
2.5. Mutagénesis dirigida.....	54
2.6. Transfecciones celulares.....	55

3. TRATAMIENTOS DE LAS CÉLULAS.....	56
3.1. Estimulación de neuronas con glutamato.....	56
3.2. Inhibidores de caspasas y otros tratamientos farmacológicos.....	56
4. ANÁLISIS DE LA APOPTOSIS NEURONAL.....	57
4.1. Anexina V/7-amino-actinomicina D.....	57
4.2. Caspasa-3 activa.....	60
5. ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS).....	61
6. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA ($\Delta\Psi_m$) COMO ÍNDICE DE INTEGRIDAD MITOCONDRIAL.....	62
7. DETERMINACIÓN DE LA INCORPORACIÓN DE BROMO-D-URIDINA (BrdU).....	63
8. TRANSFERENCIA TIPO WESTERN BLOT.....	63
8.1. Extracción de proteínas.....	63
8.1.1. Extracción de proteínas totales.....	63
8.1.2. Extracción de proteínas mitocondriales y citosólicas.....	64
8.1.3. Extracción de proteínas nucleares.....	66
8.1.4. Fraccionamiento submitocondrial.....	68
8.2. Determinación de la concentración de proteínas.....	68
8.3. Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE.....	69
8.4. Inmunodetección de proteínas por Western blot.....	70
8.5. "Stripping" de membranas de nitrocelulosa.....	73
8.6. Tinción de geles SDS-PAGE con azul de Coomasie.....	74
8.7. Co-inmunoprecipitación de proteínas en condiciones desnaturalizantes.....	74
9. OXIDACIÓN DE COMPLEJOS MITOCONDRIALES MEDIANTE ELECTROFORESIS NATIVA.....	74
9.1. Aislamiento mitocondrial.....	74
9.2. Electroforesis nativa.....	75
9.3. Inmunodetección.....	76
10. INMUNOCITOQUÍMICA.....	77
11. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS QUINASAS DEPENDIENTES DE CICLINA (CDKs).....	77

12. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS COMPLEJOS DE LA CADENA TRANSPORTADORA DE ELECTRONES MITOCONDRIAL.....	78
13. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ATP.....	80
14. DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE OXÍGENO.....	81
15. OBTENCIÓN Y MANIPULACIÓN DEL RNA.....	82
15.1. Extracción de RNA.....	82
15.2. Retrotranscripción (RT).....	83
15.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) semicuantitativa.....	83
15.4. Electroforesis de DNA en geles horizontales de agarosa.....	84
16. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	85

RESULTADOS.....87

1. LA ESTIMULACIÓN DE LOS RECEPTORES DE GLUTAMATO PROVOCA LA ENTRADA ABERRANTE DE LAS NEURONAS EN EL CICLO CELULAR Y LA ACUMULACIÓN DE CICLINA B ₁	89
2. LA INACTIVACIÓN DEL COMPLEJO APC/C-Cdh1 ES EL RESPONSABLE DE LA ACUMULACIÓN DE CICLINA B ₁ EN LAS NEURONAS CORTICALES EN CULTIVO PRIMARIO.....	97
3. LA ESTIMULACIÓN DE LOS RECEPTORES DE GLUTAMATO PRODUCE LA ACUMULACIÓN DEL COMPLEJO CDK ₁ /CICLINA B ₁ EN LA MITOCONDRIA PROVOCANDO ESTRÉS OXIDATIVO Y DEFICIENCIA ENERGÉTICA.....	104
4. LA ACTIVACIÓN DEL COMPLEJO CDK ₁ /CICLINA B ₁ INHIBE LA ATP SINTASA PROVOCANDO DAÑO OXIDATIVO AL COMPLEJO I MITOCONDRIAL.....	110

5. LA ESTIMULACIÓN DE LOS RECEPTORES DE GLUTAMATO PROVOCA QUE EL COMPLEJO CDK1/CICLINA B1 FOSFORILE BCL-XL PROVOCANDO SU DISOCIACIÓN DE LA ATP SINTASA Y CAUSANDO SU INHIBICIÓN Y LA DEL COMPLEJO |.....117
6. LA ESTIMULACIÓN DE LOS RECEPTORES DE GLUTAMATO PROMUEVE LA FOSFORILACIÓN DE BCL-XL MEDIADA POR EL COMPLEJO CDK1/CICLINA B1, LO QUE PROVOCA ESTRÉS OXIDATIVO Y DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL.....126

DISCUSIÓN.....129

1. TRAS UN ESTÍMULO EXCITOTÓXICO TIENE LUGAR UN NORMAL DESARROLLO DEL CICLO CELULAR HASTA QUE SE PRODUCE LA ESTABILIZACIÓN DE CICLINA B1.....131
2. LA ESTABILIZACIÓN DE CICLINA B1 TIENE LUGAR ESPECÍFICAMENTE EN LA MITOCONDRIA.....131
3. EL COMPLEJO CDK1-CICLINA B1 FOSFORILA BCL-XL E INHIBE LA ACTIVIDAD ATP SINTASA.....132
4. LA INACTIVACIÓN DE LA ACTIVIDAD ATP SINTASA DESENCADENA LA DISFUNCIÓN A SU VEZ EN LA ACTIVIDAD DEL COMPLEJO |.....132
5. EL COLAPSO DE LA CADENA TRANSPORTADORA MITOCONDRIAL DESENCADENA LA MUERTE NEURONAL POR APOPTOSIS.....133
6. POSIBLE IMPLICACIÓN DE LA VÍA CDK1-CICLINA B1-BCL-XL EN CÁNCER.....134

CONCLUSIONES.....135

BIBLIOGRAFÍA.....139

INTRODUCCIÓN

"En algún lugar, algo increíble espera ser descubierto"
(Carl Sagan)

PARTE I. CICLO CELULAR

El ciclo celular es un proceso esencial para el desarrollo, la diferenciación y la proliferación de las células eucariotas, y se define como el conjunto de procesos por los que, a partir de una célula madre, se obtienen dos células hijas con la misma información genética. A lo largo del ciclo celular debe existir una coordinación entre el crecimiento de las células y su división.

La condición esencial para que ocurra la división celular es que la célula madre transmita adecuadamente su información genética a las dos células hijas. Para ello, el ácido desoxirribonucleico (ADN) ha de ser replicado de forma exacta y única en cada ciclo y las cromátidas hermanas obtenidas deben ser segregadas a cada una de las nuevas células, hecho que requiere cambios drásticos en la condensación del ADN y en la organización del citoesqueleto celular [Murray, 2004].

1. FASES DEL CICLO CELULAR

Clásicamente, el ciclo celular eucariótico se divide en 4 fases:

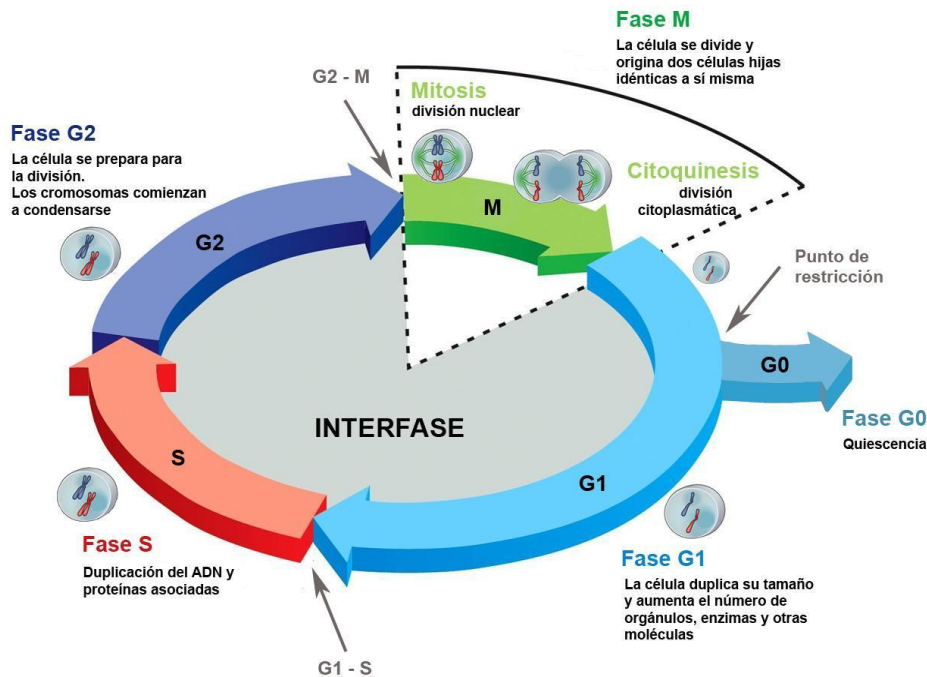
Fase S: Es la fase de replicación del ADN.

Fase M: Periodo en el que se produce la segregación cromosómica. Comprende además de la mitosis que es la división nuclear, la citoquinesis o división celular propiamente dicha.

Fase G1 y fase G2: (*gap* o intervalo), G1 conecta la fase M con el inicio de la fase S del ciclo siguiente, y G2 separa la fase S de la fase M posterior. Durante estos dos periodos la célula crece y comprueba que los procesos ocurridos durante la fase anterior se han producido adecuadamente, en cuyo caso ocurre la transición a la siguiente fase del ciclo, de ahí la importancia de las transiciones G1/S y G2/M.

La entrada de las células en un nuevo ciclo de división está determinada no sólo por la propia información interna de la célula sino por señales externas, aunque estas sólo

afectan a la progresión del ciclo hasta un momento determinado de G1, conocido como punto de restricción o punto R, a partir del cual el control lo ejerce solamente la maquinaria del ciclo celular. En el punto R, las células pueden abandonar el ciclo, ya sea temporal o permanentemente, y entrar en una fase quiescente denominada fase G0 (Esquema 1) [Schneider, 1988; Murray, 2004].



Esquema 1. Esquema general del ciclo celular. El ciclo celular consta de 4 fases: G1, S, G2 y M. La fase S comienza al iniciarse la replicación del ADN. La entrada en fase M se caracteriza por la rotura de la envuelta nuclear y la condensación cromosómica, mientras que la segregación de cromátidas hermanas marca la transición metafase/anafase. Modificado de [Hochegger, 2008].

2. REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR

2.1. PUNTOS DE CONTROL O *CHECKPOINTS*

Los puntos de control del ciclo celular o *checkpoints*, son mecanismos que permiten asegurar la estabilidad, la correcta replicación y la distribución adecuada del material genético en las células. Estos *checkpoints* funcionan principalmente durante las transiciones G2/M y metafase/anafase. Su función consiste en verificar que se hayan completado correctamente y con precisión, procesos cruciales anteriores, como pueden ser la replicación y el anclaje de todos los cinetocoros al huso mitótico, antes de que se

lleve a cabo la progresión a la siguiente fase del ciclo [Hartwell, 1989; Rieder, 1997; van Vugh, 2010]. A continuación se presentan los principales *checkpoints* descritos en células de mamífero.

2.1.1. Checkpoint de daño al ADN

Los cambios en la secuencia de ADN en la línea germinal, son esenciales para mantener la variabilidad genética y así poder asegurar la aparición de modificaciones que permiten una mejor adaptación al medio. Sin embargo, en la línea somática, los cambios genéticos son perjudiciales, y las células han desarrollado mecanismos de seguridad muy estrictos para detectar y corregir las posibles alteraciones que haya podido sufrir el ADN. Por todo ello, este *checkpoint* se pone en funcionamiento cuando se detectan alteraciones en la estructura de la cadena de ADN o roturas, con la finalidad de detener el ciclo celular y proceder a su reparación. De esta manera, se evita la transmisión de mutaciones a las células hijas, contribuyendo al mantenimiento de su estabilidad genómica [Cipressa, 2013; Furgason, 2013].

A) Transición G1/S: impide a la célula que se prepare para la replicación del ADN, hasta que se haya eliminado el daño detectado [Shiloh, 2003; Shiloh, 2013].

B) Intra S o de replicación: regula el programa temporal de los distintos orígenes de replicación, así como la tasa de elongación de las horquillas de replicación. Se activa en respuesta a problemas que afectan a la replicación o frente al daño sufrido el ADN durante la fase S. Normalmente este daño es producido por radiación ionizante o radiación ultravioleta [Abraham, 2001; Grallert, 2008].

C) Transición G2/M: evita que entren en mitosis células que han terminado la replicación de su ADN y, posteriormente, han sido expuestas a agentes que lo han dañado, o bien células que han traspasado el *checkpoint* Intra S con daño en el ADN sin reparar [Busby, 2000; Ciccia 2010].

2.1.2. Checkpoint de huso mitótico

Este checkpoint asegura la correcta segregación cromosómica en mitosis, evitando así la aparición de aneuploidías. Controla los acontecimientos que tienen lugar desde la ruptura de la envuelta nuclear hasta la metafase tardía, asegurando que todos los cromosomas estén correctamente anclados al huso mitótico y alineados en la placa metafásica. La activación de este *checkpoint* provoca la parada del ciclo celular como consecuencia de la inhibición del Complejo Promotor de la Anafase/Ciclosoma o APC/C (*Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*), del que hablaremos más adelante en profundidad [Musacchio, 2007; Silva, 2011].

2.1.3. Checkpoint de antefase

Este mecanismo se pone en marcha cuando se detectan problemas en el ensamblaje del huso mitótico, frente a cambios en la topología de la cromatina, o cuando existe un estrés térmico u osmótico. Promueve la parada de las células en la denominada antefase, que se corresponde con un periodo al final de G₂, que es anterior a los signos visibles de condensación cromosómica [Chin, 2010; Mikhailov, 2005].

2.2. QUINASAS DEPENDIENTES DE CICLINAS (CDKs)

Las quinasas dependientes de ciclinas (Cdk, *Cyclin-dependent kinases*) son moléculas heterodiméricas reguladoras cuya función es fosforilar residuos de serina y treonina de proteínas específicas. Según el modelo clásico, son las Cdk las que participan en la regulación del ciclo celular y están sometidas a una estricta regulación [Malumbres, 2005; Malumbres, 2014].

Las Cdk mantienen sus niveles proteicos constantes durante el ciclo celular a pesar de que su actividad fluctúa a lo largo del él. Por sí solas no tienen actividad quinasa, necesitan formar un complejo junto con una subunidad catalítica que es la ciclina, constituyendo lo que se conoce como complejo Cdk-ciclina. La actividad de los complejos Cdk-ciclina está regulada por la ubiquitinación y la posterior degradación proteolítica de las ciclinas, la presencia de inhibidores de Cdk o CDKIs (*cyclin-dependent kinase inhibitors*) y procesos de fosforilación y desfosforilación de las Cdk [Hochegger, 2008].

Hasta el momento hay descritas 12 Cdk: Cdk1 a Cdk12, que actúan en diferentes momentos del ciclo celular [Chen, 2006; Kimura, 2001; Kong, 2000]. En células de mamíferos se ha caracterizado, entre otras cosas, que:

a) Cdk4 y Cdk6 forman complejos con la ciclina D y funcionan durante la transición G0/G1, fosforilando, entre otras, a la proteína del retinoblastoma, que con su inhibición activa así la expresión de genes necesarios para la entrada en la fase S [Hirai, 2005].

b) Cdk2 puede unirse también a la ciclina D, pero más comúnmente se asocia con la ciclina A y la ciclina E, interviniendo en la fase S mediante el control de la síntesis de ADN [Nguyen, 2002].

c) Cdk1 es necesaria para la entrada y la progresión por las primeras etapas de la mitosis. Se une a las ciclinas mitóticas A y B, siendo el complejo Cdk1-ciclina B el más importante y único esencial para que se complete un ciclo celular [Santamaría, 2007]. Dicho complejo se activa rápidamente durante la mitosis y se asocia al huso mitótico en la metafase. La ciclina B se degrada en la transición de metafase/anafase [Malumbres, 2005; Malumbres, 2009].

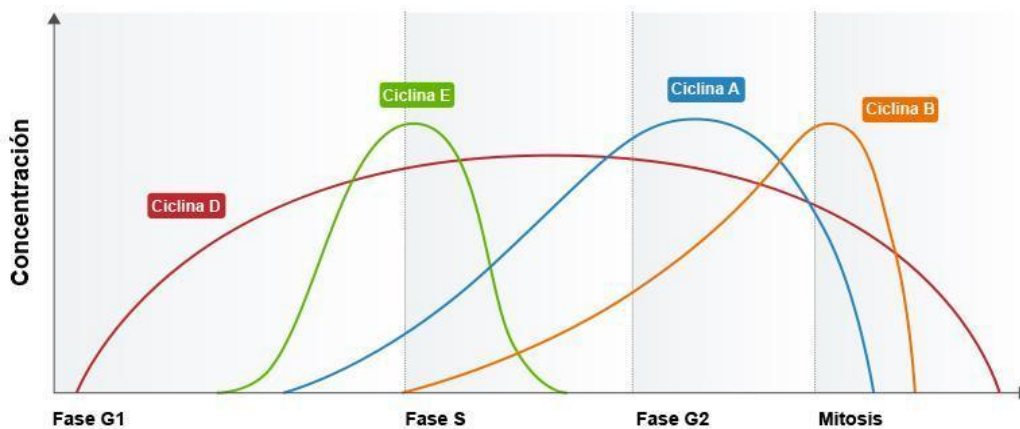
d) Cdk5, que pese a ser estructuralmente similar al resto de Cdk, difiere de ellas en cuanto a sus funciones y regulación. Aunque se expresa en varios tejidos, su actividad quinasa se detecta principalmente en neuronas postmitóticas, coincidiendo con el patrón de expresión de sus activadores [Liebl, 2011; Maestre, 2008]. La actividad de Cdk5 requiere la asociación de sus activadores específicos p35 y p39 [Arif, 2012; Hisanaga, 2010] o las formas truncadas de éstos por acción de la proteasa calpaína (p25 y p29 respectivamente) [Lee, 2000]. p35 es una proteína inestable, con una vida media de 20-30 minutos, que se degrada por la vía de la ubiquitina-proteosoma. Su degradación es más lenta cuando se inhibe su fosforilación por Cdk5, lo que sugiere un mecanismo de retroalimentación negativa en la regulación de Cdk5 [Patrick, 1998]. p25 es una proteína más estable que p35, no anclada a membrana y con una vida media tres veces mayor. La unión de Cdk5 a p25 cambia su localización subcelular, permitiendo el acceso a sustratos alejados de la membrana plasmática, y la mantiene en un estado hiperactivado, a menudo asociado a fenómenos de neurotoxicidad [Patrick, 1999; Lee, 2000].

Cdk5 fosforila residuos de serina o treonina situados en una secuencia consenso idéntica a la de Cdk1 y Cdk2, pero su función en la progresión del ciclo celular no es clara [Malumbres, 2014], sino que principalmente desempeña sus funciones en el sistema nervioso [Shah, 2014]. Durante el desarrollo del mismo, la actividad Cdk5/p35 es esencial para la migración y diferenciación neuronal, entre otras muchas funciones [Kawauchi, 2014].

Como ocurre con Cdk5, no todas las ciclinas y Cdks funcionan como reguladoras del ciclo celular. Entre otras funciones, se encuentran la regulación de la transcripción, la reparación del ADN, la diferenciación y la apoptosis [Enders, 2012; Wang, 2011].

2.2.1. Reguladores positivos de las Cdks

Los principales reguladores positivos de las Cdks son las ciclinas. Estas moléculas son proteínas sintetizadas durante la interfase y destruidas al final de la mitosis de cada ciclo [Haesslein, 2002; MacLachlan, 1995]. Se han descrito diversos tipos de ciclinas (A, B1, B2, B3, C, D1, D2, D3, E, F, G, H, I, K, L1, L2, T1 y T2), pero todas ellas contienen un dominio relativamente conservado responsable de su unión a las Cdks [Malumbres, 2005; Malumbres, 2014]. Dependiendo de la fase del ciclo en la que aparecen y la Cdk a la que se unen, se distinguen cuatro tipos de ciclinas (**Esquema 2**).



Esquema 2. Expresión de las diferentes ciclinas a lo largo del ciclo celular. Modificado de [Bardin, 2001].

a) Las ciclinas de fase G1 promueven el paso por el punto de restricción, lo que conlleva la entrada de la célula en un nuevo ciclo celular. Son las ciclinas D, que se asocian a Cdk4 y Cdk6 durante G1.

b) La ciclina E asociada a Cdk2, que es requerida para el inicio de la replicación del ADN, se considera una ciclina G1-S.

c) Las ciclinas de fase S permiten la progresión por esta fase. Forma parte de este grupo la ciclina A, que se asocia a Cdk2 y Cdk1.

d) Las ciclinas mitóticas son responsables de la mitosis. En este grupo encontramos a la ciclina A y, sobre todo, las ciclinas B cuando se asocian a Cdk1, de las que hablaremos en el siguiente apartado más extensamente [McCollum, 2001; Niehrs, 2012].

Las Cdks pueden ser también activadas por otras proteínas que no son las ciclinas. Además de algunos activadores específicos de Cdk5, existen las proteínas de la familia *RINGO/Speedy* que pueden unirse y activar directamente Cdk1 y Cdk2 [Chauhan, 2012; Nebreda, 2006]. También las denominadas ciclinas virales, como por ejemplo en el caso del virus del herpes, que contienen una proteína que comparte de manera modesta una pequeña secuencia con las ciclinas celulares en una región denominada *cyclin box*. Una de las ciclinas virales mejor caracterizada es la ciclina K, presente en el sarcoma de Kaposi o HSKV (*Herpes Kaposi's sarcoma-associated virus*), que comparte una similitud del 30% con la ciclina D2 y forma complejos activos con Cdk4 y Cdk6 [Laman, 2000; Mitnacht, 2000].

2.2.2. Ciclinas B

La familia de ciclinas de tipo B en mamíferos está formada principalmente por la ciclina B1 y ciclina B2. Se ha descrito también una ciclina B3 relacionada con la gametogénesis [Nguyen, 2002].

Tanto la ciclina B1 como B2 se asocian a Cdk1, como ya hemos descrito, y participan en la regulación del ciclo celular, principalmente en la transición G2/M. En

situaciones de daño del ADN, se detiene la progresión del ciclo celular para iniciar el proceso de senescencia y evitar la propagación de mutaciones. En estas situaciones, la salida de ciclo en fase G2 responde a la acumulación y posterior traslocación de la ciclina B1 fuera del núcleo mediada por la activación de p53 y p21 [Krenning, 2014; Müllers, 2014]. Poco se conoce de la ciclina B2, aparte de que se localiza en los satélites centriolares de células somáticas y que está implicada en la formación del huso cromático en oocitos de rana [Spalluto, 2013; Kotani, 2001; Nam y van Deursen, 2014].

En trabajos previos de nuestro grupo se ha demostrado que la supervivencia de las neuronas depende de la continua degradación de la ciclina B1 [Almeida, 2005], y se ha relacionado un aumento en la expresión de ciclina B1 con los procesos de excitotoxicidad en neuronas corticales [Maestre, 2008; Almeida, 2012]. Es más, se ha descrito la acumulación de ciclina B1 en áreas cerebrales dañadas en pacientes de la enfermedad de Alzheimer [Vincent, 1997; Yang, 2003] e ictus [Love, 2003], así como en modelos experimentales de isquemia cerebral [Erdo, 2004; Wen, 2004; Rashidian, 2007]. Este hecho es compatible con la noción de que la ciclina B1 es la responsable de la muerte neuronal asociada a dichas patologías, consecuencia de un intento fallido de reentrada en un ciclo celular aberrante por parte de neuronas post-mitóticas [Herrup, 2013]. En el apartado 6.2 describimos con detalle la relevancia de la ciclina B1 en la supervivencia neuronal.

La activación del complejo Cdk1-ciclina B1 participa en la fosforilación de varias proteínas que regulan el ciclo celular en la fase de mitosis temprana e interviene en la condensación de los cromosomas, la ruptura de la membrana nuclear y el ensamblaje del huso [Gavet y Pines, 2010]. Además, el complejo Cdk1-ciclina B1 también fosforila varias proteínas mitocondriales que permiten a la célula responder ante el aumento de la demanda energética que requiere la transición G2/M, regulando así la respiración mitocondrial para una satisfactoria progresión del ciclo celular [Wang, 2014].

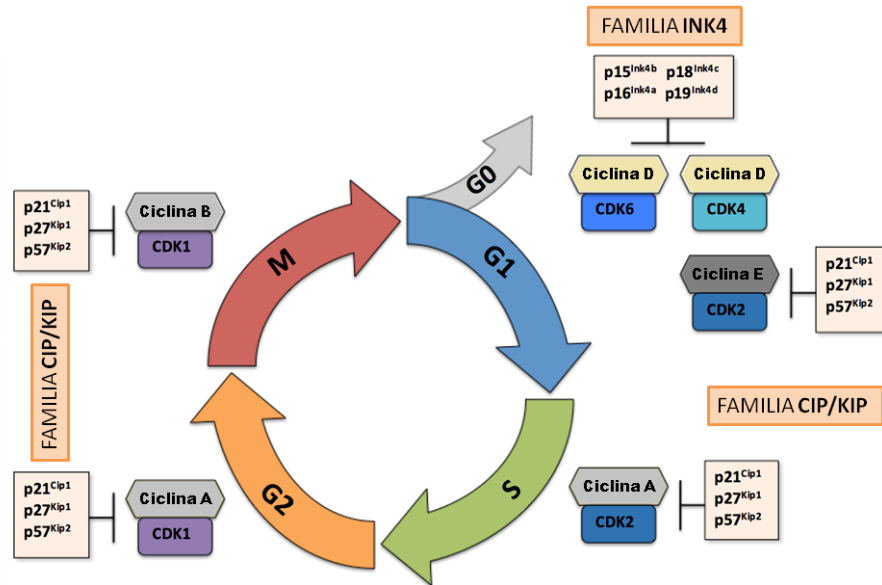
Otra de las funciones del complejo Cdk1-ciclina B1 es la regulación del comienzo de la anafase, controlando la actividad de la separasa y activando el complejo APC/C como veremos en el siguiente apartado. Este complejo es además el responsable de la degradación de la ciclina B1, que se lleva a cabo en el proteasoma después de su ubiquitilación por APC/C-Cdh1 (ver apartado 6.2).

2.2.3. Reguladores negativos de las Cdk

Las proteínas CDKIs están implicadas en la parada del ciclo celular producida en respuesta a señales intrínsecas y/o extrínsecas al propio ciclo, como las relacionadas con procesos de senescencia, inhibición por contacto o activación de un *checkpoint*, o como respuesta a señales antiproliferativas, como puede ser el mantenimiento en fase quiescente de los progenitores neurales, la privación de factores de crecimiento o citoquinas [Martín, 2005; Nixon, 2005]. En células de mamíferos se han descrito dos familias de CDKIs (**Esquema 3**):

a) La familia CIP/KIP (*kinase inhibitor protein*) incluye tres proteínas estructuralmente relacionadas entre sí (p21^{Cip1}, p27^{Kip1} y p57^{Kip2}). Estas proteínas presentan una especificidad más amplia que los miembros de la otra familia de CDKIs, porque interactúan inhibiendo la actividad quinasa de los complejos Cdk2-ciclina E, Cdk2-ciclina A, Cdk1-ciclina A, Cdk1-ciclina B y, posiblemente, Cdk4-ciclina D y Cdk6-ciclina D [Besson, 2008; Ullah, 2009].

b) La familia INK4 (*inhibitor of Cdk4*) incluye a p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c} y p19^{INK4d}. Los miembros de la familia INK4 bloquean la progresión del ciclo celular ya que se unen específicamente a Cdk4 y Cdk6 cuando se encuentran en forma de monómeros y así inhiben la acción de la ciclina D [Canepa, 2007]. Las proteínas de esta familia comparten una estructura similar dominada por varias repeticiones de anquirina.



Esquema 3. Esquema del ciclo celular con los complejos Cdk-ciclina y sus inhibidores [Fernández *et al.*, 2009].

2.3. SISTEMA UBIQUITINA PROTEASOMA

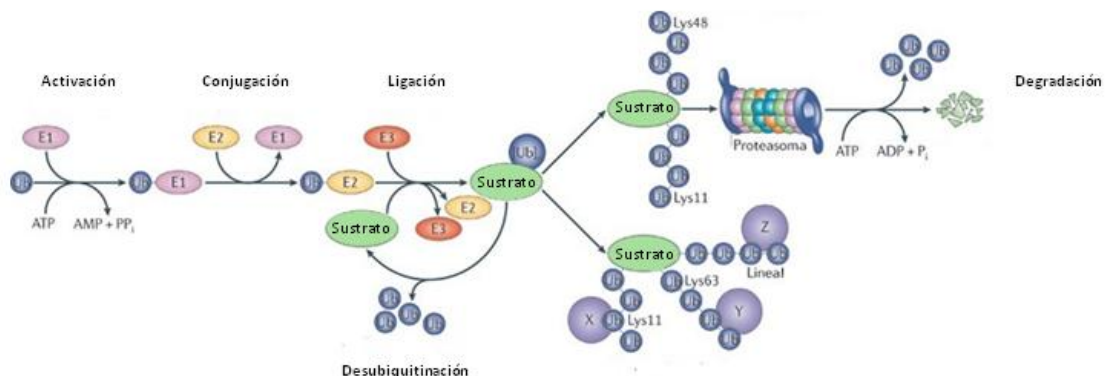
La progresión a través del ciclo celular está controlada por la degradación de las proteínas del propio ciclo. Este control es ejecutado por el Sistema Ubiquitina Proteasoma (UPS). El UPS regula la ubiquitinación y, por lo tanto, la degradación de muchos sustratos que son poliubiquitinados y reconocidos por el proteasoma 26S. Comprende una serie secuencial de procesos enzimáticos utilizando cuatro familias de enzimas: E1 ubiquitinas o activadoras (dependientes de energía), E2 ubiquitinas o de conjugación, E3 ubiquitinas o ligasas [Hershko, 1998] y E4 ubiquitinas o factores de ensamblaje de la cadena de ubiquitina [Micel, 2013].

La vía del UPS está constituida por una serie de pasos, en los que intervienen las familias de ubiquitinas anteriormente explicadas. En primer lugar, la E1 ubiquitina activa a la ubiquitina mediante la formación de un enlace tio-éster de alta energía entre un residuo de cisteína de su sitio activo y el residuo de glicina del extremo carboxilo-terminal de la ubiquitina, que conlleva el consumo de una molécula de adenosín trifosfato (ATP). Esta reacción permite que la ubiquitina activada se transfiera a un residuo de cisteína del sitio activo de la E2 ubiquitina, formándose un nuevo enlace tio-éster. A continuación, la ubiquitina se acopla al grupo ε-amino de un residuo de lisina de la proteína diana, a través de un enlace isopeptídico, gracias al proceso mediado conjuntamente por la E2

ubiquitina y E3 ubiquitina, quien confiere especificidad de sustrato. Las E3 ligasas, pueden ser monoméricas o pueden estar formadas por varias subunidades. En algunos casos, los dominios de unión a ubiquitina residen en polipéptidos que son atraídos por proteínas adaptadoras o *cullins*.

La elongación de las cadenas de ubiquitina se consigue gracias a las ubiquitinas E4 mediante el establecimiento de un enlace isopeptídico entre el residuo de glicina carboxilo-terminal de la ubiquitina, con el grupo ϵ -amino de un residuo de lisina de la ubiquitina anterior. Dado que cada molécula de ubiquitina contiene siete residuos de lisina, se puede generar una gran variedad de cadenas de poliubiquitina desde el punto de vista morfológico, con distintas funciones celulares [Corn, 2007; Hammond-Martel, 2012; Proctor, 2007].

Para que el proteasoma pueda reconocer las cadenas de poliubiquitina, éstas deben tener una longitud mínima de cuatro moléculas, aunque algunos sustratos presentan cadenas mucho más largas [Hanna, 2007]. Esto implica que la E3 debe permanecer unida al sustrato el tiempo suficiente para procesarlo varias veces, o bien, que necesita varios encuentros sucesivos con éste, antes de marcarlo para su destrucción. Por ello, tanto la actividad de la E3 como su capacidad para reconocer sustratos, resultan factores limitantes del proceso de poliubiquitinación, aunque no son los únicos, pues también influye la actividad de las enzimas desubiquitinantes (DUBs), las cuales revierten el efecto de las E3 [van Leuken, 2008]. El resultado final es que, la proteína que ha sido poliubiquitinada es degradada por el proteasoma 26S (**Esquema 4**).



Esquema 4. Esquema de los pasos de la vía de funcionamiento del UPS. Modificado de [Vucic, 2011].

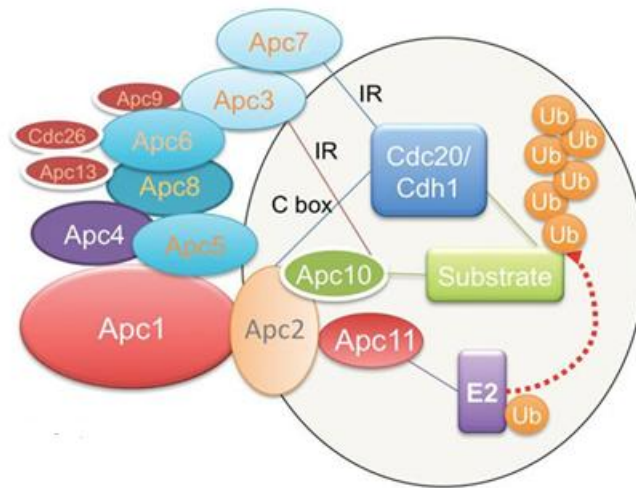
Las E3 ubiquitina ligasas se clasifican en cuatro clases principales, en función del motivo estructural que las caracteriza: *HECT*, *cullin RING-finger*, *U-box* y *PHD-finger* [Teixeira, 2013]. Las *cullin RING-finger* poseen un dominio formado por entre 40 y 100 aminoácidos con 8 residuos de cisteína e histidina muy conservados que coordinan dos átomos de zinc, formando una estructura en dedo de zinc [Sun, 2009]. La especificidad del UPS viene dada por la familia de E3 ubiquitina ligasas *cullin RING-finger*, que constituye una de las mayores clases de E3 ubiquitina ligasas y es esencial para el mantenimiento y la integridad genómica y la homeostasis celular [Chew, 2007; Lipkowitz, 2011]. Dos de los miembros más importantes de la familia *cullin RING-finger* son la proteína Skp1-Cul1-F-box (SCF) y el Complejo Promotor de la Anafase/Ciclosoma, también conocido como APC/C; ambos son los responsables de marcar las proteínas del ciclo celular para su posterior degradación. SCF es capaz de ubiquitinar sustratos desde el final de la fase G1 hasta el inicio de la fase M, mientras que APC/C es activo desde la mitosis hasta el final de la fase G1 del ciclo celular [Moncada, 2012; Nakayama, 2005; Nakayama, 2006; Song, 2011].

PARTE II. APC/C

APC/C es un complejo multiprotéico dotado con propiedades reguladoras, catalíticas y de especificidad. Por medio de la ubiquitinación de una amplia gama de proteínas mitóticas, APC/C es capaz de controlar los procesos del ciclo celular que son responsables de la segregación de las cromátidas en la anafase, la finalización de la mitosis y el establecimiento y mantenimiento de la fase G1 [Barford, 2011; Eguren, 2011; Peters, 1999; Peters, 2006; Schreiber, 2011; Sivakumar, 2015].

1. ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN

APC/C es un miembro de la familia *cullin RING-finger* inusualmente grande formado por 13 proteínas diferentes. De entre las 13 subunidades, las mejores caracterizadas son Apc2 y Apc11, que son las principales responsables de la actividad catalítica (**Esquema 5**).



Esquema 5. Esquema estructural de las 13 subunidades diferentes que constituyen el complejo APC/C. Podemos observar que las rodeadas con un círculo (Apc2, Apc10 y Apc11) son subunidades catalíticas y el resto son subunidades de sujeción o ensamblaje. Modificado de [Acquaviva, 2006].

Apc11 contiene un dominio *ring H2 finger* e interactúa directamente con la enzima E2 ubiquitina, mientras que la subunidad Apc2 interactúa con su dominio *cullin*, formando un ensamblaje para una mejor conexión entre Apc11 y la enzima [Chang, 2004; da Fonseca, 2011; Fry, 2006; Levenson, 2000; Tang, 2001]. Algunos autores han descrito que Apc11, por sí misma, es capaz de poliubiquitinar *in vitro*, aunque con menor especificidad de sustrato [Acquaviva, 2006].

Apc3 (Cdc27), Apc6 (Cdc16), Apc7 y Apc8 (Cdc23) poseen lo que se conoce como dominio *Tetratricopeptide Repeat* o TPR, que consiste en la repetición de una secuencia de 34 aminoácidos, que se pliega en una estructura en hélice y es capaz de mediar interacciones entre proteínas. Para que se produzca la activación de APC/C y se lleve a cabo la progresión de la mitosis, se requiere la fosforilación de estas cuatro subunidades [Baker, 2007; Blatch, 1999; Das, 1998; Kraft, 2003; Wang, 2009].

Apc10 (Doc1) contiene un dominio *Doc*, que está también presente en otras proteínas de la vía del UPS. Apc10 no es imprescindible para la interacción con otras subunidades de APC/C, a pesar de unir directamente Apc3 (Cdc27), Apc7 y Apc11. Algunos autores han observado que mutaciones en esta subunidad previenen el reconocimiento de sustratos por parte de APC/C-Cdh1 [Carroll, 2002; Carroll, 2005; Passmore, 2003]. Tanto Apc10 como Cdh1 están implicadas en el reconocimiento de sustratos, y su proximidad a Apc2, Apc11 y a la E2 Ubiquitina es importante para que se

lleve a cabo la reacción de ubiquitinación [Acquaviva, 2006; Thornton, 2006].

Algunas subunidades podrían tener un papel meramente estructural. Apc4 y Apc5 se unen a Apc2 y Apc11, y se piensa que median la interacción de estas proteínas con las subunidades que contienen el dominio TPR [Vodermaier, 2003]. Apc9 (aunque sólo está descrito en levaduras), Cdc26 y Apc13 parecen ser necesarias para la estabilidad de APC/C. Aunque Apc13 se une a Apc5 y Apc8 (Cdc23), es una subunidad inusual ya que parece proporcionar una función esencial y específica en meiosis, con lo cual, su papel meramente estructural está actualmente en controversia [Passmore, 2003; Peters, 2006].

Gieffers y colaboradores describieron que APC/C puede presentar dos o tres copias de cada subunidad, excepto de Apc1, que actuaría como un gran soporte de todas las demás [Gieffers, 2001]. El grupo de investigación de Passmore, encontró dos especies con diferentes coeficientes de sedimentación (25S y 36S) que presentan formas de APC/C monoméricas y diméricas respectivamente. La forma dimérica permite la formación de cadenas de poliubiquitina con una eficacia 7 veces mayor que la forma monomérica [Passmore, 2005; Peters, 2006]. Más adelante, Dube y colaboradores propusieron un modelo tridimensional de APC/C en el cual se distinguen dos grandes dominios, el dominio *platform* y el dominio *arc lamp*, que presentan una gran flexibilidad uno respecto al otro. Estos autores observaron que, la asociación del cofactor Cdh1, provoca un cambio en las posiciones relativas de los dominios, lo que sugiere que la unión de los cofactores induce cambios conformacionales en la estructura de APC/C [Dube, 2005].

Recientemente, se ha identificado la subunidad Apc15. Es una APC/C humana, que es requerida para la liberación de Cdc20. Este cofactor es secuestrado por tres componentes (Mad2, Mad3/BubR1, y Bub3 [MCC]), los cuales forman parte del punto de control de la mitosis o punto de control del ensamblaje del huso (*spindle assembly checkpoint* [SAC]) que es esencial para asegurar que la segregación cromosómica tiene lugar de forma correcta [Foster, 2012]. Tras la alineación de los cromosomas en la metafase, el SAC se inactiva y comienza a degradarse la ciclina B1, hecho que puede ser revertido si se vuelve a formar el SAC, estableciéndose una relación temporal entre éste y la regulación de la proteólisis por ubiquitinación [Clute y Pines, 1999]. Al secuestrar Cdc20, APC/C se inactiva [Mansfeld, 2011].

2. COFACTORES

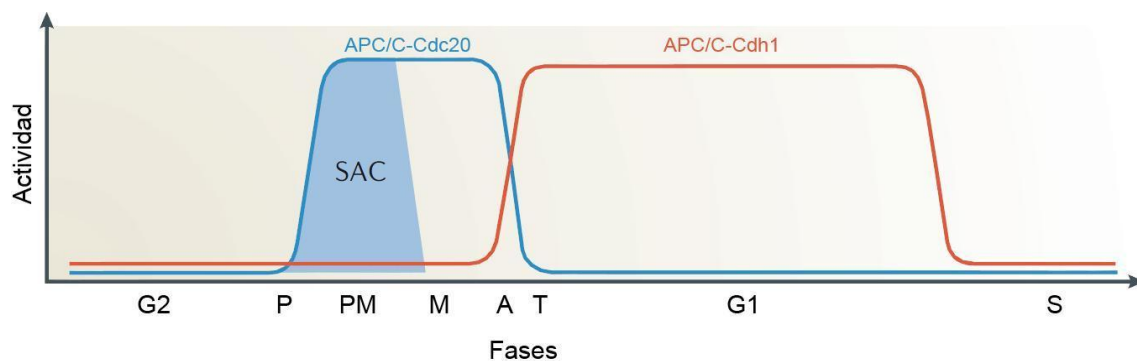
APC/C puede interactuar con varias E2 ubiquitinas, sin embargo, la actividad principal de este complejo en las células depende de su unión a cofactores o coactivadores, los cuales se unen al complejo durante periodos específicos del ciclo celular. Estos cofactores son Cdc20 (*cell division cycle 20*) y Cdh1 (o Fzr1, *fizzy/cell division cycle 20 related 1*) [Peters, 2006].

Ambas proteínas se caracterizan por presentar tres elementos en su secuencia:

- El motivo IR (dipéptido isoleucina-arginina) situado en el extremo carboxilo terminal, que media la unión con APC/C.
- La secuencia *C-box* situada en el extremo amino-terminal. Los humanos, a diferencia de las levaduras, no necesitan la *C-box* para la asociación de APC/C con sus cofactores, sin embargo se piensa que interviene en el reconocimiento de sustratos.
- El dominio WD40, situado en el extremo carboxilo-terminal. Este dominio está compuesto por repeticiones de 40 aminoácidos que contienen residuos de triptófano y aspártico en posiciones conservadas. Generalmente, siete repeticiones WD40 se pliegan en una estructura con forma de hélice. Se piensa que este dominio es el responsable de reconocer a los sustratos de APC/C, al interactuar con unas secuencias consenso presentes en ellos, denominadas *D-box* y *KEN-box* [Peters, 2006].

Los dos cofactores de APC/C están estrictamente regulados por fosforilación. Cdc20 se transcribe y se sintetiza en la interfase, sin embargo, sólo puede interactuar con APC/C de forma eficaz en la fase M, cuando algunas subunidades de APC/C son fosforiladas por quinasas mitóticas, incluyendo Cdk1-ciclina B y Plk1 [Eckerdt, 2006]. Por el contrario, Cdh1 no puede unirse a APC/C en las fases S, G2 y M, debido a su fosforilación e inactivación por los complejos Cdk-ciclina. Solo desde la anafase, cuando disminuye la actividad Cdk1 lo que permiten la desfosforilación de Cdh1, éste forma un complejo activo con APC/C y cataliza las reacciones de ubiquitinación de los sustratos desde anafase hasta el final de la fase G1, regulando así la salida de mitosis, el mantenimiento en G1 y, por tanto, el comienzo de una nueva fase S [Kramer, 2000; McLean, 2011].

La oscilación secuencial de la actividad de APC/C-Cdc20 y la actividad de APC/C-Cdh1, representa uno de los principales mecanismos en la regulación del ciclo celular [van Leuken, 2008]. Así, al inicio de la fase M, la elevada actividad de Cdk1 promueve la unión APC/C-Cdc20, que se encuentra inhibida por el complejo SAC (*spindle assembly checkpoint*), previniendo así la degradación prematura de la ciclina B1 y securina [Nilsson, 2008; Izawa, 2011]. Una vez que los cromosomas están correctamente anclados al huso acromático, APC/C-Cdc20 se activa, lo que conduce a la degradación de securina y ciclina B1 y, en consecuencia, a la disminución de la actividad de Cdk1 en anafase. La activación de las fosfatasas, junto con la disminución de la actividad kinasa de Cdk1 permite la formación del complejo APC/C-Cdh1, que, a su vez, promueve la degradación de Cdc20. El rápido e irreversible interruptor entre Cdc20 y Cdh1 en la salida de la fase M, no sólo se atribuye a la disminución repentina de la actividad kinasa de Cdk1-ciclina B, sino también a la degradación de Cdc20 por parte de APC/C-Cdh1 al comienzo de la fase G1 (**Esquema 6**) [Peters, 2006].



Esquema 6. Activación de APC/C por Cdc20 y Cdh1 durante el ciclo celular. La unión de APC/C-Cdc20 comienza en la profase. La degradación de la ciclina A se produce en la prometafase. La proteólisis de la ciclina B también depende de APC/C-Cdc20 y se lleva a cabo en la transición metafase-anafase. Durante la anafase y la telofase, APC/C-Cdh1 se activa y contribuye a la degradación de la ciclina B y de Cdc20, de tal manera que APC/C-Cdc20 se inactiva. En la fase G1, APC/C-Cdh1 media la destrucción de la enzima UbcH10, permitiendo la acumulación de ciclina A y la posterior inactivación de APC/C-Cdh1 en la transición de G1 a la fase S. Modificado de [Peters, 2006].

Estudios recientes han revelado que estos cofactores también promueven la actividad ligasa intrínseca de APC/C, probablemente mediante la activación de un cambio conformacional de la E3 ligasa [Dube, 2005].

3. RECONOCIMIENTO DE SUSTRATOS

Ciertas secuencias de aminoácidos o motivos de degradación, están presentes en los sustratos de APC/C y desempeñan un papel muy importante para su reconocimiento. El primer motivo que se describió fue la *D-box* (*destruction box*), compuesta por la secuencia consenso RxxLxxxxN/D/E que, inicialmente, se identificó en la ciclina B1. En la mayoría de sustratos de APC/C, la *D-box* se suele encontrar en regiones no plegadas de la proteína [Glotzer, 1991; Pflieger, 2001]. La ubiquitinación múltiple de residuos de lisina en los sustratos de APC/C sucede al azar. Esta idea concuerda con el planteamiento de que la secuencia *D-box* funciona como un motivo de reconocimiento que ubiquitina cualquier residuo de lisina que se quede expuesto al sitio activo de APC/C. La flexibilidad en la región que rodea a la *D-box* facilita la adición de cadenas de poliubiquitina, y aunque por sí misma no es suficiente, para inactivar a una proteína ésta necesita ser degradada por el proteasoma [Yamano, 1998]. Otra secuencia de degradación es la *KEN-box*, cuya secuencia consenso se define como KENxxxD/E/S/G. Esta secuencia se caracterizó por primera vez en Cdc20, sin embargo, también está presente en muchos sustratos de APC/C, incluyendo Aurora A y Plk1 [Burton, 2001; Pflieger, 2000].

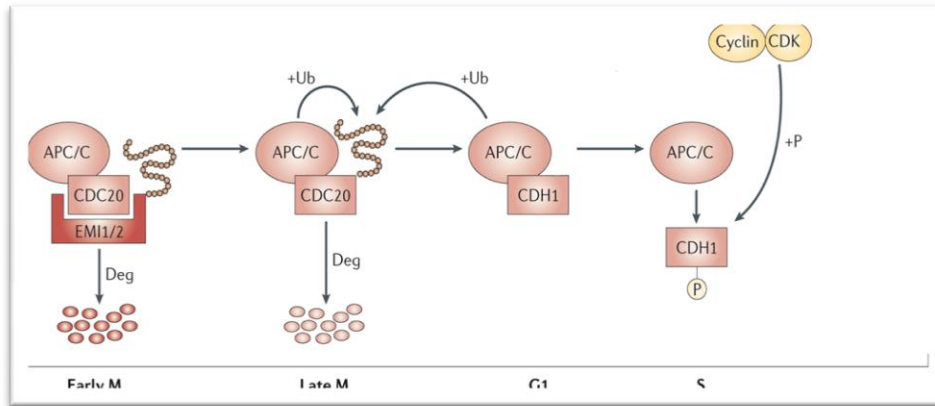
Así, ambas secuencias de degradación (*D-box* y *KEN-box*) son reconocidas por el dominio WD40 de los cofactores Cdc20 y Cdh1. De hecho, en un principio se propuso que la secuencia *D-box* era reconocida por APC/C-Cdc20 y que la secuencia *KEN-box* era reconocida por APC/C-Cdh1, sin embargo estudios recientes han demostrado que ambos motivos pueden ser utilizados eficientemente por los dos cofactores para llevar a cabo la ubiquitinación de los sustratos [Castro, 2003]. A medida que se caracterizan más sustratos de APC/C, se encuentran nuevos motivos de destrucción, normalmente localizados en los extremos amino o carboxilo de las proteínas. Además de las dos secuencias anteriormente mencionadas, se han descrito otros motivos: *A-box*, *CRY-box*, *GxEn-box*, *TEK-box* y *U-box*, pero la mayoría son relativamente poco conocidos en la actualidad [Hatakeyama, 2001; Littlepage, 2002]. Por ejemplo, podemos citar que, la destrucción de Cdc20 por parte de Cdh1, además de la *KEN-box*, depende de la *CRY-box* (*CRYxPS*) [Castro, 2003], o que la proteína Aurora A posee, además de *D-box* y *KEN-box*, un nuevo motivo al que da nombre, la *A-box* (*RxLxPSN*) [Littlepage, 2002].

4. APC/C Y SU RELEVANCIA EN EL CICLO CELULAR

La actividad de APC/C está estrictamente regulada durante la progresión del ciclo celular y ocurre, a través de la combinación de la actividad de los cofactores, proteínas y complejos inhibidores y la fosforilación reversible [Eguren, 2011; Peters, 2006; Thornton, 2006; Sivakumar, 2015]. Como ya hemos indicado, para ser activo, APC/C requiere de la unión de, al menos, uno de los dos dominios WD40 de los cofactores Cdc20 o Cdh1, que participan en el reconocimiento de sustratos. Además, los cofactores interactúan de manera muy dinámica con el dominio TPR de Apc3 y puede facilitar la unión con los sustratos a través de los dominios WD40 o mejorar la actividad específica de APC/C [Barford, 2011; da Fonseca, 2011]. La activación de APC/C, mediante su unión al cofactor Cdc20 o al cofactor Cdh1, se regula por mecanismos de fosforilación de manera opuesta [Almeida, 2012; Sivakumar, 2015].

Al comienzo de la mitosis, los complejos de Cdk-ciclinas fosforilan algunas subunidades del complejo APC/C y ello promueve la unión del cofactor Cdc20 con el complejo. De esta manera, APC/C-Cdc20 inicia una secuencia de degradación de las ciclinas mitóticas que provoca una disminución de la actividad Cdk, lo que conlleva la iniciación de la anafase. Por el contrario, la fosforilación de Cdh1 por parte de las Cdk durante la fase S, la fase G2 y la mitosis, inhibe su unión a APC/C. Durante la salida de la mitosis se produce una inactivación de las Cdk y una posterior activación de las fosfatasas, permitiendo que Cdh1 se desfosfore y así se active el complejo APC/C-Cdh1. A su vez, APC/C-Cdh1 ubiquitina a Cdc20, evitando la activación simultánea de APC/C con sus dos cofactores (ver **Esquema 7**). APC/C-Cdh1 también se encarga de destruir las ciclinas mitóticas A y B, completando la inactivación de Cdk1. Hay que tener en cuenta que la ciclina B1 se degrada en dos fases que están reguladas de forma secuencial por APC/C-Cdc20 y APC/C-Cdh1. Durante la mitosis temprana Cdc20 activa a APC/C, mientras que a finales de la mitosis APC/C-Cdh1 está activo y controla la salida de la mitosis y el mantenimiento de la fase G1, regulando así el inicio de la replicación de ADN [Li, 2009; Sivakumar, 2015].

En resumen, la actividad de APC/C oscila a lo largo del ciclo celular, siendo baja durante las fases S y G2 y alta durante la fase G1 y la mitosis. Estas oscilaciones van a ser en gran parte responsables de la progresión del ciclo celular.



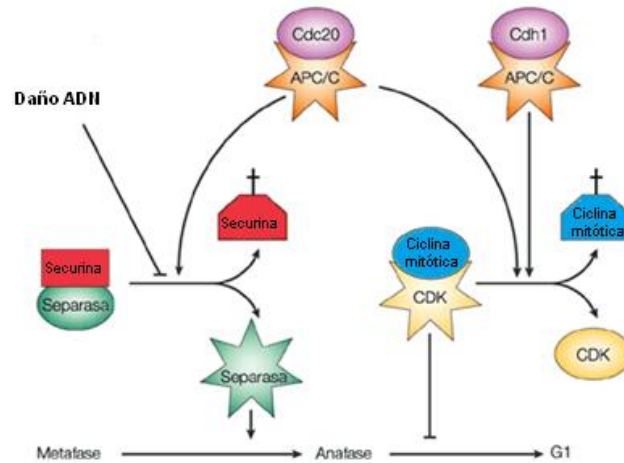
Esquema 7. Activación de APC/C por Cdc20 y Cdh1 durante el ciclo celular

4.1. PROGRESIÓN DE LA MITOSIS

La actividad Cdk es la que se encarga de dirigir el ciclo celular hasta la metafase, sin embargo, a partir de ese momento el control del ciclo celular está a cargo del complejo APC/C, que promueve la transición a la anafase y favorece la salida de mitosis. La función de APC/C es esencial en mitosis y se ha demostrado que la inactivación genética del complejo es letal en todas las especies estudiadas desde levaduras a ratones [García-Higuera, 2008].

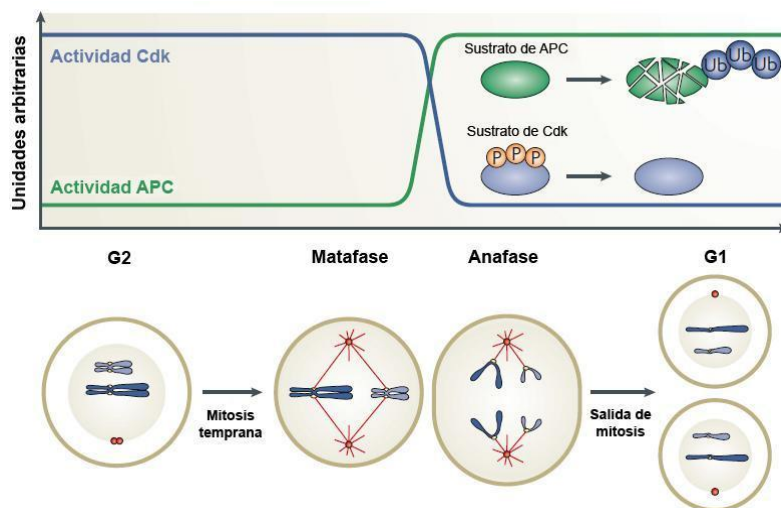
Las principales dianas de APC/C durante la mitosis son las ciclinas mitóticas (ciclinas A y B) y la securina. La securina es un inhibidor de la separasa que es una proteasa. Cuando el proteasoma degrada a la securina, se activa la separasa (ver **Esquema 8**). Debemos tener en cuenta, que la separasa también permanece inhibida por fosforilación mediada por las Cdk y por la unión al complejo Cdk1-ciclina B, de tal forma que la degradación de las ciclinas mitóticas también contribuye a su activación. Una vez que está activa, la separasa rompe la cohesina, que es la encargada de mantener unidas las cromátidas hermanas y al romperla se inicia la segregación cromosómica en la anafase [Gorr, 2006; Stemmann, 2006].

La degradación de las ciclinas mitóticas provoca la inactivación de las Cdk y esto permite que las fosfatasa desfosforilen a los sustratos de las Cdk, que es esencial para que se produzca el correcto movimiento del huso mitótico y de los cromosomas en la anafase, así como para que se lleven a cabo el desensamblaje del huso mitótico, la descondensación de la cromatina y el ensamblaje de la envuelta nuclear durante la telofase posterior [Li, 2009].



Esquema 8. APC/C-Cdc20 ubiquitina y degrada varios complejos, entre ellos la securina, un inhibidor de la separasa, y da comienzo la anafase. Se termina cuando el complejo APC/C-Cdh1 degrada a las ciclinas mitóticas unidas a las Cdk, que se inactivan y da paso a la fase G1. Modificado de [Bardin, 2001].

Principalmente existen dos mecanismos que gobiernan las últimas etapas de la mitosis, la ubiquitinación de proteínas por el complejo APC/C y la desfosforilación ordenada de sustratos fundamentalmente por parte de Cdk1, aunque también por parte de otras kinasas mitóticas. Este proceso de desfosforilación depende indirectamente de la actividad de APC/C, ya que está marcada por la degradación de las ciclinas [Sullivan, 2007] (**Esquema 9**).



Esquema 9. Regulación por APC/C de la salida de la mitosis. Durante la transición metafase/anafase se produce un aumento de la actividad de APC/C, que marca a las ciclinas mitóticas para su posterior degradación, originando un descenso de la actividad Cdk, lo que permite la desfosforilación de los sustratos. Modificado de [Sullivan, 2007].

Durante la mitosis APC/C forma parte de tres complejos diferentes dependiendo de su asociación con otros cofactores, y cada uno de estos complejos promueve la degradación de un determinado grupo de sustratos en un momento concreto del ciclo celular. Durante la prometáfase, el complejo APC/C está unido al cofactor Cdc20, pero se encuentra bajo la inhibición de las proteínas del *checkpoint* del huso mitótico, al bloquear su capacidad de reclutamiento de sustratos. Sin embargo, esta forma de APC/C-Cdc20, va a mantener la capacidad de ubiquitinar alguna de sus dianas como son la ciclina A o la kinasa Nek2A [Hayes, 2006; van Zon, 2010]. Además, cuando la última pareja de cromátidas hermanas se ancla al huso mitótico y se inactiva este *checkpoint*, APC/C-Cdc20 se activa por completo, siendo capaz de ubiquitinar otro grupo de proteínas durante la metafase, dentro de este grupo se incluyen la ciclina B y la Securina [Musacchio, 2007]. Así, la destrucción de la ciclina B conlleva una inactivación progresiva de la actividad Cdk, lo que lleva a la desfosforilación del otro cofactor de APC/C la proteína Cdh1, que permanecía activa en su forma fosforilada. Cuando Cdh1 se desfosforila, activa a APC/C y le proporciona una mayor especificidad de sustrato, lo que promueve la destrucción de un nuevo grupo de proteínas diana. En este nuevo grupo de sustratos está incluido Cdc20, además de Plk1 y las kinasa Aurora A y Aurora B, que se destruyen en este orden en anafase y telofase [van Leuken, 2009].

4.2. MANTENIMIENTO DE G0/G1

El cofactor Cdh1 está implicado en el mantenimiento de una baja actividad por parte de las Cdks, y esta baja actividad Cdk caracteriza el estado G0/G1. APC/C-Cdh1 realiza una degradación completa de las ciclinas mitóticas, así como de otros reguladores positivos de la proliferación celular, como pueden ser Plk1, Aurora A o Cdc25A. El complejo APC/C-Cdh1 también es responsable de la destrucción de Skp2, componente de la E3 ubiquitina ligasa SCF, lo que resulta en la acumulación de sus sustratos p27 y p21, que bloquean cualquier actividad Cdk residual [Bashir, 2004a; Bashir, 2004b].

Existen muchas evidencias que nos permiten confirmar que Cdh1 es uno de los reguladores más importantes de las fases G1 y G0. Su importancia en el mantenimiento de estas fases se deduce del hecho de que las células entran en fase S más fácilmente tras su inhibición. Además, Cdh1 no se expresa durante los primeros ciclos de división embrionarios, los cuales carecen de fases G1 y G2, coincidiendo así, el comienzo de su

expresión con la adquisición de la fase G1 [Peters, 2006].

4.3. ACOPLAMIENTO CON LA FASE S

APC/C-Cdh1 también controla la entrada en fase S a través de un nuevo mecanismo que implica al factor de transcripción FoxM1 (*Forkhead box M1 transcription factor*). FoxM1 activa la expresión de genes que son necesarios para la progresión de las fases S y M, tales como Plk1, ciclina B, Aurora B o Cdc25B. APC/C-Cdh1 ubiquitina a este factor para que sea degradado al final de la fase M y al inicio de la Fase G1. La ausencia de FoxM1 previene la entrada precoz en la fase S, que se observa en las células que no expresan Cdh1, indicando que FoxM1 es una de las dianas de Cdh1 al final de la fase S y al comienzo de G1, y su proteólisis es muy importante para la entrada en la fase S. Por lo tanto, es lógico pensar que FoxM1 es una diana de Cdh1, ya que estructuralmente hablando, posee una secuencia *KEN-box* en su extremo amino-terminal [Laoukili, 2008; Sadasivam, 2013].

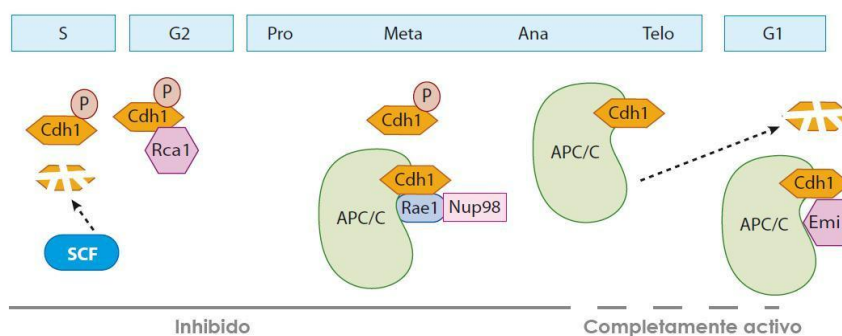
4.4. ACTIVACIÓN DE APC/C EN RESPUESTA A DAÑO EN EL ADN

Durante las fases S y G2, APC/C permanece inactivo para mantener elevada la actividad Cdk e impedir que se formen los complejos prerreplicativos. Sin embargo, cuando se produce una replicación aberrante o un daño en el ADN, el ciclo celular se detiene para poder repararlo y ello conlleva a la activación de APC/C-Cdh1. Durante la fase G1, el daño en el ADN provoca la activación tanto de p53 como de p21; al activarse p53 se provoca la degradación de la ciclina D1, mientras que cuando se activa p21, inhibidor de Cdk2, se produce la desfosforilación de Cdc6 y su subsecuente degradación vía APC/C-Cdh1 [Bartek, 2001; Mailand, 2005].

Durante la fase G2, la fosfatasa Cdc14 es la responsable de la activación de APC/C-Cdh1, que de forma indirecta permite la acumulación de claspina. Ésta, a su vez, promueve la activación de p53, que lleva finalmente a la inactivación de Cdk1 y la parada del ciclo celular en la fase G2 [Bassermann, 2008].

5. REGULACIÓN DE APC/C-Cdh1

La actividad de APC/C-Cdh1 está regulada por la cantidad de proteína, el estado de fosforilación de Cdh1 y por la unión de proteínas inhibidoras o activadoras [Pesin, 2008] (**Esquema 10**).



Esquema 10. La fosforilación de Cdh1 por Cdk's impide su asociación con APC/C en las fases S, G2 y M. La desfosforilación de Cdh1 por acción de las fosfatasas Cdc14 conduce a la completa activación de APC/C-Cdh1 en la mitosis tardía y durante la fase G1. Cdh1 es degradada por su propia actividad al final de G1, y en la fase S, gracias a la actividad de SCF. Modificado de [Pesin, 2008].

5.1. REGULACIÓN DE LA CANTIDAD DE PROTEÍNA DE Cdh1

La concentración del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de Cdh1 permanece constante a lo largo del ciclo celular, sin embargo no ocurre lo mismo con la cantidad de la proteína, que es más elevada durante la mitosis. No obstante al final de la fase G1 y de la fase S disminuye su expresión, al ser degradada por SCF [Fukushima, 2013] y por su propia actividad APC/C-Cdh1 [Fang, 1999; Kramer, 2000].

5.2. REGULACIÓN POR FOSFORILACIÓN DE Cdh1

La actividad de APC/C-Cdh1 aumenta notablemente desde la anafase, y se mantiene elevada durante la fase G1. Esta actividad está finamente regulada por la fosforilación reversible de Cdh1 y de sus sustratos, por proteínas inhibidoras y por la degradación de Cdh1 [Almeida, 2012].

La fosforilación de Cdh1 inhibe su unión con APC/C. Cdh1 es fosforilado por Cdk's durante las fases S, G2 y M, y sólo su desfosforilación en la mitosis tardía y durante

la fase G1 le permite activar a APC/C. La desfosforilación de Cdh1 se produce cuando comienza a disminuir la actividad de las Cdks, como consecuencia de la degradación por APC/C-Cdc20 de las ciclinas mitóticas, entre otras dianas. Algunos grupos han descrito que la fosfatasa encargada de activar a Cdh1 es Cdc14, la cual se activa y sale del núcleo al citosol durante la anafase. Cdc14 se encarga de la activación del propio cofactor Cdh1 y de la proteína Sic1 que es el inhibidor de la Cdk1. Cuando Cdh1 se encuentra fosforilado se localiza en el citosol, pero se transloca al núcleo al ser desfosforilado, por lo que su activación depende de la salida de Cdc14 del núcleo [Toda, 2012; Visintin, 1997].

Todo el mecanismo de Cdc14 y Cdh1, está muy caracterizado en levaduras, sin embargo, a pesar de que se han encontrado tres homólogos de la proteína en vertebrados (Cdc14A, Cdc14B y Cdc14C), su relevancia aún no está identificada. En parte debido a que no se ha visto un efecto claro de la proteína sobre la salida de mitosis, ya que el estudio está basado en las familias de fosfatasas PP1 y PP2A. De hecho, hay numerosos estudios que sugieren que las funciones de Cdc14 en vertebrados no están relacionadas con la salida de la mitosis, incluyendo funciones en el *checkpoint* de daño de ADN y su reparación y en la duplicación y funcionamiento del centrosoma. De manera particular, en respuesta al estrés genotóxico durante la fase G2, Cdc14B se transloca desde el núcleo al citoplasma, donde la fosfatasa desfosforila a Cdh1, y por lo tanto promueve la actividad de APC/C-Cdh1 [Shou, 1999].

La fosforilación de los sustratos de Cdh1, también contribuye a la regulación de la actividad de APC/C-Cdh1. Así, la fosforilación de Skp2 por Cdk2 interrumpe su unión con Cdh1 y, por tanto, su degradación, lo que resulta en la estabilización de Skp2 al final de la fase G1. Por otro lado, la desfosforilación de Skp2 mediada por la Cdc14B, promueve la degradación de Skp2 por APC/C-Cdh1 durante la transición M/G1 [Rodier, 2008].

5.3. PRINCIPALES INHIBIDORES

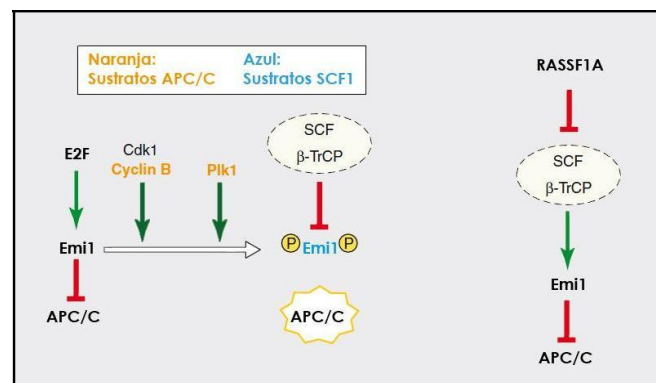
5.3.1. *Emi1*

En la transición de la fase G1 a la fase S, el factor E2F activa la transcripción de *Emi1*. De esta manera, a partir de ese momento del ciclo celular, *Emi1* inhibe a APC/C-

Cdh1 permitiendo la acumulación de sus sustratos [Miller, 2006]. Otros estudios han demostrado que, en el caso de los humanos, Emi1 es esencial para la coordinación precisa de la síntesis de ADN y la mitosis. Así, se ha demostrado que un fragmento de 143 residuos del dominio C-terminal de Emi1 inhibe múltiples funciones de APC/C-Cdh1. La *D-box*, el *linker* y los elementos de la cola, junto con el dominio *zinc-binding* de Emi1, se unen de manera sinérgica a distintas regiones de APC/C-Cdh1, bloqueando el sitio de unión del complejo a sus sustratos e inhibiendo la elongación de la cadena de ubiquitina [Frye, 2013; Skaar, 2008].

5.3.2. *Rassf1a*

Este factor inhibe de manera indirecta a APC/C-Cdh1 durante la transición G1/S, al inhibir SCF- β TrCP, activador de Emi1, lo que produce de nuevo la inhibición de APC/C-Cdh1 [Whitehurst, 2008] (**Esquema 11**).



Esquema 11. En el esquema podemos ver la activación de Emi1 por E2F. Por otra parte vemos como RASSF1A inhibe a SCF- β TrCP, se activa Emi1, volviendo a inhibir a APC/C. Modificado de [Vodermaier, 2004].

5.3.3. *Rae1-Nup98*

En el caso de los mamíferos durante la profase, APC/C-Cdh1 está inhibido por fosforilación y por el complejo Rae1-Nup98. Rae1 es un factor transportador de ARNm, que actúa anclando a Nup98, que es una nucleoporina, al complejo del poro nuclear. El complejo Rae1-Nup98 se encarga de inhibir la ubiquitinación de la Securina por parte de APC/C-Cdh1. Rae1-Nup98 se disocia de APC/C-Cdh1 al mismo tiempo que las proteínas del checkpoint del huso mitótico lo hacen de APC/C-Cdc20, y así se produce la

transición metafase/anafase [Cuende, 2008; Jeganathan, 2005].

5.4. PRINCIPALES ACTIVADORES

Los factores de transcripción CBP y p300 regulan APC/C en mitosis, y se asocian tanto a APC/C-Cdc20 como a APC/C-Cdh1. Favorecen la actividad de ambos complejos al acetilar subunidades de APC/C o los coactivadores Cdh1 y Cdc20. El silenciamiento de CBP mediante siRNA reduce la actividad E3 ubiquitina ligasa de APC/C y conlleva la acumulación de las proteínas ciclina B y Plk1, así como la parada de las células en mitosis. [Turnell, 2005; Liu, 2006].

6. FUNCIONES DE APC/C EN EL SISTEMA NERVIOSO

6.1. DIFERENCIACIÓN NEURONAL

En el año 1999, Gieffers y colaboradores [Gieffers, 1999] demostraron la expresión de diferentes subunidades de APC/C, así como de Cdh1, en el cerebro de ratón adulto. Posteriormente, trabajos de nuestro grupo mostraron que los niveles de Cdh1 permanecen estables durante la diferenciación neuronal [Almeida, 2005]. Es más, APC/C-Cdh1 media la diferenciación neuronal inducida por ácido retinoico en células de neuroblastoma humano SHSY5Y. Así, el ácido retinoico induce la acumulación nuclear de Cdh1 y, paralelamente, produce la desestabilización de Skp2 y la acumulación de p27. Además, el ácido retinoico es capaz de disminuir los niveles del ARNm de la proteína Rae-1, que es un factor de exportación nuclear que limita la actividad de APC/C-Cdh1 en mitosis. Por ello, se facilita la degradación de Skp2, la parada del ciclo celular y la diferenciación de las células de neuroblastoma hacia células de fenotipo neuronal [Cuende, 2008].

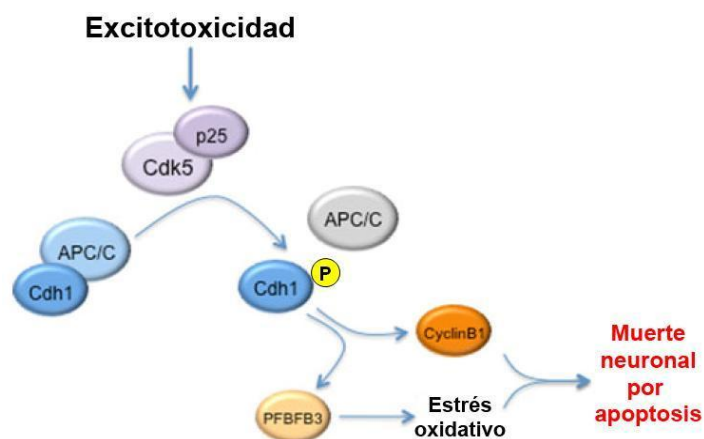
Recientemente, hemos demostrado que APC/C-Cdh1 coordina la neurogénesis y el tamaño de la corteza cerebral. En este sentido, se sabe que la morfología del cerebro adulto es el resultado de un delicado equilibrio entre la proliferación de los progenitores neurales y la iniciación de la neurogénesis en el periodo embrionario. En estadios tempranos del desarrollo de la corteza cerebral, las células progenitoras se dividen simétricamente con objeto de mantener la población de células progenitoras y esto ocurre

en las dos zonas neurogénicas de la corteza denominadas como zona ventricular y zona subventricular. Sin embargo, en estadios más tardíos del desarrollo estos progenitores neurales se dividen asimétricamente, generándose neuronas diferenciadas. No obstante, la neurogénesis es un proceso complejo en el cual se desconocen los mecanismos moleculares que regulan la salida de ciclo celular con el comienzo de los procesos de diferenciación [Delgado-Esteban, 2013]. Nuestro grupo ha demostrado que la actividad del complejo ubiquitina ligasa APC/C-Cdh1 es esencial no sólo para la diferenciación de las neuronas corticales *in vitro* [Almeida, 2005; Delgado-Esteban, 2013] sino también para la neurogénesis *in vivo* [Delgado-Esteban, 2013]. Así, Cdh1 regula la salida del ciclo celular de los precursores neurales y el inicio de la neurogénesis en corteza cerebral durante el desarrollo. Es más, la falta de Cdh1 disminuye la duración de la fase G1 e incrementa la fase S del ciclo celular, produciendo estrés replicativo y muerte por apoptosis, dependiente de p53, de los precursores neurales. En consecuencia, se produce una disminución del tamaño de la corteza cerebral y microcefalia [Delgado-Esteban, 2013].

6.2. SUPERVIVENCIA NEURONAL

En el año 2005, Almeida y colaboradores [Almeida, 2005] demostraron que Cdh1, pero no Cdc20, está presente en neuronas diferenciadas y desempeña una función esencial en la supervivencia de las neuronas. La actividad de APC/C-Cdh1 es esencial para mantener bajos los niveles de ciclina B1, impidiendo así una entrada aberrante de las neuronas en el ciclo celular y la subsecuente apoptosis neuronal por un mecanismo que aún permanece desconocido [Almeida, 2005].

En condiciones fisiológicas, la neurotransmisión excitadora que ocurre a través de receptores de glutamato, desempeña un papel crucial en el desarrollo neuronal, la diferenciación y la plasticidad sináptica, como veremos en el **apartado 6.4**. Sin embargo, la excesiva y/o prolongada activación de los receptores de glutamato induce neurotoxicidad, proceso que se ha definido como excitotoxicidad [Olney, 1969]. Recientemente, nuestro laboratorio ha demostrado que la estimulación de los receptores NMDA promueven la acumulación endógena de ciclina B, lo que desemboca en la muerte neuronal por apoptosis [Maestre, 2008].



Esquema 12. APC/C-Cdh1 regula la apoptosis neuronal. La excitotoxicidad activa a Cdk5 y a p25, que fosforilan a Cdh1. La inactivación de APC/C-Cdh1 provoca la estabilización de la ciclina B1 y de la Pfkfb3. La estabilización de estas proteínas, induce a las neuronas postmitóticas, a llevar a cabo una entrada aberrante en el ciclo celular que conlleva al estrés oxidativo y a la muerte de las neuronas por apoptosis. Modificado de [Almeida, 2012]. Completar este esquema va a ser el trabajo principal de esta memoria.

La excitotoxicidad es uno de los fenómenos más frecuentes que subyacen en la fisiopatología de los trastornos neurológicos [Wang y Qin, 2010], e implica la activación de los receptores glutamatérgicos, provocando la entrada de Ca^{2+} en la célula. Este proceso resulta en la alteración del potencial de membrana interna mitocondrial, que precede a la muerte neuronal por apoptosis [Bolaños, 2009].

Resultados previos de nuestro laboratorio describen que la estimulación de los receptores de glutamato provoca la acumulación aberrante de ciclina B1 en neuronas [Maestre, 2008], lo que le implica en la excitotoxicidad. Así, la estimulación de los receptores de glutamato, concretamente los receptores NMDA, y el subsiguiente aumento en el flujo de Ca^{2+} provoca la activación de Cdk5, que, a su vez, fosforila e inactiva Cdh1, translocándolo del núcleo al citoplasma. En consecuencia, se inhibe la actividad de APC/C, lo que induce la acumulación de ciclina B1 y la muerte neuronal por apoptosis, por un mecanismo aún desconocido [Maestre, 2008]. Es interesante observar que Cdk5 fosforila a la Ser-1232 de la subunidad NR2A, del receptor NMDA, facilitando la transmisión sináptica mediada por el receptor NMDA. La liberación de glutamato de manera prolongada, produce la sobreactivación del receptor NMDA, como la que se observa en las enfermedades neurodegenerativas y en los accidentes cerebrovasculares.

Todo ello, podría conducir a un ciclo continuo de activación Cdk5 - NMDA, que contribuye a la neurodegeneración [Li, 2001]. Cabe destacar que Cdk5 es muy activa cuando se encuentra unida a p25, que es el producto proteolítico de p35 el cual, a su vez, se acumula en neuronas de pacientes con la enfermedad de Alzheimer [Almeida, 2012]. Es importante destacar que se han descrito incrementos en las concentraciones de ciclina B1 tanto en el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer como en pacientes de ictus y otros procesos degenerativos [Yang, 2003; Love, 2003], en los que se produce excitotoxicidad [Almeida, 2012; Aulia, 2006]. Por ello, Cdh1 podría tener una importante función en las enfermedades neurodegenerativas.

6.3. GLUCÓLISIS

Las neuronas poseen una actividad glucolítica menor que los astrocitos, lo que concuerda con el hecho de que un incremento en la proliferación celular va acompañada de la activación de la glucólisis [Bauer, 2004; Lunt, 2011]. En contra de lo que ocurre en astrocitos, las neuronas son incapaces de aumentar la actividad glucolítica en condiciones patológicas, como es la inhibición de la fosforilación oxidativa [Almeida, 2004; Bolaños, 2008; Bolaños, 2010]. Todo ello, es consecuencia de que la enzima 6-fosfofructo-2-kinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa (Pfkfb3) es prácticamente inexistente en estas células, al contrario de lo que sucede en las células gliales, principalmente en los astrocitos [Almeida, 2004]. La enzima Pfkfb3 genera fructosa-2,6-bisfosfato, que es un potente activador alostérico de la 6-fosfofructo-1-kinasa (PFK1), que es la principal enzima reguladora de la glucólisis [Herrero-Mendez, 2009].

Se ha observado que el silenciamiento de Cdh1 incrementa tanto el proceso glucolítico como la proliferación celular, mientras que la expresión de la proteína, impide que ambos procesos puedan llevarse a cabo [Almeida, 2010]. Asimismo, se ha descrito que APC/C-Cdh1 es el complejo responsable de regular los niveles proteicos de Pfkfb3 y, por tanto, la actividad glucolítica de las neuronas. Así, APC/C mantiene baja la actividad glucolítica neuronal, posibilitando la utilización de la glucosa para otras funciones, como es el mantenimiento de los sistemas antioxidantes de las células [Herrero-Mendez, 2009]. La enzima Pfkfb3 posee una secuencia *KEN-box*, con lo cual es un sustrato del complejo APC/C-Cdh1 [Herrero-Mendez, 2009]. La inhibición de la actividad de APC/C-Cdh1 produce la estabilización y acumulación de la enzima Pfkfb3, lo que estimula la glucólisis

originándose una reducción de la disponibilidad de glucosa para la vía de las pentosas fosfato y afectando la producción de NADPH con el consiguiente deterioro de los sistemas antioxidantes que dependen del glutatión celular [Rodríguez-Rodríguez, 2013].

6.4. SINAPSIS, MEMORIA Y APRENDIZAJE

En el año 2004 se puso en manifiesto que el complejo APC/C-Cdh1 controla el desarrollo y la transmisión de sinapsis, al regular la localización de los receptores de glutamato de tipo AMPA. En estos trabajos se ha visto cómo mutaciones producidas en distintas subunidades del complejo APC/C, de *Caenorhabditis elegans*, provocan el incremento de GLR-1 en las sinapsis, sin alterar la localización de otras proteínas sinápticas [Fu, 2011; Juo, 2004].

En el mismo año, van Roessel y sus colaboradores, estudiaron los efectos sinápticos de APC/C en *Drosophila*, definiendo distintas funciones tanto presinápticas como postsinápticas para APC/C-Cdh1. Estos autores demostraron que individuos carentes de la subunidad Apc2 del complejo APC/C, presentan un mayor tamaño sináptico en la unión neuro-muscular; este fenotipo es atribuible al incremento en el número de botones sinápticos. El complejo APC/C-Cdh1 ejerce su acción mediante la ubiquitinación de la Liprina- α , la cual controla la cantidad de botones sinápticos. Estos estudios explican por un lado, que APC/C-Cdh1 posee función presináptica ya que interviene en la restricción del número de botones sinápticos, y por otro lado se le atribuye una función postsináptica en la restricción de la abundancia de receptores de glutamato, siendo clave su papel en el desarrollo y funcionamiento de las sinapsis [van Roessel, 2004].

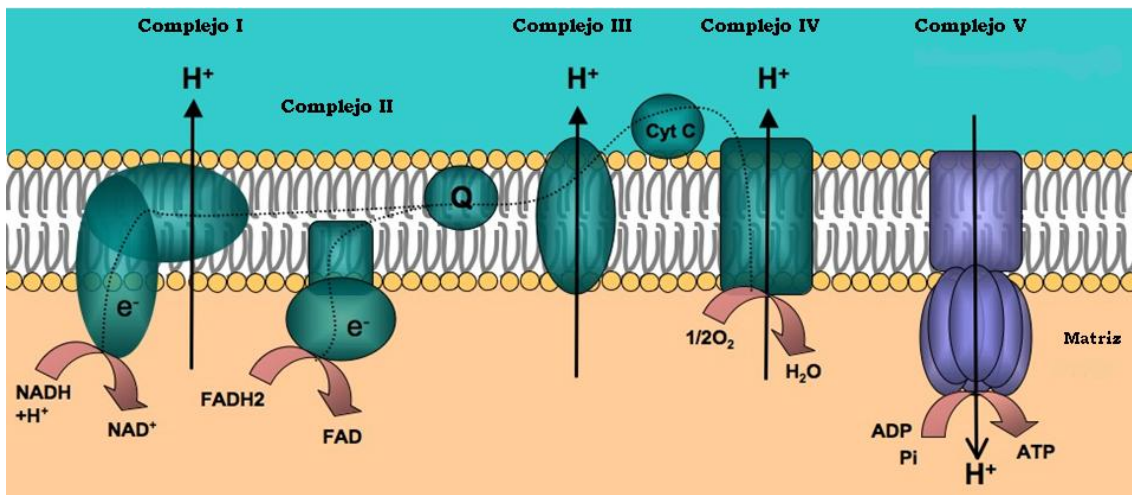
Por otra parte, se ha podido comprobar que APC/C-Cdh1 tiene una gran implicación en la plasticidad sináptica, así como en los procesos de memoria y aprendizaje [Kuczera, 2011]. Esto ocurre por ejemplo en el caso del receptor de efrina EphA4, que reduce la expresión del receptor ionotrópico de glutamato (GluR1), facilitando así el proceso de plasticidad sináptica. El mecanismo que sigue responde a la interacción de EphA4 con el complejo APC/C-Cdh1 para la ubiquitinación y degradación por parte del proteasoma del GluR1 [Fu, 2011].

También recientemente se ha descrito la participación del complejo APC/C-Cdh1 en la depresión a largo plazo de receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) en el síndrome de la X frágil. Se ha identificado a la proteína FMRP (*FragilX Mental Retardation Protein*) como un sustrato del complejo APC/C-Cdh1 para su degradación, formando ambos parte de una nueva vía de señalización para la ubiquitinación de los receptores mGluR en el cerebro, implicados en fenómenos de plasticidad sináptica [Huang, 2015].

PARTE III. MITOCONDRIA

1. SISTEMA DE FOSFORILACIÓN OXIDATIVA (OXPHOX)

En las células de mamífero, la mitocondria suministra la mayor parte de la energía a partir del metabolismo aeróbico en forma de ATP. En la producción de esta energía a la célula interviene el sistema de fosforilación oxidativa mitocondrial (*OXPHOS*), localizado en la membrana interna mitocondrial y que está formado por cinco complejos multiproteicos (**Esquema 13**).



Esquema 13. El sistema de fosforilación oxidativa mitocondrial está formado por los complejos de la cadena transportadora de electrones y la ATP sintasa o complejo V. El bombeo de protones por parte de los complejos de la cadena transportadora crean un gradiente que aprovecha la ATP sintasa para la generación de ATP. Modificado de [Bellance, 2009].

1.1. CADENA TRANSPORTADORA DE ELECTRONES

1.1.1. NADH: Ubiquinona oxidorreductasa (Complejo I)

El complejo I es la primera enzima de la cadena transportadora de electrones mitocondrial y el punto de entrada de los electrones en el sistema. Además de ser el complejo mitocondrial más grande (aproximadamente 1 MDa), actualmente es el más desconocido. Consta de, al menos, 45 subunidades, de las cuales 7 son codificadas a partir del ADN mitocondrial y el resto a partir del ADN nuclear [Willems, 2009].

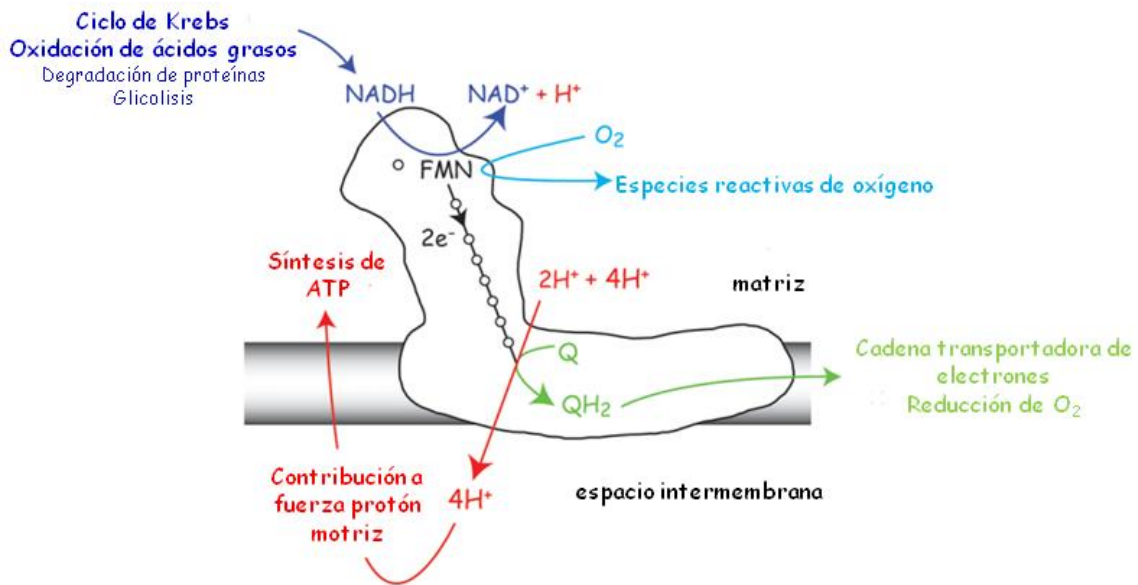
El complejo tiene una estructura en forma de L, con un brazo hidrofóbico insertado en la membrana y otro hidrofílico que se extiende hacia la matriz. Del total de estas subunidades, 14 forman el núcleo del complejo y son esenciales para que desarrolle su función. Siete de ellas son proteínas hidrofóbicas, son las codificadas a partir de ADN mitocondrial y forman parte del brazo hidrofóbico. ND2, ND4 y ND5 forman parte de la familia de transportadores Mrp que realizan un antiporte de Na^+/H^+ , participando en la translocación de protones [Mathiesen, 2002]. Las otras siete subunidades son hidrofílicas, correspondientes al dominio deshidrogenasa y sitio de unión del NADH (ver **tabla 1**). El resto de subunidades son accesorias, necesarias para la conformación del complejo pero no esenciales para el desarrollo de su actividad [Steffen, 2013].

Las mutaciones en una única de las subunidades esenciales hidrofílicas pueden provocar algunas alteraciones. Por ejemplo, está descrito que mutaciones en la subunidad NDUFS1 provocan enfermedades como la deficiencia de complejo I mitocondrial y el síndrome de Leigh, derivada de la anterior [Kirby, 1999]. En cuanto a las hidrofóbicas, además, pueden desarrollar la neuropatía óptica hereditaria de Leber [Korsten, 2010] y algunas de ellas como ND1 o ND5, el síndrome MELAS (encefalopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios similares a accidentes cerebrovasculares) [Kirby, 2004; Santorelli, 1997].

Nombre	Peso Molecular	Función
NDUFS1	75 KDa	Componente del centro Fe-S, actividad deshidrogenasa y oxidorreductasa, sitio de oxidación de NADH
NDUFS2	49 KDa	Componente del centro Fe-S
NDUFS3	30 KDa	Componente del centro Fe-S
NDUFS7	20 KDa	Componente del centro Fe-S y sitio de unión de ubiquinona
NDUFS8	23 KDa	Componente del centro Fe-S y sitio de unión de ubiquinona
NDUFV1	51 KDa	Actividad deshidrogenasa, sitio de unión de NADH y FMN, sitio de oxidación de NADH
NDUFV2	24 KDa	Actividad deshidrogenasa, sitio de oxidación de NADH

Tabla 1. Subunidades hidrofílicas de la NADH: Ubiquinona reductasa esenciales para el buen funcionamiento de la enzima, junto con el peso molecular y la(s) función(es) que desempeña cada una de ellas dentro del complejo proteico.

Este complejo enzimático cataliza la oxidación del NADH (que proviene principalmente de la oxidación de azúcares y grasas) y transfiere los electrones a través del mononucleótido de flavina (FMN) a la ubiquinona presente en la membrana interna mitocondrial que se reduce a ubiquinol (QH₂). El traspaso de dos electrones, de uno en uno, desde el NADH a la ubiquinona va emparejado a la traslocación de cuatro protones desde la matriz hacia la membrana interna mitocondrial para colaborar en la fuerza protón motriz del gradiente de protones que la mitocondria utiliza para la formación de ATP [Schultz, 2001; Walker, 1992] (**Esquema 14**).



Esquema 14. Reacciones que tienen lugar en la NADH: Ubiquinona oxidorreductasa, primer complejo de la cadena transportadora de electrones, que comienza con la oxidación del NADH y su transferencia de electrones al FMN. Durante el proceso, la ubiquinona libera protones a la matriz mitocondrial para colaborar en la fuerza protón motriz del gradiente de protones.

Los principales inhibidores del Complejo I son la rotenona (que bloquea el paso de electrones a la ubiquinona) y la piericidina A.

1.1.2. Succinato: Ubiquinona oxidorreductasa (Complejo II)

El complejo II es la segunda enzima de la cadena transportadora de electrones, y el segundo punto de entrada de electrones provenientes de la oxidación de azúcares, grasas y proteínas. Este complejo enzimático cataliza la oxidación del succinato y transfiere los electrones a través del cofactor FAD a la ubiquinona presente en la membrana mitocondrial que se reduce ubiquinol (QH₂).

Está formado por cuatro subunidades y es el único componente que no bombea protones para participar en la generación de la fuerza protón motriz. Las mutaciones en este complejo son causantes de enfermedades como el paraganglioma [Baysal, 2000].

1.1.3. Ubiquinol-citocromo C oxidoreductasa (Complejo III)

El complejo III en mamíferos, se encuentra insertado en la matriz interna mitocondrial formando fundamentalmente dímeros. Cada dímero está formado por 11 subunidades de las que cabe destacar citocromo *bL*, citocromo *c* y la proteína de Rieske, responsables de la transferencia electrónica.

El complejo III recibe los electrones de los anteriores complejos de la cadena en forma de ubiquinol (QH₂) y cataliza su transferencia hacia el citocromo *c*. Cada molécula de ubiquinol dona dos electrones a la cadena transportadora y libera dos protones (realmente libera cuatro y consume dos), colaborando así en la fuerza protón motriz del gradiente de protones.

Una pequeña parte de los electrones puede escaparse antes de llegar al siguiente complejo y reducir moléculas de oxígeno. Esta fuga prematura provoca la formación de superóxido y otros radicales libres, fundamentalmente en el espacio intermembrana del complejo III [Dröse, 2012].

El principal inhibidor específico del complejo III es la antimicina A (que impide la transferencia de electrones al ubiquinol oxidado) o el mixotiazol. Las mutaciones en este complejo, sobre todo en la subunidad citocromo *b*, pueden provocar encéfalo y cardiomiopatías, así como displasia septo-óptica [Blakely, 2005; Andreu, 2000; Schuelke, 2002].

1.1.4. Citocromo C oxidasa (Complejo IV)

El complejo IV es la enzima terminal de la cadena transportadora de electrones y cataliza la transferencia de electrones desde el citocromo *c* reducido al oxígeno molecular, formándose moléculas de agua. Para la reducción de una molécula de oxígeno hacen falta cuatro electrones y por tanto cuatro moléculas de citocromo *c* y se liberan 8H⁺ desde la membrana interna, 4H⁺ para la formación del agua y 4H⁺ que se liberan hacia la matriz para colaborar con la fuerza protón motriz del gradiente de protones.

Está formado por trece subunidades, y contiene dos grupos hemo (citocromo a y a₃) y dos centros de Cu (Cu_A y Cu_B), formando entre los cuatro dos centros binucleares. El centro Cu_A es el principal aceptor de electrones, que lo cede al citocromo a y éste lo dona al centro a₃/Cu_B donde tiene lugar la reducción del oxígeno molecular a agua.

Las mutaciones en el complejo IV son causantes de enfermedades como el síndrome de Leigh, síndrome MELAS o encefalomiopatías [Tiranti, 1998] [Papadopoulou, 1999]. El principal inhibidor de este complejo es el cianuro (CN), que se une covalentemente al grupo hemo del citocromo a₃ y bloquea la reducción del oxígeno.

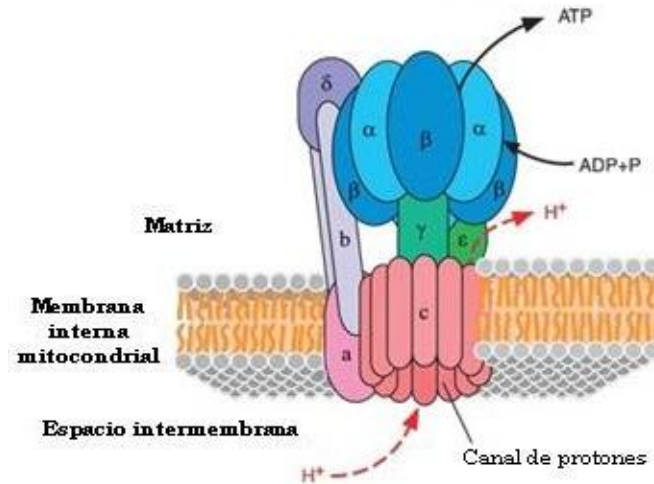
En mamíferos, la gran mayoría de estos complejos se encuentran formando unas estructuras más grandes denominadas supercomplejos, que cumplen la misma función que los complejos de forma individual y que siguen el esquema (I₁III₁₋₂IV₀₋₄). Así como la cardiolipina se ha demostrado como un lípido de membrana esencial para la estabilización de dichos complejos [Pfeiffer, 2003], ha sido SCAFI (*Supercomplex Assembly factor 1*) la primera proteína descubierta cuya función es ayudar en la formación de estos supercomplejos, en este caso facilitando la unión de los complejos III y IV [Acín-Pérez, 2008].

1.2. ATP SINTASA (COMPLEJO V)

La ATP sintasa es una enzima transmembrana que cataliza la formación de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico. Esta enzima utiliza la energía liberada por el flujo de protones que pasa a través de su canal, que tienen su origen en el espacio intermembrana, donde se acumulaban gracias al bombeo de los complejos de la cadena transportadora, y que regresan hacia la matriz mitocondrial.

El complejo V consta de dos módulos funcionales, uno hidrofílico (F₁) que se encuentra dirigido hacia la matriz mitocondrial y uno hidrofóbico (F₀) que se inserta en la matriz interna mitocondrial. El módulo F₁ está formado por tres copias de subunidad α y otras tres de subunidad β que se colocan alternativamente alrededor del eje central formado por la subunidad γ, y es responsable de catalizar la síntesis de ATP. Las subunidades γ, δ, y ε forman el tallo central del complejo y conectan ambos módulos

[Collinson, 1994]. El módulo F_0 consta de un anillo de 10-14 copias de la subunidad Su9 (c en bacterias), y las subunidades Su6 (a en bacterias), b, d, F_6 y OSCP (subunidad sensible a oligomicina, conocido inhibidor de la ATP sintasa) (**Esquema 15**).



Esquema 15. Estructura de la ATP sintasa. Consta del módulo F_0 donde se encuentra el canal de protones y el anillo que forma el "rotor", y del módulo F_1 , un hexámero de subunidades α y β que forma el "estátor" y es el responsable de la síntesis de ATP. Modificado de [Toyabe, 2011].

Cuando los protones pasan desde el espacio intermembrana hacia la matriz a través del canal formado por el anillo de las subunidades Su6 y Su9, denominado "rotor", se libera energía que provoca su rotación frente al "estátor" (módulo F_1 , formado por el hexámero $\alpha_3\beta_3$). Esta rotación es la que genera la energía necesaria para la síntesis de ATP en las subunidades catalíticas β debido a cambios conformacionales entre las subunidades del hexámero [Cox, 1984; Noji, 1997].

Las mutaciones del complejo V se producen principalmente en la subunidad Su6 y están relacionadas generalmente con el síndrome de Leigh [Houstek, 2006]. El principal inhibidor de este complejo es, como ya dijimos anteriormente, la oligomicina, que se une al módulo F_0 e impide el paso de protones a través del canal, provocándose su acumulación en el espacio intermembrana.

Los tejidos tienen diferentes demandas de energía y por lo tanto el sistema OXPHOS tendrá distinta capacidad dependiendo de en qué tipo de tejido se encuentren las mitocondrias. Los tejidos con mayor capacidad son el corazón y el músculo

esquelético, mientras que el hígado y el riñón tienen una capacidad baja. El cerebro representa una situación intermedia entre ambos.

2. FAMILIA BCL-2

La familia Bcl-2 está formada por varias proteínas que regulan procesos de permeabilización mitocondrial y juegan un importante papel en la regulación de la muerte celular por apoptosis, en concreto a través de la vía intrínseca o mitocondrial, inducida por varios tipos de estímulos [Youle, 2008].

Aunque la homología entre los distintos miembros de la familia es escasa, sí suelen conservarse cuatro dominios característicos denominados dominios de homología (BH). Éstos son esenciales para las interacciones entre los miembros de la familia y para su funcionamiento [Hirota, 1999; Hunter, 1996]. Algunos miembros de la familia presentan además un extremo hidrofóbico C-terminal que interviene dirigiendo a las proteínas hacia las membranas lipídicas celulares o subcelulares [Antonsson, 2004]. Dentro de esta familia, existen varias subfamilias con actividades proapoptóticas o antiapoptóticas.

- Subfamilia Bcl-2 (antiapoptótica): algunas de las proteínas más relevantes son la proteína Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*), que le da nombre a la familia, y la proteína Bcl-xL (*B-cell lymphoma-extra large*), la cual vamos a tratar ampliamente en esta memoria. Ambas mantienen los cuatro dominios característicos de la familia y el anclaje C-terminal.
- Subfamilia Bax (proapoptótica): las proteínas más importantes son Bax o Bak y mantienen los cuatro dominios característicos de la familia.
- Subfamilia BH3 (proapoptótica): Son las encargadas de iniciar el proceso de apoptosis y algunos de sus miembros son Bad, Bid, Bik o Noxa. Se llaman así porque sólo mantienen el dominio BH3.

De la ruptura del equilibrio existente entre las proteínas de las diferentes subfamilias dependerá si la célula comenzará o no el proceso de muerte celular programada [Adams y Cory, 2001].

2.1. Bcl-xL

Bcl-xL, localizada en la mitocondria, es la proteína antiapoptótica predominante en el cerebro adulto [Krajewska, 2002] y se encuentra tanto en la membrana externa mitocondrial como en la matriz. Fundamentalmente su función en la supervivencia neuronal (y celular), se basa en impedir la formación de poros formados por Bax y Bak en la membrana externa mitocondrial y, en consecuencia, prevenir la liberación de citocromo c al citoplasma, lo cual induciría la activación del apoptosoma y la muerte neuronal [Billen, 2008].

El descubrimiento de nuevas funciones de la familia de proteínas Bcl-2 en el sistema nervioso sugiere que la protección frente a la muerte celular es compleja e intervienen varias vías de señalización celulares. Recientemente se ha descrito que las proteínas de esta familia participan en la regulación de los procesos de fisión y fusión mitocondrial [Berman, 2009]. Este hecho contribuye en gran medida a que Bcl-xL participe en la localización mitocondrial en las sinapsis neuronales [Li, 2008], pero su implicación en procesos de plasticidad neuronal no pueden ser explicados por esta función de la familia Bcl-2. También se ha descrito que su sobreexpresión aumenta el número y tamaño de las sinapsis, la biomasa de mitocondrias y regula el crecimiento de neuritas [Berman, 2009]. La expresión de Bcl-xL se mantiene a lo largo de la vida, quizás para crear nuevas sinapsis y potenciar las conexiones ya existentes [Jonas, 2014].

Recientemente, se ha descrito que Bcl-xL puede encontrarse en la membrana interna mitocondrial y participar en la estabilización del potencial de membrana. Esto conlleva una disminución en el flujo de protones, que tiende a ser excesivo buscando un equilibrio termodinámico, y por lo tanto aumenta la eficiencia energética del proceso [Chen, 2011]. Este aumento de la eficiencia energética también implica a Bcl-xL en los procesos de resistencia de células tumorales [Vander Heiden, 2009].

En relación con esta localización de Bcl-xL y su implicación en la eficiencia energética, se sugirió que podría estar impidiendo la fuga de protones mediante una interacción con alguno de los elementos del sistema OXPHOS [Vander Heiden, 2001].

Recientemente se ha descrito una interacción entre Bcl-xL y la subunidad β de la F₁-F₀ ATP sintasa, que aumenta la actividad enzimática y los niveles de ATP en mitocondrias neuronales, y disminuye la glicólisis y el consumo de oxígeno [Alavian, 2011]. Para facilitar este aumento en la eficiencia en el metabolismo del ATP, Bcl-xL participa de dos maneras: una regulación directa de la ATP sintasa y una regulación a través de cambios en el flujo de entrada y salida de Ca²⁺ [Jonas, 2014].

Estos hechos puestos en conjunto, son de suma importancia en situaciones patológicas como la isquemia o en enfermedades neurodegenerativas, en las que existe un déficit de nucleótidos de adenina, y, por tanto, Bcl-xL puede intervenir aumentando la resistencia neuronal en estas situaciones de estrés [Jonas, 2014].

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

*"Ciencia es desechar una bonita teoría por un asqueroso hecho".
(Thomas Henry Huxley)*

1. HIPÓTESIS

Una característica fundamental de las neuronas es que son células post-mitóticas. En contra de este dogma, en los últimos años se ha demostrado que las neuronas pueden activar su maquinaria del ciclo celular. Sin embargo, dicha activación no está relacionada con la proliferación sino con la apoptosis celular.

En este sentido, en nuestro grupo se ha descrito anteriormente que en neuronas corticales en cultivo, tras un tratamiento de excitotoxicidad con glutamato, se inactiva el complejo APC/C-Cdh1. Esto provoca la acumulación de la ciclina B1, al igual que ocurre en algunas enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o en un episodio de ictus. Esta acumulación de ciclina B1 activa la quinasa Cdk1 y desencadena un proceso que culmina con la muerte neuronal por apoptosis, por un mecanismo que permanece desconocido. En el presente trabajo nos propusimos identificar el mecanismo por el cual la acumulación de ciclina B1 y la subsiguiente activación del complejo Cdk1-ciclina B1, activa la cascada de señalización de muerte por apoptosis tras un estímulo excitotóxico.

2. OBJETIVOS

A la vista de los antecedentes descritos en el apartado de introducción y la hipótesis, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Caracterizar el desarrollo del ciclo celular de las neuronas corticales en cultivo primario, tras la excitotoxicidad. Caracterizar y estudiar si el ciclo celular sigue un desarrollo normal tras el estímulo excitotóxico en neuronas.
2. Analizar la localización de la ciclina B1, tras su acumulación exógena y endógena posterior al estímulo excitotóxico, tanto en neuronas como en la línea celular HEK293T.
3. Identificar, en su caso, la/s molécula/s relacionada/s con la cascada de señalización de la apoptosis con la que puede estar interaccionando el complejo Cdk1-ciclina B1 tras su acumulación exógena y endógena posterior al estímulo excitotóxico.
4. Identificar el mecanismo molecular por el cual dicha interacción conlleva a la muerte celular por apoptosis tanto en neuronas como en HEK293T.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CULTIVOS CELULARES

1.1. ESPECIES ENSAYADAS Y CONDICIONES DEL ANIMALARIO

El cultivo primario de neuronas corticales se realizó a partir de fetos de rata albina de la raza Wistar, criadas y suministradas por el Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Salamanca. Los animales se criaron en jaulas y se mantuvo un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. Las condiciones ambientales del animalario se mantuvieron con una humedad relativa entre el 45% y el 65% y una temperatura entre 20°C y 25°C. Los animales se alimentaron *ad libitum* con una dieta sólida estándar (17% de proteínas, 3% de lípidos, 58,7% de componente glucídico, 4,3% de celulosa, 5% de minerales y 12% de humedad) y tuvieron acceso libre al agua durante todo el tiempo.

El periodo gestacional de la rata se controló limitando la cohabitación de las hembras vírgenes y los machos a una noche. A la mañana siguiente, se aislaron aquellas hembras que tuvieran presencia de espermatozoides en el frotis vaginal acompañados de células epiteliales de la vagina (que son características de un día fértil del estro). Bajo estas condiciones, se asume que el periodo de gestación de la rata es de 21,7 días.

Para los estudios *in vivo* se utilizaron ratones machos de la cepa C57BL/6J (Jackson Laboratories, Mayne, EEUU) de edad comprendida entre las 10 y 16 semanas. Estos ratones se mantuvieron en las mismas condiciones de luz/oscuridad y acceso a agua y dieta sólida que las ratas. La dieta administrada se compuso de 18% proteínas, 5,7% lípidos, 44,2% glúcidos, 3,5% celulosa, 5% minerales y 12% de agua.

Todas las manipulaciones y los procedimientos con animales están de acuerdo con la normativa vigente de la Comisión Europea 18.06.2007 (2007/526/CE) y de la Legislación Española (RD 1201/2005) en relación a la acomodación y al cuidado de animales de experimentación. Todos los protocolos realizados en esta Tesis se han aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca.

1.2. CULTIVO PRIMARIO DE NEURONAS CORTICALES

Los cultivos primarios de neuronas corticales se realizaron a partir de embriones de rata de 16 días de gestación (E16) [Almeida, 2004]. Las ratas gestantes se sacrificaron mediante dislocación cervical tras anestesarlas en una atmósfera de CO₂ y los embriones se extrajeron por histerectomía se trasladaron a una cabina de flujo laminar (TC48, Gelaire Flow Laboratories, McLean, Virginia, EEUU) para garantizar las condiciones de esterilidad en el cultivo.

Los hemisferios cerebrales se extrajeron con la ayuda de tijeras, pinzas y pañuelos impregnados en etanol al 70% y se depositaron en una placa de poliestireno (Nunc, Roskilde, Dinamarca) que contenía la solución de disgregación (EBSS: NaCl 116 mM, KCl 5,4 mM, NaH₂PO₄ 1,01 mM, MgSO₄ 1,5 mM, NaHCO₃ 26 mM, glucosa 4 mM, rojo fenol 10 mg/ml; albúmina 0,3% [p/v] y DNAsa tipo I 20 µg/ml, pH 7,2) y se disgregaron parcialmente con un bisturí. El tejido se trasladó a un tubo de 50 ml (BD Falcon, Nueva Jersey, EEUU) y se decantó durante 4 minutos. Se retiró el sobrenadante y el tejido se resuspendió suavemente en la solución de tripsinización (solución de disgregación suplementada con tripsina 0,025% [p/v]). La digestión enzimática del tejido se realizó a 37°C durante 15 minutos en un baño termostático, agitando suavemente cada 3 o 4 minutos, para facilitar el proceso. La tripsinización se detuvo mediante la adición de suero fetal de ternera (FCS; Linus, Madrid, España) a una concentración final del 10% (v/v) y el tejido se centrifugó a 500 x g, durante 5 minutos (Eppendorf 5702R, Hamburgo, Alemania).

El sedimento resultante se resuspendió en 12 ml de la solución de disgregación y se hizo pasar 9 veces a través de una pipeta Pasteur, previamente siliconada para evitar la rotura celular. La suspensión celular se dejó reposar durante 4 minutos y el sobrenadante, que contenía las células disociadas, se recogió cuidadosamente en un tubo de 50 ml. Este proceso se repitió otra vez para incrementar su eficiencia, combinándose los sobrenadantes obtenidos, y finalmente la suspensión celular se centrifugó a 500 x g, durante 5 minutos. El sedimento se resuspendió cuidadosamente en primer lugar, en 1 ml de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Sigma-Aldrich, Barcelona, España), seguido por otros 19 ml de DMEM para completar la resuspensión. De esta

suspensión celular se tomó una alícuota de 10 μl que se mezcló con 40 μl de azul de tripano (Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU) al 0,4% (v/v) y 30 μl de DMEM para el recuento total de células vivas, utilizándose una cámara cuenta glóbulos de Neubauer (Zeiss, Oberkochen, Alemania) y un microscopio de contraste de fases (modelo CK30, Olympus, Japón).

La suspensión celular se diluyó en medio de cultivo (DMEM suplementado con 10% [v/v] de FCS) y se sembró a una densidad de $2,5 \cdot 10^5$ células/ cm^2 o a $1,8-2,0 \cdot 10^5$ células/ cm^2 (para ensayos de inmunocitoquímica) en placas de poliestireno previamente recubiertas con poli-D-Lisina 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma-Aldrich). Las placas se mantuvieron en un incubador (Thermo Forma 311, Thermo Forma, Ohio, EEUU) termostaticado a 37°C , con una atmósfera saturada de vapor de agua, compuesta por un 95% de aire y un 5% de CO_2 . Transcurridos 2 días de cultivo, el medio se cambió por DMEM suplementado con suero de caballo al 5% (v/v) (HS; Sigma-Aldrich) y glucosa 20 mM (Sigma-Aldrich). Al tercer día de cultivo se añadió arabinósido de citosina 10 μM (Sigma-Aldrich) para impedir la proliferación de células no neuronales. Las células se utilizaron a los 6 días *in vitro* (6DIV). Bajo estas condiciones, los cultivos de neuronas mostraron una pureza aproximada del 95% (ver **Imagen I**) determinada mediante inmunorreacción con el marcador específico neuronal Map-2 (*Microtubule-Associated Protein 2*) y el marcador específico de glía GFAP (*Glial Fibrillary Acid Protein*).

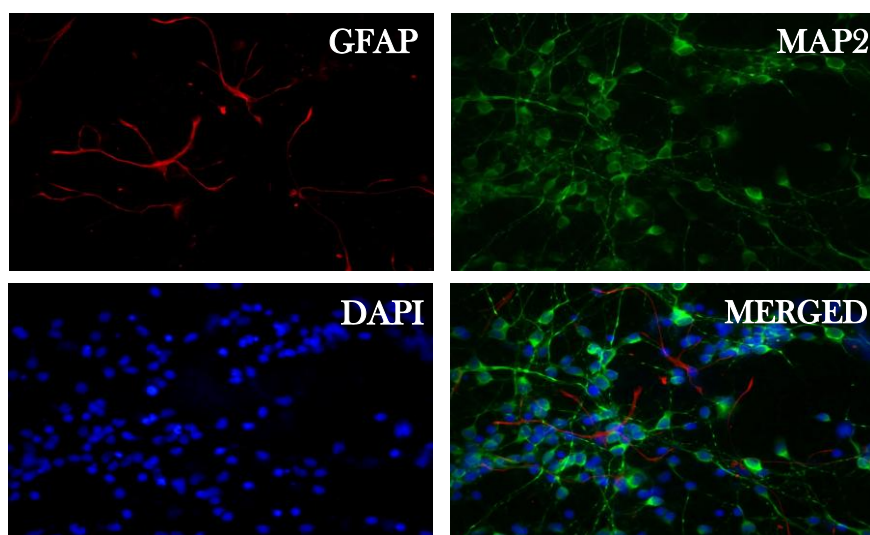


Imagen I. Microfotografías de neuronas corticales en cultivo primario donde se muestra la pureza del cultivo de aproximadamente un 96%, a juzgar por el resultado obtenido tras la inmunorreacción con el marcador neuronal anti-MAP2 (en verde) y el marcador de glía, anti-GFAP (*Glial fibrillary acid protein*) (en rojo).

Todos los medios de cultivo se suplementaron con penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 µg/ml) y anfotericina B (0,25 µg/ml; Sigma-Aldrich).

1.3. LÍNEA CELULAR HEK-293T

La línea celular procedente de riñón embrionario humano (HEK293T), se mantuvo en crecimiento en DMEM suplementado con FCS al 10% (v/v). El día previo a su utilización, las células se sembraron en placas de poliestireno, recubiertas previamente con poli-D-Lisina (10 µg/mL), a una densidad de 10^5 células/cm².

2. TRANSFECCIÓN TRANSITORIA DE CÉLULAS DE MAMÍFERO

2.1. CONSTRUCCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS

Todas las amplificaciones de plásmidos se realizaron en células competentes de *E. coli* (cepa DH-5α) preparadas en nuestro laboratorio a partir de un *stock* del Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG). Los medios de cultivo de bacterias (LB, LB-agar y 2xYT) se prepararon con bacto triptona (digerido pancreático de caseína), extracto de autolisado de levadura y agar granulado (DIFCO Laboratories, Michigan, EEUU), tal y como se indica en la **Tabla I**.

	Bactotripton (g/l)	Extracto de levadura(g/l)	Nacl (g/l)	Agar (g/l)
LB	10	5	10	-
LB-agar	10	5	10	20
2xYT	16	10	10	-

Tabla I. Concentración de los diferentes componentes que presentan los medios de cultivo bacteriano líquidos (LB, 2xYT) y sólidos (LB-agar).

La extracción y purificación de los plásmidos tras amplificación en bacterias, se llevó a cabo utilizando el sistema *Wizard Plus Midipreps* de Promega (Madison, Wisconsin, EEUU).

2.2. "SMALL INTERFERING RNA" (siRNA)

En el diseño de las secuencias se siguieron los criterios de Reynolds [Reynolds, 2004] y Ui-Tei [Ui-Tei, 2004], y, para diseñarlas, se utilizó el software de siRNA de Dharmacon (Dharmacon, GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Con el fin de reducir los niveles de expresión de la proteína Cdk5 la secuencia utilizada fue 5'-AAGCCGTACCCGATGTATC-3' [Zheng, 2007; Maestre, 2008]. Como control negativo se empleó el siRNA dirigido contra la luciferasa de la luciérnaga [Ohtsuka, 2004], no presente en el genoma de mamíferos y la secuencia utilizada fue 5'-CTGACGCGGAATACTTCGA-3'.

La especificidad de las secuencias se confirmó por Alineamiento de Secuencia Básico (BLAST) frente al genoma completo de *Rattus norvegicus*. Los siRNAs se utilizaron a una concentración final de 100 nM y las células se transfectaron 3 días antes del experimento. Estas condiciones fueron seleccionadas en base a su eficacia y especificidad.

2.3. "SMALL HAIRPIN RNA" (shRNA)

El silenciamiento de la proteína ciclina B1 se realizó mediante la expresión de shRNA. Para ello, se utilizó el vector de expresión pSuper-neo/GFP (Oligoengine, Seattle, Washington, EEUU) que, al expresar en paralelo el shRNA y la proteína verde fluorescente (GFP), permitió la identificación y el seguimiento de las neuronas transfectadas [Almeida, 2005; Maestre, 2008].

Previamente en nuestro laboratorio, se seleccionó una secuencia específica del gen que codifica esta proteína, a partir de la cual se diseñó un oligonucleótido de 64 bp (Isogen Life Science, Veldzigt, Holanda) que se insertó en los sitios BglII/HindIII del vector. Como control de las células transfectadas, se empleó la secuencia contra el cDNA de la luciferasa de luciérnaga descrita anteriormente.

2.4. SOBREENPRESIÓN DE PROTEÍNAS

El cDNA completo que codifica para la proteína ciclina B1 de ratón fue purificado del vector pCD2/CMV/ciclina B1, insertado en el vector de expresión pIRES2-eGFP (Clontech, California, EEUU) y secuenciado por el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca. Su correcta funcionalidad se probó previamente en nuestro laboratorio [Almeida, 2005].

El plásmido p8-Bcl-xL fue generosamente donado por el Dr. Felipe Pimentel (Centro de Investigación del Cáncer, Salamanca, España) y el plásmido pcDNA3-myc-ciclina B1-GFP por el Dr. Jonathon Pines (Gurdon Institute, Cambridge, Reino Unido). Los plásmidos y vectores comerciales empleados en este trabajo se detallan en la **tabla II**.

	Procedencia	Referencia
pIRES2-eGFP	Clontech	6029-1
pcDNA3.1(+)	Life technologies	V-790-20
pDsRed2-Mito	Clontech	632421

Tabla II. Construcciones y plásmidos utilizados.

2.5. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

Con objeto de profundizar en el mecanismo de acción de Bcl-xL, se mutó el residuo Ser-62 del cDNA de p8-Bcl-xL y se reemplazó por residuos de Ala (A) o Asp (D), para obtener las formas fosfodeficiente Bcl-xL (A) y fosfomimética Bcl-xL (D), respectivamente. La eficacia de las mutaciones se confirmó mediante secuenciación realizada por el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca y comparación con la secuencia original de Bcl-xL.

Para introducir las mutaciones, se utilizó el sistema QuickChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, California, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando los oligonucleótidos mutados como se indica en la **Tabla III**. El producto resultante de la PCR se digirió con *DpnI*, que reconoce exclusivamente DNA metilado (producido únicamente por bacterias).

Aminoácido	Secuencia 5' → 3'	PCR
S62A	F 5' -tggcacctggcagacgccccgcggtgaatgga- 3'	1 min a 95°C
	R 5' -tccattcaccgcggggcgctctgccaggtgccca- 3'	50 s a 95°C
S62D	F 5' -tggcacctggcagacgacccccgcggtgaatgga- 3'	50 s a 60°C
	R 5' -tccattcaccgcggggctcgtctgccaggtgccca- 3'	7 min a 68°C
		7 min 68°C

Tabla III. Oligonucleótidos empleados y mutaciones generadas en la proteína Bcl-xL. Se encuentran marcadas en rojo las bases nucleicas implicadas en cada mutación.

2.6. TRANSFECCIONES CELULARES

Las transfecciones de las células con las diferentes construcciones plasmídicas utilizadas en el presente trabajo se realizaron mediante distintos métodos, atendiendo a la naturaleza de las células a tratar. En el caso de siRNA, se realizaron mediante la utilización del reactivo catiónico *Lipofectamina RNAiMAX™* (Invitrogen, Madrid, España), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la transfección de plásmidos, se empleó el reactivo catiónico *Lipofectamina LTX* con *Plus Reagent™* (Invitrogen) en cultivos primarios de neuronas, debido a su dificultad para ser transfectadas con otras técnicas. Las transfecciones neuronales con siRNA se realizaron a los 3 DIV, y las plasmídicas a los 5 DIV, aunque los experimentos se realizaron a los 6 DIV. A estos efectos, los plásmidos se utilizaron a una concentración final de 1,6 µg/mL.

Para la transfección de plásmidos en HEK-293T se utilizó la polietilenimina (PEI, Sigma-Aldrich) [Boussif, 1995] con pequeñas variaciones. Así, tras la incubación del DNA con PEI 1 µM durante 10 min a temperatura ambiente, se añadió la mezcla a las células, que se incubaron en medio OptiMEM (Invitrogen, Paisley, Reino Unido) durante 1h. Tras lavar con PBS, las células se incubaron en DMEM suplementado con FCS al 10% (v/v).

La eficiencia de transfección se calculó mediante la cuantificación de las células fluorescentes por microscopía de fluorescencia (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

Esta eficiencia resultó ser de aproximadamente un 9-12% en neuronas y 80-95% en HEK293T. La correcta traducción de los DNA plasmídicos en sus correspondientes proteínas se comprobó mediante transferencia de Western. Esta técnica también se empleó para determinar la eficacia de los silenciamientos realizados con los siRNA y shRNA.

3. TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS

3.1. ESTIMULACIÓN DE NEURONAS CON GLUTAMATO

Al día 6 de cultivo las neuronas se lavaron con tampón Hank´s (NaCl 134,2 mM, KCl 5,26 mM, KH₂PO₄ 0,43 mM, NaHCO₃ 4,09 mM, Na₂HPO₄ 0,33 mM, D-glucosa 5,44 mM, HEPES 20 mM, CaCl₂ 4 mM; pH 7,4 esterilizado por filtración) a 37°C. A continuación, las neuronas se sometieron a un modelo de excitotoxicidad. Así, las neuronas se incubaron en tampón Hank´s con glicina (10 µM; Sigma-Aldrich) en ausencia (control) o en presencia de glutamato (100 µM; Sigma-Aldrich) en el incubador a 37°C. Tras 5 minutos de incubación, se retiró el tampón Hank´s y se sustituyó por DMEM. Las neuronas se mantuvieron en el incubador a 37°C hasta su recolección, según los experimentos [Delgado-Esteban, 2000; Almeida, 2001].

3.2. INHIBIDORES DE CASPASAS Y OTROS TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS

Como inhibidores de caspasas se utilizaron Z-VAD-fmk, Z-DEVD-fmk, Z-IETD-fmk, Z-DQMD -fmk, Z-VDVAD-fmk y Z-LEHD-fmk (Calbiochem, Merck, Darmstadt, Alemania). Estos inhibidores se utilizaron a una concentración de 50 µM, ya que previamente nuestro laboratorio ha demostrado su eficiencia a esta concentración [Diaz-Hernandez, 2007], y se añadieron al cultivo 6 horas después de las transfecciones. En la **Tabla IV** se muestra la caspasa inhibida por cada uno de estos compuestos.

Inhibidor	Caspasa(s) inhibida(s)
Z-VAD-fmk	Todas las caspasas
Z-DEVD-fmk	Todas las caspasas
Z-VDVAD-fmk	Caspasa 2
Z-DQMD -fmk	Caspasas 3 y 6
Z-IETD-fmk	Caspasa 8
Z-LEHD-fmk	Caspasa 9

Tabla IV. Inhibidores de caspasas

En la **tabla V** se recogen el resto de tratamientos farmacológicos y las condiciones experimentales utilizadas en el presente trabajo.

4. ANÁLISIS DE LA APOPTOSIS NEURONAL

4.1. ANEXINA V / 7-AMINO-ACTINOMICINA D

La muerte celular por apoptosis se determinó, mediante citometría de flujo, tras teñir las células con anexina V conjugada con el fluorocromo APC (aloficocianina) , y 7-amino-actinomicina D (7-AAD) (BD Biosciences). El método se basa en la detección de la fosfatidilserina, que en las células apoptóticas se transloca del interior al exterior de la membrana plasmática. La anexina V es una proteína anticoagulante vascular que posee una gran afinidad por la fosfatidilserina. Por ello, unida a un fluorocromo adecuado, permite la identificación de las células apoptóticas tras su unión a la fosfatidilserina localizada en su superficie celular.

	Diana	Procedencia	Concentración	Vehículo
Actinomicina D	ADN	Sigma-Aldrich	100 μ M	DMSO
Cicloheximida	Ribosoma 60S	Sigma-Aldrich	50 μ M	Etanol
Etopósido	Topoisomerasa II/DNA	Sigma-Aldrich	1 μ M	DMSO
Flavopiridol	Cdks	Sigma-Aldrich	1 μ M	DMSO
Glutation etil-éster (GSH-EE)	GPx/ROS	Bachem	5 mM	Medio de cultivo
MG132	Proteasoma	Sigma-Aldrich	10 μ M	DMSO
Oligomicina	ATP-sintasa	Sigma-Aldrich	1 μ M	Etanol
proTAME	APC/C	Sigma-Aldrich	10 μ M	DMSO
Roscovitina	Cdks	Sigma-Aldrich	1 μ M	DMSO

Tabla V. Tratamientos farmacológicos. La actinomicina D se une al DNA en el complejo de iniciación evitando así la elongación de la RNA polimerasa. La cicloheximida es un inhibidor de la síntesis proteica que actúa interfiriendo la actividad peptidil transferasa del ribosoma 60S. El etopósido es un derivado de la podofilotoxina que forma un complejo ternario con la topoisomerasa II y el DNA, provocando errores en la síntesis de ADN y promoviendo la apoptosis. El flavopiridol es un flavonoide sintético que inhibe a las quinasas dependientes de ciclina, principalmente Cdk-1, -2, -4, -6 y -7. El glutatión etil-éster es un cofactor de la glutatión peroxidasa (GPx), lo que detoxifica especies reactivas de oxígeno (ROS). El MG132 es un inhibidor del proteasoma que disminuye la degradación por ubiquitinación. La oligomicina es un macrólido que bloquea específicamente el canal de protones de la subunidad Fo de la ATP-sintasa. El proTAME es el profármaco que favorece la permeabilidad, y por tanto entrada en la célula, del TAME, fármaco que inhibe la actividad ubiquitina ligasa del complejo APC/C. La roscovitina es un análogo de purinas y potente inhibidor de quinasas dependientes de ciclina, principalmente Cdk2 y Cdk5. Todos los tratamientos se realizaron 30 min pre-estimulación con glutamato o en el momento de realizar la transfección y se mantuvieron hasta la recogida de muestras.

Sin embargo, la anexina V también es capaz de unirse a la fosfatidilserina en el interior de aquellas células que no tienen intacta su membrana plasmática (consideradas como necróticas). Por ello, junto con la anexina V se utilizó el colorante impermeable a la membrana plasmática 7-AAD, que se une específicamente al DNA de las células necróticas, para así poder identificar exclusivamente las células apoptóticas. Así, sólo aquellas células inmunorreactivas para la anexina V, que mostraron ser negativas para el 7-AAD, se consideraron apoptóticas (**Imagen II**).

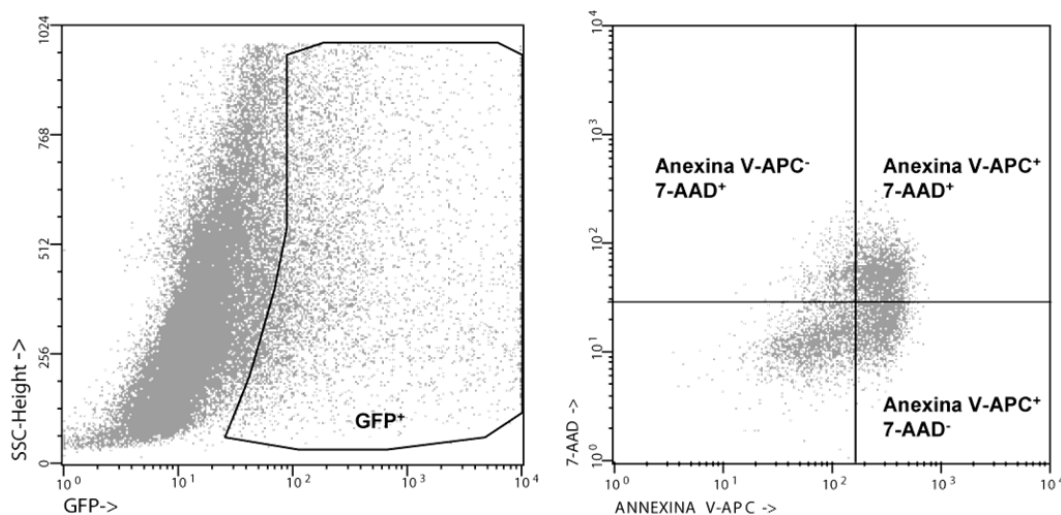


Imagen II. Determinación de la apoptosis neuronal mediante citometría de flujo. Se analizó la tinción con Anexina V-APC y 7-AAD, considerándose apoptóticas aquellas células anexina V-APC⁺ y 7-AAD⁻. En el caso de neuronas transfectadas con los diferentes plásmidos descritos, el análisis se realizó en la población de neuronas GFP⁺, es decir, en las neuronas transfectadas.

Las neuronas se recolectaron suavemente mediante incubación con EDTA tetrasódico 1mM en PBS (pH 7,4) y se tiñeron con anexina V-APC y 7-AAD en tampón de conjugación (HEPES 100 mM, NaCl 140 mM, CaCl₂ 2,5 mM), siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras 15 minutos de incubación a temperatura ambiente y oscuridad, las señales de la GFP (en el caso de células transfectadas), de la anexina V-APC y del 7-AAD se analizaron en los canales FL1, FL4 Y FL3, respectivamente, de un citómetro de flujo *FACScalibur* (BD Biosciences), equipado con un haz láser de argón de 15 mW sintonizado a 488 nm, utilizando los programas *CellQuest™* y *Paint-A-Gate™ PRO* (BD Biosciences) [Gómez-Sánchez, 2011].

El umbral del analizador se ajustó en el canal correspondiente del citómetro de flujo para excluir la mayoría de los restos subcelulares o agregados celulares. Con ello, se

estimó el ruido de fondo debido a la ruptura de neuritas y extensiones celulares, y a los dobletes o tripletes formados por uniones intercelulares. Para el análisis citométrico se seleccionaron por condición 10^5 células por cuadruplicado y los resultados se expresaron como porcentaje de neuronas apoptóticas.

4.2. CASPASA-3 ACTIVA

La detección de la caspasa 3 activa se realizó mediante el kit ApoActive3™ Kit (Bachem, California, EEUU), acorde a las instrucciones del fabricante. El fundamento de esta técnica se basa en el reconocimiento del dominio constituido por los aminoácidos 163-175 de la subunidad p18 de la caspasa 3, que queda expuesto tras la escisión por eventos pro-apoptóticos.

Para ello, se recolectaron suavemente las neuronas con EDTA tetrasódico 1 mM en PBS (pH 7,4). Tras centrifugar a $500 \times g$ durante 5 min, los sedimentos celulares se fijaron durante 20 min, y una vez lavados con PBS, se resuspendieron en PBS conteniendo albúmina bovina sérica (BSA, Sigma-Aldrich) al 2% (p/v). Después de un nuevo lavado con PBS, las células se incubaron durante 1 h con anti-caspasa 3 producido en conejo (Bachem, California, EEUU). Transcurrida 1 h de incubación a temperatura ambiente, las células se lavaron con PBS con BSA al 1% (p/v). A continuación, se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente, con un anticuerpo secundario anti-conejo producido en cabra y conjugado con CyC3 (1:500, Jackson Immunoresearch, Pensilvania, EEUU). A continuación las células se lavaron y resuspendieron con PBS conteniendo BSA al 1% (p/v). Las neuronas fueron fijadas usando el *Fix&Perm kit* (Life Technologies, Nueva York, EEUU) y marcadas con caspasa-3 activa fluoresceína isotiocianato (FITC) (1:10, BD Biosciences), siguiendo el protocolo incluido en la ficha técnica. Finalmente, se analizó la fluorescencia derivada del marcaje con el anticuerpo con el citómetro de flujo sintonizado a 488 nm, utilizando los programas *CellQuest™* y *Paint-A-Gate™ PRO* [Delgado-Esteban, 2013].

El umbral del analizador se ajustó en el canal correspondiente del citómetro de flujo para excluir la mayoría de los restos subcelulares o agregados celulares. Con ello, se estimó el ruido de fondo debido a la ruptura de neuritas y extensiones celulares, y a los dobletes o tripletes formados por uniones intercelulares. Para el análisis citométrico se

seleccionaron por condición 10^5 células por cuadruplicado y los resultados se expresaron como porcentaje de neuronas caspasa-3 activa positivas.

5. ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

El anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) se determinó utilizando la sonda MitoSOX[®] (Molecular Probes, Invitrogen), que consiste en un derivado catiónico del dihidroetidio unido a un radical trifenilfosfonio. Éste le confiere una carga positiva que lo dirige a la mitocondria, donde puede ser oxidado por $O_2^{\cdot-}$ y formar 2-hidroxi-5-(trifenilfosfonio)hexiletidio (Imagen III). Así, la emisión de fluorescencia ($\lambda_{exc} \sim 510$ nm; $\lambda_{em} \sim 590$ nm) permite detectar de manera específica los niveles de $O_2^{\cdot-}$ en el orgánulo.

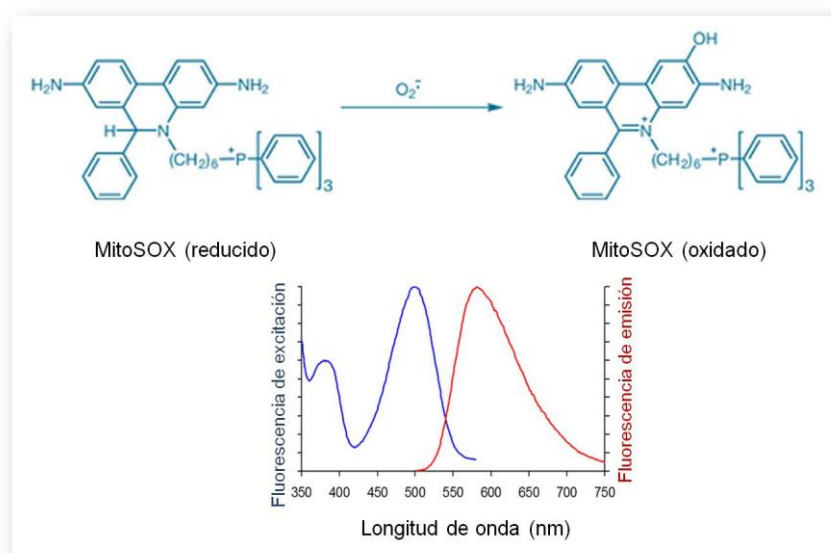


Imagen III. En la mitocondria, la oxidación de la sonda MitoSOX[®] da lugar a un derivado 2-hidroxi-5-(trifenilfosfonio)hexiletidio fluorescente, que permite la detección de $O_2^{\cdot-}$ de manera específica en el orgánulo.

Para registrar MitoSOX[®] por citometría de flujo, las células se lavaron con PBS y posteriormente se tripsinizaron y se centrifugaron (5 min a $500 \times g$). En las muestras previamente tratadas con un agente oxidante, el sedimento celular resultante se resuspendió en tampón Hank's frío y se mantuvo en hielo hasta la adquisición de

eventos. Para determinar el estado basal y oxidado de MitoSOX[®] en una misma muestra, se resuspendieron las células en tampón Hank's a 37°C, analizando la fluorescencia de la sonda antes y después del estímulo con el agente oxidante. En el análisis citométrico se utilizaron $3 \cdot 10^5$ células por cuadruplicado por condición. Los umbrales de fluorescencia se ajustaron en base a sus espectros de excitación/emisión (510/580 nm) empleando un citómetro *FACScalibur*. La calibración del citómetro se realizó utilizando muestras en presencia o ausencia de la sonda, así como GFP⁺ o GFP⁻ [Quintana-Cabrera, 2012].

6. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA ($\Delta\Psi_m$) COMO ÍNDICE DE INTEGRIDAD MITOCONDRIAL

La evaluación del potencial de membrana mitocondrial se realizó mediante citometría de flujo, siguiendo las instrucciones del sistema comercial *MitoProbe[™] DilC₁ Assay Kit for Flow Cytometry* (Invitrogen).

Las neuronas se incubaron con la sonda DilC₁ (1,1', 3, 3', 3', 3' - hexametilindodicarburo-yoduro de cianina) a una concentración de 10 μ M a 37°C, durante 15 minutos. Esta sonda, dado su carácter catiónico, se acumula en las mitocondrias polarizadas, por lo que su pérdida es un índice de despolarización mitocondrial.

Tras la incubación con la sonda, se centrifugaron a 700 x *g* durante 3 minutos y las células se resuspendieron en 500 μ l de PBS. Los valores de $\Delta\Psi_m$ se expresaron en unidades arbitrarias (u.a.) usando el desacoplador mitocondrial carbonil cianuro 3-clorofenilhidrazona (CCCP, 50 μ M) durante 15 minutos para definir el valor 0 de $\Delta\Psi_m$. En el análisis citométrico se utilizaron $3 \cdot 10^5$ células por cuadruplicado y por condición, y la señal de fluorescencia se analizó en el canal FL4 del citómetro de flujo *FACScalibur* [Gómez-Sánchez, 2011].

7. DETERMINACIÓN DE LA INCORPORACIÓN DE BROMO-D-URIDINA (BrdU)

Para la determinación de la incorporación de BrdU en el DNA neuronal, se utilizó el sistema comercial *APC BrdU Flow Kit* (BD Biosciences). En primer lugar las neuronas se incubaron con DMEM que contenía BrdU 10 μM y tras 24 horas, se procedió a la determinación de la BrdU incorporada a las células.

Siguiendo las instrucciones del fabricante, las neuronas se fijaron, se permeabilizaron y se resuspendieron con DNasa (300 $\mu\text{g/ml}$) durante 1 hora a 37°C para exponer la BrdU incorporada. Tras el marcaje con el anticuerpo monoclonal anti-BrdU unido al fluorocromo APC (ver **Tabla VI**), se analizaron las señales de fluorescencia mediante citometría de flujo. En el análisis citométrico se utilizaron $3 \cdot 10^5$ células por cuadruplicado y por condición, y la señal de fluorescencia se analizó en los canales FL4 (BrdU) y FL1 (neuronas GFP⁺) del citrómetro de flujo *FACScalibur* [Cuende, 2008].

8. TRANSFERENCIA TIPO WESTERN BLOT

8.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

8.1.1. Extracción de proteínas totales

Para la obtención de extractos celulares de proteínas totales, las células se lavaron con PBS y se lisaron en tampón RIPA (dodecilsulfato sódico [SDS] al 1 %, EDTA 10 mM, Triton Tx-100 al 1 % v/v, NaCl 150 mM, Na₂PO₄ 10 mM a pH 7,0), suplementado con inhibidores de fosfatasas (Na₃VO₄ 1 mM, NaF 50 mM) y proteasas (aprotinina 50 $\mu\text{g/ml}$, leupeptina 50 $\mu\text{g/ml}$, inhibidor de tripsina 50 $\mu\text{g/ml}$, TLCK 100 μM , fluoruro de fenilmetilsulfonilo [PMSF] 100 μM , anti-papaína 50 $\mu\text{g/ml}$, amastatina 50 $\mu\text{g/ml}$, bestatina 50 $\mu\text{g/ml}$ y pepstatina 50 $\mu\text{g/ml}$). Los extractos se recogieron en hielo e, inmediatamente, se hirvieron durante 5 minutos, se centrifugaron a 13.000 x g; durante 10 minutos, y el sobrenadante se trasladó a un nuevo tubo.

En el caso de la co-inmunoprecipitación de proteínas en condiciones desnaturalizantes, tras lavar las células con PBS, se recogieron en tampón de lisis NP-40 (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, NP-40 al 1% [v/v] e inhibidores de proteasas y fosfatasas, pH 7,6) [Gómez-Sánchez, 2011]. Los extractos se recogieron en hielo y se llevaron a un agitador orbital durante 20 minutos, para facilitar su lisis, y posteriormente se clarificaron mediante centrifugación a 13.000 x *g* durante 10 minutos y el sobrenadante se trasladó a un nuevo tubo.

8.1.2. Extracción de proteínas mitocondriales y citosólicas

Con objeto de aislar las fracciones mitocondrial y citosólica de las células tratadas, se utilizó un protocolo de fraccionamiento diferencial [Almeida, 1998], que se resume en la **imagen IV**. Para ello, se utilizaron $7-10 \cdot 10^7$ de células, previamente sembradas en placas de 145 cm² (Nunc. Thermo Fisher Scientific). Una vez alcanzada la confluencia, y tras lavar con PBS a 4°C, las células se desprendieron de la placa mediante raspado en medio de aislamiento mitocondrial (MAM), consistente en una disolución de sacarosa 320 mM, EDTA dipotásico 1 mM, Tris-HCl 10 mM y una batería de inhibidores de proteasas (AEBSF 2 mM, Aprotinina 0,3 μM, Bestatina 130 μM, EDTA 1 mM, E-64 14 μM, Leupeptina 1 μM), ajustada a pH 7,4.

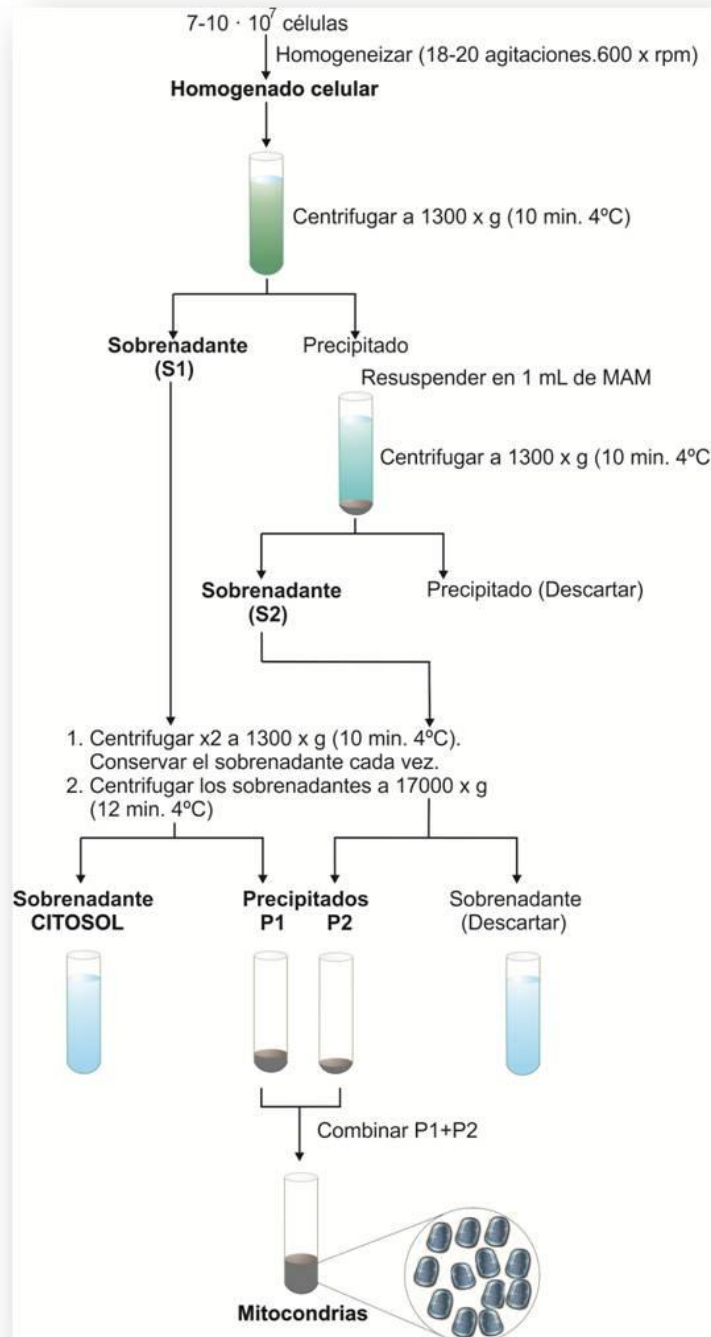


Imagen IV. Fraccionamiento subcelular. La obtención de las fracciones mitocondrial y citosólica de células se realizó por un procedimiento de centrifugación diferencial. Para ello, se homogeneizaron las células con un pistilo de teflón, obteniendo un homogenado celular. Tras centrifugarlo a 1.300 x g (10 min a 4°C), se conservaron el sobrenadante (S1) y el sobrenadante que resultó de la resuspensión del pellet (S2). Después de 2 centrifugaciones de ambos sobrenadantes a la misma velocidad, el precipitado mitocondrial (P1+P2) se obtuvo al centrifugar S1 y S2 a 17.000 x g (12 min a 4°C).

Tras centrifugar a 600 x *g* durante 5 min a 4°C, el precipitado celular se resuspendió en 1 ml de MAM y se sometió a un proceso de homogeneización con un pistilo de teflón, con objeto de lisar la membrana plasmática manteniendo intactas las mitocondrias. Tras 18-20 agitaciones a 600 rpm, se retiró una alícuota del homogenado celular (H), y el resto se centrifugó a 1.300 x *g* durante 10 min a 4°C, conservando el sobrenadante (S1), que contiene la fracción mitocondrial.

El precipitado se resuspendió en 1 ml de MAM, que se centrifugó a 1.300 x *g* durante 10 min a 4°C, conservando el nuevo sobrenadante (S2). Este protocolo se repitió hasta dos veces más con cada fracción (S1 y S2, hasta observar la desaparición de cualquier precipitado. En ese momento, S1 y S2 se sometieron a una nueva centrifugación, a 17.000 x *g* durante 10 min a 4°C. El sobrenadante de S1 se conservó, constituyendo la fracción citosólica. Los precipitados de ambos tubos (S1+S2), que representan la fracción mitocondrial, se combinaron y resuspendieron en tampón RIPA para análisis de expresión proteica. La pureza de las fracciones mitocondrial y citosólica se comprobó mediante análisis de la actividad citrato sintasa y lactato deshidrogenasa, exclusivas de mitocondria y citosol, respectivamente. El grado de pureza de cada fracción fue de un 95-98%.

8.1.3. Extracción de proteínas nucleares

La extracción se llevó a cabo mediante una técnica de fraccionamiento subcelular adaptada de otros autores [Zancai, 2005]. Se basa en el uso de una solución de lisis poco agresiva (tampón citosólico), que fragmenta las membranas celulares en una primera fase, pero mantiene los núcleos intactos, que son lisados en una segunda fase con una solución más agresiva (tampón nuclear) con el fin de obtener exclusivamente las proteínas nucleares (ver **Imagen V**).

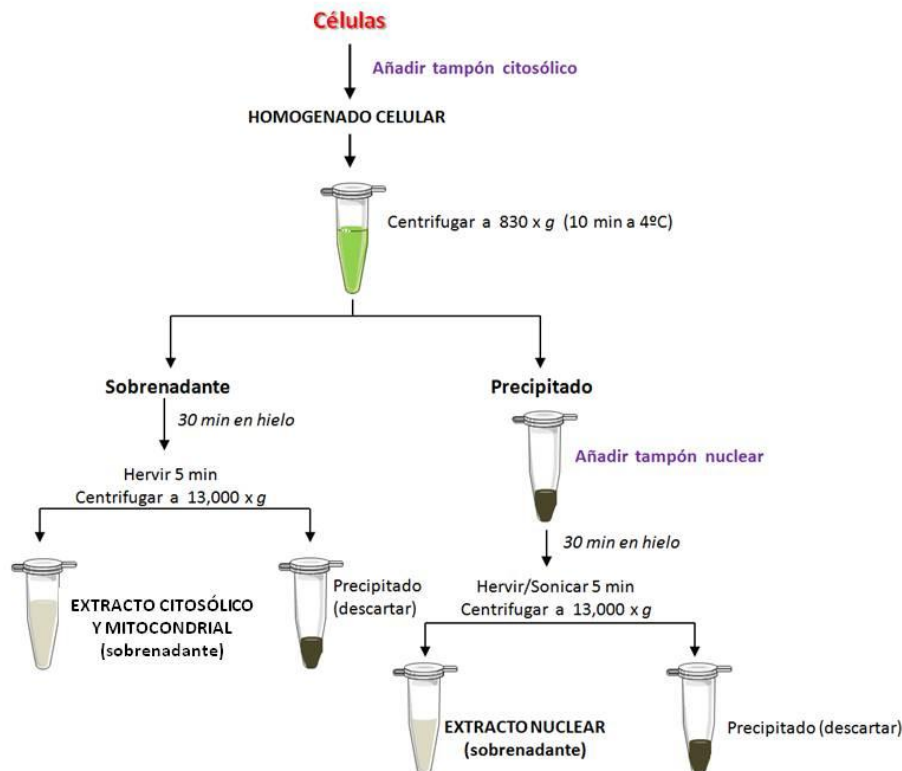


Imagen V. Fraccionamiento subcelular. La obtención de las fracciones nuclear, mitocondrial y citosólica de células se realizó por un procedimiento de centrifugación diferencial. Para ello, se homogeneizaron las células con un pistilo de teflón, obteniendo un homogenado celular. Tras centrifugarlo a $830 \times g$ (10 min a 4°C), se conservaron el sobrenadante (que contiene los extractos citosólico y mitocondrial) y el precipitado (que contiene el extracto nuclear).

Para ello, las células se sembraron en placas de 145 cm^2 y se lavaron con PBS suplementado con MgCl_2 frío. Posteriormente, se añadió el tampón citosólico [HEPES 10 mM, MgCl_2 1,5 mM, KCl 10 mM, EDTA 1 mM, sacarosa 300 mM y NP-40 0,1% (v/v); pH 7,9] suplementado con inhibidores de fosfatasa y proteasas. A continuación, se rasparon las células y se hicieron pasar 15 veces a través de una micropipeta. Tras 30 minutos en hielo, se agitaron en vórtex 10 segundos, se comprobó con el microscopio la completa rotura celular y se centrifugaron los extractos a $830 \times g$ durante 10 minutos a 4°C para separar las dos fracciones. Por un lado, se retiraron los sobrenadantes (fracción citosólica y mitocondrial) y se continuó la extracción como en el apartado anterior. Por otro lado, los precipitados (núcleos) se resuspendieron en tampón nuclear, [HEPES 50 mM, MgCl_2 1,5 mM, KCl 10 mM, NaCl 0,5 mM, EDTA 1mM y NP-40 1% (v/v); pH

7,9] suplementado con inhibidores de fosfatasa y proteasas. Seguidamente, se hicieron pasar 15 veces a través de una micropipeta y se dejaron en hielo durante 2 horas. Se agitaron en vórtex 10 segundos, se hirvieron 5 minutos, se sonicaron 5 minutos y se centrifugaron a 13,000 x *g* durante 10 minutos a 4°C.

8.1.4. *Fraccionamiento submitocondrial*

El extracto mitocondrial (ver **apartado 8.1.2**) se incubó en el tampón de extracción (EDTA 1mM, MOPS-KOH 10 mM, sacarosa 320 mM; pH 7,2) en hielo durante 30 minutos en presencia o ausencia de tripsina (25 o 50 µg/mL) [Wang, 2014]. La lisis se detuvo con la adición de PMSF 1mM y las muestras se centrifugaron 16,000 x *g* durante 10 minutos a 4°C. Los precipitados se resuspendieron en tampón RIPA para el análisis de expresión proteica.

8.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

La concentración de proteínas de las muestras se midió mediante el ensayo del ácido bicinconínico (BCA; Pierce, Thermo Fisher Scientific, Illinois, EEUU) [Smith, 1985]. Este método se basa en la reducción del Cu²⁺ (azul) a Cu⁺ por parte de las proteínas de la muestra, el cual es capaz de reaccionar con el BCA originando una solución morada que se midió espectrofotométricamente en el lector de placas *Multiskan Ascent* (Thermo Electron Corp, Basingstoke, Reino Unido) a 562 nm (ver **figura III**).

También se utilizó el método de Lowry [Lowry, 1951], que consiste en la formación de un complejo de coordinación entre el cobre y el nitrógeno peptídico. En una segunda reacción, se utiliza el reactivo *Folin-Ciocalteau* (ácido fosfomolibdotúngstico), que se reduce por medio de los grupos fenol de los aminoácidos aromáticos presentes en la proteína (Tyr, Trp y Phe), a un complejo de color azul oscuro (**Imagen VI**), el cual se mide espectrofotométricamente a una longitud de onda de 750 nm (*Uvikon*, Microbeam S.A., Barcelona, España). Con ambos métodos se utilizó la albúmina sérica bovina (BSA) como estándar y todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

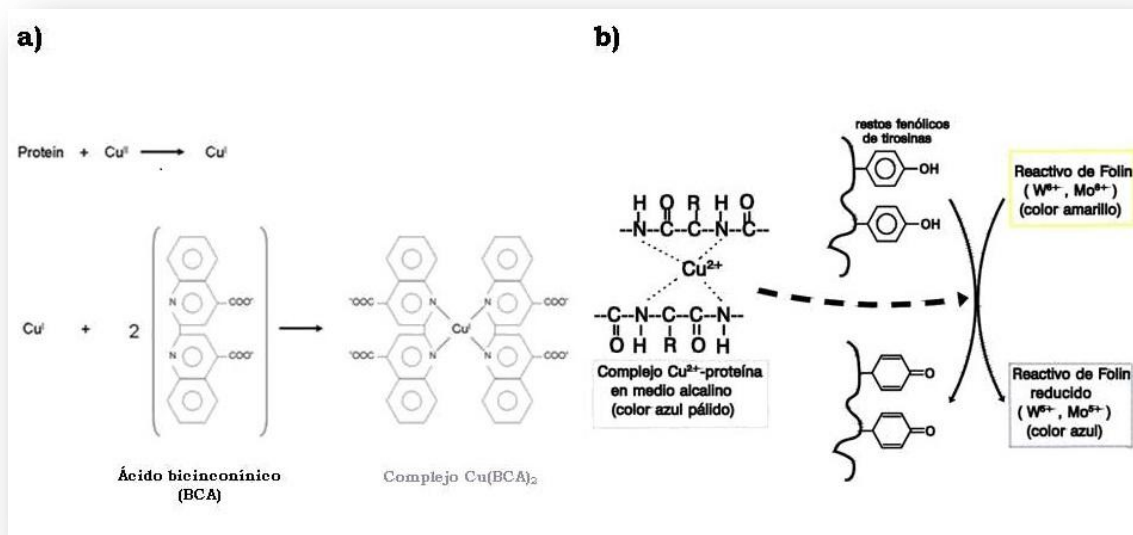


Imagen VI. Métodos de determinación de la concentración de proteínas. a) Método del ácido bicinonínico (BCA). b) Método de Lowry que usa el reactivo de Folin-Ciocalteau.

8.3. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN SDS-PAGE

Las proteínas (10-100 µg) de los extractos obtenidos se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE (solución de acrilamida / bisacrilamida 29:1; BioRad Laboratories S.A., California, EEUU) al 8, 10 o 12%, dependiendo del peso molecular de la proteína de interés. Para identificar dichos pesos moleculares, se utilizó un marcador de peso molecular (*Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder*, Thermo Fisher) o Dual Colors® (BioRad Laboratories). Las proteínas se separaron utilizando un sistema de electroforesis vertical (*MiniProtean-3®*, BioRad Laboratories,) y tampón de electroforesis (Tris 25 mM, glicina 200 mM y SDS al 0,1% p/v, pH 8,3).

Una vez finalizada la electroforesis, los geles se tiñeron con azul de Coomassie (ver composición en el apartado 8.6), o bien se sometieron a electrotransferencia e inmunodetección mediante la técnica de Western Blot.

8.4. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

Las proteínas separadas en geles de SDS-PAGE se transfirieron electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa (Hybond[®], Amersham Biosciences, Nueva Jersey, EEUU) utilizando el sistema *Mini-Transblot* (BioRad) y tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20% v/v, pH 8,3) [Burnette, 1981]. A continuación, se bloquearon las membranas durante 1 h con leche (Sveltesse, Nestlé, Vevey, Suiza) al 5% (p/v) en TTBS (Tris 20 mM, NaCl 500 mM, Tween-20 al 0,1% v/v; pH 7,5) a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron a 4°C durante toda la noche en una solución de TTBS suplementado con BSA al 2 % (p/v), que contenía el anticuerpo deseado (ver **Tabla VI**). Como control de carga, se utilizaron para extractos totales y citosólicos, anti-GAPDH (Ambion, Austin, Texas, EEUU) o anti- β III-Tubulina (Abcam; Cambridge, Reino Unido) y, para extractos mitocondriales, anti-porina (*voltage dependent anion channel*, VDAC; Calbiochem). Al día siguiente, las membranas se lavaron 3 veces con TTBS y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (ver **Tabla VII**), conjugado con la peroxidasa de rábano (HRP), en TTBS con leche al 2% durante una hora a temperatura ambiente. Tras lavar las membranas 3 veces con TTBS, y una con TBS (TTBS sin Tween-20), las membranas se incubaron, según la proteína a detectar, con los reactivos de quimioluminiscencia *Super Signal West Dura* (Pierce), *Western Blotting Luminol Reagent* (Santa Cruz Biotechnology) e *Immobilon Western Chemiluminiscent HRP Substrate* (Merck Millipore; Darmstadt, Alemania), siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Finalmente, las membranas se expusieron a una película de auto-radiografía (*Super RX photographic film*; Fujifilm, Tokio, Japón) para detectar la señal.

Anticuerpo	Especie	Dilución (Aplicación)	Clon (Referencia)	Casa comercial
ATP-β	Ratón (monoclonal)	1/1.000 (WB)	Clon 3D5 (ab14730)	Abcam
Bcl-X	Conejo (policlonal)	1/1.000 (WB,ICQ)	(556361)	BD Biosciences
BrdU	Ratón (monoclonal)	1/50; 1/500 (CF,ICQ,IHQ)	B44 (347583)	BD Biosciences
Cdh1	Ratón (monoclonal)	1/20 (WB)	AR38	Dr. J. Gannon
Caspasa-3 activa	Conejo (monoclonal)	1/100 (CF)	C92-605 (560901)	BD Biosciences
Cdk1	Ratón (monoclonal)	1/1.000 (WB)	1 (610037)	BD Biosciences
Cdk2	Ratón (monoclonal)	1/1.000 (WB)	55 (610145)	BD Biosciences
Cdk4/6	Ratón (monoclonal)	1/250 (WB)	97 (610148)	BD Biosciences
Cdk5	Conejo (policlonal)	1/250 (WB)	C-8 (sc173)	Santa Cruz
Ciclina B1	Ratón (monoclonal)	1/250 (WB)	GNS-1 (554176)	BD Biosciences
Ciclina D1	Ratón (monoclonal)	1/500 (WB)	DCS-6 (556470)	BD Biosciences
Ciclina E	Ratón (monoclonal)	1/500 (WB)	HE12 (551160)	
Fosfoserina (Pser)	Ratón (monoclonal)	1/500 (WB)	7F12 (44911M)	Invitrogen

Fosforetinoblastoma (pRb)	Ratón (monoclonal)	1/1.000 (WB)	G3-245 (554136)	BD Biosciences
GAPDH	Ratón (monoclonal)	1/40.000 (WB)	6C5 (AM4300)	Ambion
Hsp60	Conejo (Policlonal)	1/1.000 (WB)	(ab46798)	Abcam
Ki67	Conejo (monoclonal)	1/500 (ICQ)	SP6 (RM9106)	Thermo Fisher
NDUFS1	Cabra (Policlonal)	1/1.000 (WB)	E-20 (sc50132)	Santa Cruz
p27	Ratón (monoclonal)	1/1.000 (WB)	G173-524 (554069)	BD Biosciences
PCNA	Ratón (monoclonal)	1/2.000 (WB)	24 (610664)	BD Biosciences
Porina (VDAC)	Conejo (Policlonal)	1/1.000 (WB)	Ab-5 (PC548)	Calbiochem
Tom20	Ratón (Monoclonal)	1/500 (WB)	(Ab56783)	Abcam

Tabla VI. Anticuerpos primarios. En esta tabla se muestran los anticuerpos primarios utilizados para los estudios de expresión proteica por transferencia de Western Blot (WB), citometría de flujo (CF), inmunocitoquímica (ICQ) e inmunohistoquímica (IHQ). Se especifican las diluciones utilizadas, el clon, la referencia y la casa comercial de cada anticuerpo.

Anticuerpo	Especie	Dilución (Aplicación)	Referencia	Casa comercial
Anti-IgG de cabra- HRP	Conejo (policlonal)	1/10.000 (WB)	sc-2768	Santa Cruz
Anti-IgG de conejo- Alexa 568	Cabra (policlonal)	1/500 (ICQ,IHQ)	A11011	Life Technologies
Anti-IgG de conejo- HRP	Cabra (policlonal)	1/10.000 (WB)	sc-2004	Santa Cruz
Anti-IgG de ratón- Cy2 IgG	Cabra (policlonal)	1/500 (ICQ,IHQ)	115-226-008	Jackson Immuno
Anti-IgG de ratón- HRP	Cabra (policlonal)	1/10.000 (WB)	sc-2302	Santa Cruz

Tabla VII. Anticuerpos secundarios. En esta tabla se muestran los anticuerpos secundarios utilizados para los estudios de expresión proteica por transferencia de Western Blot (WB), inmunocitoquímica (ICQ) e inmunohistoquímica (IHQ). Se especifican las diluciones utilizadas, la referencia y la casa comercial de cada anticuerpo.

8.5. “STRIPPING” DE MEMBRANAS DE NITROCELULOSA

En ocasiones, las membranas de nitrocelulosa de los Western Blot se reutilizaron y se incubaron de nuevo con un anticuerpo primario distinto al inicial. Para ello, fue necesario realizar *stripping* de las mismas, que consiste en incubar las membranas en un tampón compuesto por Tris-HCl 62,5 mM (pH 6,7), SDS al 2% (p/v) y β -mercaptoetanol 100 mM a 50°C durante 30 minutos. Posteriormente, se lavaron 3 veces con TTBS a temperatura ambiente y se volvió a bloquear la membrana con leche al 5% (p/v). A partir de este momento, la incubación de los anticuerpos y el revelado se realizó de igual manera a la mencionada en la sección anterior.

8.6. TINCIÓN DE GELES SDS-PAGE CON AZUL DE COOMASSIE

Los geles de poliacrilamida se tiñeron con solución de azul de Coomassie (azul de Coomassie al 0,1% [p/v], metanol al 50% [v/v] y ácido acético al 10% [v/v]), durante 15 minutos en agitación, a temperatura ambiente. A continuación, se destiñeron en una solución que contenía metanol al 20% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v) en agitación, cambiando periódicamente dicha solución. Esta técnica se realizó para comprobar el porcentaje de proteínas que se habían quedado en el gel y, por tanto, no se habían transferido a la membrana de nitrocelulosa.

8.7. CO- INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES

Los extractos proteicos (100 - 200 μg) obtenidos en tampón NP-40 (ver apartado 8.1.1.) se incubaron con 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del anticuerpo anti-Bcl-X a 4°C con agitación orbital, durante toda la noche. A continuación, se añadieron 30 μl de proteína A-sefarosa (0,12 g/ml; GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suecia) a cada muestra y se incubó durante 2 horas a 4°C. Las bolas de sefarosa, unidas a los inmunocomplejos, se centrifugaron durante 1 minuto a 4.000 r.p.m. y se lavaron 5 veces con 1 mL de tampón NP-40. Finalmente, los inmunoprecipitados se detectaron por análisis de Western Blot [Gómez-Sánchez, 2011].

9. OXIDACIÓN DE COMPLEJOS MITOCONDRIALES MEDIANTE ELECTROFORESIS NATIVA

9.1. AISLAMIENTO MITOCONDRIAL

Las células ($1-1,5 \times 10^6$) se lavaron con PBS frío y se recogieron por tripsinización. Posteriormente, se congelaron durante 24 horas a -80°C para incrementar la rotura celular y se homogeneizaron con un pistilo de teflón en un medio A, que contenía sacarosa 83 mM y MOPS 10 mM a pH 7,2. Tras añadir el mismo volumen de medio B, constituido por sacarosa 250 mM y MOPS 30 mM a pH 7,2, los núcleos y las células íntegras fueron retiradas mediante centrifugación a 1.000 x g, durante 5 minutos.

Tras repetir todos los pasos, se recogieron ambos sobrenadantes, se extrajeron las mitocondrias mediante centrifugación a 12.000 x *g*, durante 2 minutos, y se lavaron bajo las mismas condiciones con medio C, compuesto por sacarosa 320 mM, EDTA 1 mM y Tris-HCl 10 mM a un pH de 7,4. [Acín-Pérez, 2008].

9.2. ELECTROFORESIS NATIVA

Los extractos mitocondriales (0,5 mg de proteína) se trataron con N-etil maleimida (NEM; 50 mM, 10 minutos, 37 °C) (Sigma-Aldrich), que bloquea a los grupos tiol no oxidados y se lavaron con medio C en una centrifugación de 20.000 x *g*, durante 5 minutos. A continuación se trataron con ditioneitol (DTT; 2 mM, 10 minutos) (Sigma-Aldrich), potente reductor de grupos tioles, salvo de aquellos bloqueados por la NEM, y se lavaron en las mismas condiciones. Seguidamente, los extractos mitocondriales se trataron con Iodoacetil-LC-biotina (Thermo Fisher) 25 mM, durante 10 minutos en oscuridad. Este compuesto tiene afinidad por los grupos tioles reducidos y, por lo tanto, marcará aquellos que en el momento de recogida de muestra bajo nuestras condiciones de estudio se encontraban oxidados. Por último, los extractos se resuspendieron en medio D (ácido aminohexanoico 1 M, Bis-Tris-HCl 50 mM [pH 7,0]) y las membranas mitocondriales se solubilizaron mediante la adición de digitonina 1 (g/g) (Sigma-Aldrich), un detergente suave. Tras una incubación de 5 minutos en hielo, se procedió a una centrifugación de 13.000 x *g*, durante 30 minutos, y se recogió el sobrenadante que contenía los complejos mitocondriales de la cadena transportadora de electrones.

Se añadió a cada muestra una tercera parte de su volumen final del colorante *Serva Blue G* (Sigma-Aldrich) al 5% en ácido aminohexanoico 1 M y se separaron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida en gradiente del 3-12% (Novex, Life technologies) durante toda la noche a 30 V y a 4°C. La solución del ánodo estaba compuesta por Bis-Tris 50 mM a pH 7,0 y la solución del cátodo por tricina 50 mM y Bis-Tris 15 mM a pH 7,0.

El gel se tiñó con nitroazul de tetrazolio (NBT; Sigma-Aldrich) para detectar la actividad del Complejo I y marcar su situación. Dicha banda se retiró con la ayuda de un bisturí, desechando las bandas de los supercomplejos formados también por el complejo I (**Imagen VII**) y se incubó durante 5 minutos en Tris-HCl 125 mM, NEM 50 mM y SDS

1% antes de colocarse sobre un gel de poliacrilamida SDS-PAGE. Las proteínas se separaron utilizando un sistema de electroforesis vertical y tampón de electroforesis igual que se describe en el apartado 8.3.

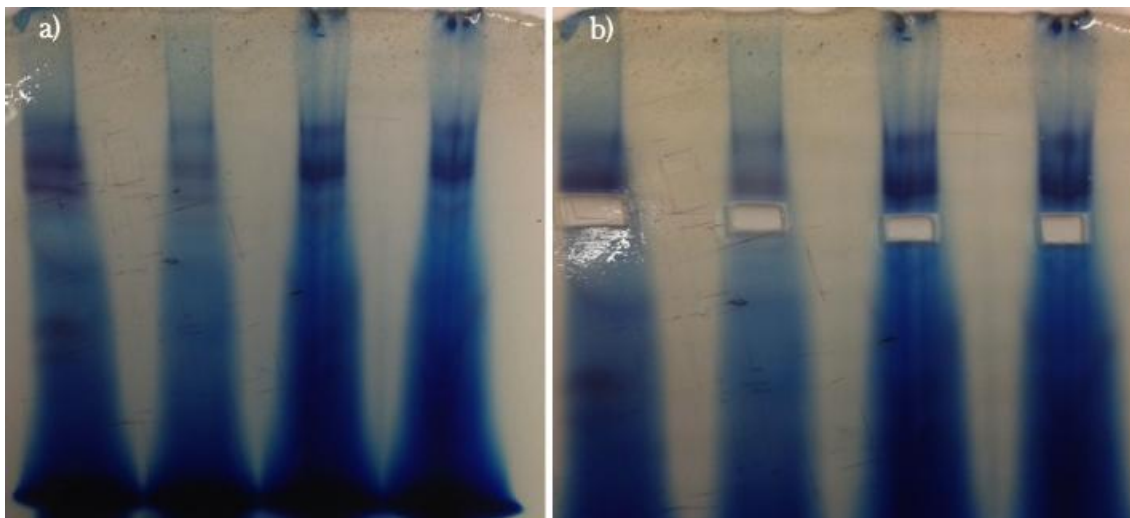


Imagen VII. Tinción con el test NBT. a) Las bandas moradas que aparecen en el gel marcan la actividad, y por tanto, la migración del complejo I, tanto en solitario como formando parte de supercomplejos. b) Cortamos con el bisturí la banda correspondiente a la migración del complejo I en solitario, atendiendo a la bibliografía.

9.3. INMUNODETECCIÓN

Las proteínas separadas en geles de SDS-PAGE se transfirieron electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa utilizando el sistema *Mini-Transblot* y tampón de transferencia, y éstas se bloquearon durante 1 hora con leche al 5% (p/v) en TTBS a temperatura ambiente. A continuación, para marcar las proteínas biotiniladas se incubaron durante 1 hora con estreptavidina conjugada con HRP (GE Healthcare) 1:1.000 en TTBS y, tras lavar las membranas 3 veces con TTBS y una con TBS, las membranas se incubaron con el reactivo de quimioluminiscencia *ECL 2* (Thermo Fisher), siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, las membranas se expusieron a una película de auto-radiografía para detectar la señal [Hurd, 2008].

10. INMUNOCITOQUÍMICA

Las células se sembraron sobre cubreobjetos de cristal esterilizados al fuego y tratados con una solución de poli-L-ornitina 15 µg/ml (Sigma-Aldrich) y fibronectina 1 µg/ml (Sigma-Aldrich), se lavaron con PBS, se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS durante 30 minutos y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,3% (v/v) en PBS durante 5 minutos. A continuación, se incubaron en la solución de bloqueo (Triton X-100 al 0,1% [v/v] y suero de cabra al 10% [v/v] en PBS) a temperatura ambiente, durante 30 minutos.

Para inmunodetectar Bcl-x, las células se incubaron en la solución de bloqueo que contenía el anticuerpo anti-Bcl-x (1/1.000, BD Biosciences) a 4°C, durante toda la noche. Posteriormente, se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG-Alexa 568 (Life Technologies) a temperatura ambiente durante 1 hora.

Para detectar la localización de la ciclina B1 en la mitocondria, las neuronas se co-transfectaron con el plásmido pcDNA3-myc-ciclina B1-GFP, que contiene la proteína GFP fusionada a la ciclina B1, y el plásmido pDsRed2-Mito (Clontech), que codifica la proteína roja (*discosoma sp. red fluorescent protein*) fusionada a la secuencia de anclaje mitocondrial de la subunidad VIII del citocromo c oxidasa.

A continuación, las células se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con DAPI (Sigma-Aldrich) 3,5 µM en PBS, a temperatura ambiente durante 10 minutos. Tras lavarlos dos veces con PBS y una vez con agua estéril, los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos utilizando el reactivo *SlowFadeGold* (Invitrogen). Finalmente, se tomaron microfotografías con un microscopio invertido de fluorescencia (Leica IM-50) acoplado a una cámara digital (Leica DC-100).

11. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS QUINASAS DEPENDIENTES DE CICLINA (CDKs)

Las quinasas Cdk1, Cdk2, Cdk4 y Cdk5 neuronales se aislaron mediante inmunoprecipitación, como se describe en el apartado 9.7. Tras lavar 5 veces con tampón de lisis NP-40, el inmunoprecipitado se resuspendió en 80 µl de dicho tampón.

A una cuarta parte del volúmen se le añadió tampón de carga y se utilizó como control de carga de su correspondiente Cdk.

El resto del inmunoprecipitado se lavó dos veces con tampón quinasa (Hepes 50 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM e inhibidores de proteasas y de fosfatasa, pH 7,5), y se resuspendió en tampón quinasa en presencia de ATP 20 μM, 2 μCi de [γ-³²P]-ATP y de histona H1 (1 mg/ml; Calbiochem) para los ensayos con Cdk1, Cdk2 y Cdk5 o de retinoblastoma (0,5 mg/ml; Upstate, Merck) que se utilizó como sustrato de la reacción para los ensayos con Cdk4. A continuación se incubaron a 30°C, durante 30 minutos en agitación (*Thermomixer*, Eppendorf).

La reacción se paró añadiendo tampón de carga e hirviendo las muestras a 95°C, durante 5 minutos. Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE (ver apartado 9.3) y, a continuación, el gel se tiñó con azul de Coomassie y se secó a 80°C, durante 2 horas con un secador de geles *Gel Dryer* (Bio-Rad, California, EEUU).

Finalmente, la incorporación de ³²P se visualizó mediante exposición a películas de autorradiografía (*BioMax XAR film*, Kodak, Nueva York, EEUU) o a una placa de fósforo estimulable (PSP), también conocida como placa de imagen (IP: *imaging plate*) o placa radioluminiscente (Fujifilm). Ésta se coloca sobre el gel durante 24 horas en oscuridad (en el interior de un *cassette*) para su posterior análisis en un escáner de alta definición *phosphorimager* (*Personal Molecular Imager System*, Bio-Rad), que produce una imagen digital que se analiza con el *software Gel Doc* (Bio-Rad).

12. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS COMPLEJOS DE LA CADENA TRANSPORTADORA DE ELECTRONES MITOCONDRIAL

Para la determinación de la actividad de los complejos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, las células, sembradas en placas de 60 cm² (Nunc, Thermo Fisher Scientific), se lavaron con PBS frío y se recolectaron suavemente por tripsinización. El sedimento celular se resuspendió en 0,2 ml de tampón fosfato potásico

0,1 M (pH 7,0) y se sometió a tres ciclos de congelación/descongelación en nitrógeno líquido, con el fin de romper las membranas celulares y mitocondriales. Las actividades enzimáticas se determinaron en el lisado celular por espectrofotometría, utilizando un espectrofotómetro *Uvikon* controlado por un ordenador con el programa informático adecuado.

La actividad del complejo I (NADH-Coenzima Q₁ reductasa) se determinó en 20-30 µg de proteína, registrando el cambio de absorbancia del NADH a 340 nm en un medio de reacción compuesto por KCN 100 mM (para inhibir la actividad del complejo IV), BSA 50 mg/ml, NADH 5 mM y coenzima Q₁, para comenzar la reacción, todo ello en tampón fosfato potásico 25 mM de pH 7,2. Para el cálculo de la actividad, la reacción se inhibía mediante la adición de rotenona 0,5 mM (Sigma-Aldrich), como se describe en Ragan [Ragan, 1987].

La actividad de los complejos II-III (succinato-citocromo c reductasa) se determinó en 15-25 µg de proteína, registrando el cambio de absorbancia producido por la reducción del citocromo c a 550 nm en un medio de reacción compuesto por KCN 100 mM, succinato 0,5 M para comenzar la reacción y citocromo c 10 mg/ml, todo ello en un tampón fosfato 166 mM de pH 7,4. Para calcular la actividad, esta reacción se inhibía mediante la adición de Antimicina A 1 mM (Sigma-Aldrich), como se describe en King [King, 1967].

La actividad del complejo IV (citocromo c oxidasa) se determinó en 5-10 µg de proteína, registrando el cambio de absorbancia producido por la oxidación del citocromo c a 550 nm, en un medio de reacción compuesto por tampón fosfato 0,1 M (pH 7,0), siguiendo el método de Wharton y Tzagoloff [Wharton y Tzagoloff, 1967]. Para esta determinación, el citocromo c se redujo previamente con ascorbato sódico, y éste se retiró de la solución de citocromo c reducido mediante una columna de *Sephadex G-25* (Amersham Biosciences Europe, Barcelona, España).

La actividad del complejo V (ATP-sintasa) se determinó en 15-25 µg de proteína, registrando el cambio de absorbancia del NADH a 340 nm en un medio de reacción compuesto por Tris-HCl 100 mM, fosfoenolpiruvato 100 mM, KCl 1 M, MgCl₂ 250

mM, KCN 100 mM, rotenona 1mM (para inhibir la actividad del complejo I), las enzimas lactato deshidrogenasa y piruvato kinasa, NADH 15 mM y ATP 300 mM para comenzar la reacción. Para calcular la actividad, esta reacción se inhibía mediante la adición de oligomicina 100 µg/ml, como se describe en Soper y Pedersen [Soper y Pedersen, 1979].

La actividad de la citrato sintasa, como medida representativa del contenido mitocondrial en muestras proteicas, se determinó en 5-10 µg de proteína, registrando el cambio de absorbancia del ácido 5-5'-ditio-bis 2-nitrobenzoico (DTNB) a 412 nm en un medio de reacción compuesto por Tris-HCl 100 mM, acetyl-CoA 0,1 mM, DTNB 0,2 mM, Triton X-100 al 0,1% (v/v) y oxaloacetato 0,2 mM según el método de Shepherd y Garland [Sheperd y Garland, 1966].

Las actividades enzimáticas se expresaron en nmol por minuto y por mg de proteína, excepto la actividad del complejo IV que se expresó como la constante de primer orden (k) por minuto y mg de proteína.

13. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ATP

Para la determinación de ATP, tras retirar el medio de cultivo en neuronas cultivadas en placas de 12 pocillos (Nunc), se añadió inmediatamente 1 ml de HClO₄ 0,3 M por pocillo. Los extractos se recogieron con un raspador y se neutralizaron con 0,6 ml de HKCO₃ 0,5 M.

La concentración de ATP se midió en células sembradas en placas de 4 cm², se recogieron muy rápidamente en 1 mL de HClO₄ 0,3 M. El extracto perclórico se neutralizó con 0,6 mL de HKCO₃ 0,5 M y se congeló el sobrenadante durante 1-2 días hasta su determinación.

La concentración de ATP se midió en los sobrenadantes por el método de la luciferina-luciferasa utilizando el kit de quimioluminiscencia *ATP Bioluminescent assay kit* (Sigma-Aldrich), siguiendo las instrucciones del fabricante. Así, el ATP en presencia

de luciferina es transformado en adenil-luciferina mediante una reacción catalizada por la luciferasa. La adenil-luciferina, en presencia de oxígeno se convierte en oxiluciferina, AMP y dióxido de carbono, emitiendo luz cuya intensidad es proporcional a la concentración de ATP (**Imagen VIII**). La intensidad de luz se midió mediante un contador de centelleo-luminómetro (Beckman Coulter, California, EEUU) y los valores de las muestras se extrapolaron a una recta patrón obtenida con soluciones estándar de ATP.

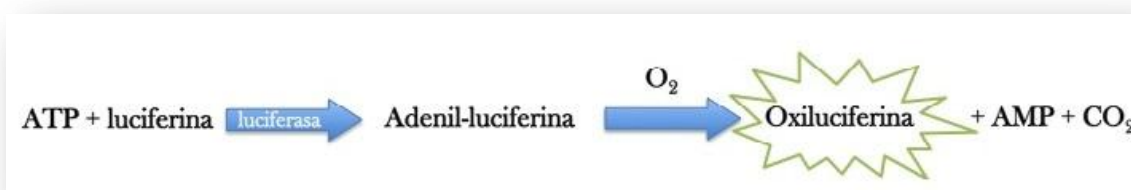


Imagen VIII. Determinación de la concentración de ATP. La adenil-luciferina formada a partir de ATP presente en la muestra y luciferina, en presencia de oxígeno forma oxiluciferina, que emite una luz detectable por un contador de centelleo-luminómetro y que es proporcional a la concentración de ATP.

14. DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE OXÍGENO

Las células ($2,5 \cdot 10^6$) se lavaron con PBS frío y se recogieron por tripsinización. De esta suspensión celular se tomó una alícuota de 10 μl que se mezcló con 40 μl de azul de tripano al 0,4% (v/v) y 30 μl de DMEM para el recuento total de células vivas, utilizándose una cámara cuenta glóbulos de Neubauer y un microscopio de contraste de fases. Posteriormente, las células se resuspendieron en la solución de respiración Hank's (Glucosa 20 mM y CaCl₂ 2 mM, pH 7,4) a 37°C y se calibró el electrodo de oxígeno del sistema de detección tipo Clark (Rank Brothers Ltd, Cambridge, Reino Unido) para realizar las mediciones. Se consideró como 100% el valor de solución de respiración saturada de aire y el 0% se calibró añadiendo ditionito sodico en la cámara del electrodo hasta que el registro generado en el *2210-Channel Recorder* (LKB, Bromma, Suecia) permaneciera estable.

La solución de respiración se introdujo en la cámara termostatazada a 37°C en contacto con el electrodo, se esperaron 2-3 minutos a que el registro generado fuera estable y se añadió la suspensión celular, valorando la pendiente de bajada del % de oxígeno en la cámara para calcular el consumo de oxígeno, que se expresó en nmol O₂ por min y por 10⁶ células.

15. OBTENCIÓN Y MANIPULACIÓN DEL RNA

15.1. EXTRACCIÓN DE RNA

La extracción de RNA se llevó a cabo con el kit comercial *GeneLute™ Mammalian Total RNA Kit* (Sigma-Aldrich).

Las neuronas a los 6 DIV se lisaron con una mezcla de β-mercaptoetanol:*Lysis Solution* en proporción 1:100 (v/v). Los lisados se filtraron con *GeneLute Filtration Column* para eliminar los restos celulares y desechar el DNA, haciéndolos pasar por una columna con filtro y centrifugándolos a 16.000 x *g*. Posteriormente, se añadió un volumen equivalente de etanol al 70% en agua DEPC (Di-etil-piro-carbonato) libre de RNasas y se vorteo hasta mezclar completamente. A continuación, se pasó la mezcla por *GeneLute Binding Column*, donde se adherió el RNA. Se eliminó el filtrado y nos quedamos con la columna que se lavó una vez con *Wash Solution 1*.

Una vez separado el RNA, se trató la columna con 100 U de DNAsa I (*DNase I, RNase-free*, Roche), durante 15 minutos a temperatura ambiente en un tampón compuesto por Tris-HCl 400 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 60 mM y CaCl₂ 10 mM; pH 7,9. Tras la incubación, para eliminar todos los restos de DNA y evitar la amplificación de DNA genómico, se lavaron las columnas tres veces, una con *Wash Solution 1* y otra con *Wash Solution 2 Concentrate/ethanol*, que nos permitió un secado completo de la columna. Finalmente, se eluyó en un eppendorf nuevo el contenido de la columna con 50 µl de *Elution Solution* mediante centrifugado a 16.000 x *g* durante 1 minuto.

El RNA purificado quedó en el filtrado y se midió la concentración con un espectrofotómetro *UV-Vis Nanodrop 2000* (Thermo Scientific). El ratio de absorbancia de 260 frente a 280 nm (A_{260}/A_{280}), que determina la pureza del RNA, fue de 1,8 - 2.

15.2. RETROTRANSCRIPCIÓN (RT)

La retrotranscripción del RNA se realizó mediante el uso de cebadores aleatorios (“random primers”) y oligo dT (DNA sintético de 15 nucleótidos con base timina complementario a la terminación poliadenilada presente en el mRNA).

Se incubó, en primer lugar, 1 µg de RNA total extraído junto con 0,5 µg de oligo dT en 10 µl de agua DEPC durante 10 minutos a 70°C. A continuación, se dejó 1 minuto en hielo y se incubó, en segundo lugar, con 1 µl de la transcriptasa reversa (*AMV Reverse Transcriptase* 40 U / µl, Promega), 2 µl del correspondiente tampón 10X (suplementado con MgCl₂ 25 mM), 1 µl de la mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs 10 Mm, Roche), y 1 µl de un inhibidor de RNasas, en un volumen final de 20 µl, durante 50 minutos a 48°C.

15.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) SEMICUANTITATIVA

Para las reacciones de PCR semicuantitativas se utilizó el kit comercial *AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, LD.* (Applied Biosystems). El producto de la retrotranscripción (cDNA 10-100 ng) se incubó en 50 µl de mezcla de reacción (*PCR Master MIX*) que contenía: 1,25 U de DNA polimerasa *Taq Gold*, dNTPs (dATP 200 mM, dCTP 200 mM, dGTP 200 mM y dTTP 200 mM), en un tampón *PCR Gold Buffer 10X* (Tris-HCL 150 mM, KCl 500 mM, pH 8,0). Posteriormente, se añadió 1 µl de los oligonucleótidos (Eurofins Biopharma, Barcelona, España) sentido y antisentido (*primers forward* y *reverse*) de cada uno de los genes de interés (ver **Tabla VIII**) a una concentración final de 1 µM.

Oligonucleótido	Secuencia 5' → 3'
Ciclina B1	F 5'-CAACTGGAGGAAGAGCAGTCA-3' R 5'-CATCTGAACCTGTATTAGCCA-3'
GAPDH	F 5'-GGGTGTGAACCACGAGAAAT-3' R 5'-GACTGTGGTCATGAGCCCTT-3'

Tabla VIII. Oligonucleótidos para RT-PCR semicuantitativa. Se muestran los genes analizados por RT-PCR y las secuencias de los oligonucleótidos diseñados para la especie de *Rattus norvegicus*.

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 10 minutos a 95°C, 28 o 35 ciclos de 15 segundos a 95°C (desnaturalización), 30 segundos a 55°C (anillamiento de oligonucleótidos) y 30 segundos a 72°C (elongación) y una extensión final durante 10 minutos a 72°C. En ningún caso se detectó banda por PCR en aquellas muestras sin transcriptasa reversa, utilizadas como controles negativos para corroborar que no teníamos contaminación de DNA genómico.

15.4. ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES HORIZONTALES DE AGAROSA

En primer lugar, se añadió a las muestras tampón de carga (azul de bromofenol al 0,25%, xileno cianol al 0,25% y ficol al 15%). La electroforesis se realizó en geles de agarosa inmersos en una solución TAE 1X (TAE 50X; Tris-acético 2 M, EDTA 0,05 M, acético glacial al 10%; pH 8,0), a voltaje constante de 90V durante 1 hora. Para calcular el tamaño de las bandas obtenidas, se incluyeron en los geles el marcador de peso molecular *DNA Weight Marker XIII (50 pb ladder, Roche)* cuyo patrón de bandas oscila de 50 a 2642 pb.

Para la realización de los geles se utilizó agarosa (*Seakem® LE Agarose, Lonza, Basilea, Suiza*) de baja electroendosmosis (menor número de grupos ácidos cargados a pH básico), para incrementar la movilidad electroforética del DNA, a una concentración variable 0,8 - 2% en función del tamaño de la banda de interés.

A los geles se les añadió *Midori Green DNA Stain* (Nippon Genetics Europe GmbH, Dueren, Alemania), que es una sonda fluorescente que se excita a $\lambda 350$ nm emitiendo luz verde a 540 nm cuando se intercala en la doble hebra del DNA. Para la visualización de las bandas se expuso el gel a un transiluminador de luz UV (Bio-Rad Laboratories) y, para el posterior análisis de las imágenes, se utilizó el sistema digital *Gel Doc* (Bio-Rad Laboratories).

16. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todas las determinaciones en células en cultivo fueron realizadas, al menos, por triplicado. Los valores se expresaron como medias \pm S.E.M. (error estándar de la media) en, al menos, tres experimentos independientes. La significatividad se determinó mediante análisis de la varianza (ANOVA), seguido del test de Bonferroni (para comparaciones múltiples) o el test de la *t de Student* (para comparaciones entre dos únicos grupos de valores). En todos los casos, un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

“Un experto es una persona que ha cometido todos los errores que se pueden cometer en un determinado campo.” (Niels Bohr)

1. La estimulación de los receptores de glutamato provoca la entrada aberrante de las neuronas en el ciclo celular y la acumulación de ciclina B1

Las neuronas son células que en su madurez no entran en mitosis para su división, como ya hemos descrito en el apartado 6 de la introducción. Una vez que se completa el ciclo, permanecen en un estado postmitótico, ya que no se preparan para volver a entrar en un nuevo ciclo [Yoshikawa, 2000].

En este sentido, nuestro grupo lleva años interesado en estudiar el papel que tiene el complejo APC/C-Cdh1 en las neuronas. Así, hemos descrito que su actividad es la responsable de la continua degradación de ciclina B1 y que este hecho constituye un mecanismo esencial de supervivencia neuronal [Almeida, 2005]. Posteriormente, hemos identificado que un estímulo excitotóxico inactiva el complejo APC/C-Cdh1, causando la acumulación aberrante de ciclina B1 y la muerte neuronal por apoptosis [Maestre, 2008].

Además, en los últimos años otros autores han demostrado que en algunas enfermedades neurodegenerativas como en el Alzheimer [Yang, 2003], en el ictus [Love, 2003] y en algunos modelos experimentales de isquemia cerebral [Wen, 2004; Rashidian, 2007] se ha descrito que se produce la acumulación de manera aberrante de ciclina B1. Esta acumulación de ciclina B1 hizo pensar que probablemente la maquinaria del ciclo celular permanecía intacta, lo que llamó la atención de nuestro grupo y decidimos estudiar el mecanismo por el cual se produce esta acumulación, ya que supone un potencial campo de actuación terapéutica.

Así, decidimos utilizar el modelo de excitotoxicidad por glutamato puesto a punto previamente en nuestro laboratorio [Maestre, 2008]; Ya que se desconocía si la acumulación de ciclina B1 observada era responsable directa de la apoptosis neuronal. En primer lugar, caracterizamos en profundidad nuestro modelo y establecimos las bases que íbamos a utilizar a lo largo de los experimentos a desarrollar en el presente trabajo. Como mencionamos en la Introducción (**Apartado 6.2; Esquema 12**), Cdk5 estaba implicada directamente en el proceso, por lo que decidimos hacer un estudio de su actividad en presencia de inhibidores de las Cdks tras un tratamiento de excitotoxicidad con glutamato. Como observamos en la **Figura 1**, el estímulo excitotóxico desencadena

un aumento de la actividad de Cdk5, que es revertido por el tratamiento con roscovitina y flavopiridol, dos inhibidores de Cdks, lo que nos confirma la implicación de esta quinasa en el proceso.

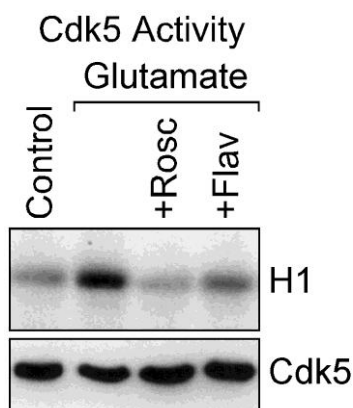
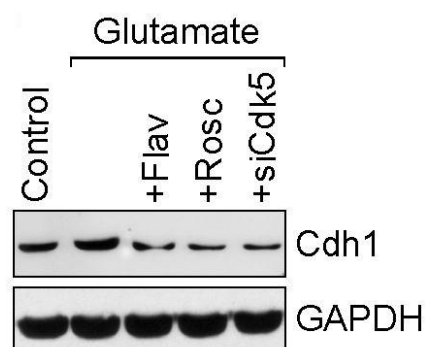


Figura 1. La estimulación de neuronas con glutamato aumenta la actividad de Cdk5. Determinación de la actividad quinasa de Cdk5 medida por su capacidad de fosforilación de la histona H1 tras estimulación con glutamato (100 μ M, 5 min) y tratamiento con los inhibidores de quinasas roscovitina (10 μ M) y flavopiridol (1 μ M) a un tiempo de 20 horas post-estimulación.

Una vez caracterizada la relevancia de Cdk5 en el proceso, quisimos estudiar su relación con Cdh1, activador de APC/C. Además, ya habíamos analizado previamente en nuestro grupo, que la estimulación de los receptores de glutamato produce la fosforilación de Cdh1 mediada por Cdk5 [Maestre, 2008], pero quisimos caracterizarla mejor inhibiendo únicamente la quinasa y poder establecer así una relación causa-efecto. Como se refleja en la **Figura 2**, tras la estimulación con glutamato, se produce un ligero cambio en la movilidad electroforética de Cdh1 y una pequeña acumulación que ya habíamos descrito, lo cual es revertido completamente por el tratamiento con los inhibidores de quinasas roscovitina y flavopiridol, así como con el siRNA de Cdk5, lo que pone de manifiesto la implicación directa de esta quinasa en el proceso.

Figura 2. Los cambios que se producen en Cdh1 tras un estímulo excitotóxico son responsabilidad de Cdk5. Análisis de transferencia tipo western de los niveles proteicos de Cdh1 tras 20 horas de post-estimulación con glutamato (100 μ M, 5 min) y tratamiento con los inhibidores de quinasas roscovitina (10 μ M) y flavopiridol (1 μ M), o transfección a los 4 DIV con siRNA de Cdk5 (100 nM).



Dado que el cambio de movilidad electroforética observado en Cdh1 hemos demostrado que es debido a su fosforilación, ya descrita anteriormente [Maestre, 2008], decidimos seguir estudiando la implicación de Cdk5 mediante la técnica de RNA de

interferencia. Para ello se realizó un ensayo de fosforilación tras la inmunoprecipitación de Cdh1 como se recoge en la **Figura 3**. Comprobamos como tras un estímulo excitotóxico se produce la fosforilación de Cdh1 a partir de 1 hora de post-estimulación. Este hecho es revertido por el silenciamiento de Cdk5, lo cual pone de manifiesto que esta fosforilación es responsabilidad de dicha quinasa, en consonancia con lo que previamente se había demostrado en nuestro grupo.

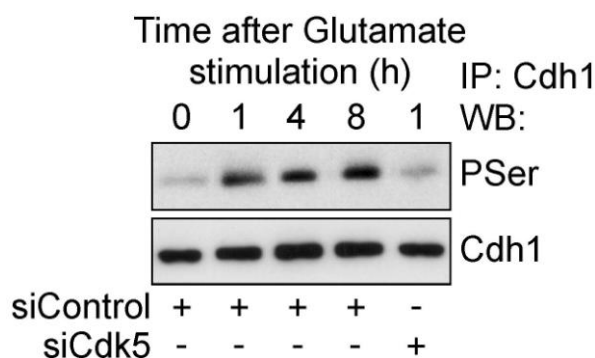


Figura 3. Cdk5 es la responsable de la fosforilación de Cdh1 tras el estímulo excitotóxico. Las neuronas fueron transfectadas a los 4 DIV con siRNA de Cdk5 (100 nM) y de luciferasa (Control; 100 nM) y tratadas o no (control) con glutamato (100 μ M, 5 min) con un tiempo de post-estimulación de 20 horas. Para el ensayo de fosforilación se obtuvieron los extractos celulares y se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-Cdh1, y se analizaron mediante transferencia tipo western los niveles proteicos de Cdh1 y P-Ser.

De acuerdo con estos resultados, la estimulación con glutamato promueve la fosforilación de Cdh1 mediada por Cdk5 a partir de 1 hora de post-estimulación. Por lo tanto, dada la estrecha relación existente con Cdh1 en la regulación del ciclo celular, quisimos determinar la implicación de este hallazgo en la actividad del complejo APC/C, como se ha mencionado anteriormente. En la **Figura 4** se recoge como tras el tratamiento de excitotoxicidad, se produce una inactivación del complejo APC/C tras 1 hora post-estimulación que es revertida por la transfección con el siRNA de Cdk5. En conjunto, estos resultados y los datos previos de nuestro grupo, muestran cómo la fosforilación de Cdh1 mediada por Cdk5 provoca la inactivación del complejo APC/C.

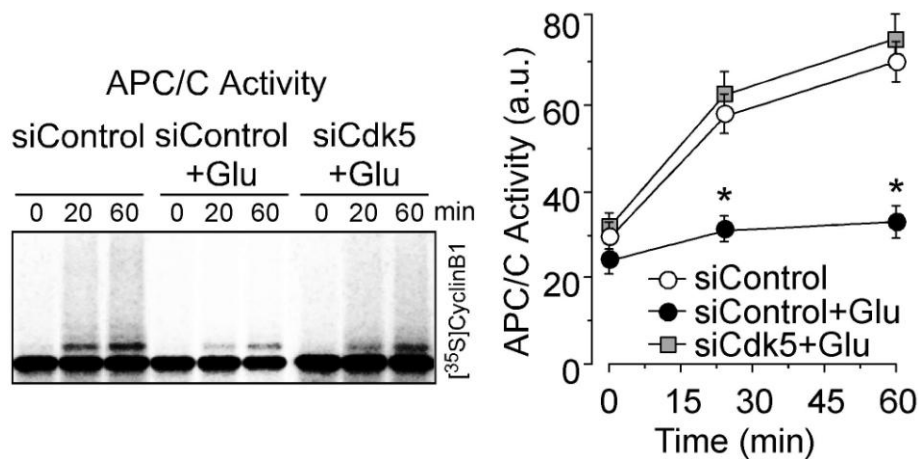


Figura 4. La estimulación de neuronas con glutamato inactiva el complejo APC/C mediado por Cdk5. Las neuronas fueron transfectadas a los 4 DIV con siRNA de Cdk5 (100 nM) y de luciferasa (Control; 100 nM) y tratadas o no (control) con glutamato (100 μ M, 5 min) con un tiempo de post-estimulación de 0, 20 y 60 minutos. Los datos son expresados como la media \pm S.E.M, * $p < 0,05$ vs control (test t-Student; $n = 3$ experimentos independientes).

Antes de comenzar a desentrañar el mecanismo que sigue a la acumulación de ciclina B1 en la neurona tras su estimulación con glutamato, quisimos estudiar si la acumulación de Cdh1 era únicamente responsabilidad de la inactivación del complejo APC/C-Cdh1 por la fosforilación de esta última. Para ello, se trataron las neuronas con el inhibidor de APC/C, conocido como proTAME (profármaco del TAME; tosyl-L-arg methyl ester) y con el inhibidor del proteasoma MG132. Como se observa en la **Figura 5**, los niveles de expresión de Cdh1 aumentan únicamente con la inhibición del APC/C, responsable de su ubiquitinación, así como con el inhibidor del proteasoma, responsable de su degradación.

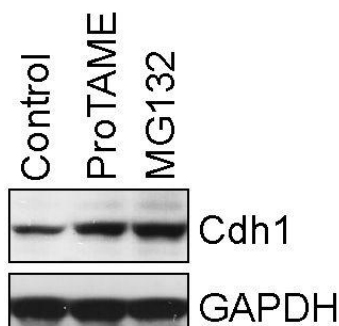


Figura 5. Los niveles de Cdh1 aumentan al inhibidor el complejo APC/C o el proteasoma. Análisis de transferencia tipo western de Cdh1, en neuronas tras un tratamiento con proTAME (10 μ M) y MG132 (10 μ M), durante 20 horas.

Puesto que el complejo APC/C-Cdh1 regula el ciclo celular, a la vista de los resultados obtenidos hasta el momento y la bibliografía previa, quisimos estudiar las alteraciones que sufría el ciclo celular en neuronas tras un estímulo excitotóxico. Así,

encaminamos a una neurona a realizar un ciclo celular para estudiar su comportamiento, desentrañar el desarrollo del ciclo celular hasta la apoptosis y determinar si ésta era causada por la acumulación de ciclina B1.

Al comienzo del ciclo celular, el complejo ciclina D/Cdk4 es el responsable de la fosforilación del retinoblastoma, que se inactiva, y es entonces cuando se libera el factor de transcripción E2F, que se activa e induce la síntesis de ciclina A, E y cdk2 para continuar con el ciclo celular. Como vemos en la **Figura 6**, al encaminar a una neurona a comenzar un ciclo celular, tiene lugar la fosforilación e inactivación de Cdh1 como se había descrito anteriormente en nuestro laboratorio. Observamos cómo se produce un aumento en la actividad Cdk4/6 a las 4 horas post-estimulación con glutamato, aunque no se aprecia un cambio de igual magnitud en su expresión proteica. Esto hace que se altere el ciclo neuronal, lo que promueve la muerte en vez de la diferenciación neuronal. Además, observamos un aumento en los niveles de expresión de ciclina D1 y una disminución en los de p27, que como recordamos es un inhibidor de kinasas de la familia CIP/KIP; lo que hace que disminuya la actividad Cdk4-6. Por ello, pensamos que la disminución de p27 podría ser consecuencia de la fosforilación por Cdk1. Finalmente, comprobamos a ese mismo tiempo cómo se producía la fosforilación del retinoblastoma. Todas estas modificaciones son compatibles con una activación funcional del complejo ciclina D/Cdk4-6 y la liberación del factor de transcripción E2F, y por lo tanto con una entrada de la neurona en ciclo celular.

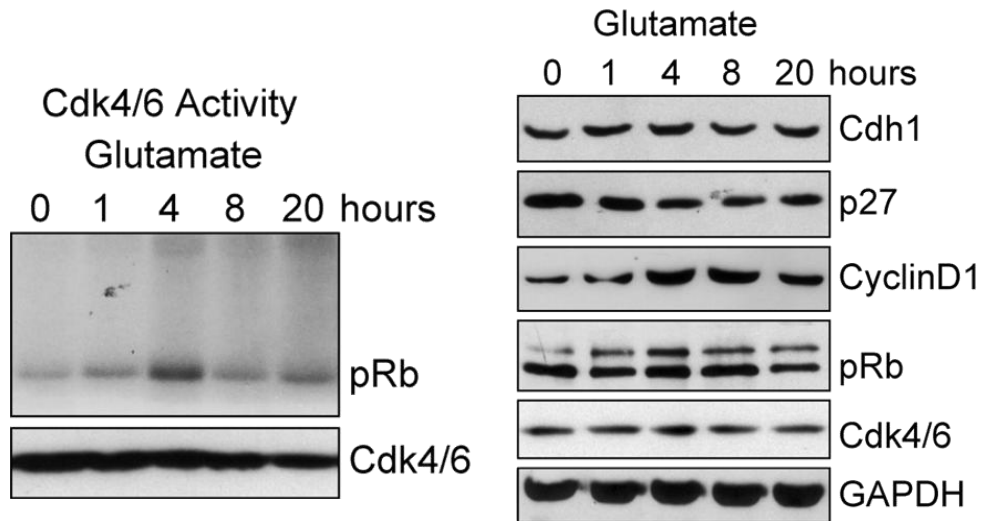


Figura 6. La estimulación de neuronas con glutamato provoca su entrada en ciclo. (A) Determinación en neuronas de la actividad quinasa de Cdk4/6 medida por su capacidad de fosforilación del retinoblastoma tras estimulación con glutamato (100 μ M, 5 min) a diferentes tiempos 0, 1, 4, 8 y 20 horas. **(B)** Análisis de transferencia tipo western de proteínas implicadas en la entrada del ciclo celular tras 0, 1, 2, 4, 8 y 20 horas de post-estimulación con glutamato (100 μ M, 5 min).

Para la continuidad del ciclo, las células deben atravesar el *checkpoint* G1/S, regulado por el complejo Cdk2/ciclina E. Por ello, nuestro siguiente paso fue determinar la actividad de este complejo y sus niveles de expresión proteicos con el mismo modelo de excitotoxicidad y tiempos de recogida de muestra mostrados previamente en la presente memoria. Como podemos ver en la **Figura 7**, existe un aumento en la actividad Cdk2 a las 4 horas que se mantiene hasta las 8 horas, aunque no se corresponde con un aumento en su expresión proteica. Sin embargo, sí que apreciamos un aumento en los niveles de ciclina E a los mismos tiempos post-estimulación. Estos resultados nos hacen pensar en una activación funcional del complejo Cdk2/ciclina E, compatible con una entrada del ciclo neuronal en fase S, atravesando el *checkpoint* G1/S.

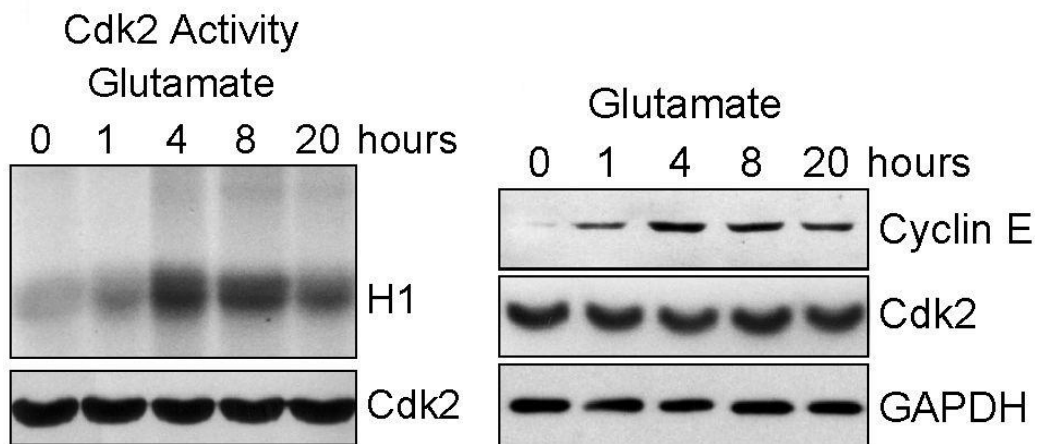


Figura 7. La estimulación de neuronas con glutamato consigue que las neuronas atraviesen el *checkpoint* G1/S. **(A)** Determinación en neuronas de la actividad quinasa de Cdk2, medida en su capacidad de fosforilación de la histona H1 a diferentes tiempos de post-estimulación con glutamato (100 μ M, 5 min). **(B)** Análisis de transferencia tipo western de las proteínas del complejo Cdk2/ciclina E, responsable del avance del ciclo hacia la fase S a los mismos tiempos de post-estimulación indicados con anterioridad.

Además, quisimos estudiar la implicación de Cdk5 en el avance del ciclo celular, para lo cual utilizamos los inhibidores de Cdks mencionados anteriormente: roscovitina y flavopiridol. Como podemos ver en la **Figura 8**, los inhibidores rescatan la disminución en los niveles de p27 y el aumento de ciclina D1, lo que nos indica que sin la presencia de la actividad quinasa no se estaría produciendo la entrada en ciclo que se observaba en la **Figura 6**. También apreciamos una disminución de los niveles de ciclina E con el tratamiento con los inhibidores, mostrando una vez más que tras un estímulo excitotóxico en ausencia de actividad Cdk5 no se puede encaminar a las neuronas a realizar un ciclo celular.

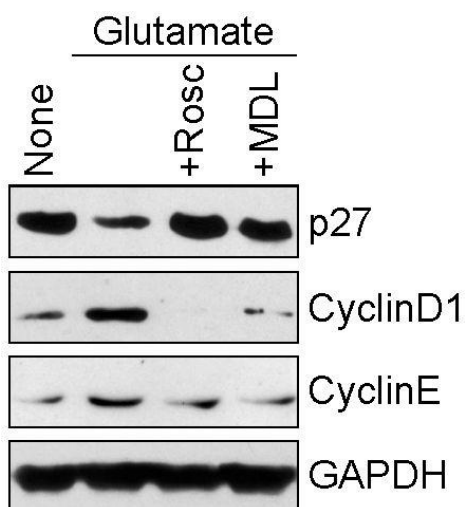


Figura 8. El avance del ciclo celular no se produce en presencia de inhibidores de Cdk5. Análisis de transferencia tipo western de los niveles proteicos de algunas proteínas implicadas en el ciclo celular tras 20 horas de post-estimulación con glutamato (100 μ M, 5 min) y tratamiento con los inhibidores de quinasas roscovitina (10 μ M) y flavopiridol (1 μ M).

Para corroborar el avance del ciclo celular, además de atravesar el checkpoint de entrada en fase S, utilizamos el ensayo de determinación de la bromo d-uridina (BrdU), que mide la incorporación del análogo de uridina al ADN y se utiliza para marcar células proliferativas, o en este caso, células que están atravesando la fase S o de síntesis. Como podemos observar en la **figura 9**, se produce una acumulación de BrdU significativa entre las 4 y 8 horas post-estimulación. Este resultado es compatible con una continuidad de la fase S en aquellas neuronas que habían sido encaminadas a realizar un ciclo celular.

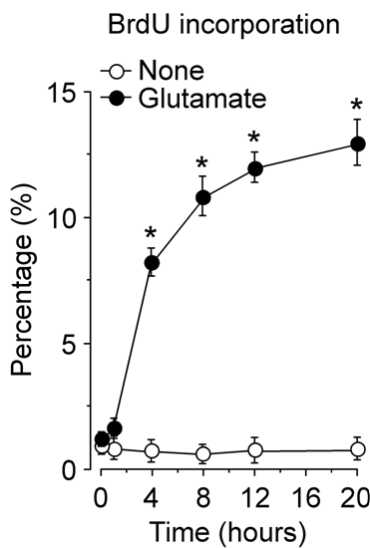
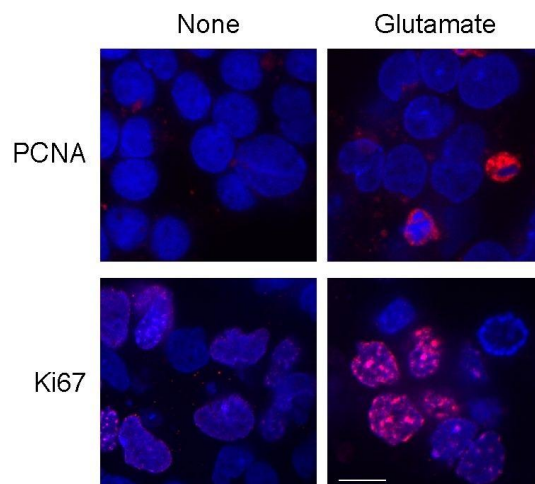


Figura 9. Las neuronas estimuladas con glutamato alcanzan la fase S, continuando el normal desarrollo del ciclo celular. Determinación de la incorporación de BrdU, método que mide de manera acumulativa el porcentaje de células que se encuentran en fase S, a diferentes tiempos de post-estimulación con glutamato (100 μ M, 5 min). Los datos son expresados como la media \pm S.E.M, * $p < 0,05$ vs control (test t-Student; $n=3$ experimentos independientes).

Para darle mayor validez a estos resultados desde otro enfoque, también quisimos comprobar que las neuronas se encontraban en la fase proliferativa mediante inmunocitoquímica con los marcadores de células proliferativas PCNA y Ki67. Como comprobamos en la **Figura 10**, tras el estímulo excitotóxico se produce un aumento en los niveles de ambos marcadores confirmando el avance del ciclo celular en las neuronas.

Figura 10. Las neuronas desarrollan un ciclo celular tras la estimulación con glutamato. Inmunocitoquímica de PCNA y Ki67 en neuronas tratadas o no (control) con glutamato (100 μ M, 5 min) con un tiempo de post-estimulación de 12-14 horas. La barra de escala corresponde a 10 μ m.



A la vista de los resultados anteriores, las neuronas que entraron en ciclo habían alcanzado la fase S y avanzaban con normalidad hacia la fase G2, llegando así al siguiente checkpoint G2/M que determina la entrada en mitosis y que se encuentra regulado por el complejo Cdk1-ciclina B1. Por los resultados previos de nuestro laboratorio, conocíamos que en este punto tenía lugar la acumulación de la ciclina B1 tras un estímulo excitotóxico [Maestre, 2008], pero quisimos igualmente confirmarlo para valorar la correcta utilización del modelo. Como se refleja en la **Figura 11**, observamos un aumento en la expresión de ciclina B1 a partir de las 8 horas que se hace más evidente a las 20 horas, aunque no tanto en los niveles de expresión proteica de Cdk1.

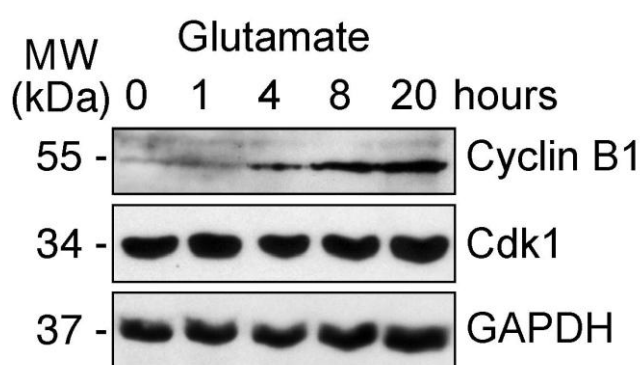


Figura 11. La estimulación con glutamato provoca un aumento en los niveles de la proteína ciclina B1. Análisis de transferencia tipo western de las proteínas del complejo Cdk1/ciclina B1, responsables de la regulación del checkpoint G2/M a los tiempos de post-estimulación con glutamato (100 μ M, 5 min) descritos anteriormente.

2. La inactivación del complejo APC/C-Cdh1 es el responsable de la acumulación de ciclina B1 en las neuronas corticales en cultivo primario

A continuación y según los resultados previamente descritos en el apartado anterior, lo primero que quisimos identificar era la causa del aumento en los niveles de expresión de ciclina B1 observados en las neuronas tras el estímulo excitotóxico. Para ello, como podemos ver en la **Figura 12**, realizamos una PCR semicuantitativa para comprobar que los niveles de ARNm permanecían inalterados tras los mismos tiempos de post-estimulación con glutamato. Además, se trataron las neuronas con cicloheximida y actinomicina D (inhibidor de la síntesis proteica y de la transcripción respectivamente) tras un tiempo de post-estimulación con glutamato de 20 horas, momento en el que la expresión proteica de la ciclina B1 era máxima, para confirmar que la acumulación de ciclina B1 no era debida a ninguna modificación postranscripcional, ni de síntesis, ni

afectaba a los niveles de ARNm de la proteína. Estos resultados nos indican que la estabilización de ciclina B1 es consecuencia de un mecanismo post-traduccional.

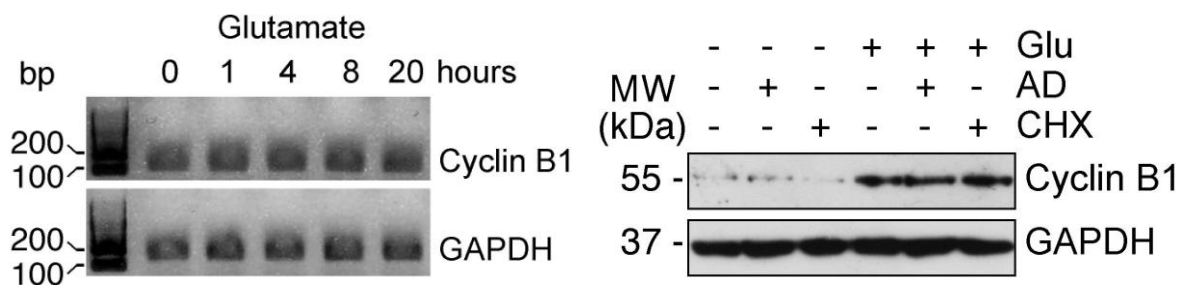


Figura 12. La acumulación de ciclina B1 no responde a variaciones en los niveles de ARNm de la proteína ni a modificaciones post-traduccionales ni post-transcripcionales. (A) La expresión del ARNm de ciclina B1 frente a un control de carga (GAPDH) a diferentes tiempos de post-estimulación con glutamato (100 μ M, 5 min) fue analizada en un gel de agarosa al 3% tras la realización de la RT-PCR. (B) Análisis proteico por transferencia tipo western de ciclina B1 en neuronas tratadas con Actinomicina D (100 μ M) o Cicloheximida (50 μ M) a 20 horas post-estimulación con glutamato (100 μ M, 5 min).

A la vista de estos resultados, y en base a resultados previamente obtenidos en nuestro grupo y descritos en la presente memoria, decidimos corroborar que el responsable directo de la acumulación de ciclina B1 era únicamente el complejo APC/C-Cdh1. Para ello, en primer lugar utilizamos el inhibidor de APC/C, proTAME, que previene la actividad de APC/C tanto por cdc20 como por Cdh1; y así, comprobar si este inhibidor era capaz de reproducir la acumulación de ciclina B1 observada en el modelo de excitotoxicidad descrito. Como podemos ver en la **Figura 13**, únicamente la inhibición de APC/C es necesaria para mimetizar el efecto del modelo excitotóxico.

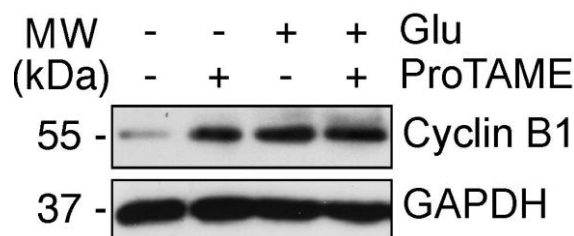


Figura 13. La inhibición del APC/C mimetiza el efecto del modelo de excitotoxicidad con glutamato. Análisis proteico por transferencia tipo western de ciclina B1 en neuronas, en presencia o ausencia del inhibidor de APC/C proTAME (10 μ M), a las 20 horas de post-estimulación con glutamato (100 μ M, 5 min).

Por otra parte, de acuerdo al hecho de que la inactivación del complejo APC/Cdh1 en el modelo excitotóxico requiere Cdk5 [Maestre, 2008], decidimos silenciar con la técnica de ARN de interferencia dicha proteína. Así, comprobamos que el silenciamiento génico de Cdk5 previno la acumulación de ciclina B1 como podemos observar en la **Figura 14**.

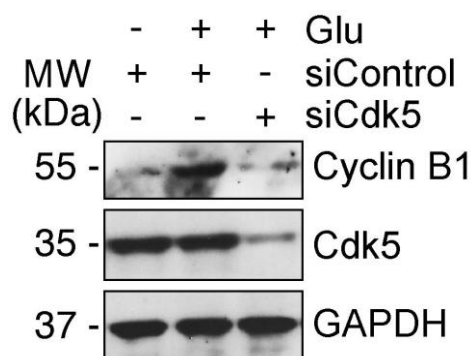


Figura 14. El silenciamiento de Cdk5 impide la acumulación de ciclina B1. Análisis proteico por transferencia tipo western de ciclina B1 y Cdk5 en neuronas transfectadas a los 4 DIV con siRNA de Cdk5 (100 nM) y de luciferasa (Control; 100 nM) y tratadas o no (control) con glutamato (100 μ M, 5 min) con un tiempo de post-estimulación de 20 horas.

Todos estos resultados en conjunto confirman nuestra teoría inicial, ya recogida por Maestre [Maestre, 2008] de que tras un estímulo excitotóxico, se activa Cdk5 y se produce la inhibición del complejo APC/C, provocando la acumulación de ciclina B1 sin que exista ningún otro mecanismo subyacente. A continuación, quisimos valorar si a pesar de esta acumulación aberrante el complejo ciclina B1/Cdk1 era funcional, por lo que nos propusimos determinar la actividad de la quinasa. Como se observa en la **Figura 15**, la actividad Cdk1 aumenta a las 8 horas y permanece elevada hasta las 20 horas post-estimulación con glutamato. Además, esta situación se revierte con el silenciamiento de Cdk5, confirmando así de nuevo su relevancia en este proceso.

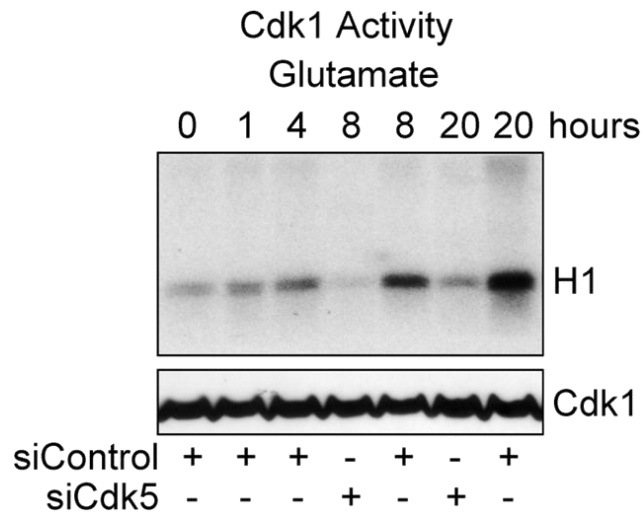


Figura 15. El complejo ciclina B1/Cdk1 es funcional pese a la acumulación aberrante de ciclina B1. Determinación de la actividad quinasa de Cdk1, medida en su capacidad de fosforilación de la histona H1 a diferentes tiempos de post-estimulación con glutamato (100 μ M, 5 min). Los siRNA de Cdk5 y luciferasa se utilizaron a una concentración de 100 nM y se transfectaron al 4 DIV.

Nuestro siguiente paso fue evaluar si el complejo ciclina B1/Cdk1 era el responsable de la muerte neuronal por apoptosis que seguía al estímulo excitotóxico. Para ello, utilizamos un *small hairpin* RNA (shCyclinB1) previamente probado en nuestro laboratorio [Almeida, 2005] o el inhibidor de quinasa denominado roscovitina. Como vemos en la **Figura 16**, ambos tratamientos atenuaron significativamente la muerte neuronal provocada por la estimulación con glutamato.

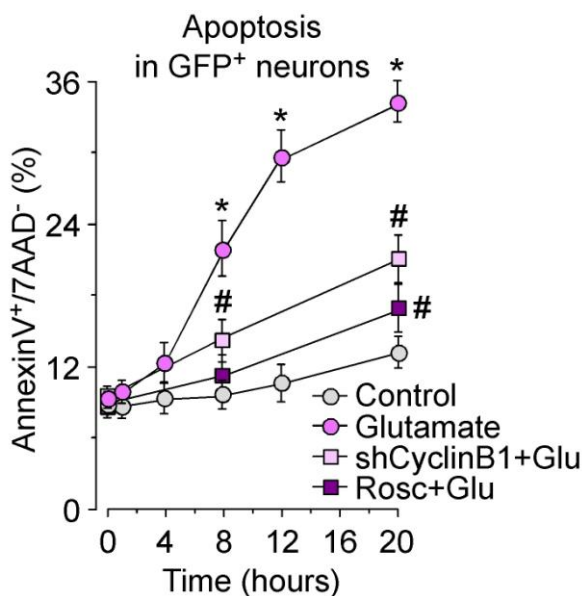


Figura 16. La apoptosis provocada por la estimulación con glutamato se previene inhibiendo Cdk1 o silenciando ciclina B1. Las neuronas se transfectaron con un shRNA contra la luciferasa (Control) o la CiclinaB1 al 4 DIV y durante 2 días. Posteriormente, se estimularon con glutamato (100 μ M, 5 min) o no (Control) y se recogieron a diferentes tiempos post-estimulación, añadiéndose roscovitina (10 μ M) a las que fuera necesario. Los datos son expresados como la media \pm S.E.M, * $p < 0,05$ vs control; # $p < 0,05$ vs glutamato (test t-Student; $n = 4$ experimentos independientes).

A continuación, además de utilizar un modelo endógeno de acumulación de ciclina B1 como es la excitotoxicidad por glutamato, decidimos evaluar también la apoptosis de manera exógena sobreexpresando la ciclina B1. Como observamos en la **Figura 17**, se produce igualmente un aumento de la apoptosis de manera tiempo-dependiente que alcanza valores significativos a partir de las 18 horas post-transfección.

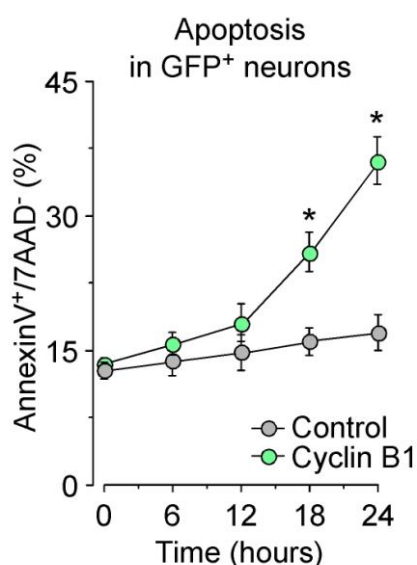


Figura 17. Determinación de la apoptosis utilizando un modelo exógeno de acumulación de ciclina B1. Las neuronas se transfectaron con $0,8 \mu\text{g}/10^6$ células del plásmido pIRES2-EGFP vacío (Control), o con el cDNA de la ciclina B1 humana (Cyclin B1) a diferentes tiempos entre 6 y 24 horas. Al contener ambos plásmidos la GFP, se puede hacer un seguimiento específico por citometría de las células transfectadas. Los datos son expresados como la media \pm S.E.M, * $p < 0,05$ vs control (test t-Student; $n=4$ experimentos independientes).

Seguidamente, además de determinar la apoptosis por citometría de flujo mediante la tinción con Annexina V y 7-AAD, decidimos aprovechar el marcaje con GFP que nos daba la expresión exógena de ciclina B1 para evaluar el porcentaje de neuronas GFP⁺ respecto al total. Además, la fluorescencia de la GFP nos permitió observar la conformación de las neuronas mediante un microscopio de epifluorescencia. Como vemos en la **Figura 18**, se produce una pérdida de neuronas GFP⁺ a partir de las 18 horas, compatible con los datos que nos arrojaba el ensayo de apoptosis. En la epifluorescencia, tras 24 horas de sobreexpresión se puede advertir una rotura en los axones característica de células apoptóticas en aquellas neuronas transfectadas con ciclina B1, pero no así en los controles.

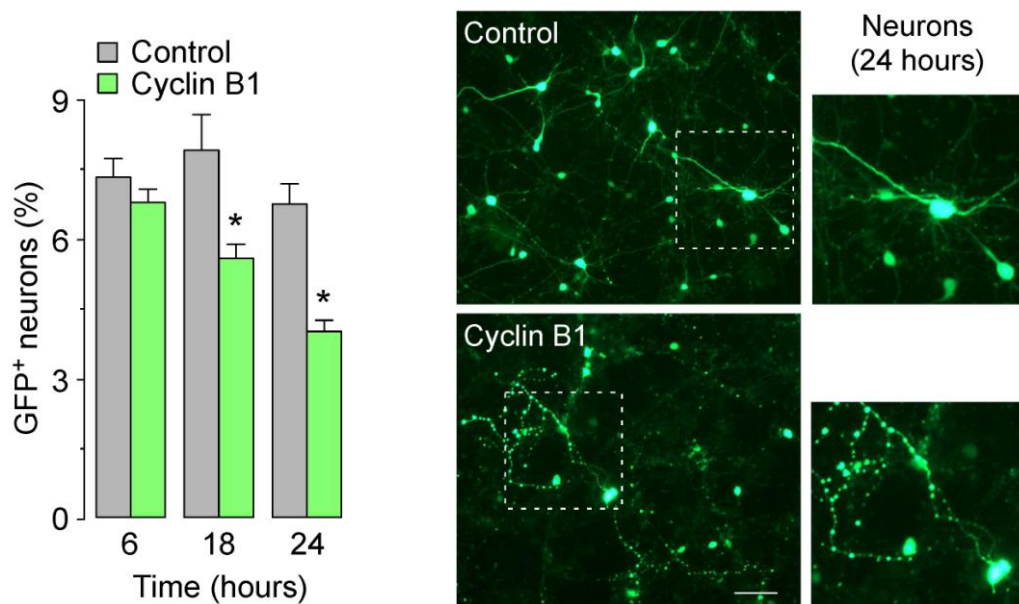


Figura 18. La sobreexpresión de ciclina B1 provoca un aumento en la apoptosis neuronal, significativo a partir de las 18 horas. **(A)** La tasa de transfección de neuronas GFP⁺, expresado como porcentaje, se determinó por citometría de flujo. Los datos son expresados como la media \pm S.E.M, * $p < 0,05$ vs control (test t-Student). **(B)** Las microfotografías de epifluorescencia tienen una barra de escala de 50 μ m.

A la vista de estos resultados, determinamos analizar cómo se encontraban las caspasas que intervenían en la apoptosis neuronal mediada por la sobreexpresión de ciclina B1. En primer lugar, se llevó a cabo un ensayo de caspasa 3 activa por citometría de flujo para confirmar de manera definitiva la apoptosis neuronal. Además, en paralelo, realizamos otro experimento que consistió en el uso de una batería de inhibidores de caspasas para determinar cuáles de ellas estaban implicadas en el proceso y poder establecer así la vía apoptótica que se encontraba activada. Como se advierte en la **Figura 19**, la apoptosis mediada por ciclina B1 se previene al tratar las neuronas con el inhibidor de Cdks roscovitina y con los inhibidores generales de caspasas (zVAD-fmk y zDEVD-fmk). De igual manera, se evita la apoptosis con el tratamiento con los inhibidores específicos de caspasa 3 (zDQMD-fmk) y caspasa 9 (zLEHD-fmk), pero no así con los inhibidores específicos de caspasa 2 (zVDVAD) o caspasa 8 (zIETD-fmk). Todos estos resultados en conjunto indican que el complejo Cdk1/ciclina B1 induce la apoptosis neuronal por la vía intrínseca o mitocondrial mediante la activación de las caspasas 3 y 9.

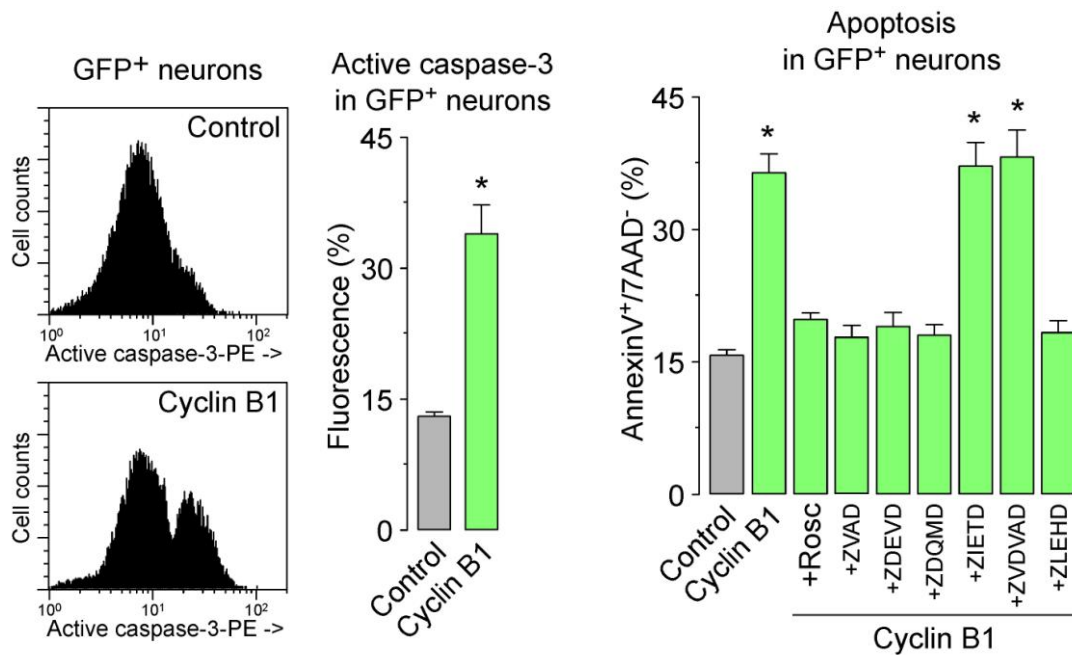


Figura 19. La expresión exógena de ciclina B1 provoca el aumento de la apoptosis neuronal por la vía intrínseca o mitocondrial. (A) Tras 24 horas post-transfección, la sobreexpresión de ciclina B1 provoca la escisión y activación de la caspasa 3, como se muestra por el análisis cuantitativo de neuronas GFP⁺ (transfectadas) por citometría de flujo. **(B)** Las neuronas fueron transfectadas con el plásmido de sobreexpresión de ciclina B1 y tratadas con roscovitina (10 μ M), el inhibidor de caspasa 9 (zLEHD-fmk; 50 μ M) o el resto de inhibidores de caspasas (100 μ M). Tras 24 horas de transfección se realizó el ensayo de apoptosis mediante citometría de flujo. Los datos son expresados como la media \pm S.E.M, * $p < 0,05$ vs control; (test t-Student; $n=4$ experimentos independientes).

Para concluir este apartado, parecía interesante determinar si aquellas neuronas que se encontraban en fase proliferativa, y por lo tanto acumulaban BrdU, eran las que posteriormente sufrían la muerte celular por apoptosis y presentaban altos niveles de caspasa 3 activa. Para ello, como observamos en la **Figura 20**, mediante citometría de flujo pudimos determinar que prácticamente el 90% de las neuronas son BrdU⁺ / caspasa 3⁺ tras la estimulación con glutamato. Esto confirma que aquellas neuronas a las que se encaminó a completar un ciclo celular con un estímulo excitotóxico son las que entran en apoptosis.

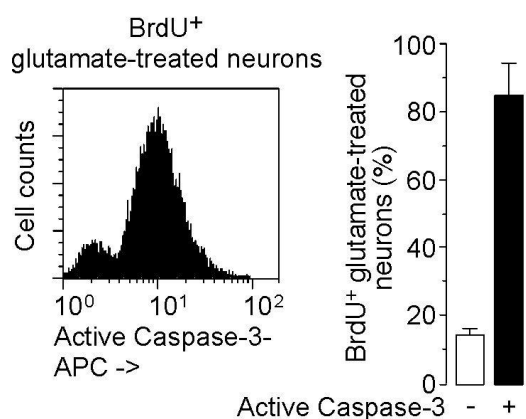


Figura 20. La muerte por apoptosis se produce en aquellas neuronas que entraron en ciclo tras el estímulo excitotóxico. Las neuronas fueron tratadas con glutamato (100 μ M, 5 min) con un tiempo de post-estimulación de 20 horas, y se determinó mediante citometría de flujo la acumulación de BrdU y la activación de la caspasa 3. Los datos son expresados como la media \pm S.E.M, * $p < 0,05$ vs caspasa 3; (test t-Student; $n=3$ experimentos independientes).

3. La estimulación de los receptores de glutamato produce la acumulación del complejo Cdk1/Ciclina B1 en la mitocondria provocando estrés oxidativo y deficiencia energética

Una vez observada la evidencia de que la mitocondria estaba implicada en la muerte celular por apoptosis mediada por la acumulación de ciclina B1, el siguiente paso que decidimos fue investigar si el complejo Cdk1/ciclina B1 aparecía en este orgánulo. Para ello, realizamos un estudio de fragmentación subcelular para poder determinar mediante transferencia tipo western el compartimento en el que se encontraban las proteínas de nuestro interés. Como podemos comprobar en la **Figura 21**, se produce una acumulación tanto de ciclina B1 endógena como de Cdk1 en la fracción mitocondrial purificada a partir de neuronas tras un estímulo excitotóxico.

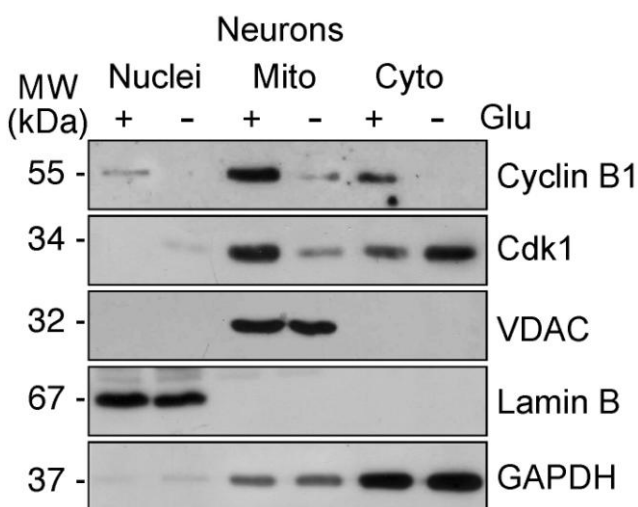


Figura 21. Las proteínas del complejo Cdk1/ciclina B1 se acumulan en la mitocondria tras un estímulo excitotóxico. Análisis proteico por transferencia tipo western de las proteínas del complejo Cdk1/ciclina B1, a 20 horas de post-estimulación con glutamato (100 μ M, 5 min) en los distintos extractos de los compartimentos celulares: núcleo (nuclei), mitocondria (mito) y citosol (cyto). Se utilizó VDAC como marcador de carga mitocondrial, Lamin B como marcador de carga nuclear y GAPDH como marcador de carga citosólica.

Seguidamente, quisimos corroborar este hecho utilizando la línea celular HEK-293T, para comprobar el resultado de la acumulación si el aumento en los niveles de ciclina B1 se producía de forma exógena con la transfección de un plásmido que codificara la ciclina B1 humana. Como se refleja en la **Figura 22**, obtuvimos una situación análoga en la que tanto la ciclina B1 como Cdk1 se acumulaban en el extracto mitocondrial purificado.

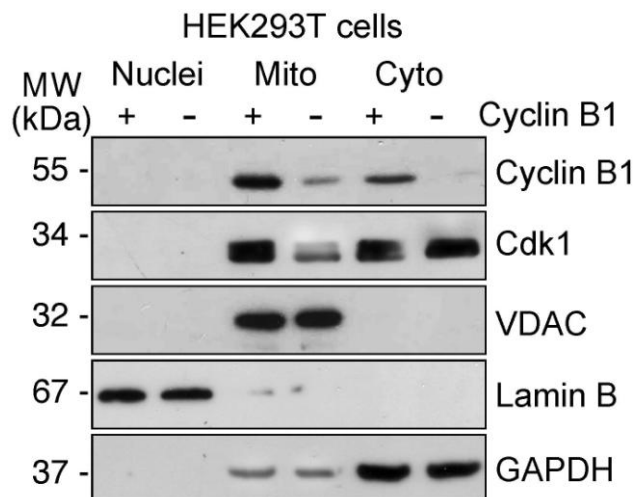


Figura 22. Las proteínas del complejo Cdk1/ciclina B1 se acumulan en la mitocondria tras la sobreexpresión de ciclina B1. Análisis proteico por transferencia tipo western de las proteínas del complejo Cdk1/ciclina B1, en células transfectadas durante 24 horas con $0,8 \mu\text{g}/10^6$ células del plásmido pIRES2-EGFP vacío (Control), o con el cDNA de la ciclina B1 humana (Cyclin B1). Se analizaron los mismos extractos y se utilizaron los mismos marcadores que en la **Figura 21**.

Con el fin de corroborar la aparición de la ciclina B1 en la mitocondria, decidimos utilizar un microscopio de fluorescencia tipo confocal para observar su localización. Las neuronas fueron cotransfectadas con mitoRed, un plásmido que marca con la proteína roja fluorescente únicamente la mitocondria, y con una construcción plasmídica que codificaba la ciclina B1 fusionada a la GFP, o el plásmido GFP vacío en el caso de los controles. Como se puede observar en las microfotografías de confocal de la **Figura 23**, la fluorescencia aportada por el mitoRed colocaliza con aquella emitida por la GFP en las neuronas transfectadas con la construcción que la contiene fusionada a la ciclina B1; pero no así en las neuronas transfectadas con el plásmido de GFP vacío (controles).

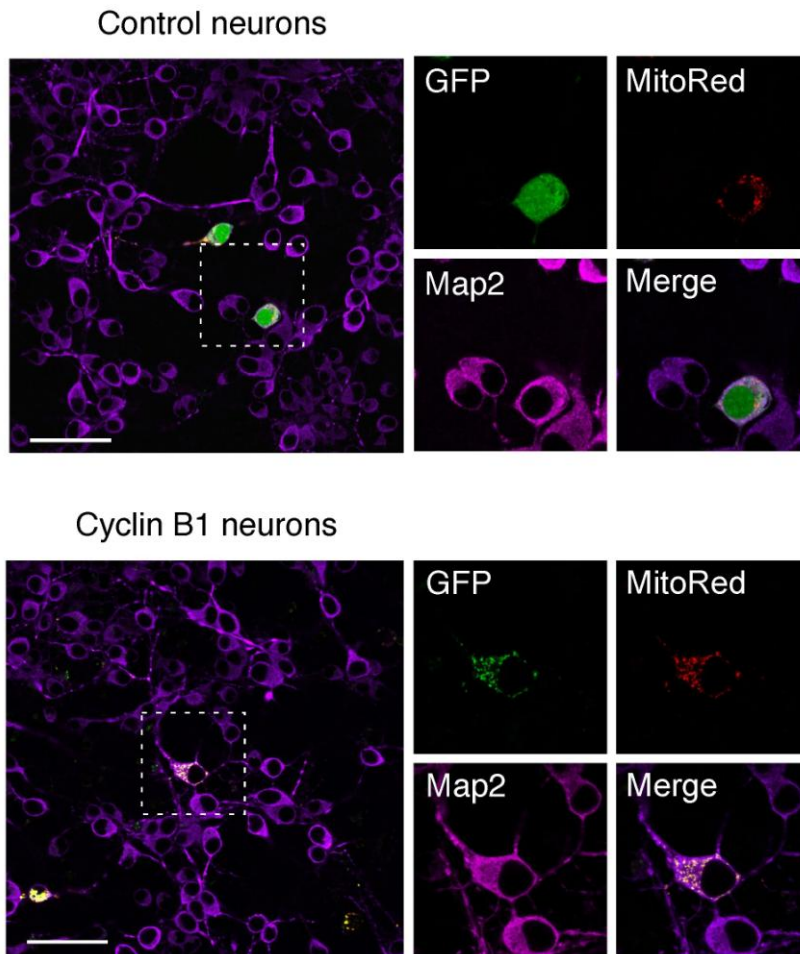


Figura 23. La ciclina B1 se localiza en la mitocondria tras un estímulo excitotóxico. Las neuronas se cotransfectaron con $0,8 \mu\text{g}/10^6$ células del plásmido pcDNA3-GFP (Control neurons) o pcDNA3-ciclina B1-GFP (GFP fusionada a la ciclina; Cyclin B1 neurons) y $0,8 \mu\text{g}/10^6$ células del plásmido marcador mitocondrial pMitoDsRed2 (MitoRed) durante 12-14 horas. Se utilizó Map2 como marcador neuronal (violeta), y la barra de escala corresponde a $50 \mu\text{m}$.

En este escenario, comprobamos que la acumulación de ciclina B1, tanto con la estimulación por glutamato como con la sobreexpresión exógena de la proteína, ocurre principalmente en la mitocondria. Estos resultados junto con la revisión bibliográfica realizada referente al hecho de que el estímulo excitotóxico mediado por glutamato incrementa la producción de anión superóxido (O_2^-) mitocondrial y las despolarización de la membrana interna mitocondrial, hizo que nos propusiéramos investigar la implicación que podría tener la ciclina B1 en estos procesos. Para ello, utilizamos el análisis de producción de especies reactivas de oxígeno que utiliza la sonda Mitosox y mediante citometría de flujo. Como se observa en la **Figura 24**, el anión superóxido mitocondrial se incrementa de manera tiempo-dependiente a partir de las 4 horas post-estimulación. Este efecto se previno en gran medida con el silenciamiento con el shCiclina B1 y con el inhibidor de Cdks roscovitina, lo que la implicación directa de la ciclina B1 en la producción de anión superóxido mediada por la estimulación con glutamato, aunque no parece ser la única vía.

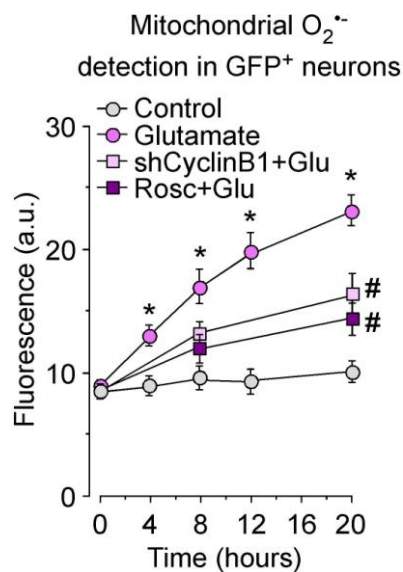


Figura 24. La producción de anión superóxido mitocondrial mediada por la estimulación con glutamato es fundamentalmente consecuencia de la acumulación de ciclina B1 en la mitocondria. Las neuronas, a los 4 DIV se transfectaron con el shRNA de luciferasa (Control) o de ciclina B1 (shCyclin B1) durante 2 días. Seguidamente, las neuronas se estimularon con glutamato (100 μ M, 5 min) y se incubaron a distintos tiempos de 4, 8, 12 y 20 horas. Se le añadió roscovitina (10 μ M) a la condición indicada. Los datos son expresados como la media \pm S.E.M, * $p < 0,05$ vs control; # $p < 0,05$ vs glutamato (test t-Student; $n=4$ experimentos independientes).

Como se apuntó anteriormente, y con objeto de aclarar si la acumulación de ciclina B1 influye en la función mitocondrial, analizamos el potencial de membrana mitocondrial mediante citometría de flujo. Como podemos ver en la **Figura 25**, tras estímulo excitotóxico se produce una despolarización de la membrana interna mitocondrial tiempo-dependiente que se previene con la transfección del shRNA de ciclina B1, y con el tratamiento con roscovitina, al igual que ocurría con la producción de radicales libres de oxígeno de la **Figura 24**. Estos resultados indicaban que el complejo Cdk1-ciclina B1 estaba participando directamente en la despolarización de la membrana causada por la estimulación con glutamato. Además, resultó muy interesante que tras incubación a las neuronas con glutatión etil-éster (GSH-EE), un *scavenger* de radicales libres, prácticamente se abolió en su totalidad el efecto del estímulo excitotóxico, sugiriendo que el incremento en la producción de radicales libres de oxígeno precede a la despolarización de la membrana mitocondrial.

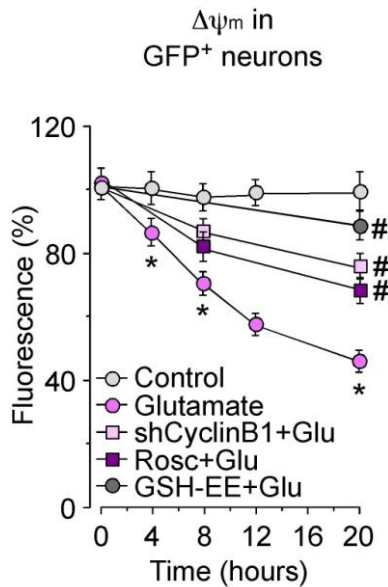


Figura 25. La despolarización de la membrana mitocondrial mediada por la estimulación con glutamato es fundamentalmente consecuencia de la acumulación de ciclina B1 en la mitocondria.

Las neuronas se transfectaron y estimularon igual que en la Figura 24. Se trataron con roscovitina (10 μM) o glutatión etil-éster (1 mM) a la condición correspondiente. Los datos son expresados como la media ±S.E.M, * p<0,05 vs control; # p<0,05 vs glutamato (test t-Student; n=4 experimentos independientes).

De igual manera, quisimos realizar estos mismos experimentos utilizando una acumulación de ciclina B1 exógena por sobreexpresión, en lugar de la endógena reflejada en las anteriores figuras que ocurría tras la estimulación con glutamato. Como se aprecia en la Figura 26, se mimetiza el efecto observado, con un incremento en la producción de anión superóxido tiempo-dependiente y una despolarización de la membrana. Ambos efectos fueron revertidos completamente con los tratamientos de roscovitina y glutatión etil-éster.

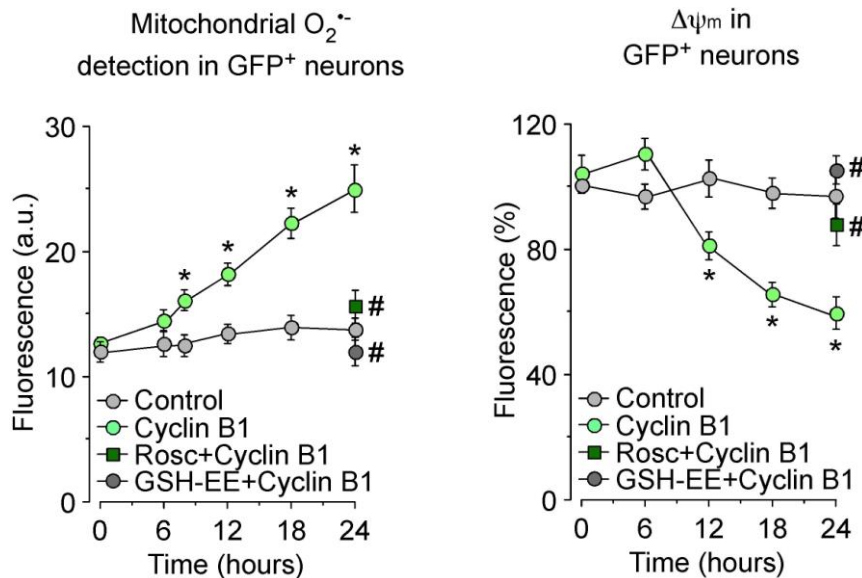


Figura 18. La producción de anión superóxido mitocondrial y la despolarización de la membrana mediada por sobreexpresión de ciclina B1 mimetiza a la observada por la estimulación con glutamato. Las neuronas se transfectaron con 0,8 μg/10⁶ células del plásmido pIRES2-EGFP vacío (Control), o con el cDNA de la ciclina B1 humana (Cyclin B1) a diferentes tiempos entre 4 y 24 horas. Se trataron con roscovitina (10 μM) o glutatión etil-éster(1 mM) a la condición correspondiente. Los datos son expresados como la media ±S.E.M, * p<0,05 vs control; # p<0,05 vs transfección (test t-Student; n=4 experimentos independientes).

En resumen, nuestro estudio realizado a diferentes tiempos pone de manifiesto que la despolarización de la membrana precede a la apoptosis neuronal como consecuencia del estímulo excitotóxico. Este aspecto indica que la disfunción mitocondrial es la causa, y no la consecuencia, del proceso apoptótico, confirmando así la importancia del mantenimiento del potencial de membrana para la supervivencia neuronal [White, 1996; Almeida, 2001].

A la vista de que la despolarización de la membrana mitocondrial está relacionada en la mayoría de los casos con una disminución en la producción de energía, decidimos determinar la concentración neuronal de ATP. En la **Figura 27** apreciamos que existe una disminución en el ATP neuronal, que se previene con el tratamiento de roscovitina. Este hecho pone de manifiesto la contribución de la actividad Cdk en el estado energético neuronal. Así, podemos concluir que la activación del complejo Cdk1-ciclina B1 mediada por la estimulación con glutamato induce la aparición de estrés oxidativo, que lleva a una disfunción mitocondrial y a una deficiencia energética.

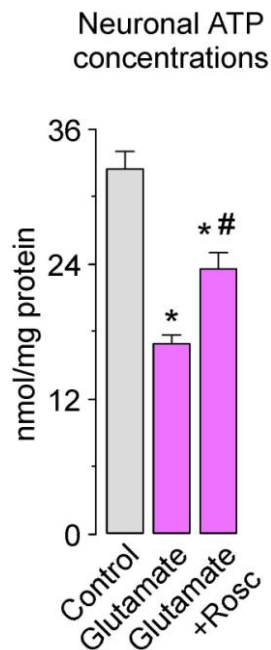


Figura 27. El complejo Cdk1-ciclina B1 está implicado en la deficiencia energética causada por la disfunción mitocondrial. Las neuronas se estimularon con glutamato (100 μ M, 5 min) al 6 DIV y se incubaron 24 horas post-estimulación. Se le añadió roscovitina (10 μ M) a la condición indicada. Los datos son expresados como la media \pm S.E.M, * $p < 0,05$ vs control; # $p < 0,05$ vs glutamato (test t-Student; n=4 experimentos independientes).

4. La activación del complejo Cdk1/Ciclina B1 inhibe la ATP sintasa provocando daño oxidativo al complejo I mitocondrial

Una vez puesta en escena la disfunción mitocondrial, nuestro siguiente paso fue dilucidar el mecanismo molecular que tenía lugar, del que el complejo Cdk1-ciclina B1 era responsable. Para hacerlo, decidimos analizar en primer lugar el estado funcional de la cadena transportadora de electrones mitocondrial en la línea celular HEK-293T, transfectadas con un plásmido para la sobreexpresión de ciclina B1. Como era de esperar, los niveles de proteína de ciclina B1 aumentaban de manera tiempo-dependiente tras la transfección, como vemos reflejado en la **Figura 28**.

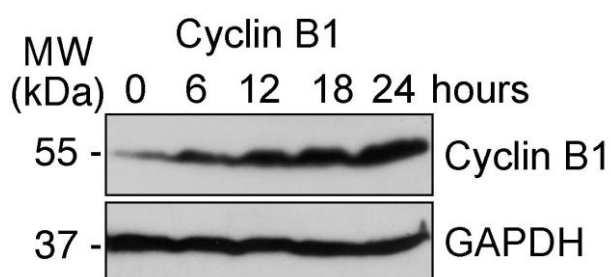


Figura 28. La transfección con ciclina B1 provoca un aumento en los niveles de la proteína tiempo-dependiente. Las células HEK-293T se transfectaron con $0,8 \mu\text{g}/10^6$ células del plásmido pIRES2-EGFP con el cDNA de la ciclina B1 humana (Cyclin B1). Análisis de transferencia tipo western para determinar los niveles de proteína ciclina B1 a diferentes tiempos 0, 6, 12, 18 y 24 horas, usando GAPDH como control de carga.

En la **Figura 29** se muestran las distintas actividades de los complejos de la cadena transportadora mitocondrial tras la sobreexpresión de ciclina B1. En el caso del complejo I, observamos una inhibición de la actividad tiempo-dependiente, al igual que ocurría con la actividad de la ATP sintasa o complejo V. Aún así, parecía muy interesante el hecho de que la inhibición de la ATP sintasa se produjera desde las 12 horas, mientras que la del complejo I comenzaba a apreciarse a las 18 horas. Tanto las actividades de los complejos II-III como del complejo IV permanecieron inalteradas, como podemos observar en la **Figura 29**, en las que se determinó la actividad a un tiempo final de 24 horas. Sin embargo, esto se produjo cuando las actividades de los otros complejos ya se encontraban fuertemente inhibidas.

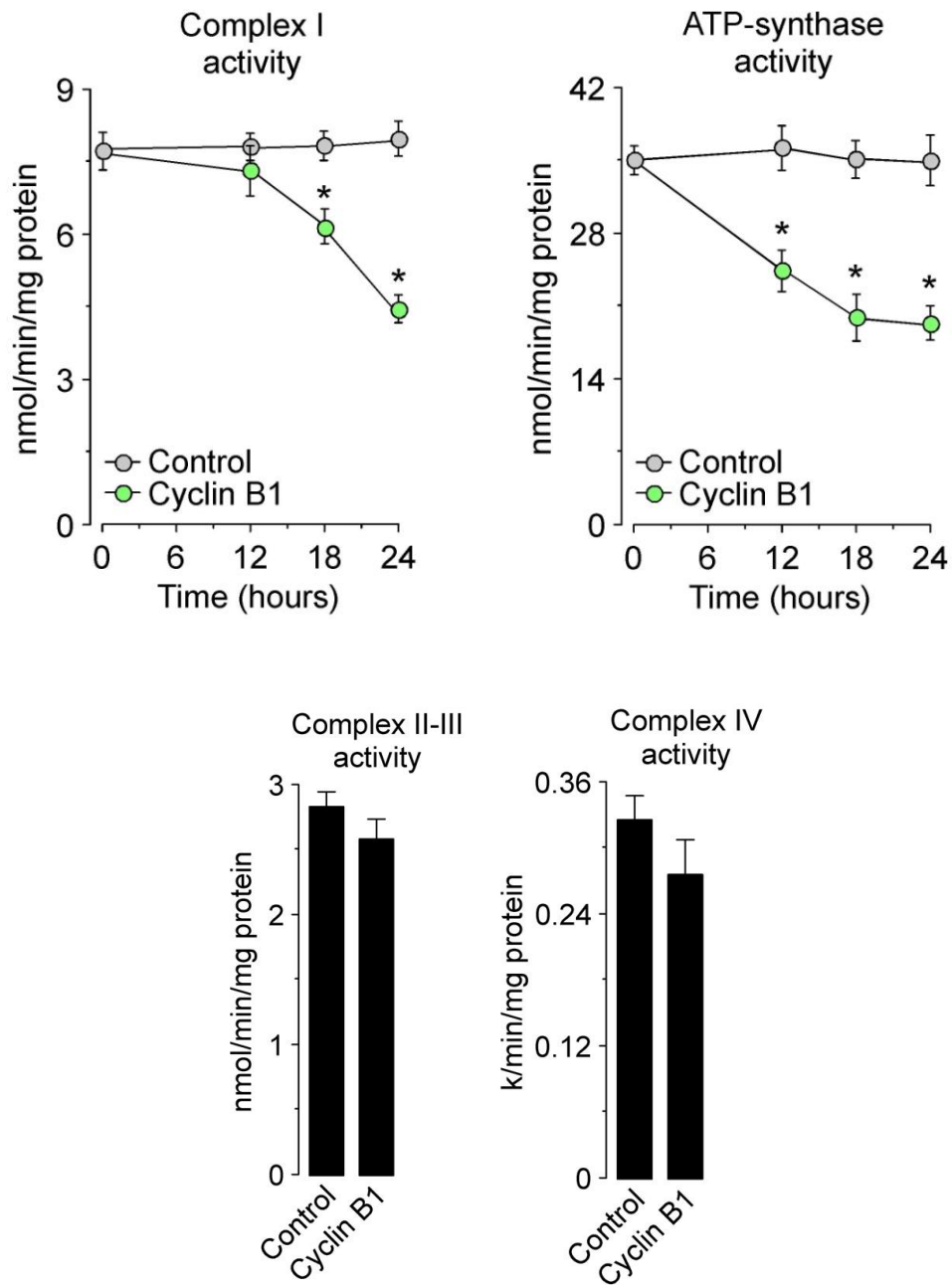


Figura 29. La inhibición en los complejos I y ATP sintasa de la cadena transportadora de electrones mitocondrial frente a la sobreexpresión de ciclina B1, se produce de manera tiempo-dependiente. Las células HEK-293T se transfectaron como en la **Figura 28**. Las actividades del complejo I y ATP sintasa se midieron mediante espectrofotometría a diferentes tiempos post-transfección 0, 12, 18 y 24 horas. Las actividades de los complejos II-III y complejo IV se determinaron mediante espectrofotometría a un único tiempo post-transfección de 24 horas. Los datos son expresados como la media \pm S.E.M, * $p < 0,05$ vs control; (test t-Student; $n=4$ experimentos independientes).

La inhibición observada en la actividad del complejo I que provoca la ciclina B1, comprobamos si existía alguna descompensación en la respiración mitocondrial, y para ello, decidimos observar si el consumo de oxígeno se encontraba afectado. Como se aprecia en la **Figura 30**, la tasa de consumo de oxígeno presenta dos fases tras la sobreexpresión de ciclina B1: en primer lugar aparece un incremento de consumo a las 12 horas, y posteriormente la tasa del consumo de oxígeno se encuentra disminuida a las 24 horas. Este hecho resultaba muy interesante, ya que como recordamos, a las 12 horas cuando el consumo de oxígeno aumenta, la actividad de la ATP sintasa se encuentra disminuída, pero no así la actividad del complejo I. Por lo tanto, decidimos seguir estudiando este efecto en profundidad y desentrañar el mecanismo responsable.

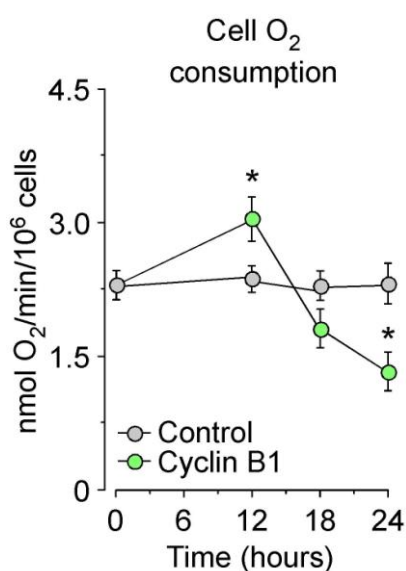


Figura 30. La tasa de consumo de oxígeno tras la transfección con el plásmido de sobreexpresión de ciclina B1 aumenta en primera instancia mientras la ATP sintasa se encuentra inhibida, para luego decaer. Las células HEK-293T se transfectaron como en la **Figura 28**, se resuspendieron en buffer Hank's y se midió la tasa de consumo de oxígeno con un electrodo tipo Clark de oxígeno disuelto a diferentes tiempos de 0, 12, 18 y 24 horas. Los datos son expresados como la media \pm S.E.M, * $p < 0,05$ vs control; (test t-Student; $n=3$ experimentos independientes).

Dado que se conoce que la inhibición de la ATP sintasa induce una hiperpolarización de la membrana interna mitocondrial de manera transitoria [Brand, 2004; Sánchez-Cenizo 2010; Formentini, 2014], quisimos comprobar cuál era la evolución del potencial de membrana a lo largo del tiempo de post-transfección con el plásmido de sobreexpresión de ciclina B1.

Como podemos comprobar en la **Figura 31**, la membrana se encontraba hiperpolarizada a las 12 horas, seguida de una despolarización que se hacía evidente a las 24 horas tras la sobreexpresión de ciclina B1. Con estos datos, estábamos en condiciones de sugerir que la ciclina B1 inhibe en primera instancia a la ATP sintasa, provocando un aumento del consumo de oxígeno, una hiperpolarización de la membrana mitocondrial y un aumento en la producción de anión superóxido, lo cual encamina a provocar un daño en el complejo I. De hecho, ya otros autores han descrito cómo la hiperpolarización de la membrana mitocondrial incrementa la producción de anión superóxido [Brand, 2004; Sánchez-Cenizo 2010; Formentini, 2014], asimismo nosotros ya comprobamos en neuronas que la sobreexpresión de ciclina B1 producía una ligera hiperpolarización y un aumento en la producción de anión superóxido, aunque la primera no llegaba a ser significativa (**Figura 26**).

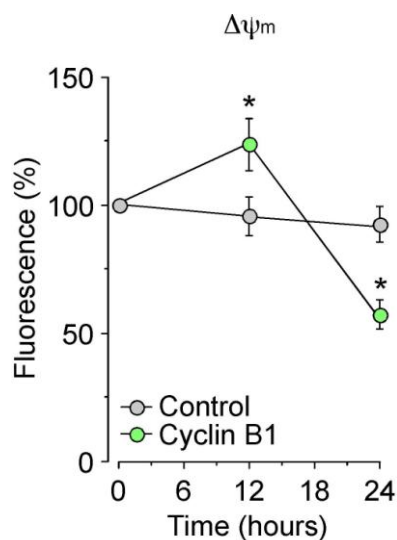


Figura 31. La membrana mitocondrial se hiperpolariza en un primer momento antes de despolarizarse tras la sobreexpresión con ciclina B1. Las células HEK-293T se transfectaron como en la **Figura 28** y se determinó el potencial de membrana mediante citometría de flujo a las 0, 12 y 24 horas post-transfección. Los datos son expresados como la media \pm S.E.M, * $p < 0,05$ vs control; (test t-Student; $n = 3$ experimentos independientes).

Para corroborar nuestra hipótesis de que la inhibición de la ATP sintasa tiene lugar en un primer momento y es la causante de la pérdida de actividad del complejo I, decidimos mimetizar los efectos de la inhibición de la ATP sintasa farmacológicamente, mediante el tratamiento de las neuronas con oligomicina, y determinamos nuevamente los parámetros medidos anteriormente. Como se aprecia en la **Figura 32**, el tratamiento con oligomicina provocó una rápida hiperpolarización de la membrana a los 30 min,

seguida de una despolarización más tardía a las 6 horas, lo cual es totalmente compatible con los resultados arrojados en la **Figura 26** y **Figura 31**. Además, la producción de anión superóxido se ve incrementada ya desde los 30 min post-tratamiento con oligomicina, resultado también acorde con los experimentos mostrados en la **Figura 26**.

Por otra parte, ya que se ha descrito que la producción de anión superóxido mitocondrial causa principalmente daño oxidativo en el complejo I [Bolaños, 2009], decidimos determinar esta posibilidad en nuestro modelo. Como podemos observar en la **Figura 32**, tras 2 horas post-estimulación con oligomicina la actividad del complejo I permanece inalterada, pero ya se encuentra inhibida a las 6 horas coincidiendo con los resultados obtenidos de despolarización de la membrana mitocondrial.

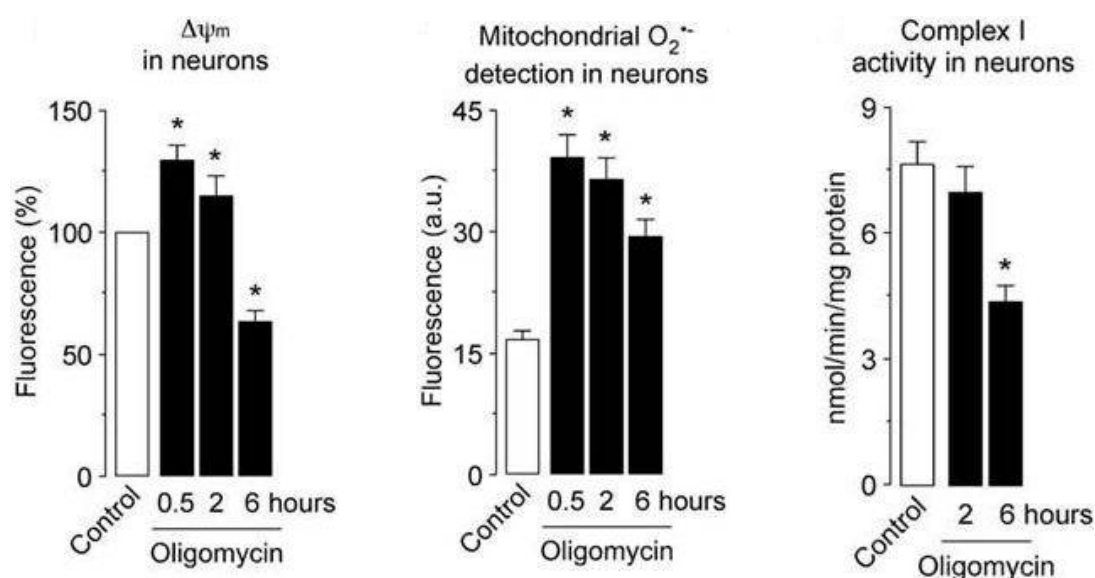


Figura 32. El tratamiento con el inhibidor de la ATP sintasa oligomicina mimetiza los efectos que el complejo Cdk1-ciclina B1 provoca en el potencial de membrana, la producción de anión superóxido y la actividad del complejo I. Las neuronas se trataron con oligomicina (6 μ M) a los 6 DIV durante unos tiempos de 0,5, 2 y 6 horas. Tanto la determinación del potencial de membrana como la producción de anión superóxido se realizaron mediante citometría de flujo, mientras que la determinación de la actividad del complejo I se realizó mediante espectrofotometría. Los datos son expresados como la media \pm S.E.M, * $p < 0,05$ vs control; (test t-Student; $n=3$ experimentos independientes).

Dado que estos datos sugieren que la actividad del complejo Cdk1-ciclina B1 provoca un daño oxidativo al complejo I, quisimos estudiar más acerca de este hecho. Para ello, utilizamos una técnica de análisis de transferencia de tipo western en

condiciones nativas que puso de manifiesto la oxidación, a partir de subunidades del complejo I aisladas y marcadas con biotina-NEM.

Como observamos en la **Figura 33**, la acumulación de ciclina B1 produce un aumento de la oxidación de distintas subunidades del complejo I, siendo la más evidente la NDUFS1 que utilizamos como control de carga y que es una de las subunidades esenciales del complejo I para que este desarrolle su actividad. Esta oxidación se previene bajo tratamiento con GSH-EE y roscovitina. Igualmente, apreciamos como el simple tratamiento con oligomicina mimetiza el efecto de la ciclina B1 provocando la oxidación en dicha subunidad.

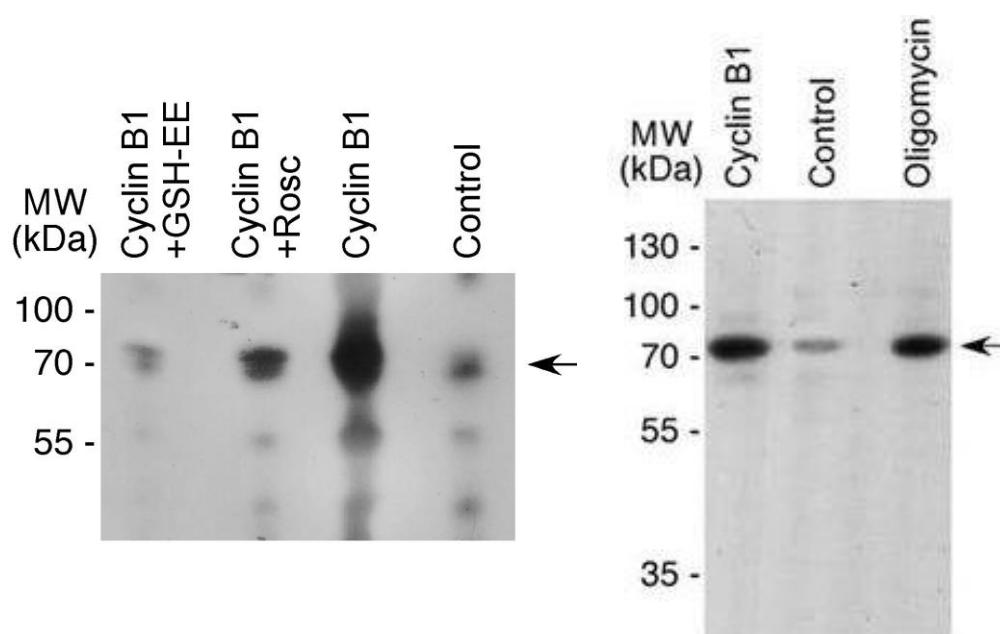


Figura 33. El complejo Cdk1-ciclina B1 provoca la oxidación de una subunidad esencial para el desarrollo de la actividad del complejo I. Las células HEK-293T se transfectaron con $0,8 \mu\text{g}/10^6$ células del plásmido pIRES2-EGFP con el cDNA de la ciclina B1 humana (Cyclin B1) con la presencia o no según el caso, de roscovitina ($10 \mu\text{M}$), GSH-EE (1mM) u oligomicina ($6 \mu\text{M}$) durante 24 horas.

A la luz de estos resultados, nuestro siguiente objetivo fue dilucidar la implicación del complejo Cdk1-ciclina B1 en el proceso. Así, determinamos las actividades del complejo I y de la ATP sintasa de la cadena transportadora mitocondrial. Como vemos en la **Figura 34**, la inhibición causada por ciclina B1 en el complejo I es revertida por los tratamientos con roscovitina y GSH-EE, lo que sugiere poderosamente un daño oxidativo del complejo I producido por el complejo Cdk1-ciclina B1. Sin embargo, la actividad de

la ATP sintasa inhibida por la acumulación de ciclina B1 es restablecida bajo el tratamiento con roscovitina, pero no así con el GSH-EE, sugiriendo que la implicación del complejo Cdk1-ciclina B1 con la inhibición de la ATP sintasa no sigue mecanismos oxidativos en contraposición a lo que ocurría con el complejo I.

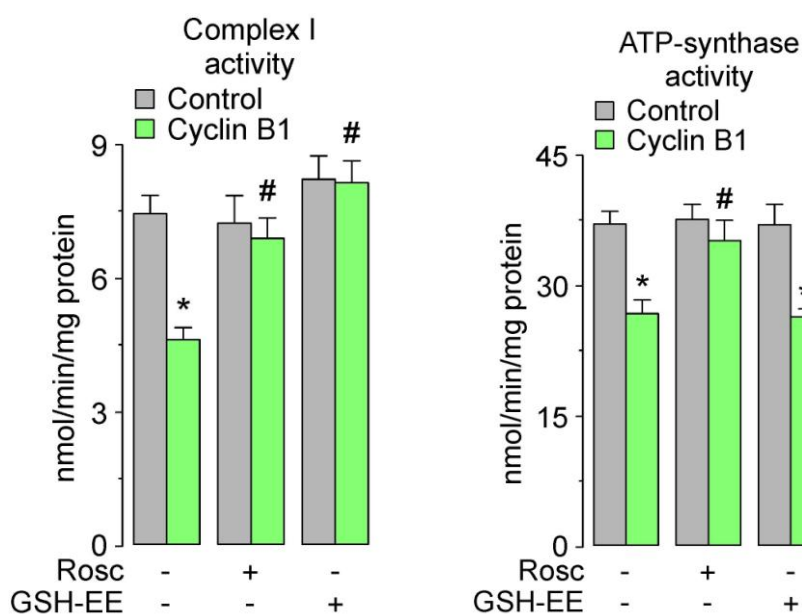


Figura 34. La actividad del complejo Cdk1-ciclina B1 inhibe la actividad del complejo I por un mecanismo de oxidación, pero no así la inhibición de la actividad de la ATP sintasa. Las células HEK-293T se transfectaron como en la **Figura 25**. Las actividades del complejo I y ATP sintasa se midieron mediante espectrofotometría a las 24 horas post-transfección. Los datos son expresados como la media \pm S.E.M, * $p < 0,05$ vs control; # $p < 0,05$ vs ciclina B1 (test t-Student; $n=4$ experimentos independientes).

Revisando en conjunto todos los resultados del presente apartado, la correlación de eventos relacionados con la activación del complejo Cdk1-ciclina B1 que sugerimos, es en primer lugar una inhibición de la ATP sintasa, que conduce a un elevado consumo de oxígeno e hiperpolarización de la membrana mitocondrial, lo cual estimula la producción de anión superóxido. Este aumento de radicales libres provoca la oxidación de una subunidad esencial del complejo I, se produce una disminución de su actividad y provoca la disminución tardía que observábamos en el consumo de oxígeno.

5. La estimulación de los receptores de glutamato provoca que el complejo Cdk1/Ciclina B1 fosforile Bcl-xL, provocando su disociación de la ATP sintasa y causando su inhibición y la del complejo I

Acorde con la bibliografía reciente, la actividad enzimática de la ATP sintasa puede ser activada en neuronas mediante la interacción directa entre su subunidad β y la proteína antiapoptótica Bcl-xL [Alavian, 2011]. Por otra parte, en células tumorales el complejo Cdk1-ciclina B1 está descrito que fosforila e inactiva algunos miembros de la familia de proteínas Bcl-2 [Harley, 2010; Terrano, 2010; Sakurikar, 2012]. Por lo tanto, nuestra hipótesis se encaminaba a que la inhibición de la ATP sintasa tras la estimulación con glutamato era consecuencia del complejo Cdk1/ciclina B1, pero relacionada con la interacción entre Bcl-xL y la subunidad β de la ATP sintasa. Por lo tanto, quisimos dilucidar a continuación el mecanismo por el cual el complejo Cdk1-ciclina B1 inhibía a la ATP sintasa.

Para comprobarlo, como primer acercamiento decidimos utilizar la microscopía confocal, para intentar observar la posible existencia de entre ciclina B1 y Bcl-xL. Como se aprecia en las microfotografías de la **Figura 35**, la acumulación endógena de ciclina B1 provocada por un estímulo excitotóxico hace que la proteína ciclina B1 co-localice con la proteína antiapoptótica Bcl-xL en neuronas. Además, confirmamos que en neuronas no tratadas con glutamato, la ciclina B1 está ausente, de acuerdo con el western que se mostró en la **Figura 11**.

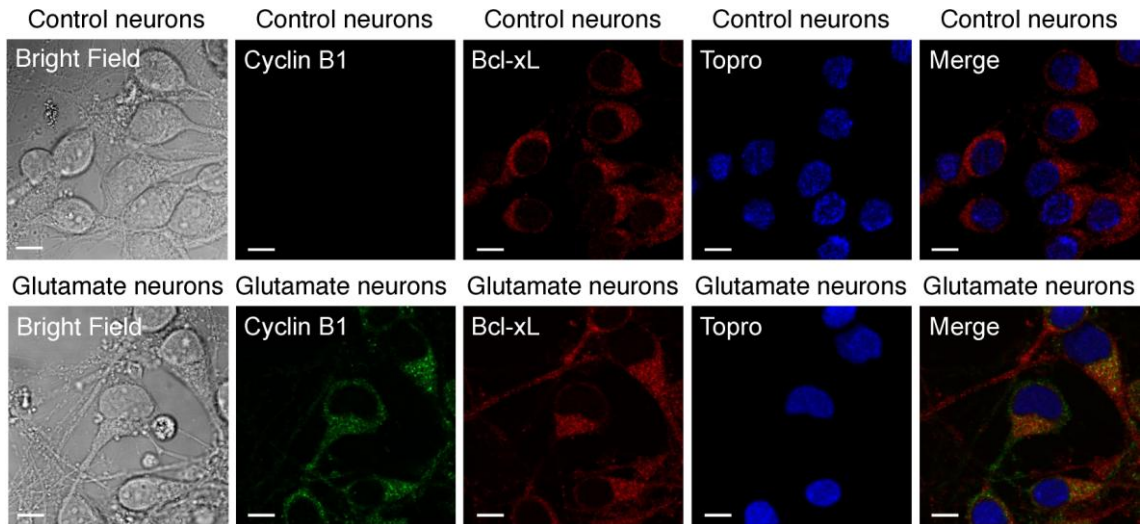


Figura 35. La ciclina B1 co-localiza con Bcl-xL en neuronas tras la estimulación con glutamato. Inmunocitoquímica de ciclina B1 y Bcl-xL en neuronas tratadas o no (control) con glutamato (100 μ M, 5 min) con un tiempo de post-estimulación de 12-14 horas. La barra de escala corresponde a 10 μ m.

Para confirmar la co-localización de ciclina B1 y Bcl-xL, realizamos co-transfección de Bcl-xL por un lado, y una construcción plasmídica con GFP en el caso de los controles, o GFP fusionada a la ciclina B1 para la condición Cyclin B1. Como comprobamos en las microfotografías de la **Figura 36**, mientras que GFP presenta una distribución subcelular dispersa, la ciclina B1 aparece fusionada a la GFP co-localizando con Bcl-xL.

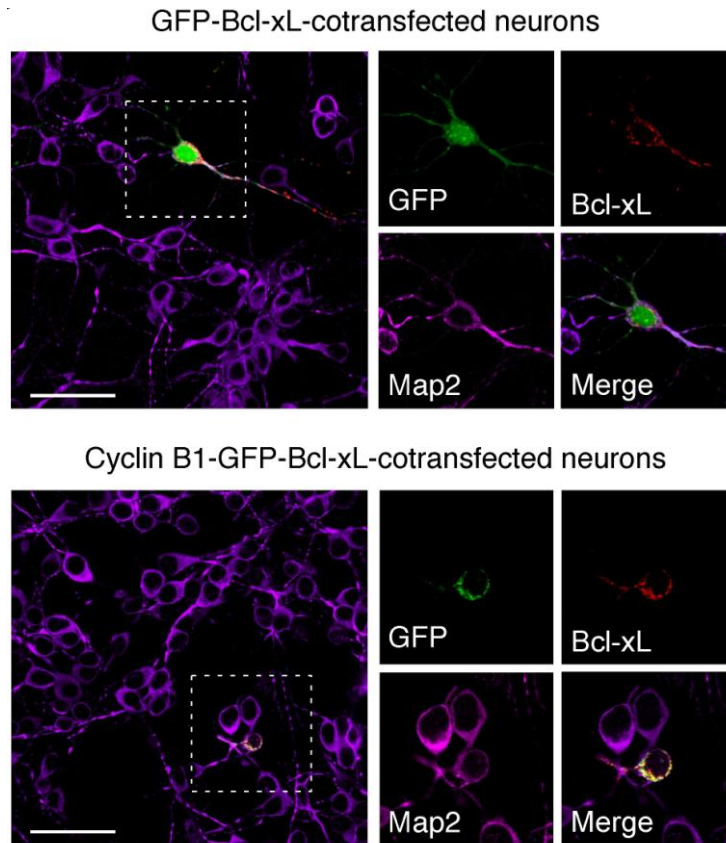


Figura 36. La ciclina B1 co-localiza con Bcl-xL en neuronas, también tras una acumulación exógena de ciclina B1 por transfección. Las neuronas se co-transfectaron con $0,8 \mu\text{g}/10^6$ células del plásmido pcDNA3-GFP (Control) o pcDNA3-ciclina B1-GFP (GFP fusionada a la ciclina; Cyclin B1) y $0,8 \mu\text{g}/10^6$ células del plásmido p8-Bcl-xL durante 12-14 horas. Se utilizó Map2 como marcador neuronal (violeta), y la barra de escala corresponde a $50 \mu\text{m}$.

Una vez confirmada mediante microscopía confocal la co-localización entre ciclina B1 y Bcl-xL, pensamos en corroborar este hecho utilizando la técnica de co-inmunoprecipitación. Este experimento se realizó en neuronas estimuladas con glutamato y por lo tanto, neuronas a las que se les provocó una acumulación de ciclina B1 endógena. Además, el experimento se realizó también en células de la línea HEK-293T que fueron transfectadas, creando una acumulación de ciclina B1 artificial. Como observamos en la **Figura 37**, existe una co-inmunoprecipitación de ciclina B1 y Bcl-xL. Además, la roscovitina, que está descrito que se une al sitio de unión del ATP en el dominio catalítico de Cdk1 [De Azevedo, 1997], impide que se produzcan estas interacciones, sugiriendo una fosforilación de Bcl-xL por parte del complejo Cdk1-ciclina B1.

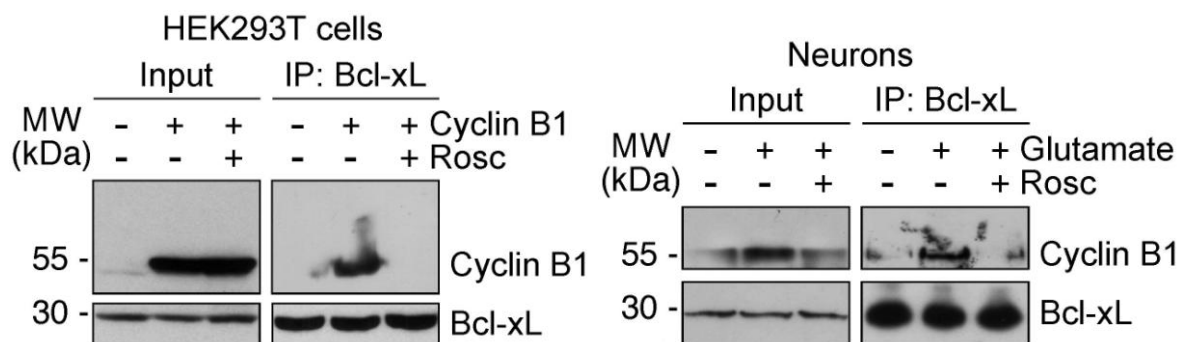


Figura 37. La ciclina B1 co-inmunoprecipita con Bcl-xL tras una acumulación exógena por transfección en la línea celular HEK-293T y tras un estímulo excitotóxico en neuronas. Las células HEK-293T se transfectaron con $0,8 \mu\text{g}/10^6$ células del plásmido pIRES2-EGFP vacío (control) o con el cDNA de la ciclina B1 humana (Cyclin B1) con la presencia o no según el caso, de roscovitina ($10 \mu\text{M}$). Tras 24 horas post-transfección, se obtuvieron los extractos celulares y se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-Bcl-X, y se analizaron mediante transferencia tipo western los niveles proteicos de ciclina B1 y Bcl-xL. Del total del extracto celular recogido, el 10% se cargó en un SDS-PAGE como Input. Las neuronas fueron tratadas o no (control) con glutamato ($100 \mu\text{M}$, 5 min) con un tiempo de post-estimulación de 20 horas en la presencia o ausencia de roscovitina ($10 \mu\text{M}$), realizándose el ensayo de co-inmunoprecipitación de igual forma que en el caso anterior.

Para probar directamente nuestra hipótesis y por lo tanto que en nuestro modelo se produce la fosforilación de Bcl-xL, realizamos un ensayo de co-inmunoprecipitación con los modelos endógeno y exógeno de acumulación de ciclina B1. En este caso, se inmunoprecipitaron los extractos celulares con anti-Bcl-X y posteriormente se analizaron por transferencia tipo western con el anticuerpo anti-fosfoserina. Como apreciamos en la **Figura 38**, tanto la acumulación de ciclina B1 endógena en neuronas como la expresión exógena en HEK-293T fosforila a Bcl-xL. Además, este hecho es revertido por la adición de roscovitina por lo que demuestra la implicación del complejo Cdk1-ciclina B1 en el proceso.

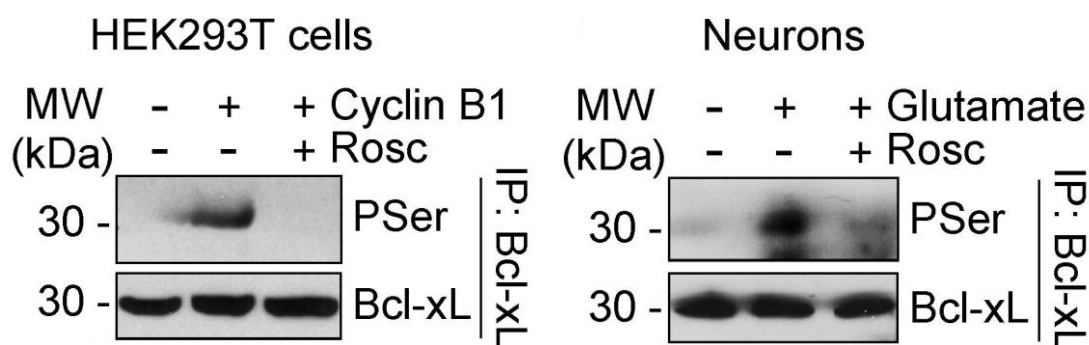


Figura 38. La ciclina B1 fosforila a Bcl-xL tras una acumulación exógena por transfección en la línea celular HEK-293T y tras un estímulo excitotóxico en neuronas. Las células HEK-293T se transfectaron y trataron de la misma manera que en la **Figura 37**. Tras 24 horas post-transfección, se obtuvieron los extractos celulares y se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-Bcl-X, y se analizaron mediante transferencia tipo western con anti-Bcl-X y anti-Pser. Los niveles de ciclina B1 (Input) aparecen en la **Figura 37**. Las neuronas fueron tratadas de igual forma a la **Figura 37** y el ensayo de co-inmunoprecipitación de igual forma que en el caso anterior.

Nuestro siguiente paso fue determinar si la fosforilación que se observa en Bcl-xL era la responsable de la inhibición de la actividad de la ATP sintasa. Aunque Bcl-xL se encuentra en la membrana externa mitocondrial [Jonas, 2013], otros autores han descrito también su localización en la membrana interna o en la matriz mitocondrial, donde podría interactuar con la subunidad β de la F_1-F_0 -ATP sintasa para regular la eficiencia energética en neuronas [Alavian, 2011]. Decidimos entonces determinar la fracción mitocondrial en la que se producía la co-localización de ciclina B1, Bcl-xL y la subunidad β de la F_1-F_0 -ATP sintasa tras un estímulo excitotóxico.

Para hacerlo, se prepararon los mitoplastos (extractos que contienen la matriz y la membrana interna mitocondrial) mediante la incubación de las mitocondrias en un medio hipotónico con sacarosa 70 mM, y se analizaron las proteínas por transferencia tipo western. De acuerdo con la ruptura de la membrana externa mitocondrial que se produce con esa concentración de sacarosa, como observamos en la **Figura 38**, Tom20, una proteína marcadora de membrana externa mitocondrial, se pierde. Sin embargo, la ciclina B1, Bcl-xL y la subunidad β de la F_1-F_0 -ATP sintasa permanecen en el extracto mitoplasto, al igual que la proteína de matriz Hsp60 y la proteína de membrana interna Ndufs1 (subunidad del complejo I).

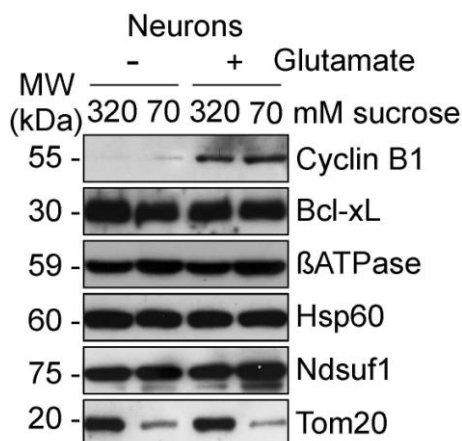


Figura 38. Tras la ruptura de la membrana externa mitocondrial, ciclina B1, Bcl-xL y la subunidad β de la F₁-F₀-ATP sintasa permanecen en el extracto mitoplasto. Las neuronas fueron tratadas de igual forma a la **Figura 29**. Las mitocondrias aisladas fueron incubadas con un medio isoosmótico (320 mM) o hipotónico (70 mM) de sacarosa y se realizó un análisis por transferencia tipo western de las proteínas ciclina B1, Bcl-xL, βATPasa, Hsp60, Ndufs1 y Tom20.

Para corroborar estos resultados, en cuanto a la localización submitocondrial de ciclina B1, realizamos un ensayo de protección a proteasas en mitocondrias aisladas a partir de neuronas a las que previamente se les había realizado un proceso de excitotoxicidad con glutamato, usando tripsina para digerir las proteínas expuestas. Como se muestra en la **Figura 39**, al igual que ocurre con Hsp60 y Ndufs1, pero no Tom 20, la ciclina B1, Bcl-xL y la subunidad β de la F₁-F₀-ATP sintasa fueron protegidas de la digestión por tripsina, lo que confirma que la co-localización de estas proteínas tiene lugar en el compartimento mitoplasto tras un estímulo excitotóxico.

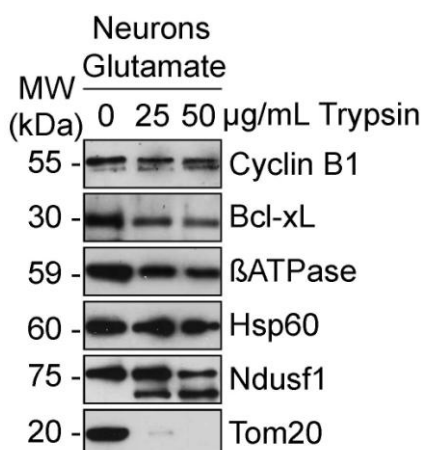


Figura 39. Ciclina B1, Bcl-xL y la subunidad β de la F₁-F₀-ATP sintasa co-localizan en el extracto mitoplasto. Las neuronas fueron tratadas de igual forma a la **Figura 37**. Las mitocondrias aisladas fueron incubadas con un medio mitocondrial en presencia o ausencia de tripsina de soja (25 o 50 μg/mL) y se realizó un análisis por transferencia tipo western de las mismas proteínas que en la **Figura 38**.

Una vez demostrada la co-localización e interacción de ciclina B1 y Bcl-xL, decidimos estudiar la interacción entre Bcl-xL y la subunidad β de la F₁-F_o-ATP sintasa tras un estímulo excitotóxico. Como se muestra en la **Figura 40**, tanto la expresión exógena de ciclina B1 en HEK-293T como la acumulación endógena que tiene lugar tras la estimulación con glutamato provoca una ruptura en la interacción existente entre Bcl-xL y la subunidad β de la F₁-F_o-ATP sintasa. Esta disociación fue bloqueada por el tratamiento con roscovitina, por lo que estos datos en conjunto confirman que la activación del complejo Cdk1-ciclina B1 tras un estrés excitotóxico, fosforila a la proteína Bcl-xL y provoca su disociación de la subunidad β de la F₁-F_o-ATP sintasa.

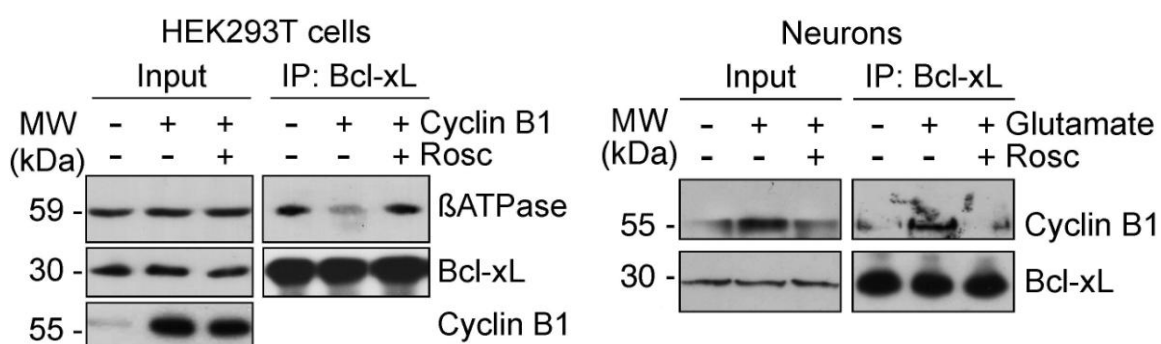


Figura 40. El complejo Cdk1-ciclina B1 provoca la disociación de Bcl-xL y la subunidad β de la F₁-F_o-ATP sintasa tras una expresión exógena de ciclina B1 o la acumulación exógena tras estimulación con glutamato. Las células HEK-293T se transfectaron e inmunoprecipitaron igual que en la **Figura 37**. En los extractos se analizaron mediante transferencia tipo western los niveles proteicos de la subunidad β de la F₁-F_o-ATP sintasa (β ATPasa) y Bcl-xL. Del total del extracto celular recogido, el 10% se cargó en un SDS-PAGE como Input. Las neuronas fueron tratadas de la misma forma que en la **Figura 37**, realizándose el ensayo de co-inmunoprecipitación de igual forma que en el caso anterior.

Para dilucidar si dicho mecanismo implica alguna consecuencia funcional en la actividad de la ATP sintasa, diseñamos una mutagénesis dirigida para generar mutantes de Bcl-xL respecto a la fosforilación de Cdk1 [Abbott, 1986], un fosfomimético [Bcl-xL(D), en el que cambiamos la Ser62 por un aspartato] y un fosfodeficiente [Bcl-xL (A), en el que la Ser62 se ha cambiado por una alanina], basándonos en que la Ser62 en Bcl-xL es el sitio de fosforilación de alta afinidad para Cdk1 [Terrano, 2010].

Nuestro primer paso tras realizar la mutagénesis dirigida fue confirmar que la forma fosfodeficiente, Bcl-xL (A), no se fosforilaba por el complejo Cdk1-ciclina B1. Para

ello, como se muestra en la **Figura 41**, se co-transfectaron células HEK-293T con el plásmido de sobreexpresión de ciclina B1 y nuestras formas mutantes de Bcl-xL [Bcl-xL (A) y Bcl-xL (D)] y se observó que funcionaron según lo esperado.

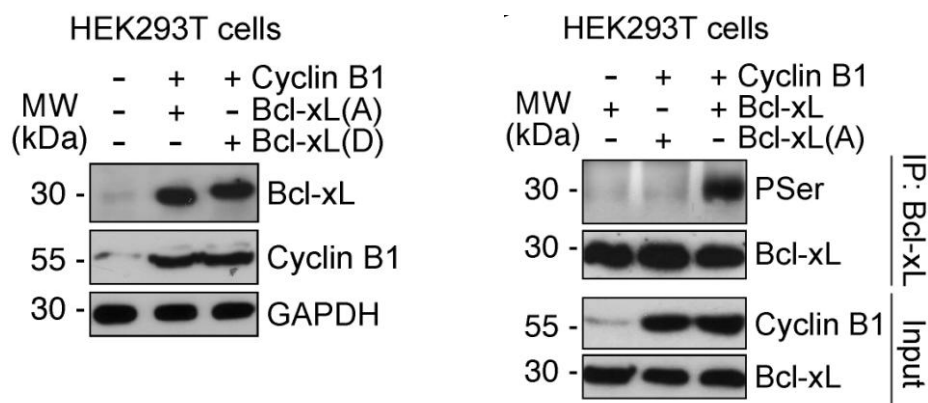


Figura 41. El complejo Cdk1- ciclina B1 no fosforila a la forma mutante fosfodefensiva de Bcl-xL. Las células HEK-293T se co-transfectaron con $0,8 \mu\text{g}/10^6$ células del plásmido pIRES2-EGFP vacío (control) o con el cDNA de la ciclina B1 humana (Cyclin B1) y por otra parte con $0,8 \mu\text{g}/10^6$ células del plásmido p8 vacío (control) o con el cDNA de Bcl-xL o los mutantes de Ser 62 fosfodefensivo Bcl-xL(A) o fosfomimético Bcl-xL (D). Tras 24 horas post-transfección, se obtuvieron los extractos celulares y se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-Bcl-X, y se analizaron mediante transferencia tipo western los niveles proteicos de Pser y Bcl-xL. Del total del extracto celular recogido, el 10% se cargó en un SDS-PAGE como Input.

A continuación, decidimos estudiar con estas nuevas herramientas cómo influye la fosforilación de Bcl-xL en su interacción con la subunidad β de la $F_1\text{-}F_0\text{-ATP}$ sintasa, algo que ya habíamos iniciado con los resultados de la **Figura 40**. Como se refleja en la **Figura 42**, la subunidad β de la $F_1\text{-}F_0\text{-ATP}$ sintasa interacciona con la forma fosfodefensiva de Bcl-xL, pero no así con el fosfomimético. Además, en neuronas observamos como la expresión de la forma fosfodefensiva restaura la interacción entre Bcl-xL y la subunidad β de la $F_1\text{-}F_0\text{-ATP}$ sintasa tras un estímulo excitotóxico, lo que no ocurre con la expresión del fosfomimético. Estos resultados demuestran que la fosforilación de la ser62 de Bcl-xL inducida por la estimulación con glutamato, desacopla la interacción existente entre ésta y la subunidad β de la $F_1\text{-}F_0\text{-ATP}$ sintasa, explicando por tanto el mecanismo que sigue la anteriormente expuesta inhibición, de la ATP sintasa [Alavian, 2011].

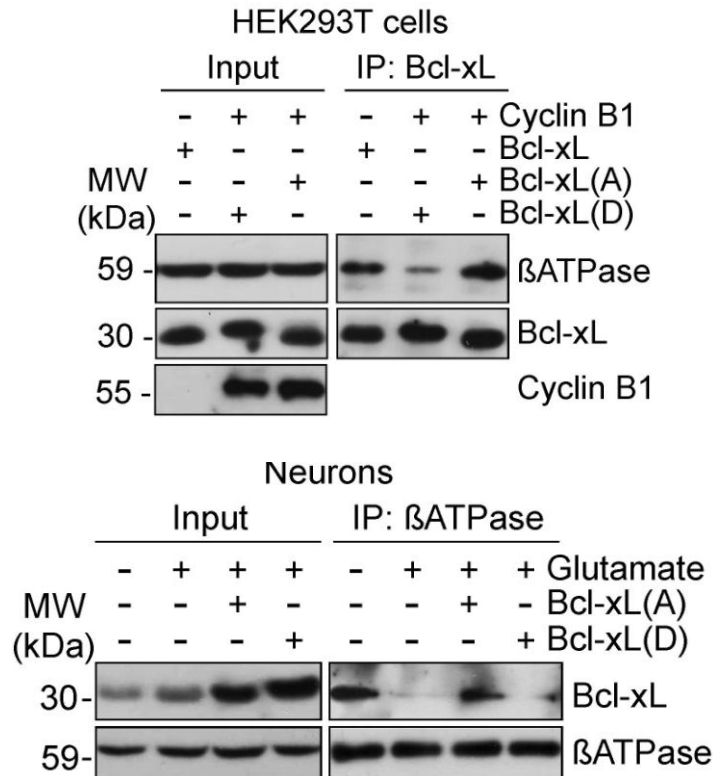


Figura 42. La fosforilación de Bcl-xL mediada por ciclina B1 provoca la ruptura en la interacción entre la subunidad β de la F₁-F₀-ATP sintasa y Bcl-xL. Las células HEK-293T se transfectaron e inmunoprecipitaron al igual que en la **Figura 41**, y se analizaron mediante transferencia tipo western los niveles proteicos de β ATPasa y Bcl-xL. Las neuronas, fueron tratadas o no (control) con glutamato (100 μ M, 5 min) y transfectadas con 0,8 μ g/10⁶ células del plásmido p8 vacío (control) o con el cDNA de los mutantes de Bcl-xL fosfodefectivo Bcl-xL(A) o fosfomimético Bcl-xL (D), con un tiempo de post-estimulación de 20 horas. El ensayo de inmunoprecipitación se realizó con el anticuerpo β ATPasa y se analizaron mediante transferencia tipo western los niveles proteicos de β ATPasa y Bcl-xL. En ambos casos, del total de extracto celular recogido, el 10% se cargó en un SDS-PAGE como Input.

Para corroborar esta hipótesis, seguidamente pretendimos volver a determinar la actividad de los complejos de la cadena transportadora mitocondrial para comprobar cómo la fosforilación de Bcl-xL afectaba a su actividad.

Como se refleja en la **Figura 43**, la expresión de la forma fosfodefactiva de Bcl-xL crea un efecto dominante negativo, siendo incapaz de inhibir la actividad de la ATP sintasa tras la sobreexpresión con ciclina B1. Sin embargo, la expresión de la forma fosfomimética imita el efecto del Bcl-xL endógeno al inhibir la actividad de la ATP sintasa. Este resultado nos indica que la fosforilación de Bcl-xL en la Ser62 mediada por

el complejo Cdk1-ciclina B1 y que ocasiona su separación de la subunidad β de la F₁-F₀-ATP sintasa, es suficiente para inhibir la actividad de este complejo enzimático.

Así mismo, quisimos dilucidar si esta inhibición de la ATP sintasa afectaba de alguna manera a la actividad del complejo I. Como vemos, la inhibición de la actividad del complejo I causada por ciclina B1 es anulada por la co-expresión del mutante fosfodeficiente de Bcl-xL, pero no así por el fosfomimético. Por lo tanto, también podemos concluir que la inhibición de la ATP sintasa por medio del complejo Cdk1-ciclina B1 es suficiente para provocar el desacoplamiento en la actividad del complejo I.

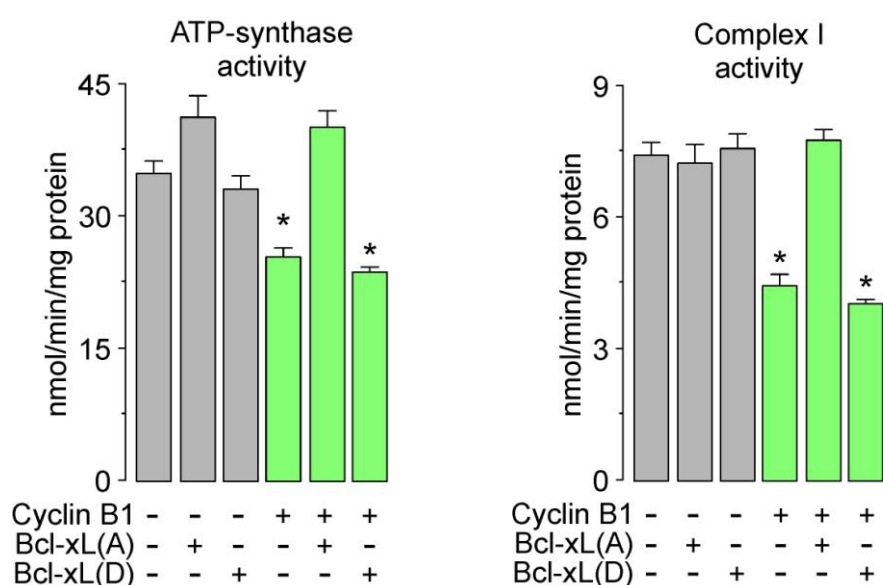


Figura 43. La fosforilación de Bcl-xL mediada por ciclina B1 provoca la ruptura en la interacción entre la subunidad β de la F₁-F₀-ATP sintasa y Bcl-xL. Las células HEK-293T se transfectaron al igual que en la Figura 41. Las actividades del complejo I y ATP sintasa se midieron mediante espectrofotometría a las 24 horas post-transfección. Los datos son expresados como la media \pm S.E.M, * $p < 0,05$ vs control (test t-Student; n=4 experimentos independientes).

6. La estimulación de los receptores de glutamato promueve la fosforilación de Bcl-xL mediada por el complejo Cdk1/Ciclina B1, lo que provoca estrés oxidativo y disfunción mitocondrial

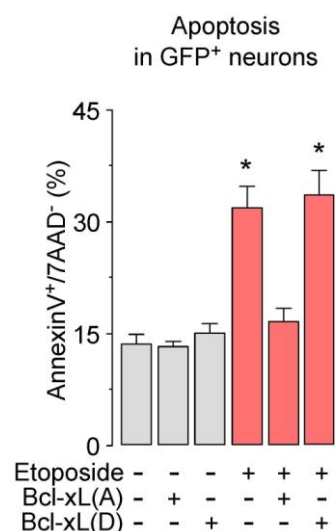
Por último quisimos conocer si la fosforilación de Bcl-xL era esencial en la cascada de señalización que determina el estrés oxidativo, la despolarización de la membrana mitocondrial y la apoptosis, que sigue a un estímulo excitotóxico.

Para ello, utilizamos los dos modelos realizamos en neuronas, de generación de una acumulación de ciclina B1, es decir, la expresión de ciclina B1 exógena y la acumulación endógena que sigue a la estimulación con glutamato. Los resultados, que se recogen en la **Figura 45**, nos indican que la expresión del mutante fosfodeficiente de Bcl-xL previene completamente el incremento en la producción de anión superóxido, la despolarización de la membrana y la muerte neuronal por apoptosis provocada por ciclina B1. Sin embargo, la expresión del mutante fosfomimético de Bcl-xL no interviene de ninguna manera en este fenómeno.

Por otra parte, el aumento de producción de anión superóxido, la despolarización de la membrana y la muerte por apoptosis mediada por la estimulación con glutamato, se previnieron al expresar el mutante fosfodeficiente de Bcl-xL, pero no así por su forma fosfomimética. Estos resultados nos indican que la fosforilación de Bcl-xL en la Ser62 explica convenientemente el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y el efecto proapoptótico del complejo Cdk1-ciclina B1 en excitotoxicidad.

Para confirmar esta hipótesis, proyectamos estudiar si los mutantes de Ser62 afectaban al efecto anti-apoptótico de Bcl-xL. Para ello, como se muestra en la **Figura 44**, expresamos en neuronas el mutante fosfodeficiente, que previno completamente la apoptosis neuronal inducida por el tratamiento con etopósido. Como era de esperar, la expresión del mutante fosfomimético no protegió a las neuronas de la neurotoxicidad causada por el etopósido. Estos resultados están en consenso con la bibliografía que muestra cómo el Bcl-xL se fosforila en su Ser62, y por lo tanto pierde su función antiapoptótica, en células cancerosas en respuesta a fármacos antimitóticos [Schmitt, 2007; Antony, 2010; Upreti, 2008].

Figura 44. La expresión del mutante fosfodeficiente de la Ser62 de Bcl-xL bloquea la apoptosis mediada por etopósido. Las neuronas, fueron transfectadas con 0,8 $\mu\text{g}/10^6$ células del plásmido p8 vacío (control) o con el cDNA de los mutantes de Bcl-xL fosfodeficiente Bcl-xL(A) o fosfomimético Bcl-xL (D), y estimuladas posteriormente con etopósido (10 μM) durante 24 horas. Los datos son expresados como la media \pm S.E.M, * $p < 0,05$ vs control (test t-Student; $n=3$ experimentos independientes).



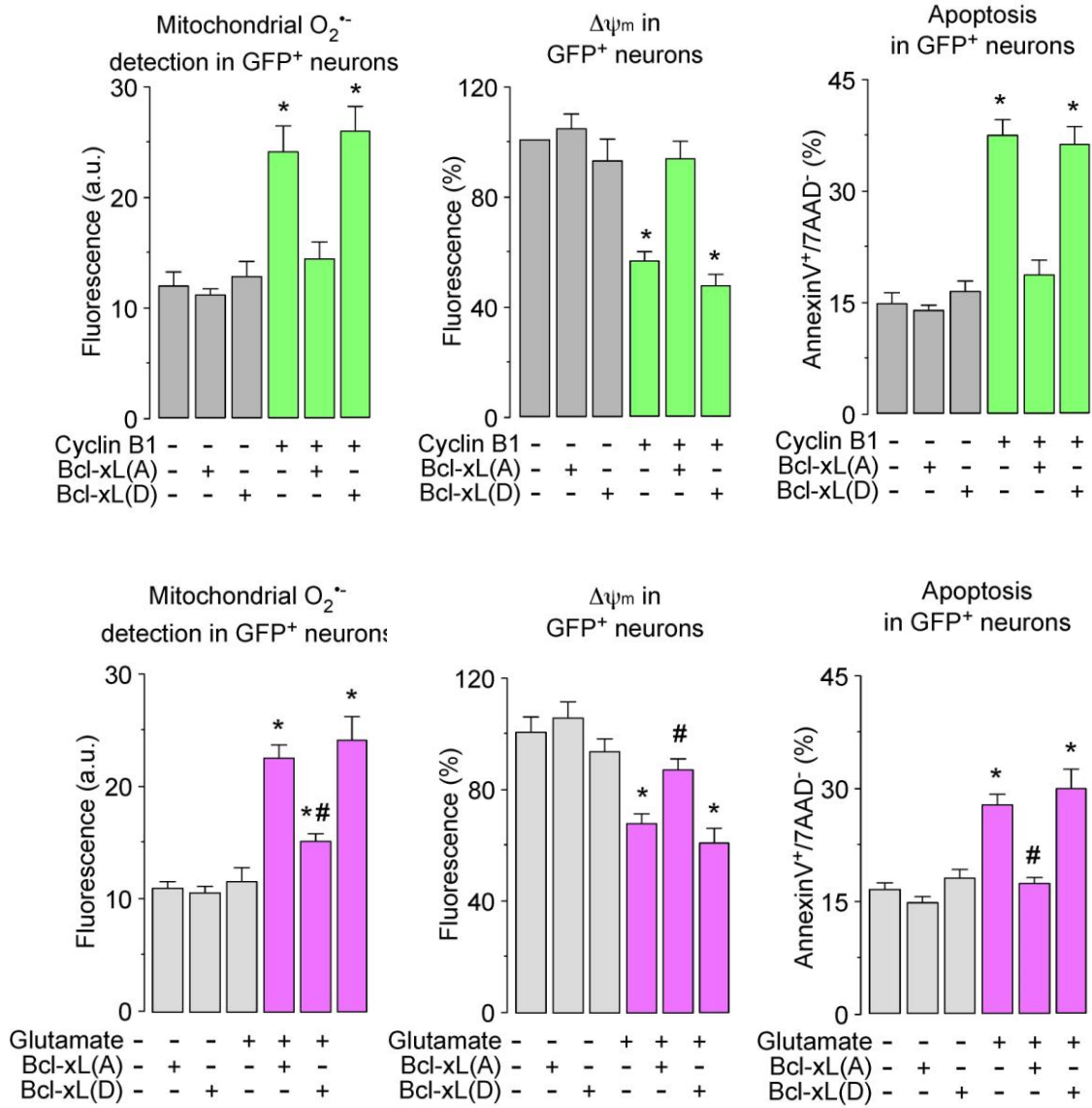


Figura 45. La fosforilación de Bcl-xL en la Ser62 es la responsable del aumento de producción de anión superóxido, la despolarización de la membrana y la muerte neuronal por apoptosis mediada por la actividad del complejo Cdk1-ciclina B1. **(A)** Las neuronas se co-transfectaron con 0,8 μg/10⁶ células del plásmido pIRES2-EGFP vacío (control) o con el cDNA de la ciclina B1 humana (Cyclin B1) y por otra parte con 0,8 μg/10⁶ células del plásmido p8 vacío (control) o con el cDNA de Bcl-xL o los mutantes de Ser62 fosfodefectivo Bcl-xL(A) o fosfomimético Bcl-xL (D). La producción de anión superóxido, la determinación del potencial de membrana y la muerte neuronal por apoptosis fueron determinadas mediante citometría de flujo en neuronas GFP⁺. **(B)** Las neuronas fueron estimuladas y transfectadas como en la **Figura 42** y se hicieron las determinaciones de la misma manera que en el apartado anterior. En todos los casos los datos son expresados como la media ±S.E.M, * p<0,05 vs control; # p<0,05 vs glutamato (test t-Student; n=3 experimentos independientes).

DISCUSIÓN

1. TRAS UN ESTÍMULO EXCITOTÓXICO TIENE LUGAR UN NORMAL DESARROLLO DEL CICLO CELULAR HASTA QUE SE PRODUCE LA ESTABILIZACIÓN DE CICLINA B1

En resultados previos de nuestro grupo, hemos mencionado cómo un estímulo excitotóxico que produce una activación de los receptores NMDA de glutamato provoca la estabilización de la ciclina B1, siguiendo una cascada de eventos que comienzan con la activación de la calpaína mediada por un aumento en el flujo de Ca^{2+} . Esta activación conduce a la ruptura de la proteína p35 anclada a la membrana en p25, que activa intensamente la actividad de la quinasa Cdk5 en el núcleo [Maestre, 2008].

La activación de Cdk5 produce una hiperfosforilación de Cdh1 que conlleva su disociación del complejo APC/C y por lo tanto inhibe su capacidad para producirse una co-activación [Jaquenoud, 2002; Maestre, 2008]. Al tratarse Cdh1 de un regulador del ciclo celular, nos era desconocido si la acumulación de ciclina B1 se producía tras un desarrollo normal del ciclo celular. Así, nosotros ahora hemos demostrado que tras el estímulo excitotóxico nuestros resultados son compatibles con un comienzo y evolución del ciclo completamente normal hasta la consecución de la acumulación aberrante de ciclina B1 durante la fase G2. Nos interesaba caracterizar nuestro modelo de excitotoxicidad respecto a Cdk5, que como recordamos es la quinasa con mayor presencia en el cerebro, y a la vista de nuestros resultados pudimos comprobar cómo en ausencia de Cdk5 no se producía la entrada en ciclo celular ni se fosforilaba Cdh1, por lo que la actividad del complejo APC/C-Cdh1 era restablecida y no se producía la acumulación de ciclina B1.

2. LA ESTABILIZACIÓN DE CICLINA B1 TIENE LUGAR ESPECÍFICAMENTE EN LA MITOCONDRIA

Se conoce la necesidad de que la ciclina B1 se trasloque fuera del núcleo para que en células en división tenga lugar la parada del ciclo celular en G2 [Müllers, 2014]. Intentando dilucidar que ocurría con la localización de la ciclina B1 tras el estímulo excitotóxico, nuestros resultados muestran que la estabilización ocurre de manera selectiva en la mitocondria. En un trabajo previo, se determinó cómo la expresión forzada de una forma mutante de ciclina B1 que portaba una secuencia para dirigirla a la mitocondria en células en división, ejercía la coordinación de la respiración mitocondrial

con la progresión del ciclo celular, especialmente referido a la transición G2/M [Wang, 2014]. Sin embargo, la localización mitocondrial de la ciclina B1, como mostramos aquí, no había sido mostrada hasta este momento. Este resultado es interesante, dado que aparentemente la ciclina B1 carece de una secuencia que le pueda dirigir a la mitocondria. Además, las neuronas post-mitóticas no necesitarían coordinar el metabolismo que se describe en [Wang, 2014], ya que esto es algo característico de células proliferativas. En consecuencia de todo ello, el mecanismo por el cual la ciclina B1 se dirige específicamente a la mitocondria y la(s) consecuencia(s) de dicha localización subcelular permanecen aún desconocidas.

3. EL COMPLEJO CDK1-CICLINA B1 FOSFORILA BCL-XL E INHIBE LA ACTIVIDAD ATP SINTASA

En nuestros resultados mostramos que Cdk1 es responsable del reclutamiento de la ciclina B1 por parte de la mitocondria, ya que ambas proteínas co-localizan en dicho orgánulo. Además, los resultados que muestran a Bcl-xL fosforilado en su Ser62, son compatibles con la formación de un complejo Cdk1-ciclina B1 activo en la mitocondria, ya que la Ser62 es el residuo de fosforilación de mayor afinidad para dicho complejo [Terrano, 2010].

Bcl-xL es una proteína anti-apoptótica que se sabe que interacciona con la subunidad β de la F₁F₀-ATP sintasa, formando un complejo estable [Alavian, 2011]. Nosotros hemos demostrado que la fosforilación de Bcl-xL en su Ser62 es suficiente para producir la disociación de la subunidad β de la F₁F₀-ATP sintasa, provocando la inhibición de actividad enzimática de la ATP sintasa.

4. LA INACTIVACIÓN DE LA ACTIVIDAD ATP SINTASA DESENCADENA LA DISFUNCIÓN A SU VEZ EN LA ACTIVIDAD DEL COMPLEJO I

Se sabe que esta inhibición de la actividad afecta al potencial de membrana mitocondrial [Brand, 2004; Sanchez-Cenizo, 2010; Formentini, 2014]. De hecho, según nuestros resultados, la estimulación con glutamato ejerce en el potencial de membrana un efecto bifásico mediado por la ciclina B1, con una hiperpolarización transitoria seguida de una despolarización tardía. Durante la hiperpolarización, se sabe que la cadena

transportadora de electrones mitocondrial estimula la producción de anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) [Sanchez-Cenizo, 2010; Formentini, 2014], que encontramos en neuronas tras el estímulo excitotóxico.

El complejo I de la cadena transportadora de electrones mitocondrial contiene centros Fe-S sensibles al anión superóxido [Sazanov, 2014] y residuos específicos de cisteína [Chouchani, 2013] esenciales para la óptima transferencia electrónica hacia la ubiquinona. En consecuencia, un incremento en la producción de anión superóxido tanto por el complejo I como por el III de la cadena transportadora [Murphy, 2009], causa en ambos casos un daño oxidativo retardado en el complejo I y una disfunción en la transferencia electrónica responsable de la inhibición de su actividad.

5. EL COLAPSO DE LA CADENA TRANSPORTADORA MITOCONDRIAL DESENCADENA LA MUERTE NEURONAL POR APOPTOSIS

Este efecto tiene consecuencias funcionales para la integridad celular, produciendo tanto la despolarización tardía de la membrana mitocondrial como la drástica caída en el consumo de oxígeno. El colapso del potencial de membrana que observamos bajo nuestras condiciones es debido a la ineficacia del complejo I a bombear protones hacia el espacio intermembrana, y desencadena la formación del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial, que se sabe que está formado por la dimerización de dos subunidades β de la F_1F_0 -ATP sintasa [Carraro, 2014]. Así, la disociación del Bcl-xL fosforilado de la subunidad β de la F_1F_0 -ATP sintasa que nosotros describimos debe de ser un importante paso en este proceso que permite a las subunidades β dimerizarse. La subsiguiente apertura del poro de transición mitocondrial, inicia la permeabilización de la membrana externa mitocondrial favoreciendo la liberación de factores pro-apoptóticos [Galluzzi, 2009; Bernardi, 2013], sensibles a la unión de Bcl-xL con la subunidad β de la F_1F_0 -ATP sintasa [Chen, 2011; Alavian, 2014]. Este mecanismo puede dar cuenta de los efectos perjudiciales de la acumulación de ciclina B1 en las zonas de neurodegeneración de algunas enfermedades neurológicas [Vincent, 1997; Love, 2003; Yang, 2003].

6. POSIBLE IMPLICACIÓN DE LA VÍA CDK1-CICLINA B1-BCL-XL EN CÁNCER

Además, la regulación negativa de la función mitocondrial sometida por la actividad del complejo Cdk1-ciclina B1 que describimos en el presente trabajo podría tener implicaciones más allá del tejido neural. Por ejemplo, se sabe que en células cancerosas regulan de manera positiva el metabolismo glucolítico aerobio para favorecer la proliferación celular aberrante [Vander Heiden, 2009], lo que va unido a una disminución de la actividad del complejo APC/C-Cdh1 [Almeida, 2010; Moncada, 2012].

La acumulación aberrante de ciclina B1 en la mitocondria provoca la inhibición del complejo I, disminuyendo drásticamente la eficiencia energética de la mitocondria, lo que podría estimular la glicolisis en células proliferativas. La combinación de este hecho junto con la capacidad anormal de las células cancerosas para formar el poro de transición mitocondrial [Brenner y Grimm, 2006; Javadov, 2011] podría representar un mecanismo aún no descrito donde el complejo Cdk1-ciclina B1 favorece la progresión de las células cancerosas.

CONCLUSIONES

A la vista de los resultados presentados en este trabajo, se obtuvieron las siguientes conclusiones:

1. Tras un estímulo excitotóxico, en las neuronas se produce una entrada en ciclo celular que sigue un desarrollo normal y que culmina antes de la entrada en mitosis con una acumulación aberrante de ciclina B1, que desencadena la muerte celular por apoptosis.
2. La activación fisiológica de los receptores NMDA, así como la sobreexpresión artificial de ciclina B1, provoca una estabilización de la ciclina B1 que tiene lugar específicamente en la mitocondria, donde se forma un complejo Cdk1-ciclina B1 activo.
3. El complejo Cdk1-ciclina B1 fosforila a la proteína anti-apoptótica Bcl-xL, provocando su inactivación y disociación de la subunidad β de la F₁F_o-ATP sintasa, lo que conduce a una inhibición de la actividad de la enzima.
4. La pérdida de actividad de la F₁F_o-ATP sintasa produce una despolarización de la membrana interna mitocondrial y un aumento en los niveles de O₂^{•-}, desencadenando el fallo del complejo I debido al incremento del estrés oxidativo. La subsiguiente disfunción mitocondrial y la disociación de Bcl-xL de la subunidad β de la F₁F_o-ATP sintasa, favorece la apertura del poro de transición mitocondrial que culmina con la apoptosis.

BIBLIOGRAFÍA

Abbott WA, Griffith OW, Meister A. Gamma-glutamyl-glutathione. Natural occurrence and enzymology. *J Biol Chem.* **261**, 13657-13661 (1986).

Abraham RT. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* **15**, 2177-2196 (2001).

Acquaviva C, Pines J. The anaphase promoting complex/cyclosome: APC/C. *J Cell Sci* **119**, 2401-2404 (2006).

Adams JM , Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci.* **26**, 61-6 (2001).

Alavian KN, Beutner G, Lazrove E, Sacchetti S, Park HA, Licznanski P, Li H, Nabili P, Hockensmith K, Graham M, Porter GA, Jr., Jonas EA. An uncoupling channel within the c-subunit ring of the F1FO ATP synthase is the mitochondrial permeability transition pore. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **111**, 10580-10585 (2014)

Alavian KN, Li H, Collis L, Bonanni L, Zeng L, Sacchetti S, Lazrove E, Nabili P, Flaherty B, Graham M, Chen Y, Messerli SM, Mariggio MA, Rahner C, McNay E, Shore GC, Smith PJ, Hardwick JM, Jonas EA. Bcl-xL regulates metabolic efficiency of neurons through interaction with the mitochondrial F1FO ATP synthase. *Nat Cell Biol.* **13**, 1224-1233 (2011).

Almeida A. Regulation of APC/C-Cdh1 and its function in neuronal survival. *Mol Neurobiol* **46**, 547-554 (2012).

Almeida A, Almeida J, Bolaños JP, Moncada S. Different responses of astrocytes and neurons to nitric oxide: the role of glycolytically-generated ATP in astrocyte protection. *Proc Natl Acad Sci USA.* **98**, 15294-15299 (2001).

Almeida A, Bolaños JP. A transient inhibition of mitochondrial ATP synthesis by nitric oxide synthase activation triggered apoptosis in primary cortical neurons. *J Neurochem* **77**, 676-690 (2001).

Almeida A, Bolaños JP, Moncada S. E3 ubiquitin ligase APC/C-Cdh1 accounts for the Warburg effect by linking glycolysis to cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 738-741 (2010).

Almeida A, Bolaños JP, Moreno S. Cdh1-Hct1-APC is essential for the survival of postmitotic neurons. *J Neurosci* **25**, 8115-8121 (2005).

Almeida A, Medina JM. A rapid method for the isolation of metabolically active mitochondria from rat neurons and astrocytes in primary culture. *Brain Res Prot.* **2**, 209-214 (1998).

Almeida A, Moncada S, Bolaños JP. Nitric oxide switches on glycolysis through the AMP protein kinase and 6-phosphofructo-2-kinase pathway. *Nat Cell Biol* **6**, 45-51 (2004).

Andreu AL, Checcarelli N, Iwata S, Shanske S, DiMauro S. A missense mutation in the mitochondrial cytochrome b gene in a revisited case with histiocytoid cardiomyopathy. *Pediatr Res.* **48**, 311-4 (2000).

Antonsson B. Mitochondria and the Bcl-2 family proteins in apoptosis signaling pathways. *Mol Cell Biochem.* **256-257**, 141-55 (2004).

Antony R, Lukiw WJ, Bazan NG. Neuroprotectin D1 induces dephosphorylation of Bcl-xL in a PP2A-dependent manner during oxidative stress and promotes retinal pigment epithelial cell survival. *J Biol Chem.* **285**, 18301-18308 (2010).

Arif A. Extraneuronal activities and regulatory mechanisms of the atypical cyclin dependent kinase Cdk5. *Biochem Pharmacol* **84**, 985-993 (2012).

Aulia S, Tang BL. Cdh1-APC/C, cyclin B-Cdc2 and Alzheimer's disease pathology. *Biochem Biophys Res Commun* **339**, 1-6 (2006).

Baker DJ, Dawlaty MM, Galardy P, van Deursen JM. Mitotic regulation of the anaphase promoting complex. *Cell Mol Life Sci* **64**, 589-600 (2007).

Bardin AJ, Amon A. Men and sin: what's the difference? *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 815-826 (2001).

Barford D. Structural insights into anaphase promoting complex function and mechanism. *Phil Trans R Soc B* **366**, 3605-3624 (2011).

Bartek J, Lukas J. Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *FEBS Lett* **490**, 117-122 (2001).

Bashir T, Dorrello NV, Amador V, Guardavaccaro D, Pagano M. Control of the SCF-Skp2-Cks1 ubiquitin ligase by the APC/C-Cdh1 ubiquitin ligase. *Nature* **428**, 190-193 (2004a).

Bashir T, Pagano M. Don't skip the G1 phase: how APC/C-Cdh1 keeps SCF-Skp2 in check. *Cell Cycle* **3**, 850-852 (2004b).

Bassermann F, Frescas D, Guardavaccaro D, Busino L, Peschiaroli A, Pagano M. The Cdc14B-Cdh1-Plk1 axis controls the G2 DNA damage response checkpoint. *Cell* **134**, 256-267 (2008).

Bauer DE, Harris MH, Plas DR, Lum JJ, Hammerman PS, Rathmell JC, Riley JL, Thompson CB. Cytokine stimulation of aerobic glycolysis in hematopoietic cells exceeds proliferative demand. *FASEB J.* **18**, 1303-5 (2004).

Baysal BE, Ferrell RE, Willett-Brozick JE, Lawrence EC, Myssiorek D, Bosch A, van der Mey A, Taschner PE, Rubinstein WS, Myers EN, Richard CW 3rd, Cornelisse CJ, Devilee P, Devlin B. Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science.* **287**, 848-51 (2000).

Bellance N, Lestienne P, Rossignol R. Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis. *Front Biosci.* **14**, 4015-34 (2009).

Berman SB, Chen YB, Qi B, McCaffery JM, Rucker EB 3rd, Goebbels S, Nave KA, Arnold BA, Jonas EA, Pineda FJ, Hardwick JM. Bcl-x L increases mitochondrial fission, fusion, and biomass in neurons. *J Cell Biol.* **184**, 707-19 (2009).

Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved? *Frontiers in physiology.* **4**, 95 (2013).

Besson A, Dowdy SF, Roberts JM. Cdk inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell* **14**, 159-169 (2008).

Billen LP, Kokoski CL, Lovell JF, Leber B, Andrews DW. Bcl-XL inhibits membrane permeabilization by competing with Bax. *PLoS Biol.* **6**, e147 (2008).

Blakely EL, Mitchell AL, Fisher N, Meunier B, Nijtmans LG, Schaefer AM, Jackson MJ, Turnbull DM, Taylor RW. A mitochondrial cytochrome b mutation causing severe respiratory chain enzyme deficiency in humans and yeast. *FEBS J.* **272**, 3583-92 (2005).

Blatch GL, Lässle M. The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* **21**, 932-939 (1999).

Bolaños JP, Almeida A, Moncada S. Glycolysis: a bioenergetic or a survival pathway? *Trends Biochem Sci* **35**, 145-149 (2010).

Bolaños JP, Delgado-Esteban M, Herrero-Mendez A, Fernandez-Fernandez S, Almeida A. Regulation of glycolysis and pentose phosphate pathway by nitric oxide: impact on neuronal survival. *Biochim Biophys Acta* **1777**, 789-793 (2008).

Bolaños JP, Moro MA, Lizasoain I, Almeida A. Mitochondria and reactive oxygen and nitrogen species in neurological disorders and stroke: Therapeutic implications. *Adv Drug Deliv Rev.* **61**, 1299-1315 (2009).

Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**, 7297-301 (1995).

Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, Pakay JL, Parker N. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med.* **37**, 755-767 (2004).

Brenner C, Grimm S. The permeability transition pore complex in cancer cell death. *Oncogene.* **25**, 4744-4756 (2006).

Burnette WN. Western Blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* **112**, 195-203 (1981).

Burton JL, Solomon MJ. D-box and KEN-box motifs in budding yeast Hsl1p are required for APC mediated degradation and direct binding to Cdc20p and Cdh1p. *Genes Dev* **15**, 2381-2395 (2001).

Busby EC, Leistriz DF, Abraham RT, Karnitz LM, Sarkaria JN. The radiosensitizing agent 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) inhibits the DNA damage checkpoint kinase hChk1. *Cancer Res* **60**, 2108-2112 (2000).

Canepa ET, Scassa ME, Ceruti JM, Marazita MC, Carcagno AL, Sirkin PF, Ogara MF. INK4 proteins, a family of mammalian Cdk inhibitors with novel biological functions. *IUBMB Life* **59**, 419-426 (2007).

Carraro M, Giorgio V, Sileikyte J, Sartori G, Forte M, Lippe G, Zoratti M, Szabo I, Bernardi P. Channel formation by yeast F-ATP synthase and the role of dimerization in the mitochondrial p 774 permeability transition. *J Biol Chem.* **289**, 15980-15985 (2014).

Carroll CW, Enquist-Newman M, Morgan DO. The APC subunit Doc1 promotes recognition of the substrate destruction box. *Curr Biol* **15**, 11-18 (2005).

Carroll CW, Morgan DO. The Doc1 subunit is a processivity factor for the anaphase promoting complex. *Nat Cell Biol* **4**, 880-887 (2002).

Castro A, Vigneron S, Bernis C, Labbé JC, Lorca T. Xkid is degraded in a D-box, KEN-box, and A-box independent pathway. *Mol Cell Biol* **23**, 4126-4138 (2003).

Chang TS, Jeong W, Lee DY, Cho CS, Rhee SG. The RING-H2-finger protein Apc11 as a target of hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med* **37**, 521-530 (2004).

Chauhan S, Zheng X, Tan YY, Tay BH, Lim S, Venkatesh B, Kaldis P. Evolution of the Cdk-activator Speedy/RINGO in vertebrates. *Cell Mol Life Sci* **69**, 3835-3850 (2012).

Chen HH, Wang YC, Fann MJ. Identification and characterization of the Cdk12-cyclin L1 complex involved in alternative splicing regulation. *Mol Cell Biol* **26**, 2736-2745 (2006).

Chen YB, Aon MA, Hsu YT, Soane L, Teng X, McCaffery JM, Cheng WC, Qi B, Li H, Alavian KN, Dayhoff-Brannigan M, Zou S, Pineda FJ, O'Rourke B, Ko YH, Pedersen PL, Kaczmarek LK, Jonas EA, Hardwick JM. Bcl-xL regulates mitochondrial energetics by stabilizing the inner membrane potential. *J Cell Biol.* **195**, 263-76 (2011).

Chew EH, Hagen T. Substrate mediated regulation of cullin neddylation. *J Biol Chem* **282**, 17032-17040 (2007).

Chin CF, Yeong FM. Safeguarding entry into mitosis: the antephasis checkpoint. *Mol Cell Biol* **30**, 22-32 (2010).

Chouchani ET, Methner C, Nadtochiy SM, Logan A, Pell VR, Ding S, James AM, Cocheme HM, Reinhold J, Lilley KS, Partridge L, Fearnley IM, Robinson AJ, Hartley RC, Smith RA, Krieg T, Brookes PS, Murphy MP. Cardioprotection by S-nitrosation of a cysteine switch on mitochondrial complex I. *Nat Med.* **19**, 753-759 (2013).

Ciccia A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell* **40**, 179-204 (2010).

Cipressa F, Cenci G. DNA damage response, checkpoint activation and dysfunctional telomeres: face to face between mammalian cells and *Drosophila*. *Tsitologija* **55**, 211-217 (2013).

Clute P, Pines J. Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase. *Nat Cell Biol.* **1**, 82-7 (1999).

Collinson IR, Runswick MJ, Buchanan SK, Fearnley IM, Skehel JM, van Raaij MJ, Griffiths DE, Walker JE. Fo membrane domain of ATP synthase from bovine heart mitochondria: purification, subunit composition, and reconstitution with F1-ATPase. *Biochemistry*. **33**, 7971-8 (1994).

Corn PG. Role of the ubiquitin proteasome system in renal cell carcinoma. *BMC Biochem* **8**, 1-10 (2007).

Cox GB, Jans DA, Fimmel AL, Gibson F, Hatch L. Hypothesis. The mechanism of ATP synthase. Conformational change by rotation of the beta-subunit. *Biochim Biophys Acta*. **768**, 201-8 (1984).

Cuende J, Moreno S, Bolaños JP, Almeida A. Retinoic acid downregulates Rae1 leading to APC/C-Cdh1 activation and neuroblastoma SH-SY5Y differentiation. *Oncogene* **27**, 3339-3344 (2008).

da Fonseca PC, Kong EH, Zhang Z, Schreiber A, Williams MA, Morris EP, Barford D. Structures of APC/C-Cdh1 with substrates identify Cdh1 and Apc10 as the D-box co-receptor. *Nature* **470**, 274-278 (2011).

Das AK, Cohen PW, Barford D. The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *EMBO J* **17**, 1192-1199 (1998).

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*. **243**, 518-526(1997).

Delgado-Esteban M, Almeida A, Bolaños JP.D-Glucose prevents glutathione oxidation and mitochondrial damage after glutamate receptor stimulation in rat cortical primary neurons. *J Neurochem*. **75**, 1618-24 (2000).

Delgado-Esteban M, Garcia-Higuera I, Maestre C, Moreno S, Almeida A. APC/C-Cdh1 coordinates neurogenesis and cortical size during development. *Nat Commun* **4**, 1-12 (2013).

Diaz-Hernandez JI, Moncada S, Bolaños JP, Almeida A. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 protects neurons against apoptosis induced by oxidative stress. *Cell Death Differ*. **14**, 1211-21 (2007).

Dröse S, Brandt U.Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Adv Exp Med Biol*. **748**, 145-69 (2012).

Dube P, Herzog F, Gieffers C, Sander B, Riedel D, Müller SA, Engel A, Peters JM, Stark H. Localization of the coactivator Cdh1 and the cullin subunit Apc2 in a cryo-electron microscopy model of vertebrate APC/C. *Mol Cell* **20**, 867-879 (2005).

Eckerdt F, Strebhardt K. Polo-like kinase 1: target and regulator of anaphase promoting complex/cyclosome dependent proteolysis. *Cancer Res* **66**, 6895-6898 (2006).

Eguren M, Manchado E, Malumbres M. Non-mitotic functions of the anaphase promoting complex. *Semin Cell Dev Biol* **22**, 572-578 (2011).

Enders GH. Mammalian interphase Cdks: dispensable master regulators of the cell cycle. *Genes Cancer* **3**, 614-618 (2012).

Erdo F, Trapp T, Mies G, Hossmann KA. Immunohistochemical analysis of protein expression after middle cerebral artery occlusion in mice. *Acta Neuropathol.* **107**, 127-136 (2004).

Fang G, Yu H, Kirschner MW. Control of mitotic transitions by the anaphase promoting complex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **354**, 1583-1590 (1999).

Formentini L, Pereira MP, Sanchez-Cenizo L, Santacatterina F, Lucas JJ, Navarro C, Martinez-Serrano A, Cuezva JM. In vivo inhibition of the mitochondrial H⁺-ATP synthase in neurons promotes metabolic preconditioning. *Embo J.* **33**, 762-778 (2014).

Foster SA, Morgan DO. The APC/C subunit Mnd2/Apc15 promotes Cdc20 autoubiquitination and spindle assembly checkpoint inactivation. *Mol Cell* **47**, 921-932 (2012).

Fry AM, Yamano H. APC/C mediated degradation in early mitosis: how to avoid spindle assembly checkpoint inhibition. *Cell Cycle* **5**, 1487-1491 (2006).

Frye JJ, Brown NG, Petzold G, Watson ER, Grace CR, Nourse A, Jarvis MA, Kriwacki RW, Peters JM, Stark H, Schulman BA. Electron microscopy structure of human APC/C -Cdh1-Emi1 reveals multimodal mechanism of E3 ligase shutdown. *Nat Struct Mol Biol* **20**, 827-835 (2013).

Fu AK, Hung KW, Fu WY, Shen C, Chen Y, Xia J, Lai KO, Ip NY. APC-Cdh1 mediates Eph A4 dependent downregulation of AMPA receptors in homeostatic plasticity. *Nat Neurosci* **2**, 181-189 (2011).

Fukushima H, Ogura K, Wan L, Lu Y, Li V, Gao D, Liu P, Lau AW, Wu T, Kirschner MW, Inuzuka H, Wei W. SCF-mediated Cdh1 degradation defines a negative feedback system that coordinates cell-cycle progression. *Cell Rep.* **4**, 803-16 (2013).

Furgason JM, Bahassi el M. Targeting DNA repair mechanisms in cancer. *Pharmacol Ther* **137**, 298-308 (2013).

Galluzzi L, Blomgren K, Kroemer G. Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. *Nat Rev Neurosci.* **10**, 481-494 (2009).

Garcia-Higuera I, Manchado E, Dubus P, Cañamero M, Mendez J, Moreno S, Malumbres M. Genomic stability and tumour suppression by the APC/C cofactor Cdh1. *Nat Cell Biol* **10**, 802-811 (2008).

Gavet O, Pines J. Activation of cyclin B1-Cdk1 synchronizes events in the nucleus and the cytoplasm at mitosis. *J Cell Biol.* **189**, 247-59 (2010).

Gieffers C, Dube P, Harris JR, Stark H, Peters JM. Three dimensional structure of the anaphase promoting complex. *Mol Cell* **7**, 907-913 (2001).

Gieffers C, Peters BH, Kramer ER, Dotti CG, Peters JM. Expression of the Cdh1 associated form of the anaphase promoting complex in postmitotic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 11317-11322 (1999).

Glotzer M, Murray AW, Kirschner MW. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**, 132-138 (1991).

Gomez-Sanchez JC, Delgado-Esteban M, Rodriguez-Hernandez I, Sobrino T, Perez de la Ossa N, Reverte S, Bolanos JP, Gonzalez-Sarmiento R, Castillo J, Almeida A. The human Tp53 Arg72Pro polymorphism explains different functional prognosis in stroke. *J Exp Med.* **208**, 429-437 (2011).

Gorr IH., Reis A, Boos D, Wühr M, Madgwick S, Jones KT., Stemmann O. Essential Cdk1 inhibitory role for separase during meiosis I in vertebrate oocytes. *Nat Cell Biol* **8**, 1035-1037 (2006).

Grallert B, Boye E. The multiple facets of the intra-S checkpoint. *Cell Cycle* **7**, 2315-2320 (2008).

Haesslein JL, Jullian N. Recent advances in cyclin dependent kinase inhibition. Purine based derivatives as anti-cancer agents. Roles and perspectives for the future. *Curr Top Med Chem* **2**, 1037-1050 (2002).

Hammond-Martel I, Yu H, Affar El B. Roles of ubiquitin signaling in transcription regulation. *Cell Signal* **24**, 410-421 (2012).

Hanna J, Finley D. A proteasome for all occasions. *FEBS Lett* **581**, 2854-2861 (2007).

Harley ME, Allan LA, Sanderson HS, Clarke PR. Phosphorylation of Mcl-1 by CDK1-cyclin B1 initiates its Cdc20-dependent destruction during mitotic arrest. *Embo J.* **29**, 2407-2420 (2010).

Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* **246**, 629-634 (1989).

Hatakeyama S, Yada M, Matsumoto M, Ishida N, Nakayama KI. U-box proteins as a new family of ubiquitin protein ligases. *J Biol Chem* **276**, 33111-33120 (2001).

Hayes MJ, Kimata Y, Wattam SL, Lindon C, Mao G, Yamano H, Fry AM. Early mitotic degradation of Nek2A depends on Cdc20 independent interaction with the APC/C. *Nat Cell Biol* **8**, 607-614 (2006).

Herrero-Mendez A, Almeida A, Fernandez E, Maestre C, Moncada S, Bolaños JP. The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. *Nat Cell Biol* **11**, 747-752 (2009).

Herrup K. Post-mitotic role of the cell cycle machinery. *Curr Opin Cell Biol.* **25**, 711-716 (2013).

Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* **67**, 425-479 (1998).

Hirai H, Kawanishi N, Iwasawa Y. Recent advances in the development of selective small molecule inhibitors for cyclin dependent kinases. *Curr Top Med Chem* **5**, 167-179 (2005).

Hirotsu M, Zhang Y, Fujita N, Naito M, Tsuruo T. NH₂-terminal BH4 domain of Bcl-2 is functional for heterodimerization with Bax and inhibition of apoptosis. *J Biol Chem.* **274**, 20415-20 (1999).

Hisanaga S, Endo R. Regulation and role of cyclin dependent kinase activity in neuronal survival and death. *J Neurochem* **115**, 1309-1321 (2010).

Hochegger H, Takeda S, Hunt T. Cyclin dependent kinases and cell cycle transitions: does one fit all? *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 910-916 (2008).

Houstek J, Pícková A, Vojtísková A, Mráček T, Pecina P, Jesina P. Mitochondrial diseases and genetic defects of ATP synthase. *Biochim Biophys Acta.* **1757**, 1400-5 (2006).

Huang J, Ikeuchi Y, Malumbres M, Bonni A. A Cdh1-APC/FMRP Ubiquitin Signaling Link Drives mGluR-Dependent Synaptic Plasticity in the Mammalian Brain. *Neuron.* **86**, 726-39 (2015).

Hunter JJ, Parslow TG. A peptide sequence from Bax that converts Bcl-2 into an activator of apoptosis. *J Biol Chem.* **271**, 8521-4 (1996).

Hurd TR, Requejo R, Filipovska A, Brown S, Prime TA, Robinson AJ, Fearnley IM, Murphy MP. Complex I within oxidatively stressed bovine heart mitochondria is glutathionylated on Cys-531 and Cys-704 of the 75-kDa subunit: potential role of CYS residues in decreasing oxidative damage. *J Biol Chem.* **283**, 24801-24815 (2008).

Izawa D, Pines J. How APC/C-Cdc20 changes its substrate specificity in mitosis. *Nat Cell Biol.* **13**, 223-33 (2011).

Jaquenoud M, van Drogen F, Peter M. Cell cycle-dependent nuclear export of Cdh1p may contribute to the inactivation of APC/C(Cdh1). *Embo J.* **21**, 6515-6526 (2002).

Javadov S, Hunter JC, Barreto-Torres G, Parodi-Rullan R. Targeting the mitochondrial permeability transition: cardiac ischemia-reperfusion versus carcinogenesis. *Cell Physiol Biochem.* **27**, 179-190 (2011).

Jeganathan KB., Malureanu L., van Deursen JM. The Rae1-Nup98 complex prevents aneuploidy by inhibiting securin degradation. *Nature* **438**, 1036-1039 (2005).

Jonas EA. Contributions of Bcl-xL to acute and long term changes in bioenergetics during neuronal plasticity. *Biochim Biophys Acta.* **1842**, 1168-78 (2014).

Jonas EA, Porter GA, Alavian KN. Bcl-xL in neuroprotection and plasticity. *Front Physiol.* **5**, 355 (2014).

Juo P, Kaplan JM. The anaphase promoting complex regulates the abundance of GLR1 glutamate receptors in the ventral nerve cord of *C. elegans*. *Curr Biol* **14**, 2057-2062 (2004).

Kawauchi T. Cdk5 regulates multiple cellular events in neural development, function and disease. *Dev Growth Differ.* **56**, 335-48 (2014).

Kimura SH, Ikawa M, Ito A, Okabe M, Nojima H. Cyclin G1 is involved in G2/M arrest in response to DNA damage and in growth control after damage recovery. *Oncogene* **20**, 3290-3300 (2001).

King TE. Preparation of succinate cytochrome c reductase and the cytochrome b824 c1 particle, and reconstitution of succinate cytochrome c reductase. *Methods Enzymol.* **10**, 216-225 (1967).

Kirby DM, Crawford M, Cleary MA, Dahl HH, Dennett X, Thorburn DR. Respiratory chain complex I deficiency: an underdiagnosed energy generation disorder. *Neurology.* **52**, 1255-64 (1999).

Kirby DM, McFarland R, Ohtake A, Dunning C, Ryan MT, Wilson C, Ketteridge D, Turnbull DM, Thorburn DR, Taylor RW. Mutations of the mitochondrial ND1 gene as a cause of MELAS. *J Med Genet.* **41**, 784-9 (2004).

Kong M, Barnes EA, Ollendorff V, Donoghue DJ. Cyclin F regulates de nuclear localization of cyclin B1 through a cyclin-cyclin interaction. *EMBO J* **19**, 1378-1388 (2000).

Korsten A, de Coo IF, Spruijt L, de Wit LE, Smeets HJ, Sluiter W. Patients with Leber hereditary optic neuropathy fail to compensate impaired oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta.* **1797**, 197-203 (2010).

Kotani T, Yoshida N, Mita K, Yamashita M. Requirement of cyclin B2, but not cyclin B1, for bipolar spindle formation in frog (*Rana japonica*) oocytes. *Mol Reprod Dev.* **59**, 199-208 (2001).

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* **22**, 6598-6609 (2003).

Krajewska M, Mai JK, Zapata JM, Ashwell KW, Schendel SL, Reed JC, Krajewski S. Dynamics of expression of apoptosis-regulatory proteins Bid, Bcl-2, Bcl-X, Bax and Bak during development of murine nervous system. *Cell Death Differ.* **9**, 145-57 (2002).

Kramer ER, Scheuringer N, Podtelejnikov AV, Mann M, Peters JM. Mitotic regulation of the APC activator proteins Cdc20 and Cdh1. *Mol Biol Cell* **11**, 1555-1569 (2000).

Krenning L, Feringa FM, Shaltiel IA, van den Berg J, Medema RH. Transient activation of p53 in G2 phase is sufficient to induce senescence. *Mol Cell.* **55**, 59-72 (2014).

Kuczera T, Stilling RM, Hsia HE, Bahari-Javan S, Irniger S, Nasmyth K, Sananbenesi F, Fischer A. The anaphase promoting complex is required for memory function in mice. *Learn Mem.* **18**, 49-57 (2010).

Laman H, Mann DJ, Jones NC. Viral encoded cyclins. *Curr Opin Genet Dev* **10**, 70-74 (2000).

Laoukili J, Alvarez-Fernandez M, Stahl M, Medema RH. FoxM1 is degraded at mitotic exit in a Cdh1 dependent manner. *Cell Cycle* **7**, 2720-2726 (2008).

Lee MS, Kwon YT, Li M, Peng J, Friedlander RM, Tsai LH. Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature.* **405**, 360-4 (2000).

Leverson JD, Joazeiro CA, Page AM, Huang H, Hieter P, Hunter T. The Apc11 RING-H2 finger mediates E2-dependent ubiquitination. *Mol Biol Cell* **11**, 2315-2325 (2000).

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* **98**, 12742-12747 (2001).

Li H, Chen Y, Jones AF, Sanger RH, Collis LP, Flannery R, McNay EC, Yu T, Schwarzenbacher R, Bossy B, Bossy-Wetzler E, Bennett MV, Pypaert M, Hickman JA, Smith PJ, Hardwick JM, Jonas EA. Bcl-xL induces Drp1-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**, 2169-74 (2008).

Li M, Zhang P. The function of APC/C-Cdh1 in cell cycle and beyond. *Cell Div* **4**, 1-7 (2009).

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* **23**, 1698-1707 (2011).

Lipkowitz S, Weissman AM. RINGs of good and evil: RING finger ubiquitin ligases at the crossroads of tumour suppression and oncogenesis. *Nat Rev Cancer* **11**, 629-643 (2011).

Littlepage LE, Ruderman JV. Identification of a new APC/C recognition domain, the A-box, which is required for the Cdh1 dependent destruction of the kinase Aurora A during mitotic exit. *Genes Dev* **16**, 2274-2285 (2002).

Liu J, Fuchs SY. Cross-talk between APC/C and CBP/p300. *Cancer Biol Ther.* **5**, 760-2 (2006).

Love S. Neuronal expression of cell cycle-related proteins after brain ischaemia in man. *Neurosci Lett.* **353**, 29-32 (2003).

Lowry OH, Rosebrough NJ, Lewis-Farr A, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* **193**, 265-275 (1951).

Lunt SY, Vander Heiden MG. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **27**, 441-64 (2011).

MacLachlan TK, Sang N, Giordano A. Cyclins, cyclin dependent kinases and Cdk inhibitors: implications in cell cycle control and cancer. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **5**, 127-156 (1995).

Maestre C, Delgado-Esteban M, Gomez-Sanchez JC, Bolaños JP, Almeida A. Cdk5 phosphorylates Cdh1 and modulates cyclin B1 stability in excitotoxicity. *EMBO J* **27**, 2736-2745 (2008).

Mailand N, Diffley JF. Cdks promote DNA replication origin licensing in human cells by protecting Cdc6 from APC/C dependent proteolysis. *Cell* **122**, 915-926 (2005).

Malumbres M. Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol.* **15**, 122 (2014).

Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, Cdks and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* **9**, 153-166 (2009).

Malumbres M, Barbacid M. Mammalian cyclin dependent kinases. *Trends Biochem Sci* **30**, 630-641 (2005).

Mansfeld J, Collin P, Collins MO, Choudhary JS, Pines J. Apc15 drives the turnover of MCC-Cdc20 to make the spindle assembly checkpoint responsive to kinetochore attachment. *Nat Cell Biol* **13**, 1234-1243 (2011).

Martin A, Odajima J, Hunt SL, Dubus P, Ortega S, Malumbres M, Barbacid M. Cdk2 is dispensable for cell cycle inhibition and tumor suppression mediated by p27Kip1 and p21Cip1. *Cancer Cell* **7**, 591-598 (2005).

Mathiesen C, Hägerhäll C. Transmembrane topology of the NuoL, M and N subunits of NADH:quinone oxidoreductase and their homologues among membrane-bound hydrogenases and bona fide antiporters. *Biochim Biophys Acta.* **1556**, 121-32 (2002).

McCollum D, Gould KL. Timing is everything: regulation of mitotic exit and cytokinesis by the men and sin. *Trends Cell Biol* **11**, 89-95 (2001).

McLean JR, Chaix D, Ohi MD, Gould K. State of the APC/C: organization, function and structure. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **46**, 118-136 (2011).

Micel LN, Tentler JJ, Smith PG, Eckhardt GS. Role of ubiquitin ligases and the proteasome in oncogenesis: novel targets for anticancer therapies. *J Clin Oncol* **31**, 1231-1238 (2013).

Mikhailov A, Shinohara M, Rieder CL. The p38 mediated stress activated checkpoint. A rapid response system for delaying progression through antephasis and entry into mitosis. *Cell Cycle* **4**, 57-62 (2005).

Miller JJ, Summers MK, Hansen DV, Nachury MV, Lehman NL, Loktev A, Jackson PK. Emi1 stably binds and inhibits the anaphase promoting complex/cyclosome as a pseudosubstrate inhibitor. *Genes Dev* **20**, 2410-2420 (2006).

Mittnacht S, Boshoff C. Viral cyclins. *Rev Med Virol* **10**, 175-184 (2000).

Moncada S, Higgs EA, Colombo SL. Fulfilling the metabolic requirements for cell proliferation. *Biochem* **446**, 1-7 (2012).

Müllers E, Silva Cascales H, Jaiswal H, Saurin AT, Lindqvist A. Nuclear translocation of Cyclin B1 marks the restriction point for terminal cell cycle exit in G2 phase. *Cell Cycle.* **13**, 2733-43 (2014).

- Murphy MP.** How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.* **417**, 1-13 (2009).
- Murray A.** Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* **116**, 221-234 (2004).
- Musacchio A, Salmon ED.** The spindle assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 379-393 (2007).
- Nakayama KI, Nakayama K.** Regulation of the cell cycle by SCF type ubiquitin ligases. *Semin Cell Dev Biol* **16**, 323-333 (2005).
- Nakayama KI, Nakayama K.** Ubiquitin ligases: cell cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer* **6**, 369-381 (2006).
- Nam HJ, van Deursen JM.** Cyclin B2 and p53 control proper timing of centrosome separation. *Nat Cell Biol.* **16**, 538-49 (2014).
- Nebreda AR.** Cdk activation by non-cyclin proteins. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 192-198 (2006).
- Nguyen TB, Manova K, Capodici P, Lindon C, Bottega S, Wang XY, Refik-Rogers J, Pines J, Wolgemuth DJ, Koff A.** Characterization and expression of mammalian cyclin B3, a prepachytene meiotic cyclin. *J Biol Chem* **277**, 41960-41969 (2002).
- Niehrs C, Acebron SP.** Mitotic and mitogenic Wnt signalling. *EMBO J* **31**, 2705-2713 (2012).
- Nilsson J, Yekezare M, Minshull J, Pines J.** The APC/C maintains the spindle assembly checkpoint by targeting Cdc20 for destruction. *Nat Cell Biol.* **10**, 1411-20 (2008).
- Nixon C, Chambers G, Ellsmore V, Campo MS, Burr P, Argyle DJ, Reid SW, Nasir L.** Expression of cell cycle associated proteins cyclin A, Cdk2, p27Kip1 and p53 in equine sarcoids. *Cancer Lett* **221**, 237-245 (2005).
- Noji H, Yasuda R, Yoshida M, Kinosita K Jr.** Direct observation of the rotation of F1-ATPase. *Nature.* **386**, 299-302 (1997).
- Ohtsuka T, Ryu H, Minamishima YA, Macip S, Sagara J, Nakayama KI, Aaronson SA, Lee SW.** ASC is a Bax adaptor and regulates the p53-Bax mitochondrial apoptosis pathway. *Nat Cell Biol.* **6**, 121-8 (2004).

Olney JW. Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* **164**, 719-721 (1969).

Papadopoulou LC, Theophilidis G, Thomopoulos GN, Tsiftoglou AS. Structural and functional impairment of mitochondria in adriamycin-induced cardiomyopathy in mice: suppression of cytochrome c oxidase II gene expression. *Biochem Pharmacol.* **57**, 481-9 (1999).

Passmore LA, Booth CR, Vénien-Bryan C, Ludtke SJ, Fioretto C, Johnson LN, Chiu W, Barford D. Structural analysis of the anaphase promoting complex reveals multiple active sites and insights into polyubiquitylation. *Mol Cell* **20**, 855-866 (2005).

Passmore LA, McCormack EA, Au SW, Paul A, Willison KR, Harper JW, Barford D. Doc1 mediates the activity of the anaphase promoting complex by contributing to substrate recognition. *EMBO J* **22**, 786-796 (2003).

Patrick GN, Zhou P, Kwon YT, Howley PM, Tsai LH. p35, the neuronal-specific activator of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) is degraded by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem.* **273**, 24057-64 (1998).

Patrick GN, Zukerberg L, Nikolic M, de la Monte S, Dikkes P, Tsai LH. Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature.* **402**, 615-22 (1999).

Pesin JA, Orr-Weaver TL. Regulation of APC/C activators in mitosis and meiosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **24**, 475-499 (2008).

Peters JM. Subunits and substrates of the anaphase promoting complex. *Exp Cell Res* **248**, 339-349 (1999).

Peters JM. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 644-656 (2006).

Pfeiffer K, Gohil V, Stuart RA, Hunte C, Brandt U, Greenberg ML, Schagger H. Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem.* **278**, 52873-80 (2003).

Pfleger CM, Kirschner MW. The KEN-box: an APC recognition signal distinct from the D-box targeted by Cdh1. *Genes Dev* **14**, 655-665 (2000).

Pfleger CM, Lee E, Kirschner MW. Substrate recognition by the Cdc20 and Cdh1 components of the anaphase promoting complex. *Genes Dev* **15**, 2396-2407 (2001).

Proctor CJ, Tsirigotis M, Gray DA. An in silico model of the ubiquitin proteasome system that incorporates normal homeostasis and age related decline. *BMC Syst Biol* **1**, 1-18 (2007).

Quintana-Cabrera R, Fernandez-Fernandez S, Bobo-Jimenez V, Escobar J, Sastre J, Almeida A, Bolaños JP. γ -Glutamylcysteine detoxifies reactive oxygen species by acting as glutathione peroxidase-1 cofactor. *Nat Commun* **3**, 1-8 (2012).

Ragan CI, Wilson MT, Darley-Usmar VM, Lowe PN. Subfractionation of mitochondria and isolation of the proteins of oxidative phosphorylation. In: *Mitochondria: A Practical Approach*. pp 79-112 (1987).

Rashidian J, Iyirhiaro GO, Park DS. Cell cycle machinery and stroke. *Biochimica et biophysica acta* **1772**, 484-493 (2007).

Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol.* **22**, 326-30 (2004).

Rieder CL, Khodjakov A. Mitosis and checkpoints that control progression through mitosis in vertebrate somatic cells. *Prog Cell Cycle Res* **3**, 301-312 (1997).

Rodier G, Coulombe P, Tanguay PL, Boutonnet C, Meloche S. Phosphorylation of Skp2 regulated by CDK2 and Cdc14B protects it from degradation by APC(Cdh1) in G1 phase. *EMBO J.* **27**, 679-91(2008).

Rodriguez-Rodriguez P, Fernandez E, Almeida A, Bolaños JP. Excitotoxic stimulus stabilizes PFKFB3 causing pentose phosphate pathway to glycolysis switch and neurodegeneration. *Cell Death Differ* **19**, 1582-1589 (2012).

Sadasivam S, DeCaprio JA. The DREAM complex: master coordinator of cell cycle dependent gene expression. *Nat Rev Cancer* **13**, 585-595 (2013).

Sakurikar N, Eichhorn JM, Chambers TC. Cyclin-dependent kinase-1 (Cdk1)/cyclin B1 dictates cell fate after mitotic arrest via phosphoregulation of antiapoptotic Bcl-2 proteins. *J Biol Chem.* **287**, 39193-39204 (2012).

Sanchez-Cenizo L, Formentini L, Aldea M, Ortega AD, Garcia-Huerta P, Sanchez-Arago M, Cuezva JM. Up-regulation of the ATPase inhibitory factor 1 (IF1) of the mitochondrial H⁺-ATP synthase in human tumors mediates the metabolic shift of cancer cells to a Warburg phenotype. *J Biol Chem.* **285**, 25308-25313 (2010).

Santamaría D, Barrière C, Cerqueira A, Hunt S, Tardy C, Newton K, Cáceres JF, Dubus P, Malumbres M, Barbacid M. Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature.* **448**, 811-5 (2007).

Santorelli FM, Tanji K, Kulikova R, Shanske S, Vilarinho L, Hays AP, DiMauro S. Identification of a novel mutation in the mtDNA ND5 gene associated with MELAS. *Biochem Biophys Res Commun.* **238**, 326-8 (1997).

Sazanov LA. The mechanism of coupling between electron transfer and proton translocation in respiratory complex I. *J Bioenerg Biomembr.* **46**, 247-253 (2014).

Schmitt E, Beauchemin M, Bertrand R. Nuclear colocalization and interaction between bcl-xL and cdk1(cdc2) during G2/M cell-cycle checkpoint. *Oncogene.* **26**, 5851-5865 (2007).

Schneider C, King RM., Philipson L. Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells. *Cell* **54**, 787-793 (1988).

Schreiber A, Stengel F, Zhang Z, Enchev RI, Kong EH, Morris EP, Robinson CV, da Fonseca PC, Barford D. Structural basis for the subunit assembly of the anaphase promoting complex. *Nature* **470**, 227-232 (2011).

Schuelke M, Krude H, Finckh B, Mayatepek E, Janssen A, Schmelz M, Trefz F, Trijbels F, Smeitink J. Septo-optic dysplasia associated with a new mitochondrial cytochrome b mutation. *Ann Neurol.* **51**, 388-92 (2002).

Schultz BE, Chan SI. Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* **30**, 23-65 (2001).

Shah K, Lahiri DK. Cdk5 activity in the brain - multiple paths of regulation. *J Cell Sci.* **127**, 2391-400 (2014).

Shepherd D, Garland PB. ATP controlled acetoacetate and citrate synthesis by rat liver mitochondria oxidising palmitoyl-carnitine, and the inhibition of citrate synthase by ATP. *Biochem Biophys Res Commun.* **22**, 89-93 (1966).

Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* **3**, 155-168 (2003).

Shiloh Y, Ziv Y. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**, 197-210 (2013).

Shou W, Seol JH, Shevchenko A, Baskerville C, Moazed D, Chen ZW, Jang J, Shevchenko A, Charbonneau H, Deshaies RJ. Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex. *Cell*. **97**, 233-44 (1999).

Silva P, Barbosa J, Nascimento AV, Faria J, Reis R, Bousbaa H. Monitoring the fidelity of mitotic chromosome segregation by the spindle assembly checkpoint. *Cell Prolif* **44**, 391-400 (2011).

Sivakumar S, Gorbsky GJ. Spatiotemporal regulation of the anaphase-promoting complex in mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **16**, 82-94 (2015).

Skaar JR, Pagano M. Cdh1: a master G0/G1 regulator. *Nat Cell Biol* **10**, 755-757 (2008).

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**, 76-85 (1985).

Song L, Rape M. Substrate specific regulation of ubiquitination by the anaphase promoting complex. *Cell Cycle* **10**, 52-56 (2011).

Soper JW, Pedersen PL. Isolation of an oligomycin-sensitive ATPase complex from rat liver mitochondria. *Methods in enzymology*. **55**, 328-333 (1979).

Spalluto C, Wilson DI, Hearn T. Evidence for centriolar satellite localization of CDK1 and cyclin B2. *Cell Cycle*. **12**, 1802-3 (2013).

Steffen W, Steuber J. Cation transport by the respiratory NADH:quinone oxidoreductase (complex I): facts and hypotheses. *Biochem Soc Trans*. **41**, 1280-7 (2013).

Stemmann O, Gorr IH, Boos D. Anaphase topsy-turvy: Cdk1 a securin, separase a CKI. *Cell Cycle* **5**, 11-13 (2006).

Sullivan M, Morgan DO. Finishing mitosis, one step at a time. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 894-903 (2007).

Sun L, Shi L, Li W, Yu W, Liang J, Zhang H, Yang X, Wang Y, Li R, Yao X, Yi X, Shang Y. JFK, a Kelch domain containing F-box protein, links the SCF complex to p53 regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 10195-10200 (2009).

Tang Z, Li B, Bharadwaj R, Zhu H, Ozkan E, Hakala K, Deisenhofer J, Yu H. Apc2 cullin protein and Apc11 RING protein comprise the minimal ubiquitin ligase module of the anaphase promoting complex. *Mol Biol Cell* 12, 3839-3851 (2001).

Teixeira LK, Reed SI. Ubiquitin ligases and cell cycle control. *Annu Rev Biochem* 82, 14.1-14.28 (2013).

Terrano DT, Upreti M, Chambers TC. Cyclin-dependent kinase 1-mediated Bcl xL/Bcl-2 phosphorylation acts as a functional link coupling mitotic arrest and apoptosis. *Mol Cell Biol*. 30, 640-656 (2010).

Thornton BR, Toczyski DP. Precise destruction: an emerging picture of the APC. *Genes Dev* 20, 3069-3078 (2006).

Tiranti V, Hoertnagel K, Carrozzo R, Galimberti C, Munaro M, Granatiero M, Zelante L, Gasparini P, Marzella R, Rocchi M, Bayona-Bafaluy MP, Enriquez JA, Uziel G, Bertini E, Dionisi-Vici C, Franco B, Meitinger T, Zeviani M. Mutations of SURF-1 in Leigh disease associated with cytochrome c oxidase deficiency. *Am J Hum Genet*. 63, 1609-21 (1998).

Toda K, Naito K, Mase S, Ueno M, Uritani M, Yamamoto A, Ushimaru T. APC/C-Cdh1 dependent anaphase and telophase progression during mitotic slippage. *Cell Div* 7, 1-15 (2012).

Toyabe S, Watanabe-Nakayama T, Okamoto T, Kudo S, Muneyuki E. Thermodynamic efficiency and mechanochemical coupling of F1-ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 108, 17951-6 (2011).

Turnell AS, Stewart GS, Grand RJ, Rookes SM, Martin A, Yamano H, Elledge SJ, Gallimore PH. The APC/C and CBP/p300 cooperate to regulate transcription and cell-cycle progression. *Nature*. 438, 690-5 (2005).

Ui-Tei K, Naito Y, Takahashi F, Haraguchi T, Ohki-Hamazaki H, Juni A, Ueda R, Saigo K. Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. *Nucleic Acids Res*. 32, 936-48 (2004).

Ullah Z, Lee CY, DePamphilis ML. Cip/Kip cyclin dependent protein kinase inhibitors and the road to polyploidy. *Cell Div* 4, 1-15 (2009).

Upreti M, Galitovskaya EN, Chu R, Tackett AJ, Terrano DT, Granell S, Chambers TC. Identification of the major phosphorylation site in Bcl-xL induced by microtubule inhibitors and analysis of its functional significance. *J Biol Chem.* **283**, 35517-35525 (2008).

van Leuken R, Clijsters L, van Zon W, Lim D, Yao X, Wolthuis RM, Yaffe MB, Medema RH, van Vugt MA. Polo-like kinase 1 controls Aurora A destruction by activating APC/C-Cdh1. *PLoS One* **4**, 1-12 (2009).

van Leuken R, Clijsters L, Wolthuis R. To cell cycle, swing the APC/C. *Biochim Biophys Acta* **1786**, 49-59 (2008).

van Roessel P, Elliott DA, Robinson IM, Prokop A, Brand AH. Independent regulation of synaptic size and activity by the anaphase promoting complex. *Cell* **119**, 707-718 (2004).

van Vugt MA, Yaffe MB. Cell cycle re-entry mechanisms after DNA damage checkpoints: giving it some gas to shut off the breaks! *Cell Cycle* **9**, 2097-2101 (2010).

van Zon W, Wolthuis RM. Cyclin A and Nek2A: APC/C-Cdc20 substrates invisible to the mitotic spindle checkpoint. *Biochem Soc Trans* **38**, 72-77 (2010).

Vander Heiden MG, Li XX, Gottlieb E, Hill RB, Thompson CB, Colombini M. Bcl-xL promotes the open configuration of the voltage-dependent anion channel and metabolite passage through the outer mitochondrial membrane. *J Biol Chem.* **276**, 19414-9 (2001).

Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* **324**, 1029-33 (2009).

Vincent I, Jicha G, Rosado M, Dickson DW. Aberrant expression of mitotic cdc2/cyclin B1 kinase in degenerating neurons of Alzheimer's disease brain. *J Neurosci.* **17**, 3588-3598 (1997).

Visintin R, Prinz S, Amon A. Cdc20 and Cdh1: a family of substrate specific activators of APC dependent proteolysis. *Science* **278**, 460-463 (1997).

Vodermaier HC. APC/C and SCF: controlling each other and the cell cycle. *Curr Biol* **14**, R787-R796 (2004).

Vodermaier HC, Gieffers C, Maurer-Stroh S, Eisenhaber F, Peters JM. TPR subunits of the anaphase promoting complex mediate binding to the activator protein Cdh1. *Curr Biol* **13**, 1459-1468 (2003).

Vucic D, Dixit VM, Wertz IE. Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **12**, 439-52 (2011).

Walker JE. The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) of respiratory chains. *Q Rev Biophys.* **25**, 253-324 (1992).

Wang J, Dye BT, Rajashankar KR, Kurinov I, Schulman BA. Insights into anaphase promoting complex TPR subdomain assembly from a Cdc26-Apc6 structure. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 987-989 (2009).

Wang Q, Su L, Liu N, Zhang L, Xu W, Fang H. Cyclin dependent kinase 1 inhibitors: a review of recent progress. *Curr Med Chem* **18**, 2025-2043 (2011).

Wang Y, Qin ZH. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis* **15**, 1382-1402 (2010).

Wang Z, Fan M, Candas D, Zhang TQ, Qin L, Eldridge A, Wachsmann-Hogiu S, Ahmed KM, Chromy BA, Nantajit D, Duru N, He F, Chen M, Finkel T, Weinstein LS, Li JJ. Cyclin B1/Cdk1 coordinates mitochondrial respiration for cell-cycle G2/M progression. *Developmental cell.* **29**, 217-232 (2014).

Wen Y, Yang S, Liu R, Brun-Zinkernagels AM, Koulen P, Simpkins JW. Transient cerebral ischemia induces aberrant neuronal cell cycle re-reentry and Alzheimer's disease-like tauopathy in female rats. *J Biol Chem.* **279**, 22684-22692 (2004).

Wharton DC, Tzagoloff A. Cytochrome oxidase from beef heart mitochondria. *Methods Enzymol.* **10**, 245-250 (1967).

White RJ, Reynolds IJ. Mitochondrial depolarization in glutamate-stimulated neurons: an early signal specific to excitotoxic exposure. *J Neurosci.* **16**, 5688-5697(1996).

Whitehurst AW, Ram R, Shivakumar L, Gao B, Minna JD, White MA. The RASSF1A tumor suppressor restrains anaphase promoting complex/cyclosome activity during the G1/S phase transition to promote cell cycle progression in human epithelial cells. *Mol Cell Biol* **28**, 3190-3197 (2008).

Willems PH, Smeitink JA, Koopman WJ. Mitochondrial dynamics in human NADH:ubiquinone oxidoreductase deficiency. *Int J Biochem Cell Biol.* **41**, 1773-82 (2009).

Yamano H, Tsurumi C, Gannon J, Hunt T. The role of the destruction box and its neighbouring lysine residues in cyclin B for anaphase ubiquitindependent proteolysis in fission yeast: defining the D-box receptor. *EMBO J* **17**, 5670-5678 (1998).

Yang Y, Mufson EJ, Herrup K. Neuronal cell death is preceded by cell cycle events at all stages of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* **23**, 2557-2563 (2003).

Yoshikawa K. Cell cycle regulators in neural stem cells and postmitotic neurons. *Neurosci Res.* **37**, 1-14 (2000).

Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **9**, 47-59 (2008).

Zancai P, Dal Col J, Piccinin S, Guidoboni M, Cariatì R, Rizzo S, Boiocchi M, Maestro R, Dolcetti R. Retinoic acid stabilizes p27Kip1 in EBV-immortalized lymphoblastoid B cell lines through enhanced proteasome-dependent degradation of the p45Skp2 and Cks1 proteins. *Oncogene.* **24**, 2483-94 (2005).

Zheng YL, Kesavapany S, Gravel M, Hamilton RS, Schubert M, Amin N, Albers W, Grant P, Pant HC. A Cdk5 inhibitory peptide reduces tau hyperphosphorylation and apoptosis in neurons. *EMBO J.* **24**, 209-20 (2005).