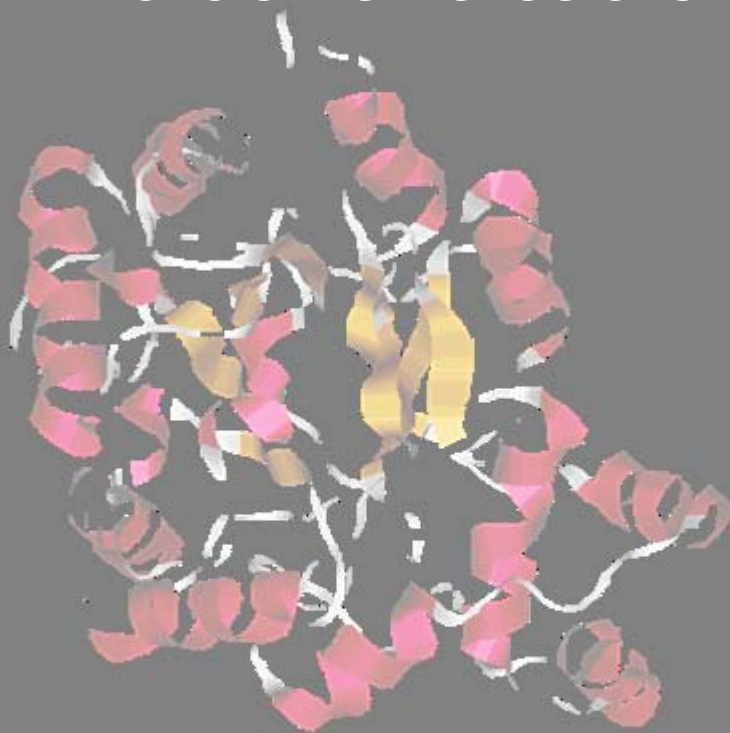




UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS



**MODIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR
LÍPIDOS ELECTRÓFILOS: SELECTIVIDAD
E IMPLICACIONES BIOLÓGICAS**



JAVIER GAYARRE NAVARRO

Madrid, 2007

Universidad Complutense de Madrid
Centro de Investigaciones Biológicas

Memoria presentada por
Javier Gayarre Navarro
para optar al título de Doctor

Trabajo realizado bajo la dirección de la Dra. María Dolores Pérez-Sala
Gozalo, en el Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC

Dra. María Dolores Pérez-Sala
Directora

Dra. Cristina Casals
Tutora

Madrid, 2007

Imagen de portada: Estructura tridimensional de la Aldosa reductasa

A mi hermano y mis padres

A mis abuelos

A Leo

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la financiación del programa de becas predoctorales I3P del CSIC, a los fondos proporcionados por el Ministerio de Educación y Ciencia (SAF-2003-03713 y SAF-2006-03489) y la Fundación la Caixa (04/179-01).

Agradecer, en primer lugar la dirección de la Dra. Pérez-Sala en este trabajo, por haberme dado la oportunidad de trabajar en investigación y haberme enseñado gran parte de lo que sé.

Ha sido fundamental también el apoyo de Maria Jesús Carrasco durante estos años. Dar las gracias a mis dos grandes compañeros y sobre todo amigos que he tenido en el laboratorio, Kostas y Fran. Ellos me han ayudado mucho durante estos años, y esta tesis es en buena parte suya. También agradecer a Bea su apoyo estos últimos meses y a las diferentes personas que han ido pasando a lo largo de estos años por el laboratorio.

No quiero olvidarme también de todo el personal del Centro de Investigaciones Biológicas que de modo diferente han contribuido en este trabajo; especialmente la Dra. Alicia Prieto, responsable del Servicio de Proteómica, Dra. Blanca Pérez, responsable del cultivo de células animales, al Dr. Francisco Javier Cañada por la ayuda en la generación de algunos reactivos.

Fuera del C.I.B, agradecer la colaboración del Dr. Jose María Rojas y a todo su equipo del Instituto de Salud Carlos III.

A todo el laboratorio del Dr. John Timms del Institute of Women's Health, University College London, por permitirme hacer dos magníficas estancias en su laboratorio durante mi tesis doctoral. En especial a Severin por su gran ayuda durante las estancias, a Carmen, a J. Sinclair, Stephane, Eli, Hong Lei....

A todos los amigos que he hecho durante la tesis en el CIB. Podría estar páginas y páginas nombrándolos, porque creo que en ningún sitio puede

sentirse uno mejor que aquí. A Marta, por su ayuda en todo momento y a Edu. A Zahira, Mari Jose, Loli, Donna, Yoli, la mancheguita en California, Eva y Carlos, las FdP, las Vidalitas, etc...

Y como gran aficionado y practicante al fútbol que soy, dar las gracias al pequeño equipo de fútbol por los buenos ratos después del trabajo que me han hecho pasar en especial a Mariano, Alfredo, Rodri, Dey, Patxi, Africa, Rubén, Elena....etc.

A todo el resto de personas que me han hecho reír, sobre todo en los momentos de fiesta, por los pasillos...

A mis compañeros de piso, a todos mis amigos de Tudela y de Coslada, por su apoyo y ayuda.

Y ahora viene la parte más importante...las personas cuyo nombre debería de aparecer en la portada de esta tesis, pero que por cuestiones formales y administrativas, me han dicho que sólo debe figurar el mío:

Leo, siempre estas ahí cuando lo necesito. Tu sonrisa y tu mirada le hacen a uno el camino más fácil. Sin ti esto no hubiera sido lo mismo. Gracias por cada rato que me das.

A toda mi familia, que han descubierto el mundo de la investigación conmigo. Por toda la ayuda y apoyo que me dan cada día.

A todos ellos **MUCHAS GRACIAS.**

En situaciones de estrés oxidativo se generan lípidos electrofilos que pueden unirse covalentemente a proteínas y modificar su estructura y función. Entre estos lípidos se encuentran las prostaglandinas con estructura ciclopentenona (cyPG). Las cyPG son metabolitos del ácido araquidónico que pueden formar aductos con tioles celulares por adición de Michael. Las cyPG 15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J₂ (15d-PGJ₂) y PGA₁ ejercen potentes efectos anti-inflamatorios, antivirales y pro- o antiproliferativos. Estos efectos son debidos en parte a la modificación de proteínas. Aunque poseen estructuras muy diversas, frecuentemente se asume que las cyPG poseen las mismas dianas y efectos biológicos. Hemos usado derivados biotinilados de estas cyPG (15d-PGJ₂-B y PGA₁-B) para identificar mediante abordajes proteómicos nuevas dianas proteicas cuya modificación pudiera contribuir a los efectos de las cyPG. Hemos observado diferencias cuantitativas y cualitativas en la unión de distintas cyPG a proteínas celulares, que están relacionadas con su diferente reactividad en presencia de glutatión, que reduce la incorporación de cyPG a proteínas. Hemos caracterizado la unión de 15d-PGJ₂ y PGA₁ a la proteína H-Ras, comprobando que estas cyPG se unen preferentemente a residuos diferentes. Por otra parte, mediante fraccionamiento subcelular y análisis posterior mediante espectrometría de masas de fracciones enriquecidas en proteínas biotiniladas, hemos identificado posibles proteínas diana de PGA₁-B entre las que hemos encontrado proteínas estructurales, enzimas glucolíticas, chaperonas y enzimas implicadas tanto en la síntesis como en la degradación de proteínas. Además hemos identificado proteínas que resultan modificadas selectivamente por 15d-PGJ₂-B o PGA₁-B. Una de las proteínas que se modificarían selectivamente por PGA₁-B es la aldosa reductasa, que desempeña un importante papel en la respuesta inflamatoria y en el desarrollo de complicaciones de la diabetes. La identificación de nuevas dianas podría contribuir a dilucidar el mecanismo de acción y el potencial terapéutico de los compuestos con estructura ciclopentenona.

	Página
Abreviaturas	1
Introducción	7
1. Generación de eicosanoides.	7
1.1 Vía de las ciclooxigenasas (COX).	9
1.1.1 Prostaglandinas.	11
1.2 Vía de las lipooxigenasas.	11
1.2.1 Leucotrienos.	11
1.2.2 Lipoxinas.	12
1.2.3 Otros eicosanoides generados por lipooxigenasas.	12
1.3 Isoprostanos.	13
1.4 Otros lípidos electrófilos.	14
2. Prostaglandinas ciclopentenonas.	15
2.1 Efectos de las cyPG.	16
2.2 Mecanismos de acción de cyPG.	18
2.2.1 Activación de PPAR.	18
2.2.2 Modificación de proteínas por cyPG.	19
3. Importancia del GSH en el efecto de las cyPG.	22
3.1 Síntesis de GSH.	22
3.2 Función detoxificante del GSH.	24
3.3 Función antioxidante del GSH.	25
3.4 Función del GSH en la regulación de la actividad de proteínas mediante glutationilación de cisteínas.	26
3.5 GSH y cyPG.	27
4. Proteínas Ras.	28
4.1 Tipos de proteínas Ras.	29
4.2 Interacción entre cyPG y las proteínas Ras.	31

5. Aldosa reductasa.	33
5.1 Características estructurales de la AR.	36
Objetivos	41
Material y métodos	45
1.1 Reactivos	45
1.1.1 Materiales de cultivo.	45
1.1.2. Reactivos de electroforesis.	45
1.1.3 Lípidos electrófilos.	45
1.1.4 Anticuerpos.	46
1.1.5 Proteínas recombinantes.	47
1.1.6 Oligonucleótidos.	47
1.1.7 Plásmidos.	47
1.1.8 Vectores de expresión.	48
1.1.9 Otros reactivos.	49
2 Métodos	50
2.1 Preparación 15d-PGJ ₂ biotinilada.	50
2.2 Cultivos celulares.	51
2.3 Tratamientos celulares.	52
2.4 Cuantificación de nitritos.	52
2.5 Transfecciones transitorias.	52
2.6 Inmunoblot.	52
2.7 Fraccionamientos subcelulares.	54
2.7.1 Fraccionamientos citosol membranas.	54
2.7.2 Obtención de extractos citosólicos y nucleares.	54
2.8 Purificación de proteínas unidas a 15d-PGJ ₂ y PGA ₁ biotiniladas mediante cromatografía en resina de avidina-agarosa.	55
2.9 Inmunoprecipitación de proteínas.	55
2.10 Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas.	56
2.10.1 Análisis de la modificación de proteínas recombinantes por lípidos electrófilos.	57

2.11 Microscopía.	58
2.12 Análisis estadístico.	59
Resultados	63
1. Caracterización de la unión de prostaglandinas ciclopentenonas biotiniladas a proteínas.	63
1.1 Las cyPG biotiniladas se unen a proteínas de forma estable.	64
1.2 Distribución intracelular de 15d-PGJ ₂ -B y PGA ₁ -B.	65
1.3 Caracterización de los efectos biológicos de los análogos biotinilados de las prostaglandinas 15d-PGJ ₂ y PGA ₁ .	67
1.4 15d-PGJ ₂ -B y PGA ₁ -B modifican en células intactas polipéptidos celulares de forma selectiva.	70
1.5 Modificación de proteínas por 15d-PGJ ₂ -B y PGA ₁ -B en lisados celulares.	72
1.6 Efecto del glutation (GSH) en la unión de cyPG a proteínas.	73
1.6.1 Efecto de la modulación de la síntesis de GSH sobre la modificación de proteínas por cyPG biotiniladas en células intactas.	73
1.6.2 Efecto del GSH en la unión de cyP a proteínas recombinantes <i>in vitro</i> .	76
2. Estudio de la modificación de la proteína H-Ras por 15d-PGJ ₂ y PGA ₁ .	80
2.1 Análisis de la interacción de 15d-PGJ ₂ y PGA ₁ con H-Ras mediante espectrometría de masas.	80
2.2 15d-PGJ ₂ y PGA ₁ modifican selectivamente distintos residuos de cisteína de H-Ras <i>in vitro</i> .	82
2.3 15d-PGJ ₂ -B y PGA ₁ -B modifican selectivamente H-Ras tanto <i>in vitro</i> como en células.	87
2.4 Estudio de la repercusión funcional de la modificación de H-Ras por cyP en células.	89

3. Estudio de las proteínas modificadas selectivamente por prostaglandinas ciclopentenonas biotiniladas en células intactas.	92
3.1 Abordajes para la obtención de fracciones enriquecidas en proteínas modificadas con 15d-PGJ ₂ -B y PGA ₁ -B.	92
3.1.1 Fraccionamiento subcelular.	92
3.1.2 Cromatografía en avidina-agarosa.	96
3.2 Identificación de proteínas marcadas con PGA ₁ -B mediante espectrometría de masas.	98
3.3 Validación de las posibles proteínas diana de PGA ₁ -B identificadas.	102
3.4 Identificación y caracterización de una diana selectiva de PGA ₁ -B: la aldosa reductasa.	106
3.5 Puesta a punto de sistemas de expresión de la aldosa reductasa en células eucariotas.	114
Discusión	119
1. Modificación de proteínas de fibroblastos NIH-3T3 por 15d-PGJ ₂ -B y PGA ₁ -B.	119
1.1 15d-PGJ ₂ -B modifica de manera más intensa proteínas celulares que PGA ₁ -B.	120
1.2 Comprobación de los efectos biológicos de 15d-PGJ ₂ -B y PGA ₁ -B.	121
1.3 El GSH regula la unión de cyP a proteínas.	122
1.4 Modificación selectiva de H-Ras por 15d-PGJ ₂ -B y PGA ₁ -B.	125
2. Estudio de la modificación selectiva de proteínas celulares de fibroblastos NIH-3T3 por 15d-PGJ ₂ -B o PGA ₁ -B.	129
2.1 Proteínas modificadas por PGA ₁ -B.	131
2.2 PGA ₁ -B modifica selectivamente a la aldosa reductasa.	134

Conclusiones 139

Bibliografía 143

Anexo: Publicaciones relacionadas con la tesis 169

ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
ADP	Adenosín difosfato
AKR	Aldo-keto-reductasas
AP-1	Proteína activadora 1
AR	Aldosa reductasa
ARE	Elementos de respuesta antioxidante
ATP	Adenosín trifosfato
ATPasa	Enzima que hidroliza ATP a ADP
BicAm	Bicarbonato amónico
BLT	receptores para el LTB ₄
BSO	Butionina sulfoximina
CK	Citoquinas
CoA	Coenzima A
COX	Ciclooxigenasa
cyP	Prostanoides con estructura ciclopentenona
CyPG	Prostaglandinas ciclopentenonas
DAG	Diacilglicerol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Dipeptidasa
DTT	ditiotreitol
E	Eluido
ECL	Sustrato quimioluminiscente
EDTA	Disodio etilenodiaminatetraacetato
EETs	Ácidos epoxieicosatrienoicos
EF	Factor de elongación
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGTA	Ácido etileno-bis(oxietilenonitrilo)tetraacético
ERK	Proteína kinasa regulada por señales extracelulares
GAPDH	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
GAPs	Proteínas activadoras de GTPasa

GCL	Glutamato cisteína ligasa
GDP	Guanosín difosfato
GEF	Factores intercambiadores de nucleótidos de guanina
GS	Glutation sintetasa
GSH	Glutation reducido
GSSG	Glutation oxidado
GSTs	Glutation S-transferasas
GST-RBD	Dominio de unión de Raf a GTP-Ras fusionado a GST
GTP	Guanosín trifosfato
GTPasa	Enzima que hidroliza el GTP a GDP
HA	Epítipo de la hemaglutinina
HETEs	Ácidos hidroxieicosatetraenoicos
HETrE	Ácido hidroxieicosatrienoico
HNE	4-hidroxi-trans-2-nonenal
HODE	Ácido hidroxioctadecanoico
HPETE	Ácido hidroperoxieicosatetranoico
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
HSF-1	Factor de choque térmico 1
HSP	Proteína de choque térmico
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
IEF	Isoelectroenfoque
I κ B	Inhibidor del factor de transcripción NF- κ B
IP	Inmunoprecipitación
LC	Cromatografía líquida
LOX	Lipooxigenasa
LTs	Leucotrienos
MALDI-TOF	Ionización/desorción mediante láser, asistida por matriz - tiempo de vuelo
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MS	Espectrometría de masas
MRP	Proteína de resistencia a drogas
m/z	Cociente masa/carga
NAC	N-acetil-cisteína

NADH	Nicotín-adenín-dinucleótido
NADPH	Nicotín-adenín-dinucleótido fosfato
NFAT	Factor nuclear de células T activadas
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NR	Fracción no retenida
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
NP-40	Nonidet P-40
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Fosfato tampón salino
PG	Prostaglandinas
PGA ₁	Prostaglandina A ₁
PGA ₁ -B	Prostaglandina A ₁ biotinilada
pI	Punto isoeléctrico
PI3K	Fosfatidil-inositol-3-kinasa
PKC	Proteína kinasa C
PLA ₂	Fosfolipasa A ₂
PPAR	Receptor activado por inductores de la proliferación peroxisomal.
PTP1B	Proteína tirosín fosfatasa 1B
RMC	Células mesangiales de rata
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
SDS	Dodecil sulfato de sodio
S.E.M.	Error estándar de la media
STAT-1	Transductor de señal y activador de transcripción 1
S100	Fracción citosólica
TBS	Tris tampón salino
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamina
TXs	Tromboxanos
WB	Western blot
wt	Proteína o DNA salvaje
15d-PGJ ₂	Prostaglandina 15-desoxi-Δ ^{12,14} -PGJ ₂
15d-PGJ ₂ -B	Prostaglandina 15-desoxi-Δ ^{12,14} -PGJ ₂ biotinilada

1D/2D

Electroforesis en 1 dimensión/ 2 dimensiones

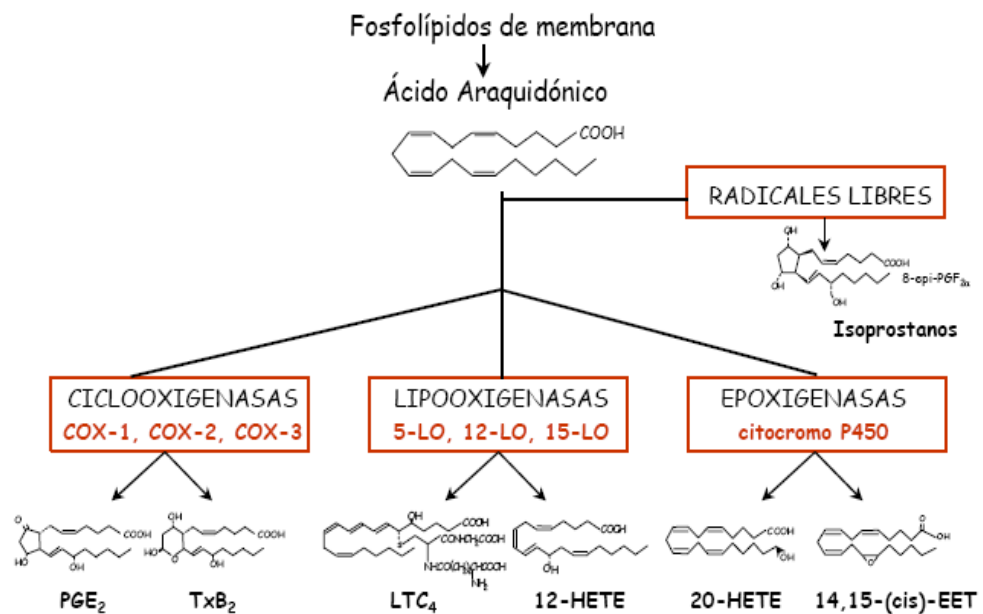
Las prostaglandinas con estructura ciclopentenona, son eicosanoides generados a partir del ácido araquidónico. Algunos eicosanoides son lípidos electrófilos y desempeñan un papel fundamental en procesos fisiopatológicos tales como la inflamación o el estrés oxidativo. Entre ellos se encuentran los prostanoides con estructura ciclopentenona (cyP), que pueden formar aductos covalentes con residuos de cisteínas en proteínas mediante un proceso denominado adición de Michael. En estudios farmacológicos, los cyP han mostrado potentes efectos protectores en modelos de inflamación o de daño tisular. Uno de los principales mecanismos de efectos anti-inflamatorios es la modificación covalente de cisteínas presentes en proteínas implicadas en la modulación de la inflamación, como NF- κ B y AP-1. En los últimos años, ha despertado un gran interés la identificación de posibles proteínas diana de los prostanoides electrófilos, cuya modificación pudiera estar implicada en sus efectos beneficiosos y que podrían constituir nuevas dianas terapéuticas.

1. GENERACIÓN DE EICOSANOIDES.

Los eicosanoides (del griego *eicosa* = “veinte”) engloban toda una serie de mediadores lipídicos derivados del ácido araquidónico (AA), ácido graso poli-insaturado de 20 átomos de carbono. Entre ellos se encuentran compuestos de potente actividad biológica como las prostaglandinas (PGs), tromboxanos (TXs), leucotrienos (LTs) y lipoxinas (Funk, 2001). El AA se ingiere en la dieta o se deriva de la metabolización de dos ácidos grasos esenciales de 18 átomos de carbono, el ácido linoleico y el ácido α -linolénico. El AA se almacena formando parte de los glicerofosfolípidos de membrana, esterificado en la posición 2 y se libera junto al lisofosfolípido correspondiente en respuesta a distintos estímulos físicos, químicos o mecánicos que pueden variar de un tipo celular a otro. En respuesta a estos estímulos se activan varias fosfolipasas, en concreto la fosfolipasa A₂ (PLA₂) que libera el AA de las membranas celulares. De entre las diferentes isoformas existentes de esta enzima, la PLA₂ citosólica (cPLA₂) es la que está principalmente involucrada en la liberación de AA. La concentración de AA libre intracelular en estado de reposo es muy baja y está controlada parcialmente por dos actividades enzimáticas que lo

reincorporan a los lípidos de membrana: la araquidonil-coenzima A sintasa (araquidonil CoA sintasa) y la araquidonil-CoA transferasa. La primera realiza la esterificación del ácido graso con el coenzima-A y la segunda añade el éster CoA a la posición 2 de un lisofosfolípido que suele ser la lisofosfatidilcolina o el lisofosfatidilinositol. Sin embargo, las características moleculares del AA y en particular la presencia de cuatro dobles enlaces en posición *cis* lo hacen susceptible de reaccionar con la molécula de oxígeno. Esto puede ocurrir de manera no enzimática, contribuyendo al estrés oxidativo mediante la formación de isoprostanos (Roberts, 2005), o a través de tres vías diferentes: la vía de las ciclooxigenasas (COX) que da lugar a compuestos como las PGs y los TXs, la vía de las lipooxigenasas (LO) (Kuhn, 2005) que dan lugar a los ácidos hidroxieicosatetraenicos (HETEs) y a los leucotrienos y las epoxigenasas o citocromos P450 que originan ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs) e isómeros de los HETEs. Estas diferentes vías de señalización celular se encuentran distribuidas de forma variable en los diferentes tipos celulares y se activan en respuesta a estímulos de naturaleza variada transformando el AA a eicosanoides, metabolitos que ejercen potentes acciones biológicas de amplio espectro.

Tanto las PG como los leucotrienos pueden tener marcados efectos pro-inflamatorios y dar lugar a la vasodilatación, edema, fiebre, dolor, etc. Algunos isoprostanos pueden contribuir al daño oxidativo induciendo una modificación y agregación anómala de proteínas y/o ejercer efectos anti-inflamatorios (Musiek, 2005a). Otros eicosanoides, como las prostaglandinas ciclopentenonas (Straus, 2001) y las lipoxinas ejercen también efectos anti-inflamatorios, como la inhibición de la generación de citoquinas pro-inflamatorias y de la quimiotaxis y la transmigración de los neutrófilos y la estimulación de su fagocitosis por parte de monocitos-macrófagos. Así pues, los eicosanoides desempeñan importantes papeles fisiológicos y además de su papel en inflamación, están implicados en la fisiopatología de la diabetes, cáncer, arteriosclerosis e hipertensión (Capdevila, 2001).



Esquema 1. Metabolismo del ácido araquidónico. Esquema donde se muestran algunos de los productos principales de la vía de las ciclooxygenasas (COX), lipooxygenasas (LOX) y epoxigenasas.

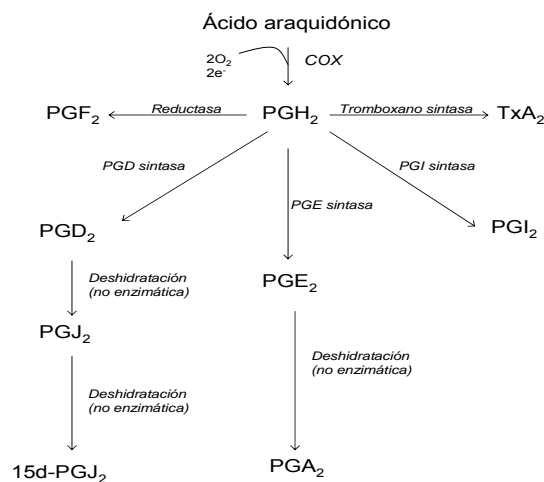
1.1 Vía de las ciclooxygenasas (COX).

El ácido araquidónico, por acción de las ciclooxygenasas, da lugar a compuestos endoperóxidos cíclicos inestables como la PGG₂ y la PGH₂, que por vía enzimática dan lugar a otros metabolitos como las prostaglandinas PGF_{2α}, PGE₂, PGI₂ (prostaciclina), PGD₂, PGA₂ y tromboxano A₂ (TXA₂) (Samuelsson, 1979). La tromboxano sintasa se ha encontrado principalmente en plaquetas y macrófagos, la prostaciclina sintasa en células endoteliales, la PGF sintasa en útero y la PGD sintasa en cerebro y mastocitos (Funk, 2001).

Se han descrito tres isoformas diferentes de ciclooxygenasas: COX-1, 2 y 3. La COX-1 es la forma constitutiva de la enzima y se encuentra presente en casi todos los tejidos, aunque sus niveles de expresión son más elevados en el

estómago, riñón, células endoteliales y plaquetas. La activación de COX-1 tiene varias funciones fisiológicas, como por ejemplo la producción de prostaciclina (PGI_2 y PGI_3), que cuando son liberadas por el endotelio son antitrombogénicas y cuando se liberan por la mucosa gástrica son citoprotectoras. La COX-2 es una isoenzima inducible que puede ser expresada prácticamente por cualquier célula o tejido como respuesta a citoquinas proinflamatorias, promotores tumorales o factores de crecimiento. La estructura de la COX-2, se asemeja bastante a la de la COX-1, existiendo pequeñas diferencias en el lugar de acoplamiento del ácido araquidónico. El sitio activo de la COX-2 es de tamaño algo superior, y puede así acomodar estructuras de mayor tamaño que la COX-1. Ambas enzimas, tienen pesos moleculares idénticos de 71 kDa y una homología estructural del 60% (Vane, 1998).

En los últimos años se ha descrito una tercera isoforma de COX, la ciclooxigenasa 3 (COX-3) (Willoughby, 2006), que se ha localizado en el sistema nervioso central y en la aorta humana principalmente. Se genera por procesamiento alternativo del gen codificante para COX-1. Se ha comprobado que posee un 80 % menos de actividad ciclooxigenasa que la COX-1 (Berenbaum, 2004).



Esquema 2. Vía de la COX. Síntesis de prostaglandinas y tromboxanos.

1.1.1 Prostaglandinas.

Las prostaglandinas son eicosanoides que pueden ejercer efectos autocrinos o paracrinis, al unirse a receptores específicos acoplados a proteínas G con siete dominios transmembrana. Así, se han descrito cuatro receptores para la PGE₂ (EP₁-EP₄), dos en el caso de la PGD₂ (DP₁ y DP₂) y un tercero que se ha descrito recientemente, el CRTH₂ que incluye como ligandos, además de la PGD₂, al TXA₂ y a la indometacina, una droga no esteroidea con efectos anti-inflamatorios (Sandig, 2006). También se ha descrito un receptor al que se une la PGF₂, PGI₂ y tromboxano A₂ (FP, IP y TP, respectivamente) (Narumiya, 2001). Algunas prostaglandinas pueden deshidratarse en un proceso en el cual no media ninguna enzima dando lugar a las prostaglandinas ciclopentenonas (cyPG).

Ciertas prostaglandinas ciclopentenonas poseen la capacidad de unirse a receptores nucleares como peroxisome-proliferator activated-receptors (PPAR- γ) (Forman, 1995) y regular los procesos inflamatorios (Zingarelli, 2005) y el metabolismo lipídico. Las cyPG también pueden actuar por mecanismos independientes de receptor, como se comentará más adelante.

Así pues, podríamos concluir comentando que los prostanoideos son potentes mediadores y moduladores de la inflamación y coagulación (Tilley, 2001), reguladores del tono vascular y con una importante implicación en procesos reproductivos (Gibb, 1998).

1.2 Vía de las lipooxigenasas.

1.2.1 Leucotrienos

El ácido araquidónico puede ser metabolizado por la 5-LO formando el ácido 5-hidroperoxieicosatetranoico (5-HPETE) y el leucotrieno LTA₄. El LTA₄ mediante la LTA₄ hidrolasa da lugar al LTB₄, un potente quimioatrayente de

neutrófilos (Harvath, 1991) y estimulador de la adhesión de leucocitos sobre las células endoteliales (Eriksson, 2004). El LTA_4 puede ser también convertido por la LTC_4 sintasa en LTC_4 , y este puede dar lugar a su vez a LTD_4 y LTE_4 . Los leucotrienos son sintetizados principalmente en células inflamatorias como leucocitos polimorfonucleados, macrófagos y mastocitos. Sus efectos biológicos dependen de su interacción con receptores específicos. Se han caracterizado cuatro receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G. Hay dos receptores para el LTB_4 , el BLT1 que es el de alta afinidad y el BLT2 de baja afinidad (Tager, 2003), y dos receptores para el LTC_4 , LTD_4 y LTE_4 (Kanaoka, 2004). También se ha descrito que el LTB_4 puede interactuar con el receptor nuclear PPAR- α e inducir la expresión de genes implicados en la β -oxidación de ácidos grasos (Latruffe, 1997). Los leucotrienos son vasoconstrictores, broncoconstrictores y mediadores en los procesos inflamatorios.

1.2.2 Lipoxinas

Las lipoxinas A_4 y B_4 son sintetizadas a partir del 5-epoxitetraeno por la acción de la 15-LO, 5-LO y LXA_4 y LXB_4 hidrolasas respectivamente o por interacciones de la 5-LO y 12-LO. Existe una tercera vía de formación de lipoxinas (Serhan, 1999) cuyos productos principales son la 15-epi- LXA_4 y 15-epi-15- LXB_4 . Ambas son formadas por acción de la 5-LO durante la fase de resolución de la inflamación. Por otra parte, cuando la aspirina acetila el sitio activo de la COX-2, ésta transforma el ácido araquidónico en ácido 15(*R*)-hidroxieicosatetraenoico (15(*R*)-HETE), que cuando es liberado por las células endoteliales y epiteliales es transformado por la 5-LO en los productos anteriormente descritos (15-epi- LXA_4 y 15-epi-15- LXB_4).

1.2.3. Otros eicosanoides generados por lipooxigenasas.

Las lipooxigenasas también pueden actuar sobre el carbono 18 del ácido linoleico dando lugar al ácido 13-hidroxióctadecanoico (13-HODE). También la 15-LO puede catalizar la transformación del ácido dihomo- γ -linoleico

(DGLA) al ácido 15 hidroxieicosatrienoico (15-HETrE). Estos compuestos poseen efectos anti-proliferativos y anti-inflamatorios actuando en las cascadas de señalización activadas por la proteína kinasa C (PKC) (Ziboh, 2002).

1.3 Isoprostanos.

Los isoprostanos son eicosanoides que son formados por peroxidación de ácido araquidónico debido a la acción de radicales libres (Milne, 2006; Montuschi, 2007). A diferencia de las prostaglandinas, no requieren de la acción de la COX para su formación, y son formados *in situ*, esterificados a fosfolípidos, y adquieren su forma libre por la acción de fosfolipasas.

Cuando los radicales libres atacan al ácido araquidónico se forman una serie de intermediarios que son reducidos a formas químicamente estables denominadas F₂-isoprostanos. Entre ellos, podemos destacar las series 5-, 8-, 12-, 15- F₂ isoprostanos dependiendo de la localización de su grupo hidroxilo (Morrow, 2000). Dependiendo de la localización del anillo ciclopentano, pueden formarse otros isoprostanos de tipo D₂, E₂, A₂, I₂ o isotromboxanos. Algunos isoprostanos también pueden deshidratarse dando lugar a prostanoides electrófilos con estructura ciclopentenona (Roberts, 2002). Los isoprostanos están implicados en enfermedades vasculares, así como en múltiples patologías relacionadas con el estrés oxidativo y la peroxidación lipídica (Musiek, 2005c). En concreto, se ha visto, que la serie de isoprostanos 15-F(2) y E(2) median en procesos de vasoconstricción. 15-F(2t)-isoprostanos inducen mitogénesis en células de la musculatura lisa y adhesión de monocitos en células endoteliales (Cracowski, 2006).

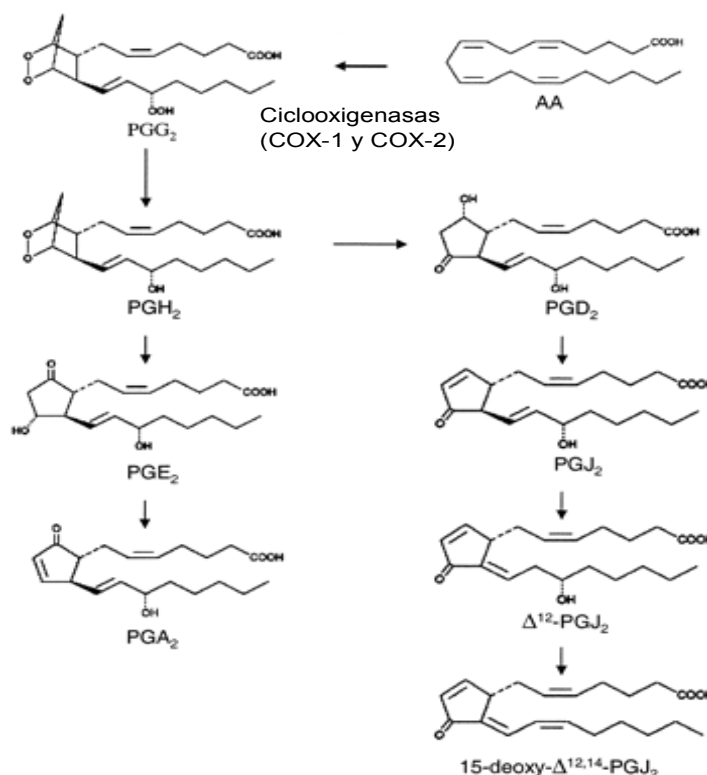
1.4 Otros lípidos electrófilos

En situaciones de inflamación y estrés oxidativo pueden generarse otra serie de mediadores lipídicos que pueden derivar del AA o de otros ácidos grasos poliinsaturados, algunos de los cuales poseen grupos carbonilos insaturados con capacidad para formar aductos con grupos tioles. Entre estos compuestos cabe destacar los ácidos 5- y 15- eicosatetranoico, los ácidos 9- y 13-octadienoico (Shiraki, 2005), varias 15-keto-prostaglandinas, fosfolípidos epoxiciclopentanos (Birukov, 2004; Subbanagounder, 2002) y neuroprostanos (Musiek, 2005b). Estos lípidos actúan a través de varios mecanismos, muchos de ellos desconocidos. Por otro lado, el papel de aldehidos α,β -insaturados como el 4-hidroxi-nonenal (HNE) y la acroleína está muy estudiado. Se ha comprobado que son productos generados por la peroxidación lipídica y pueden reaccionar tanto con grupos tioles mediante adición de Michael como con grupos amino formando bases de Schiff.

Todos estos compuestos poseen una gran variedad de efectos biológicos (Dianzani, 2003; Kehrer, 2000). En diversos estudios, se ha observado que concentraciones bajas (nanomolares) de estos compuestos ejercen un efecto protector frente a estrés oxidativo, y a concentraciones altas (micromolares) pueden desencadenar apoptosis (Ceaser, 2004). Compuestos como el HNE son capaces de reaccionar con proteínas sensibles a la modificación por cyPG (Levonen, 2004; Moos, 2003).

2. PROSTAGLANDINAS CICLOPENTENONAS

Las prostaglandinas ciclopentenonas (cyPG) son eicosanoides endógenos formados por deshidratación espontánea de otras prostaglandinas. Las prostaglandinas de la serie A se forman por deshidratación de la PGE, mientras que las prostaglandinas de la serie J se forman por deshidratación de la PGD₂. Las cyPG han sido detectadas en múltiples fluidos biológicos y tejidos (Straus, 2001). PGA₁ y PGA₂ fueron descubiertas en plasma seminal y en riñón respectivamente, y fueron identificadas como productos de deshidratación de derivados de PGE *in vitro* (Granström, 1980). Otros eicosanoides derivados de la PGD₂ fueron identificados en fluidos biológicos como la 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂, la cual fue generada a partir de PGD₂ en presencia de albúmina (Fitzpatrick, 1983), y Δ^{12} -PGJ₂ fue localizada al incubar PGD₂ en presencia de plasma humano (Kikawa, 1984) y también fue localizada en orina humana (Hirata, 1988).



Esquema 3. Generación de algunas prostaglandinas ciclopentenonas.

2.1 Efectos de las cyPG.

La característica principal de las cyPG es la presencia en su estructura de carbonos electrófilos altamente reactivos. Esta estructura particular fue identificada como un factor importante para los efectos biológicos de estas cyPG. Todas ellas tienen en común un grupo carbonilo α,β -insaturado en el anillo ciclopentano. Algunas prostaglandinas ciclopentenonas, como la 15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ (15d-PGJ₂) y la Δ^{12} -PGJ₂, poseen una estructura de dienona con dos carbonos electrófilos. Entre las principales acciones de estas prostaglandinas destacan sus efectos antitumorales (Kato, 1986). Las cyPG inhiben el crecimiento de algunas líneas celulares transformadas (Ikai, 1987). Esta inhibición está frecuentemente asociada a una inducción de la apoptosis (Kim, 1993). Sin embargo, se ha comprobado que en algunos tipos celulares, algunas cyPG como la 15d-PGJ₂ pueden inducir proliferación, como es el caso de células mesangiales (Rovin, 2002), fibroblastos NIH-3T3 (Oliva, 2003) y células de cáncer de colon (Chinery, 1999). En algunos modelos experimentales, las cyPG han mostrado efectos bifásicos, a concentraciones bajas en el rango nanomolar, se ha visto que ejercen efectos protectores sobre proliferación (Matsuo, 2004; Nencioni, 2003) y efectos citotóxicos a niveles altos (Musiek, 2005b).

El estudio de los efectos biológicos de estos compuestos ha mostrado efectos protectores en modelos celulares y animales en situaciones de inflamación y daño tisular. Se han descrito efectos protectores de 15d-PGJ₂ frente a daño renal por isquemia reperfusión (Lin, 2006), en modelos de artritis (Kawahito, 2000), de enfermedades inflamatorias intestinales (Su, 2001; Wada, 2000), de Alzheimer (Combs, 2000; Muñoz, 2005), de encefalomiелitis experimental autoinmune (Diab, 2002), etc. En algunos casos, los efectos protectores están relacionados con la inhibición de NF- κ B y AP-1 y con la capacidad de cyPG para modificar residuos de cisteína de proteínas (Pérez-Sala, 2003).

Otro de los efectos de las cyPG más extendido es la inducción de respuesta de choque térmico, ya que ésta desempeña un papel protector frente a diferentes tipos de estrés. Las cyPG inducen la activación del factor de choque térmico 1

(HSF-1) y la expresión de la proteína de choque térmico 70 kDa (HSP 70) (Amici, 1992) generando un efecto citoprotector durante la hipertermia y la infección viral (Santoro, 1997). PGA_1 está implicada en la asociación de la inducción de la respuesta de choque térmico con el aumento de la expresión de la subunidad inhibidora del factor de transcripción NF- κ B, I κ B α . 15d-PGJ₂ y PGA_1 inducen la expresión de I κ B α (Castrillo, 2000; Rossi, 2000). Estos fenómenos podrían contribuir a los efectos protectores de las cyPG.

Las cyPG también se han visto implicadas en la regulación del estado redox. Se ha comprobado que concentraciones micromolares bajas de 15d-PGJ₂ incrementan las concentraciones intracelulares de GSH. Este efecto está mediado por un incremento en la expresión de la enzima glutamato-cisteína ligasa (Levonen, 2001), mientras que las cyPG a concentraciones más altas ejercen una inhibición. En otros casos se ha observado que inducen estrés oxidativo (Hortelano, 2000; Kondo, 2001). Por ejemplo, en algunos tipos celulares como los macrófagos, la generación de anión superóxido aumenta después del tratamiento con 15d-PGJ₂, y esto, en presencia de altas concentraciones de NO, da lugar a la formación de peroxinitrito que causa disfunciones mitocondriales y apoptosis. La inducción de estrés oxidativo también se ha visto implicada en el aumento en la expresión de la hemo oxigenasa (Alvarez-Maqueda, 2004) que puede ser también debido a la modificación directa de cisteínas de Keap1 (Itoh, 2004), activando así a Nrf2.

Uno de los hallazgos más relevantes en el estudio de los efectos de cyPG ha sido su identificación como ligandos del receptor nuclear “peroxisome-proliferator activated-receptor” (PPAR- γ) (Forman, 1995), el cual regula el metabolismo de lípidos y la diferenciación de adipocitos. Muchos de los agonistas de PPAR han sido implicados como reguladores negativos de la inflamación. En algunos modelos animales se ha observado que la activación de PPAR podría contribuir a los efectos de cyPG (Colville-Nash, 1998; Nosjean, 2002).

Existe un cierto debate en cuanto a la relevancia fisiológica de los efectos protectores de las cyPG, debido a que se precisan concentraciones más altas que las detectadas en sistemas biológicos. Una de las causas de esta discrepancia podría ser la elevada reactividad de estos compuestos a la hora de reaccionar con tioles celulares, de forma que los niveles de cyPG detectables son muy inferiores a los niveles totales. Concentraciones en el rango micromolar inhiben la proliferación celular e inducen apoptosis (Gilroy, 2004; Trivedi, 2006), mientras que concentraciones inferiores a 0,1 μM de 15d-PGJ₂ inducen quimiotaxis de eosinófilos (Kobayashi, 2005) e inhiben la expresión de IL-1 β (Berry, 2005).

Durante estos últimos años se ha estudiado la generación de prostaglandinas endógenas en modelos de inflamación. Se han detectado concentraciones en el rango nanomolar de 15d-PGJ₂ y PGD₂ en exudados pleurales de ratones tratados con carragenina (Gilroy, 1999), así como concentraciones variables en el rango micromolar en macrófagos pre-tratados con selenio y/o lipopolisacárido (LPS) (Vunta, 2007). También se han observado concentraciones nanomolares en células neuronales estimuladas con glutamato (Liang, 2005).

El posible planteamiento del uso terapéutico de dichos compuestos y el desarrollo de fármacos basados en la estructura ciclopentenona, hacen necesaria la identificación de las dianas de cyPG y el estudio de su selectividad.

2.2 Mecanismos de acción de cyPG.

2.2.1 Activación de PPAR.

Algunas cyPG, como 15d-PGJ₂ y PGA₁ pueden actuar como agonistas de PPAR (α , β y γ) (Bishop-Bailey, 2003). Se ha propuesto que 15d-PGJ₂ sería capaz de activar PPAR α y γ , reducir, por ejemplo, la activación de macrófagos por inhibición de genes pro-inflamatorios como iNOS (Ricote, 1998) o la liberación de citoquinas pro-inflamatorias por los monocitos (Jiang, 1998). El

PPAR activado puede interferir con la actividad de otros factores de transcripción como NF- κ B, AP-1, STAT-1 y NFAT por competición con cantidades limitantes de coactivadores (Li, 2000), o en la modulación en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (Delerive, 1999). Estudios moleculares han demostrado que PPAR γ puede interferir *in vitro* en vías en la que interviene NF- κ B, por interacción física con la subunidades p50 y p65 (Chung, 2000). Al igual que PPAR γ , PPAR α puede inhibir AP-1 por interacción con c-Jun (Delerive, 1999). La activación de promotores de genes codificantes de proteínas pro-inflamatorias como la iNOS depende de la interacción entre miembros de varias familias como AP-1, STAT o NF- κ B. 15d-PGJ₂ podría inhibir la interacción de estos factores de transcripción con los promotores en una vía dependiente de PPAR γ (Ricote, 1998).

Por otro lado, se ha observado apoptosis y muerte celular en modelos celulares deficientes en PPAR γ al ser tratados con cyPG (Erl, 2004). Además, algunos efectos de cyPG se producen en presencia de antagonistas de PPAR (Sánchez-Gómez, 2004). Esto podría sugerir que ciertos efectos de estos prostanoides podrían ser independientes de la activación de PPAR.

2.2.2 Modificación de proteínas por cyPG.

Las cyPG pueden formar aductos covalentes con tioles celulares, como tioles libres de residuos de cisteína en proteínas y glutatión (GSH) a través de adición de Michael (Noyori, 1993). La modificación de proteínas por cyPG podría alterar la funcionalidad de las mismas. El GSH, es uno de los tioles celulares más importantes, y se ha postulado como uno de los factores más importantes en la regulación de los efectos de las cyPG.

Las primeras evidencias de la unión covalente de cyPG a proteínas se obtuvieron usando prostaglandinas radiactivas. En estos estudios se descubrió que dichos compuestos podían tener diferente distribución intracelular y distinta estabilidad en la unión a estructuras polipeptídicas (Narumiya, 1987). Más tarde, en experimentos llevados a cabo con células incubadas con

análogos biotinilados de cyPG, procesados mediante Western blot con estreptavidina peroxidasa, se observó la presencia de polipéptidos celulares que habían incorporado biotina a sus estructuras (Parker, 1995). Aunque la modificación de tioles de bajo peso molecular por cyPG parece ser un fenómeno reversible, la modificación de proteínas es considerada irreversible en condiciones fisiológicas (Noyori, 1993). Nuestro grupo evidenció por primera vez la interacción entre cyPG y una proteína conocida. Pudimos observar la unión de 15d-PGJ₂ biotinilada a la subunidad p50 del factor de transcripción NF-κB (Cernuda-Morollón, 2001). La estabilidad de estos aductos se ha relacionado con la reducida movilidad molecular de los mismos en biomatrices de polímeros. Sin embargo, la estabilidad podría también depender de la estructura de cyPG. Desde los primeros estudios se observó que las cyPG no se unían de manera similar a todas las proteínas celulares.

Algunas de las proteínas modificadas por estos prostanoides, están implicadas en la modulación de la inflamación como NF-κB (Straus, 2000). Se ha postulado el efecto inhibitorio de cyPG sobre la actividad de AP-1 en diversos estudios (Fahmi, 2001; Ricote, 1998). Recientemente, nuestro grupo ha demostrado mediante análisis de espectrometría de masas y empleando derivados biotinilados de 15d-PGJ₂ tanto *in vitro* como en células, que 15d-PGJ₂ puede unirse covalentemente a la subunidad de c-Jun a través de la cisteína 269 y a la subunidad c-Fos inhibiendo la unión a DNA de ambas. También es interesante destacar la modificación de proteínas encargadas del mantenimiento del estado redox de la célula, como la tioredoxina (Shibata, 2003), o la tioredoxina reductasa (Moos, 2003). También podemos encontrar proteínas fundamentales para el desarrollo y proliferación celular como H-Ras (Oliva, 2003). Es interesante destacar también la modificación de Keap1 por cyPG (Itoh, 2004; Levonen, 2004). Keap1 es una proteína citosólica que puede encontrarse unida al factor de transcripción Nrf2 manteniéndolo inactivo. Nrf2 es fundamental en la activación de genes cuyos promotores contienen los llamados “elementos de respuesta antioxidante” (ARE) y se activan en situaciones de estrés oxidativo y en presencia de compuestos electrófilos en la célula. Keap1, no sólo mantiene inactivo al factor de transcripción Nrf2, sino que también actúa de señal para la ubiquitinación del mismo y su posterior

degradación por el proteasoma (Zhang, 2003). Keap1 es una proteína rica en cisteínas, de las cuales, la cisteína 273 y la 288 parecen ser críticas en la regulación de la actividad de Nrf2. Se ha visto recientemente que Keap1 puede ser modificada por compuestos electrófilos generados por oxidación lipídica, incluyendo cyPG. La modificación de grupos tioles de Keap1 induce la disociación de Nrf2 y la activación de los ARE (Levonen, 2004; Wakabayashi, 2004). Por otro lado, el uso de derivados biotinilados de 15d-PGJ₂ ha demostrado la formación de aductos con Keap1 (Itoh, 2004; Levonen, 2004), aunque todavía no han sido identificadas las cisteínas implicadas en dicha interacción. De este modo, la activación de Nrf2 por cyPG tiene importantes implicaciones en la inducción de la respuesta antioxidante, en la generación de enzimas de fase 2 y en la modulación de la inflamación.

Es importante destacar, que no todas las cisteínas presentes en la estructura de las proteínas son susceptibles de modificación por cyPG. En dicha modificación, están implicados una serie de factores, como la estructura de la proteína diana y la naturaleza de los aminoácidos que rodean la cisteína, que estabilizan el aducto proteína-cyPG. La presencia de uno o dos carbonos electrófilos en la estructura de las cyPG, podría conllevar que en la modificación de proteínas por prostanoídes electrófilos existiera una cierta selectividad. Estudios recientes en nuestro grupo han demostrado que el patrón de modificación de polipéptidos celulares por iodoacetamida biotinilada y 15d-PGJ₂-B es diferente (Sánchez-Gómez, 2004), lo cual indica que la reactividad de las cyPG es diferente de la de un reactivo general de tioles. Es importante destacar la presencia de patrones diferentes, pues indica que no todos los tioles libres se modifican y la existencia de una selectividad en la unión de cyPG a proteínas. Así pues, la caracterización funcional y estructural de estas proteínas diana podría proporcionar valiosa información sobre el mecanismo de acción de estas cyPG, así como sobre los factores implicados en la selectividad de estas modificaciones.

3. IMPORTANCIA DEL GSH EN EL EFECTO DE PROSTAGLANDINAS.

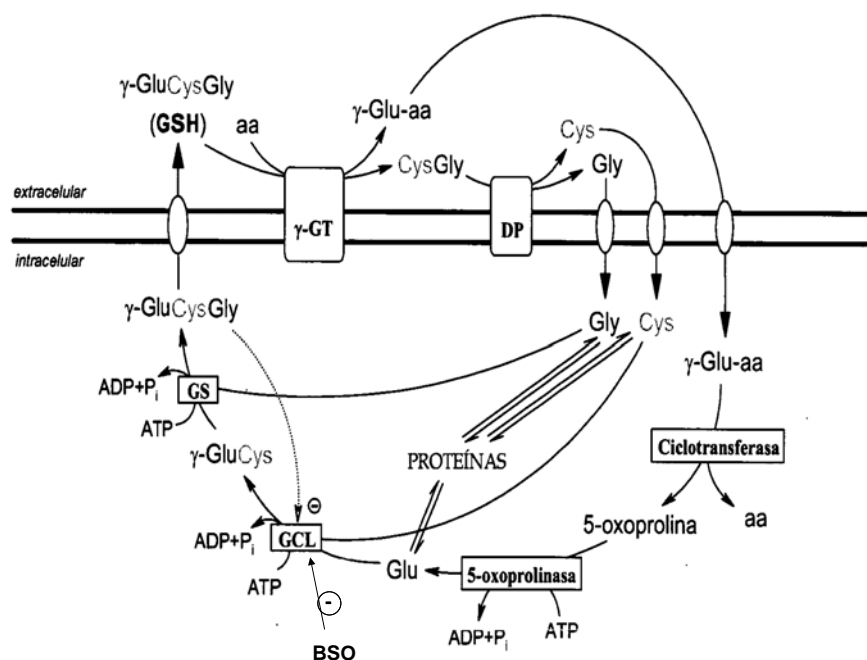
El glutatión reducido (GSH) es un tripéptido (L- γ -glutamil-L-cisteinilglicina) que juega un papel fundamental en la biología celular. Los niveles de GSH intracelular son unos perfectos indicadores de la funcionalidad y viabilidad celular. El rango de concentración normal en tejidos humanos oscila entre 0,1 y 10 mM y a menudo, el descenso de los niveles de GSH es indicativo de múltiples anomalías, tales como cáncer, enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares principalmente (Pastore, 2003).

Durante los últimos años se ha descrito ampliamente el papel del GSH en procesos fisiopatológicos (Cotgreave, 1998; Fratelli, 2002; Klatt, 2000). Su síntesis es indispensable para el buen desarrollo de la gastrulación en mamíferos (Shi, 2000). El GSH participa entre muchas otras funciones, en reacciones de transhidrogenación que conllevan la formación y el mantenimiento de los grupos sulfidrilos de otras moléculas como el coenzima A, y otras enzimas. Además, en su forma reducida es el encargado de aportar la capacidad reductora en ciertas reacciones, como en la formación de desoxirribonucleótidos por la ribonucleótido reductasa. Los niveles de GSH podrían modular la unión de cyPG a proteínas y contribuir a la selectividad de la modificación.

3.1 Síntesis de GSH

El GSH se sintetiza tanto en procarionotas como eucariotas exclusivamente en el citosol en dos reacciones consecutivas dependientes de ATP. La primera, catalizada por la enzima glutamato cisteína ligasa (GCL), conlleva la unión de los aminoácidos cisteína y glutamato para dar lugar a γ -glutamilcisteína. Posteriormente se une glicina por la acción de la GSH sintetasa (GS). La GCL controla la síntesis de GSH ya que resulta inhibida por retroalimentación negativa del propio GSH (Richman, 1975) y está regulada por la disponibilidad de L-cisteína (Deneke, 1989).

El hígado es el principal órgano de síntesis del GSH ya que obtiene la cisteína directamente de la dieta o del catabolismo de proteínas. La cisteína se puede sintetizar a partir de metionina mediante la ruta de la transulfuración (Reed D.J., 1977). Estudios recientes en pacientes con Alzheimer y Parkinson, en los cuales se ha visto alterado el metabolismo del GSH, sugieren que la vía de transulfuración también podría llevarse a cabo en el cerebro, además de en el hígado (Vitvitsky, 2006).



Esquema 4. Ciclo del γ -glutamilo para el transporte y síntesis de glutatión. Adaptado de Meister y Anderson, 1983; aa, aminoácido; DP, dipeptidasa; BSO, butionina sulfoximina; GCL, γ -glutamilcisteína ligasa.

La enzima γ -glutamilcisteína ligasa es inhibida de manera específica por la butionina sulfoximina (Griffith, 1979). El GSH es exportado mediante la γ -glutamilo transpeptidasa, que es una enzima que se encuentra en las superficies externas de ciertas células. Cuando esta enzima es inhibida, los niveles plasmáticos de GSH disminuyen. Existen transportadores específicos que exportan el GSH fuera de las células (Ookhtens, 1998). El GSH puede

transportarse al interior celular en forma de γ -glutamil o γ -glutamil-L-cisteína (Lash, 2005). El estado redox de la célula depende principalmente de las cantidades de GSH reducido/oxidado (GSH/GSSG). En condiciones normales, es la forma reducida la que predomina sobre la oxidada.

3.2 Función detoxificante del GSH.

Una de las funciones más relevantes del GSH reside en la detoxificación de múltiples compuestos, tales como peróxidos de hidrógeno, otros peróxidos, radicales libres, y la detoxificación de una amplia variedad de xenobióticos, que al reaccionar con GSH son eliminados a través de la orina o de las heces en forma de ácidos mercaptúricos (Townsend, 2003).

La unión del GSH a diversos compuestos para su posterior detoxificación, tiene lugar a través del grupo tiol presente en su estructura. Éste, puede realizar un ataque nucleófilo sobre el centro electrófilo de un amplio espectro de compuestos (como los metabolitos reactivos formados por el sistema del citocromo P-450 y la mayoría de los plaguicidas) tanto de manera espontánea como catalizada por las glutation-S-transferasas (GSTs), resultando en la formación de productos menos tóxicos y facilitando su eliminación (DeLeve, 1991). Las GSTs son una familia multigénica de isoenzimas que contienen una región hidrofóbica muy polimórfica para unirse a una gran variedad de sustratos electrófilos. En el hígado las GSTs representan del 5 al 10% de las proteínas solubles (Whalen, 1998), por lo que la detoxificación de contaminantes se produce principalmente en este órgano.

La detoxificación de compuestos mediada por glutation se lleva a cabo fundamentalmente a través de proteínas de membrana denominadas MDR-1 y/o MRP (multi drug resistance protein). La resistencia a múltiples fármacos y compuestos (Multidrug resistance –MDR), esta causada principalmente por la sobreexpresión de estas dos proteínas, lo cual constituye uno de los mayores obstáculos para la terapia química del cáncer. Se ha visto un aumento en la expresión de COX-1 y 2 e iNOS en células cancerosas que habían adquirido

resistencia a ciertos fármacos (Fantappiè, 2002; Kang, 2005). Estudios recientes, han demostrado que el transporte de ciertos compuestos mediados por la MRP-1 dependerían del co-transporte con GSH (Morrow, 2006).

3.3 Función antioxidante del glutatión.

La función detoxificante del GSH puede tener también consecuencias antioxidantes puesto que contribuye a la eliminación de productos procedentes de la peroxidación lipídica como hidroxialquenos mediante su conjugación por las glutatión S-transferasas. Además, determinadas GSTs poseen actividad peroxidasa y son capaces de desactivar los productos de la peroxidación lipídica como bases de DNA oxidadas e hidroperóxidos lipídicos (Ketterer, 1994).

El GSH es capaz de reaccionar espontáneamente con HO^\cdot , N_2O_3 y ONOO^\cdot (Wink, 1998) y regenerar a la vitamina C y ésta a la E. Sin embargo, la eliminación de H_2O_2 y de otros peróxidos está catalizada por la glutatión peroxidasa (GPx). Como consecuencia de estas reacciones el GSH se oxida a GSSG, el cual es reducido otra vez a GSH por la glutatión reductasa (GR) a expensas de NADPH, formándose un ciclo redox. La principal ruta metabólica de regeneración del NADPH es por la vía de las pentosas fosfato, donde participan las enzimas glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa y transaldolasa, pero hay otras enzimas que también pueden generar NADPH citosólico como la isocitrato deshidrogenasa y el enzima málico.

3.4 Función del GSH en la regulación de la actividad de proteínas mediante glutationilación de cisteínas.

La glutationilación de proteínas (S-glutationilación) posee una gran relevancia en procesos fisiológicos y patológicos, ya que dicha modificación puede ejercer diversos efectos sobre la función de la proteína. Se trata de una modificación posttraduccional que regula la función de la proteína en respuesta a situaciones de estrés oxidativo. La unión reversible de GSH a residuos de cisteína protege a la proteína de oxidaciones irreversibles de grupos tioles presentes en su estructura.

La modificación de proteínas implicadas en cascadas de señalización pueden producir la activación de nuevas vías. En el caso de la proteína H-Ras, la unión de GSH a las cisteínas 181 y 184 del extremo carboxilo terminal activaría la cascada de señalizaciones iniciadas por ERK (Mallis, 2001). En muchas otras proteínas, si la cisteína se encuentra próxima al sitio activo de la proteína, como en la proteína tirosin fosfatasa 1B (PTP1B) (Barrett, 1999), la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Mohr, 1999) o proteína kinasa C (PKC) (Reddy, 2000), la S-glutationilación puede causar la inactivación de la proteína. La unión de GSH a los factores de transcripción c-Jun y NF- κ B inhibe su unión a DNA (Klatt, 1999; Pineda-Molina, 2001).

La glutationilación reversible de actina en la cisteína 374 reduce la polimerización de los filamentos de G-actina en el citoesqueleto (Dalle-Donne, 2003; Wang, 2001). Proteínas pertenecientes a la familia de las chaperonas de choque térmico (HSP) también se ha observado que son sensibles a la modificación por GSH, como la HSP 27 (Eaton, 2002) y la HSP 70 (Hoppe, 2004).

Así pues, la glutationilación de proteínas es un fenómeno muy importante a la hora de estudiar la actividad y funcionalidad de las proteínas en respuesta a situaciones de estrés oxidativo, y como mecanismo regulador del estado redox celular.

3.5 GSH y cyPG.

Como hemos introducido anteriormente, el GSH desempeña una serie de funciones vitales para el mantenimiento de la fisiología celular. Entre ellas, la capacidad para reaccionar con una amplia variedad de moléculas a través del grupo tiol. Entre estas moléculas se encuentran lípidos reactivos, como las prostaglandinas ciclopentenonas. Es conocida la función reguladora del GSH sobre los efectos de las cyPG. La reducción de los niveles de GSH ha sido asociada en múltiples estudios con una potenciación de los efectos de cyP (Atsmon, 1990; Levonen, 2001). Por el contrario, el suplemento de cultivos celulares con N-acetil-cisteína, como precursor de la síntesis de GSH, reduce los efectos de cyPG (Zhang, 2004). Así pues, parece ser que existe una estrecha relación entre los niveles de GSH intracelular y los efectos de cyPG.

La formación de aductos cyPG-GSH es un proceso reversible mientras que la unión de cyPG a proteínas resulta ser irreversible en condiciones fisiológicas. Diversos estudios han demostrado que las dienonas como la 15d-PGJ₂ son tres veces más reactivas que las enonas sencillas a la hora de reaccionar con GSH unido a una matriz de Sefarosa. Los aductos de las dienonas con tioles solubles son menos estables que los formados con enonas (Noyori, 1993).

La formación de aductos GSH-cyPG puede ocurrir de manera enzimática por acción de la glutation-S-transferasa, o bien de modo no enzimático. Los aductos GSH-cyPG son sustrato de múltiples transportadores que desempeñan un papel fundamental en la detoxificación de cyPG (Paumi, 2003). Los aductos cyPG-cisteínas podrían tener una cierta actividad biológica (Bickley, 2004), así como la presencia de aductos entre oxieicosanoides y GSH podrían reducir la actividad biológica de estos lípidos o incluso dar lugar a nuevas acciones biológicas (Murphy, 2002).

4. PROTEÍNAS RAS

Las proteínas Ras son componentes clave de las vías de transducción de señales que conectan la activación de los receptores de la superficie celular con los procesos transcripcionales que conducen a la regulación de la proliferación, la diferenciación y la apoptosis (Barbacid, 1987). Además de su importante papel en procesos fisiológicos, los genes ras juegan un papel relevante en el desarrollo de tumores. Muchos cánceres desarrollados en el hombre, presentan mutaciones en proteínas Ras, por lo que también se las conoce con el nombre de “proteínas Ras oncogénicas”. Estas mutaciones generan alteraciones en las cascadas de señalización activadas por Ras, en proliferación celular, supervivencia y en respuesta a factores de crecimiento.

Las proteínas Ras pertenecen a la familia de GTPasas, de forma que su actividad está controlada fundamentalmente por un ciclo entre un estado inactivo, unido a GDP, y un estado activo, unido a GTP. La unión de GTP es facilitada por factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEF). Hasta el momento se han descrito cinco diferentes GEF: Sos (Sos1 y Sos2), Ras-GRF (Ras-GRF1 y Ras-GRF2), SMG21-GDS, Ras-GRP y CNrasGEF (Bhattacharya, 2004). La hidrólisis de Ras unido a GTP supone el fin de la cascada de señales y este paso es favorecido por las proteínas activadoras de GTPasa (GAPs): p120 GAP y neurofibromina.

Se ha observado una actividad incrementada de Ras en procesos tumorales (30 % de cánceres humanos), lo cual podría guardar relación con mutaciones activadoras, con un incremento de los niveles de proteínas Ras, o simplemente de actividad sin mutación. Las mutaciones son variables dependiendo del tipo de cáncer con que nos encontremos. Por ejemplo, las mutaciones en K-Ras son comunes en cáncer pancreático (60%) , colorrectal (32%), endometrial (15%), tracto biliar (33%), pulmón (19%) y cánceres cervicales (9%). En desórdenes mieloides se han localizado mutaciones en K-Ras y N-Ras (14% y 5% respectivamente), mientras que en melanoma se han localizado mutaciones en N-Ras y H-Ras (18% y 6%) y en cánceres de vejiga (3% y 11%)

respectivamente (Bos, 1989; Downward, 2003). En la mayoría de los casos anteriores, las mutaciones introducidas consisten en la sustitución de aminoácidos en las posiciones 12, 13 y 61. Estas mutaciones alteran la actividad GTPasa intrínseca y confieren resistencia a las GAPs, causando un acúmulo de la forma activa unida a GTP (Trahey, 1987).

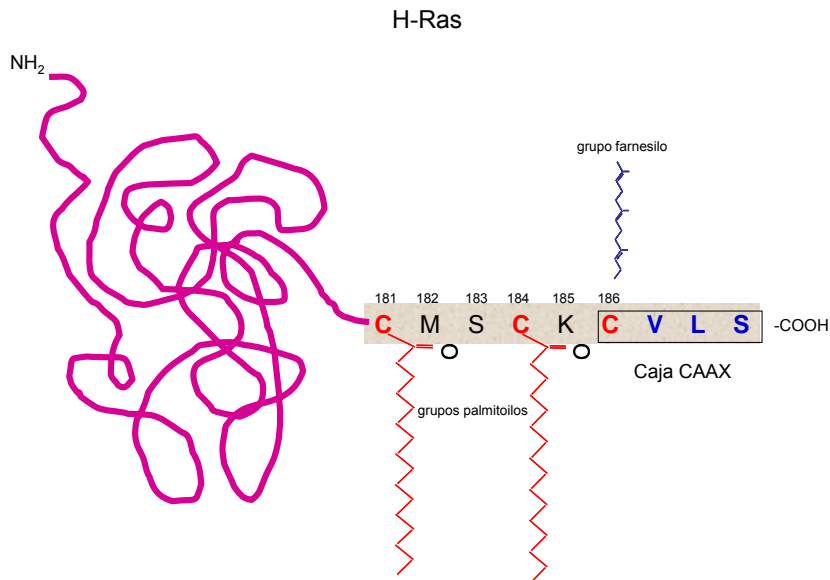
Las proteínas Ras regulan la respuesta celular a múltiples estímulos como factores de crecimiento, citoquinas, hormonas y neurotransmisores.

4.1 Tipos de proteínas Ras.

Existen tres tipos de genes Ras que codifican cuatro proteínas homólogas de 21 kDa: H-Ras, K-Ras4A, K-Ras4B y N-Ras. K-Ras4A y K-Ras4B resultan del procesamiento alternativo del extremo C terminal. Las proteínas Ras se expresan en todos los tejidos y tipos de células, aunque en distintas proporciones: H-Ras predomina en piel y músculo, K-Ras en timo e intestino y N-Ras en testículos y tejido nervioso (León, 1987). El extremo N-terminal (1-165 aminoácidos) de las tres isoformas está altamente conservado, mientras que es en el extremo C-terminal donde encontramos una mayor variabilidad. En concreto, los 25 últimos residuos son muy diferentes, con excepción de la cisteína 186, que forma parte de la secuencia consenso CAAX que determina la farnesilación (Rando, 1996). A es normalmente un aminoácido alifático, y X es cualquier aminoácido. Además, N-Ras, H-Ras y K-Ras4A son modificadas adicionalmente por uno o dos ácidos palmíticos en una secuencia anterior al motivo CAAX (Hancock, 1989). El conjunto de estas modificaciones confiere una mayor hidrofobicidad a la proteína y es esencial para su correcta localización en membrana y para su actividad. K-Ras4B, por el contrario, contiene una secuencia de residuos de lisina. El anclaje a la membrana está mediado por las cargas positivas de las lisinas que interaccionan con las negativas de los lípidos de membrana.

Las distintas proteínas Ras se localizan de manera diferente en las distintas regiones de la membrana plasmática. H-Ras, se localiza en regiones de la

membrana ricas en colesterol y ceramida (caveolas) (Choy, 1999), mientras que K-Ras se distribuye de manera uniforme a través de toda la membrana plasmática.



Esquema 5. Modificaciones postraduccionales de H-Ras. El residuo de cisteína de la caja CAAX es sitio de isoprenilación, mientras que las cisteínas 181 y 184 son sitios de palmitoilación.

Las distintas proteínas Ras son procesadas de manera diferente y siguen distintas vías para su localización. (Hingorani, 2003; Mor, 2006) N-Ras y H-Ras sufren ciclos de palmitoilación-despalmitoilación en los cuales se van desplazando desde la membrana plasmática al Golgi a través de vesículas. Una importante proporción de N-Ras y H-Ras reside en el Golgi, así como en otros compartimentos celulares como el retículo endoplásmico (Hancock, 2005).

Por otro lado, K-Ras farnesilada es transportada a la membrana plasmática por un mecanismo todavía poco conocido. K-Ras puede retornar a los compartimentos de endomembranas tras la fosforilación en su región hipervariable. Es interesante destacar que la fosforilación de formas oncogénicas de K-Ras induce apoptosis en fibroblastos NIH-3T3 transformados por mecanismos dependientes de BCL-X_L (Bivona, 2006).

Las distintas funciones llevadas a cabo por cada una de las proteínas Ras, tienen repercusiones directas en los procesos relacionados con el desarrollo. Así pues, estudios genéticos en ratones han demostrado que K-Ras es esencial para el desarrollo embrionario de ratones (Johnson, 1997). Ratones deficientes en esta proteína mueren de anemia y sufren eritropoyesis fetal en el hígado después de 12-14 días de gestación (Khalaf, 2005). Por el contrario, ratones deficientes en H-Ras y N-Ras, ya sea de una de ellas o ambas, se desarrollan normalmente y son viables y fértiles (Esteban, 2001; Umanoff, 1995). Estas observaciones sugieren que K-Ras desempeña funciones específicas que no puede suplir la presencia de las otras isoformas. Así pues, como podemos comprobar, a pesar de su gran homología, las distintas proteínas Ras poseen características estructurales y funcionales diferentes.

4.2 Interacción entre prostaglandinas ciclopentenonas y las proteínas Ras.

En procesos tumorales se ha observado un incremento en la expresión de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), la isoforma inducible de la enzima que cataliza la etapa limitante en la síntesis de prostaglandinas. En cáncer de colon, se han observado niveles de entre 2 y 50 veces más elevados en mucosa intestinal que en condiciones normales (Dubois, 2000). En cáncer de piel, la COX-2 favorece la desdiferenciación de queratinocitos, y la administración de inhibidores específicos de esta isoforma reduce el edema, permeabilidad vascular y otros marcadores presentes en inflamación cutánea (Lee, 2003). La PGE₂ parece ser el producto mayoritario del ácido araquidónico en ciertas líneas celulares tumorales (Tsujii, 1997) y se ha descrito que esta prostaglandina puede activar las proteínas Ras, favorecer la expresión de la COX-2 y reducir la apoptosis en células tumorales.

Como ya hemos comentado en apartados anteriores, las prostaglandinas con estructura ciclopentenona poseen implicaciones directas en procesos de proliferación celular. La generación de estas prostaglandinas se ha visto asociada además con un incremento en la expresión de COX-2 en diversas situaciones fisiopatológicas, tales como la formación de placas de ateroma

(Shibata, 2002), en esclerosis lateral amiotrófica (Kondo, 2001), modelos celulares y animales de inflamación (Gilroy, 1999) y en ciertas líneas celulares de carcinoma de colon (Chinery, 1999).

Aunque existen evidencias de que estas prostaglandinas pueden ejercer efectos anti-inflamatorios y anti-proliferativos en determinados sistemas experimentales, en otros sistemas, y concretamente en células mesangiales (Rovin, 2002), células de cáncer de mama (Shahabi, 1987) y en células de cáncer de colon en las que se ha eliminado la expresión endógena de COX-2 (Chinery, 1999), pueden inducir proliferación celular. También se ha observado que pueden inducir una activación de las MAPK ERK 1 y 2 y de la vía de la fosfatidil inositol 3-kinasa (PI3-K) (Oliva, 2003; Wilmer, 2001). Estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron que la activación de MAPK (ERK 1 y 2) inducida por 15d-PGJ₂ era dependiente de la actividad de Ras, pues la sobreexpresión de un mutante dominante negativo de Ras (Ras N17) bloqueó esta activación (Oliva, 2003).

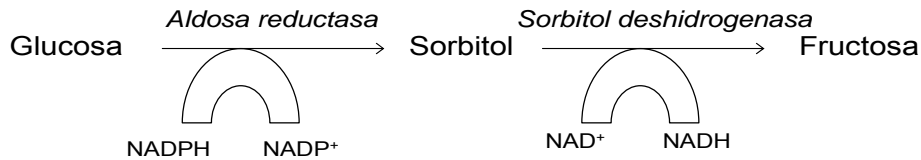
El estudio de estos fenómenos resultó en la observación de la modificación directa de H-Ras por la cyPG 15d-PGJ₂, un efecto que guardaba correlación con la activación de las proteínas Ras en sistemas biológicos. Estos hallazgos podrían implicar que existe una relación entre situaciones de inflamación o tumorigénesis en las que hay un incremento en la expresión de COX-2 y cyPG, que desencadenan un aumento de la proliferación celular.

5. ALDOSA REDUCTASA

La aldosa reductasa (AR) forma parte de la superfamilia de las aldo-keto reductasas (AKR). Esta superfamilia contiene 114 proteínas expresadas en eucariotas y procariotas clasificadas en 14 familias (AKR1-AKR14). La AR forma parte de la subfamilia AKR1B. Con el mismo nombre distinguimos 4 isoformas diferentes: AKR1B1, AKR1B3, AKR1B4 y AKR1B5. Dentro de la familia de las AKR1 también se han descrito las siguientes isoformas: AKR1B7, AKR1B8, AKR1B9, AKR1B10 y AKR1B13 (Hyndman, 2003). Tomaremos como representativa a la aldosa reductasa AKR1B1 (EC 1.1.1.21). Ésta, se localiza principalmente en el citosol, posee un tamaño aproximado de 36 kDa y consta de 315 aminoácidos (aa).

Muchas de las proteínas pertenecientes a esta superfamilia están implicadas en procesos de detoxificación de una amplia variedad de sustratos como aldehídos alifáticos y aromáticos, monosacáridos, esteroides, hidrocarburos policíclicos aromáticos e isoflavonoides. Algunos estudios recientes han implicado a las aldo-keto reductasas en la detoxificación de aldehídos, los principales productos de la peroxidación lipídica. (Rittner, 1999; Vander Jagt, 2003) como el 4-hidroxi-trans-2-nonenal (HNE) y sus conjugados con GSH (GS-HNE) (Tammali, 2006). Otros miembros de la familia de las aldo-keto reductasas han sido implicados en el metabolismo de esteroides (Pawlowski, 1990), o en la formación de carcinógenos por activación con dihidrodiol (Penning, 1993). Desempeñan un papel fundamental en disfunciones diabéticas (Tomlinson, 1982), así como en la regulación de la osmolaridad celular (Carper, 1990).

Una de las funciones principales de la AR es catalizar el paso de glucosa a sorbitol mediante un proceso redox que comporta el consumo de NADPH. Posteriormente el sorbitol es oxidado a fructosa por la sorbitol deshidrogenasa, generándose NADH.



Esquema 6. Vía de los polioles en el metabolismo de la glucosa. La AR cataliza la reducción de glucosa a sorbitol dependiente de NADPH. La sorbitol deshidrogenasa oxida el sorbitol a fructosa usando como cofactor NAD⁺.

En condiciones normales esta vía sólo supone un 3% del metabolismo de la glucosa, pero en la diabetes se incrementa de 2 a 4 veces, en relación directa con la concentración de glucosa. Las consecuencias directas de la activación de la vía de la AR son el aumento del sorbitol, incremento del NADH y la disminución de NADPH. El acúmulo de sorbitol origina un efecto osmótico lesivo debido a su capacidad limitada para difundir a través de las membranas. Sin embargo, diversas observaciones y estudios experimentales sugieren que este efecto osmótico no es el principal responsable del daño tisular asociado a la activación de la vía del polirol. El acúmulo de sorbitol también contribuye a la depleción intracelular de mioinositol y de la actividad Na⁺/K⁺ ATPasa. Este mecanismo etiopatogénico es válido para aquellos tejidos con altos niveles de AR, como son el cristalino o el nervio periférico (más concretamente la célula de Schwann), pero en los tejidos con escasa actividad AR (ej. células endoteliales, células glomerulares y mesangiales) la vía de la AR induce efectos lesivos fundamentalmente a través del aumento del cociente NADH/NAD y mediante la disminución del NADPH que resulta consumido en la reacción. El aumento del cociente NADH/NAD generará una situación de estrés oxidativo, con un aumento de radicales libres, que puede derivar en situaciones que se asemejan a isquemia desde el punto de vista metabólico (Iwata, 2006; Kaiserova, 2006; Ramasamy, 1998), con aumento del cociente lactato/piruvato y favorecer la síntesis *de novo* de diacilglicerol (DAG). La disminución del NADPH tiene como consecuencias:

- Disminución del glutatión reducido, que es uno de los principales mecanismos de eliminación de los radicales libres.
- Disminución de la síntesis de NO, ya que tanto la AR como la NO sintasa compiten por el NADPH como cofactor.
- Aumento de síntesis de prostanoïdes vasoconstrictores.

La AR ha sido implicada en la patogénesis de complicaciones diabéticas, aunque la eficacia clínica de algunos inhibidores no ha sido probada claramente. La inhibición de la AR por parte de algunos inhibidores de estructura diferente ampliamente contrastados, como el sorbinil y tolrestat, previene la fosforilación y degradación de I κ B- α inducida por TNF- α y factores de crecimiento; así como la activación de NF- κ B y PKC (Ramana, 2004a; Ramana, 2004b). Evidencias recientes han demostrado que la AR interactúa con la cascada de señales iniciada por PKC. La activación de PKC por diacilglicerol (DAG) podría estar implicada en la patogénesis de complicaciones vasculares de la diabetes. En situaciones de neuropatía, una de las mayores complicaciones de la diabetes, se ha observado que ratones deficientes en aldosa reductasa poseen una mayor resistencia al retraso en la conducción nerviosa del nervio motor y a estrés oxidativo (Lo, 2007), medido como el aumento de los niveles de anión superóxido o la depleción de GSH. Además se ha observado una protección frente a daños en el DNA y a la activación de la Jun kinasa (JNK) (Ho, 2006).

También se ha visto que la inhibición de AR reduce la proliferación de las células musculares lisas (Ramana, 2006), y la apoptosis de las células endoteliales vasculares (Ramana, 2003; Ramana, 2004b). En conjunto, estos estudios podrían sugerir que la inhibición de la AR ejerce un cierto efecto anti-inflamatorio.

5.1 Características estructurales de la AR.

El sitio activo de la AR, que puede ser considerada como el prototipo de enzima perteneciente a la superfamilia de las AKR, reside en el corazón de un barril β,α (Rondeau, 1992; Wilson, 1992). El NADPH se une a la parte superior de dicho barril con el anillo de nicotinamida protegido en el centro del barril y el grupo pirofosfato flanqueando la abertura del mismo. La localización de la cisteína 4 (Cys-4) en el lugar donde se ancla el anillo de nicotinamida, es la base de la interacción hidrofóbica con éste. Otros tres residuos (Tyr-48, His-110, Cys-298) han sido identificados como potenciales donadores de protones.

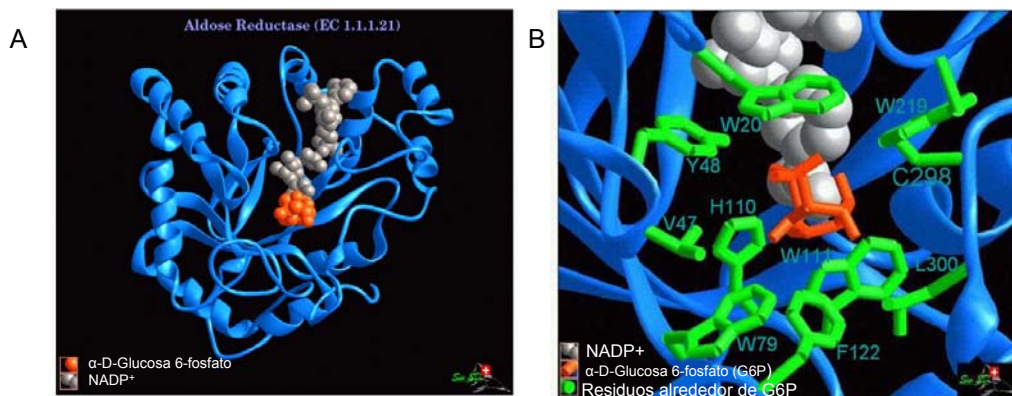


Figura 1. Estructura tridimensional de la aldosa reductasa. A) Estructura de la molécula completa de AR. En gris, molécula de NADP^+ , en rojo, molécula de glucosa. B) Estructura de la región catalítica de la AR con los principales aminoácidos señalados. La estructura tridimensional ha sido realizada con glucosa 6-fosfato (Harrison, 1994) Las imágenes han sido obtenidas de Swiss-prot-3Dimage.

Se ha sugerido que la formación de puentes disulfuro de la AR con otras moléculas podría jugar un papel crucial en la activación de la enzima. El tratamiento de AR con ácido iodoacético o N-etilmaleimida causa un

incremento de la K_m hacia múltiples sustratos y un descenso en la sensibilidad a cierto tipo de inhibidores como el sorbinil, alrestatin o epalrestat.

Estudios recientes han demostrado que la cisteína 298 es el principal grupo reactivo. La mutación de la Cys 298 por serina (C298S) o alanina (C298A) confirió a la enzima una resistencia a ser inhibida por agentes que causan cambios funcionales en la actividad enzimática, como el sorbinil y el tolrestat (Bohren, 1993; Petrash, 1992). La Cys-298 también es sitio de tiolación por glutation oxidado (Cappiello, 1996) y adición de hidroxinonal (HNE) (Srivastava, 1998) causando la inactivación de la enzima. Esto puede deberse al bloqueo del sitio catalítico de la AR, por la generación de impedimentos estéricos. Estudios recientes han demostrado que el óxido nítrico podría actuar como regulador de la actividad de la aldosa reductasa, uniéndose también a la Cys 298. La modificación de AR por nitrosoglutation causa la inactivación de la misma (Chandra, 1997). Por otro lado, cuando la AR está unida a NADP es menos susceptible de ser modificada por NO, GSH, o HNE entre otros. Esto podría sugerir que la cisteína 298 estaría implicada en la estabilización del complejo AR-NADP.

La búsqueda de posibles compuestos que pudieran modificar la actividad de la aldosa reductasa y su función en procesos fisiopatológicos, podría ser de gran interés en el desarrollo de fármacos para futuras aplicaciones en complicaciones diabéticas.

Las prostaglandinas ciclopentenonas son lípidos electrófilos altamente reactivos que pueden reaccionar con tioles libres de proteínas y alterar su función. Sin embargo, se conoce muy poco acerca de los determinantes estructurales de esta interacción y se asume que las diversas prostaglandinas ciclopentenonas causan los mismos efectos biológicos y actúan sobre las mismas dianas. Este trabajo trata de analizar la modificación de proteínas por las prostaglandinas ciclopentenonas 15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ –prostaglandina J_2 (15d-PG J_2) y prostaglandina A_1 (PGA $_1$). Hemos comprobado que estos prostanoides son compuestos permeables a la membrana celular y forman aductos con proteínas que son resistentes a electroforesis en condiciones reductoras. Por ello, nos hemos ayudado de análogos biotinilados de estos compuestos (15d-PG J_2 -B y PGA $_1$ -B) con el fin de profundizar en el estudio de los requerimientos estructurales de la modificación de proteínas por cyPG y llevar a cabo la identificación de posibles proteínas diana de estos prostanoides y estudiar los efectos sobre las mismas. Así pues, los objetivos que nos hemos planteado son los siguientes:

- Caracterizar la modificación de proteínas por las ciclopentenonas 15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ – prostaglandina J_2 (15d-PG J_2), y PGA $_1$, en sus aspectos cuantitativos y cualitativos en células intactas e in vitro.
- Evaluar la posible selectividad diferencial en la modificación de proteínas por estos prostanoides.
- Estudiar la influencia de los niveles de GSH en la formación de aductos entre proteínas y cyPG.
- Estudiar la modificación de proteínas Ras por cyPG con diversa estructura.
- Evaluar los efectos biológicos de PGA $_1$ -B para validar su utilidad como compuesto modelo y desarrollar procedimientos para la identificación de proteínas diana de PGA $_1$ -B.

- Identificar proteínas modificadas selectivamente por alguna de las cyPG biotiniladas.

1. REACTIVOS Y MATERIALES.

1.1 Reactivos.

1.1.1 Materiales de Cultivos.

Los medios de cultivo DMEM, RPMI 1460 y el medio de transfección Opti-MEM, así como el suero fetal de ternera, la penicilina/estreptomina y la tripsina-EDTA fueron suministrados por Invitrogen. El material de plástico para el cultivo de células fue suministrado por Falcon (Beckton Dickinson).

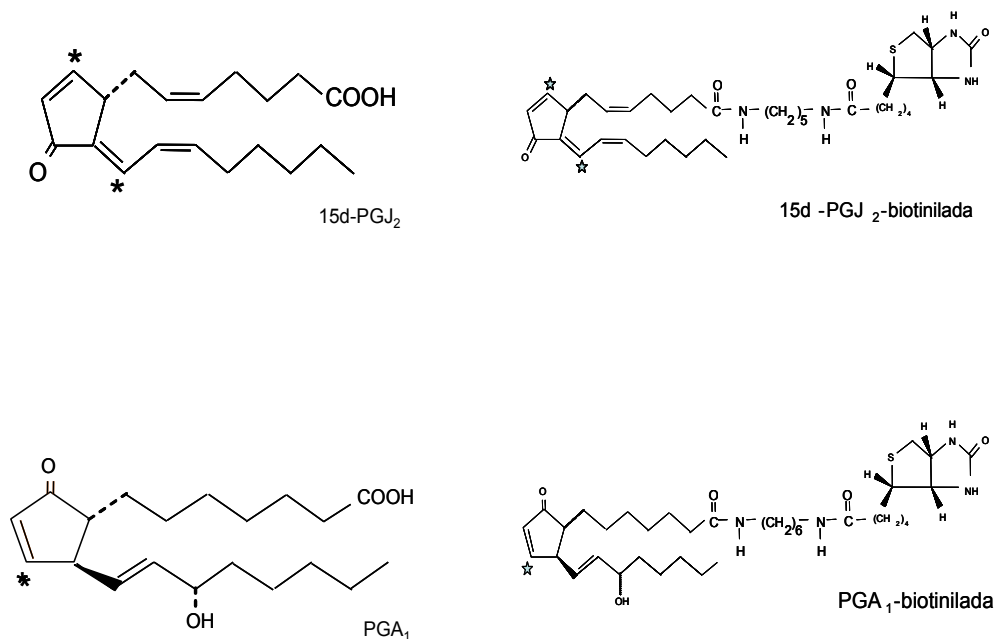
1.1.2 Reactivos de Electroforesis.

La acrilamida, N-N'-metilén-bis-acrilamida, el persulfato amónico, N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED), el dodecil sulfato sódico (SDS), el Tris y la glicina, todos con un grado de pureza apto para electroforesis, fueron suministrados por Bio-Rad.

1.1.3 Lípidos electrófilos.

La prostaglandina 15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ prostaglandina J₂ (15d-PGJ₂) fue suministrada por Cayman Chemical. Con el objetivo de desarrollar un método para la identificación de posibles dianas de estos prostanoides y estudiar los efectos sobre las mismas, nos hemos ayudado de análogos biotinilados. La 15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ prostaglandina J₂ biotinilada, fue preparada por un método puesto a punto en el laboratorio (Cernuda-Morollón, 2001).

La prostaglandina A₁ y su análogo biotinilado, la prostaglandina A₁ biotinilada fueron suministrados también por Cayman Chemical.



Esquema 7. Estructura de las prostaglandinas ciclopentenonas 15d-PGJ₂ y PGA₁ y sus análogos biotinilados. Los asteriscos marcan los carbonos electrófilos reactivos que ha sido descritos que forman aductos con tioles.

1.1.4 Anticuerpos.

Los anticuerpos anti-gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa, anti aldosa reductasa, anti c-Jun y anti factor de elongación 2 (EF-2) fueron suministrados por Santa Cruz Biotechnology. Los anticuerpos anti-actina, anti-vimentina, anti-proteína de choque térmico (heat shock protein 70 - HSP 70) y anti- enzima E1 activadora de ubiquitina se obtuvieron de Sigma. El anticuerpo anti-fosfoglicerato kinasa 1 (PGK1) fue adquirido a Abgent, el anti-proteína de choque térmico (heat shock protein 90 - HSP 90) a Stressgen; el anti-glutation-S-transferasa P1-1 a Calbiochem y el anti-factor de elongación 1 (EF-1) a Upstate.

Los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa procedieron de Dako. La estreptavidina conjugada con peroxidasa fue suministrada por Amersham Biosciences.

1.1.5 Proteínas recombinantes.

La glutatión S-transferasa P1-1 fue suministrada por Sigma, el dominio de unión a DNA de la proteína c-Jun fue obtenido como se ha descrito (Cernuda-Morollón, 2001; Pérez-Sala, 2003). La proteína H-Ras procedió de Calbiochem.

1.1.6 Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos utilizados a lo largo del trabajo se sintetizaron de manera automática en un sintetizador Oligo 1000M (Beckman) o en el sintetizador Applied Biosystems 3400 y se purificaron en columnas de Sefadex G25, NAPTM suministradas por Amersham, en el Servicio de Química de Proteínas del CIB.

1.1.7 Plásmidos.

Las preparaciones de DNA plasmídico a pequeña escala se llevaron a cabo mediante el empleo del “*High Pure Plasmid Isolation Kit*” de Roche. Para la obtención de DNA a gran escala, se empleó el Kit “*JetStar 1.0 plasmid Maxi kit*” de GENOMED, y en caso de necesidad de DNA libre de endotoxinas se utilizó el Kit “*EndoFree Plasmid Maxi Kit*” de Qiagen. Todas las enzimas de restricción utilizadas fueron de Promega. Los productos de digestión se separaron por electroforesis en geles de agarosa 1% y 5 ng/ml de bromuro de etidio (SIGMA) en tampón TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM Na₂EDTA, pH 8), y se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta. Para la purificación de fragmentos de DNA a partir de los geles de agarosa, se utilizó el “*GeneClean II Kit*” de Q-BIOgene. Todas las construcciones fueron verificadas mediante secuenciación en el Servicio de Secuenciación Automática de ADN (actualmente SECUGEN S.A.) del CIB.

1.1.8 Vectores de expresión.

Aldosa reductasa.

La construcción pCMV6-XL5-AKRB10 que contiene el cDNA completo de la proteína aldosa reductasa B10 humana (AKRB10) fue obtenido de Origene. Para su subclonación en el vector pCEFL-AU5, en el marco de lectura de AU5, eliminando las regiones no traducidas 5' del cDNA de la aldosa reductasa, se procedió a la incorporación de un sitio de restricción EcoRI antes del ATG de la proteína, por mutagénesis dirigida, usando el *Site Directed Mutagenesis Kit II* de Stratagene. Para ello, se usaron los siguientes oligonucleótidos complementarios que contenían la mutación:

5'-CACTCAGAATCATTCTGCA**GAATT**CATGGCCACGTTTGTGG-3'

5'-CCACAAACGTGGCCATG**AATTC**TGCAGAAATGATTCTGAGTG-3'

Una vez incorporado el sitio EcoRI, la construcción se digirió simultáneamente con la enzima NotI, que corta después del 3' de la aldosa reductasa B10, y con EcoRI, liberando así el DNA codificante de la proteína. En paralelo, el vector pCEFL-AU5 se digirió con las enzimas EcoRI y NotI. Los productos de los dos procesos, una vez purificados, se unieron mediante la enzima T4 Ligasa de Promega. El producto final, pCEFL-AU5-AKRB10-wt, es un vector de expresión de la aldosa reductasa en fusión con el epítipo de la proteína AU5. Una vez obtenida dicha construcción se procedió a la generación del mutante C298S de la aldosa reductasa, utilizando el kit de mutagénesis mencionado arriba y los oligonucleótidos complementarios que contienen la mutación:

5'- CTGGAGGGCC**TCT**AACGTGTTGCAATCCTCTCATTGG-3'

5'- CCAAATGAGAGGATTGCAACACGTT**AGA**GGCCCTCCAG-3'

H-Ras.

Los plásmidos pCEFL-KZ-HA, pCEFL-KZ-AU5, pCEFL-AU5-H-Ras wt, pCEFL-KZ-AU5-H-Ras C118S, pCEFL-KZ-AU5-H-Ras C184S, pCEFL-KZ-HA-H-Ras wt, pCEFL-KZ-HA-H-Ras C118S, y pCEFL-KZ-HA-H-Ras C184S fueron suministrados por el laboratorio del Dr. Jose María Rojas del Instituto de Salud Carlos III (Majadahonda, Madrid).

1.1.9 Otros reactivos.

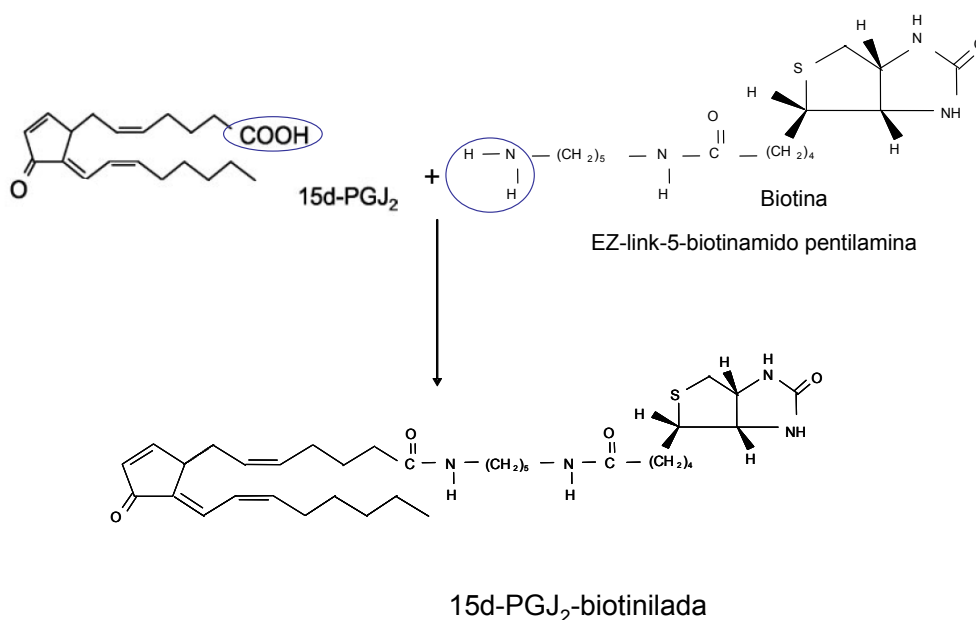
Las cuantificaciones de proteína se llevaron a cabo mediante el método BCA Assay (Pierce) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las tinciones con Coomassie coloidal se realizaron con el reactivo “GelCode Blue Stain Reagent” de Pierce. Las soluciones utilizadas (Tampón fosfato salino, tampón tris salino...) se prepararon según se ha descrito previamente (Sambrook y Rusel, 2001) y el resto de reactivos utilizados fueron de calidad analítica de distintos proveedores (Merck y Sigma principalmente). El agua empleada fue de grado reactivo Milli Q (Millipore). La neutravidina–agarosa para realizar la purificación de proteínas biotiniladas procedió de Pierce.

2. MÉTODOS

2.1 Preparación 15d-PGJ₂ biotilada.

A continuación se describe brevemente el método usado para la preparación de 15d-PGJ₂ biotilada:

Se trata de una reacción de deshidratación en la cual el grupo COOH de la prostaglandina reacciona con el grupo NH₂ del brazo diaminohexano del compuesto biotilado (EZ-link-5-biotinamido pentilamina).



Esquema 8. Unión del grupo COOH de la prostaglandina 15d-PGJ₂ con el grupo NH₂ del brazo diaminohexano de la EZ-link-5-biotinamido pentilamina. El producto final de la reacción es la 15d-PGJ₂-B.

Como catalizador de la reacción se utilizó carbodiimida (1-etil-3-(3-diaminoetilaminopropil) carbodiimida hidrocloreto), la cual es la encargada de acelerar el proceso de deshidratación entre los grupos carboxilo y amino, ya que la reacción no transcurre espontáneamente. El progreso de la reacción se siguió en placas de TLC (Thin Layer Chromatography) usando como solvente

acetato de etilo/metanol 1:1. El producto (prostaglandina-biotina) es hidrofílico y asciende hacia la parte superior de la placa de TLC arrastrado por el solvente. Para la detección de grupos amino libres se usó el reactivo ninhidrina y para la detección del producto se usó H_2SO_4 y luz ultravioleta. Posteriormente se pasó a purificar el producto de la reacción en columnas de silicagel con el fin de eliminar posibles restos de prostaglandina y de biotina libres (Gayarre, 2006).

2.2 Cultivos celulares.

Para los experimentos de cultivo celular se usaron las siguientes líneas celulares procedentes del banco de células del CIB:

. Los fibroblastos de ratón NIH-3T3, las células COS-7 (procedentes de riñón de mono), las células NRK (células de túbulo proximal renal de rata), las células HEK 293 (procedentes de riñón de embriones humanos), células CHO (de ovario de hamster) y las células MCF-7 (procedentes de carcinoma de mama) fueron cultivadas en medio DMEM, que contenía suero fetal bovino 10%, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 μ g/ml y 2 mM glutamina.

. Los fibroblastos NIH-3T3 de ratón transfectados de forma estable con la proteína H-Ras fueron cultivados en medio DMEM con suplementos especificados anteriormente más geneticina a 0,5 mg/ml durante los dos primeros pases y a 0,25 mg/ml durante el resto del tiempo para seleccionar las células resistentes a este antibiótico.

. Células HeLa (epiteliales procedentes de adenocarcinoma de cérvix) y las células Jurkat de leucemia fueron cultivadas en RPMI 1460 con suero fetal bovino 10%, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 μ g/ml y 2 mM glutamina.

Todos los tipos celulares anteriores se mantuvieron en atmósfera humidificada con 5 % CO_2 y a una temperatura de 37°C.

2.3 Tratamientos celulares.

Los tratamientos se realizaron en medio sin suero durante tiempos variables, las prostaglandinas se añadieron en dimetilsulfóxido (DMSO) y los cultivos controles recibieron un volumen equivalente de DMSO. En el caso de los fibroblastos, células HeLa, COS-7 y MCF-7 los tratamientos se realizaron cuando las células se encontraban a un 80-90 % confluencia.

2.4 Cuantificación de nitritos.

La determinación de los niveles de nitritos acumulados en los sobrenadantes se llevó a cabo mediante la reacción colorimétrica de éstos con el reactivo de Griess (sulfanilamida 1% en ácido fosfórico al 5 %, naftilendiamina 0,1% en agua). La absorbancia se midió a 540 nm.

2.5 Transfecciones transitorias.

Los fibroblastos NIH-3T3, las células COS-7 y las células MCF-7 se transfectaron cuando se encontraban a un 80 % de confluencia. En todos los casos se usó el reactivo Lipofectamine 2000 y se siguieron las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Tras la transfección, las células se recuperaron durante 24 horas en medio completo para ser posteriormente procesadas o tratadas.

2.6 Immunoblot.

Para el análisis de los niveles de las distintas proteínas de interés, las células correspondientes se lisaron en tampón de lisis que contenía 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 50 mM FNa, 0,1 mM ortovanadato de sodio, 0,1 mM β -mercaptonetanol, SDS 0,5%, inhibidores de proteasas (leupeptina, pepstatina y aprotinina a 2 μ g/ml cada uno, y pefablock SC (4-2-aminoetil-bencenosulfonil fluoruro hidrocloreuro) a 320 μ g/ml). Las células se homogenizaron mediante pases a través de agujas de calibre 26G1/2. Los lisados se centrifugaron a 12000 x g y se recogió el sobrenadante libre de restos celulares.

Los lisados celulares se separaron en geles de SDS- poliacrilamida cuyas características se describen en el apartado siguiente.

Electroforesis en geles de poliacrilamida

-Una dimensión

Cantidades variables de proteína (entre 5 y 50 µg) fueron cargadas en geles de SDS-poliacrilamida cuyo porcentaje de acrilamida varió entre 10-15 %.

- Dos dimensiones

Los lisados celulares se obtuvieron con el método descrito anteriormente. 100 µg de proteína se precipitaron mediante la adición de 10 % TCA durante 10 minutos, posteriormente el precipitado se centrifugó a 15000 x g y el pellet obtenido se lavó una vez con etanol 80% y dos veces con acetona pura. El precipitado se dejó secar durante toda la noche y se resuspendió en tampón de muestra para el isoelectroenfoque: 2 M tiourea, 7 M urea, CHAPS 4%, 100 mM DTT y anfolitos 0,4% (Biolyte, Bio-Rad). Las muestras se cargaron por rehidratación activa en tiras IPG ReadySrip pH 3-10 de Bio-Rad en el aparato Protean IEF Cell, y después se llevó a cabo el isoelectroenfoque. En todos los casos se siguieron las instrucciones suministradas por el fabricante. Después del isoelectroenfoque, las tiras se equilibraron en un tampón que contenía 6 M urea, SDS 2 % (peso/volumen), 0,375 M Tris pH 8,8, glicerol 20 % y 130 mM DTT y posteriormente se realizó un segundo equilibrado en el mismo tampón, con la excepción de que en lugar de DTT contenía 135 mM iodoacetamida. A continuación, para llevar a cabo la segunda dimensión, las tiras se dispusieron sobre geles de SDS-poliacrilamida.

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Immobilon-P Millipore) mediante un sistema de transferencia semiseco (BioRad), según las instrucciones del fabricante. Las membranas se bloquearon en TBS que contenía Tween-20 (Sigma) 0,05% y leche desnatada 2% (peso/volumen). Las incubaciones posteriores se realizaron con

estreptavidina-peroxidasa o con anticuerpos primarios frente a las proteínas de interés y a continuación con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados con peroxidasa; todos ellos preparados en TBS con Tween-20 0,05% y albúmina sérica bovina 1%. Los inmunocomplejos o los complejos biotina-estreptavidina se detectaron mediante quimioluminiscencia con los reactivos ECL de Amersham. Los niveles de las proteínas de interés se estimaron mediante análisis densitométrico de las exposiciones para la proteína de interés y se corrigieron por los niveles de proteína total según la tinción de Coomassie o los niveles de una proteína no relacionada, con el uso de un escáner AGFA y el programa informático *Scion Image* de *Scion Corporation*.

2.7 Fraccionamientos subcelulares.

2.7.1 Fraccionamiento citosol-membranas.

Las células se homogenizaron en tampón de lisis sin SDS. Los lisados obtenidos se centrifugaron a 1000 x g para eliminar posibles restos de células no rotas y se recogió el sobrenadante para proseguir con una centrifugación a 200,000 x g durante 30 minutos a 4°C en un rotor Beckman TLA 100. El sobrenadante o fracción citosólica (S100) se recogió para su posterior análisis. El sedimento o fracción P100 se resuspendió en el mismo tampón descrito al inicio de este apartado.

2.7.2 Obtención de extractos nucleares y citosólicos.

Las células fueron lisadas en tampón de lisis sin SDS. Posteriormente se procedió a incubar los lisados en hielo durante 15 minutos. Al cabo de dicho tiempo se añadió NP-40 para que quedara a una concentración final del 0,5 % (vol/vol). Las muestras se agitaron brevemente en un vortex, tras lo cual se centrifugaron durante 5 minutos a 15000 rpm para obtener los núcleos (sedimento). El sobrenadante (citosol) fue guardado y el pellet nuclear se resuspendió en 20 mM HEPES, 0,4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 50 mM FNa, 0,1 mM ortovanadato de sodio, e inhibidores de proteasas

(leupeptina, pepstatina y aprotinina a 2µg/ml cada uno, y pefablock a 320 µg/ml); y se incubó en agitación en hielo durante 30 minutos aproximadamente. Tras ese periodo de tiempo se centrifugó de nuevo 5 minutos a 15000 x g para eliminar posibles restos nucleares (sedimento) y el extracto nuclear (sobrenadante) se almacenó para su posterior análisis.

2.8 Purificación de proteínas unidas a 15d-PGJ₂ y PGA₁ biotiniladas mediante cromatografía en resina de avidina-agarosa.

Los fibroblastos NIH-3T3 fueron tratados con 5 µM 15d-PGJ₂-B o 60 µM PGA₁-B durante 2 horas en medio sin suero. Las células se lisaron y homogenizaron en tampón de lisis y posteriormente se llevó a cabo el fraccionamiento subcelular. La fracción S100 se usó para purificar las proteínas modificadas por los prostanoideos biotinilados mediante cromatografía en neutravidina-agarosa (Pierce) siguiendo las especificaciones del producto. Brevemente, a las fracciones S100 se les añadió SDS y NP-40 a una concentración final de 0,1% y 1% respectivamente para reducir la unión inespecífica de proteínas a la resina. Posteriormente, la fracción S100 (100 µg de proteína) se incubó con la resina durante 1 hora en agitación constante a 4°C. Las proteínas no unidas fueron eliminadas mediante centrifugación a 2500 x g durante 2 minutos. Después de varios lavados de la resina con tampón de lisis con SDS 0,1% y NP-40 1%, las proteínas retenidas en la resina se eluyeron mediante incubación en tampón Laemmli 2X a 100°C durante 5 minutos. Las proteínas de interés fueron sometidas a un posterior análisis mediante Western blot o espectrometría de masas.

2.9 Inmunoprecipitación de proteínas.

Para la inmunoprecipitación de proteínas, incubamos el anticuerpo frente a la proteína que deseábamos inmunoprecipitar (0,5-2 µg) con 50 µg de proteína procedente de fracciones citosólicas S100 durante 1 hora a 4° C con agitación constante. Posteriormente se añadió 40 µl de proteína G-agarosa y se incubó

otra hora en las mismas condiciones anteriores. Las proteínas no retenidas fueron eliminadas mediante centrifugación a 1500 x g durante 2 minutos. Después de varios lavados de la resina con tampón de lisis, las proteínas retenidas en la resina se eluyeron mediante incubación con tampón Laemmli 2X a 100°C durante 5 minutos. Las proteínas de interés fueron sometidas a un posterior análisis mediante Western blot o técnicas de proteómica.

2.10 Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas.

La identificación de proteínas se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. John Timms (Institute of Women's Health, University College London, UK). Las piezas de geles que se querían analizar fueron lavadas dos veces en 25 mM bicarbonato amónico (BicAm); acetonitrilo 50% y secadas en el Speed Vac. Las muestras fueron reducidas posteriormente con 10 mM DTT en 25 mM BicAm durante 45 minutos a 50°C y alquiladas en 50 mM ácido iodoacético en 25 mM BicAm durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. A continuación, las piezas de geles fueron lavadas dos veces en 25 mM BicAm, acetonitrilo 50% y secadas en el Speed Vac. Las proteínas fueron digeridas mediante incubación con tripsina (1 ng/μl) en 25 mM BicAm durante 16 horas a 37°C. Posteriormente se recogió el sobrenadante y las piezas de gel se trataron con ácido trifluoroacético (TFA) 5% y acetonitrilo 50% para extraer los péptidos. Ambos sobrenadantes fueron combinados y secados en el Speed Vac. Después los péptidos se resuspendieron en 3 μl de ácido fórmico al 0,1 %. 0,5 μl de la muestra fueron co-cristalizados junto con 1 μl de la matriz (solución saturada de ácido 2,5-dihidroxibenzoico en agua) en la placa. El análisis mediante espectrometría de masas se realizó mediante **MALDI-TOF** (ionización/desorción mediante láser asistida por matriz-tiempo de vuelo). Dicho análisis se llevó a cabo mediante calibración externa e interna (picos de digestión de la tripsina m/z 842.51 y m/z 2211.10). Se generó una lista correspondiente a las masas de los péptidos obtenidos y se procedió a la búsqueda en la base de datos Swissprot usando el programa Mascot (Matrix Science, versión 2.0.02). Para la identificación de dianas potenciales de PGA₁-B a partir de fracciones S100, los resultados obtenidos se aceptaron siempre y cuando existiera un mínimo de 6 péptidos identificados de cada proteína en

cuestión, con un error no superior a 50 partes por millón (ppm), una cobertura mínima de secuencia del 30 % y con una significación estadística $p < 0,05$, a no ser que se indique lo contrario.

Nano-HPLC-electrospray. Los péptidos obtenidos en la digestión con tripsina fueron analizados en un Ultimate HPLC con una columna PepMap C18 de 75 μM de diámetro (ambas de LC Packings) con una tasa de flujo de 300 nL/min acoplado a un espectrómetro de masas Q-Tof, usando un gradiente de acetonitrilo (0-80%). Los espectros obtenidos fueron procesados usando el programa MassLynx (Waters) y el Mascot descrito anteriormente. Los resultados obtenidos se aceptaron siempre y cuando existiera un mínimo de 2 péptidos secuenciados de cada proteína en cuestión, con un error no superior a 50 partes por millón (ppm), una cobertura mínima de secuencia del 30 % y con una significación estadística $p < 0,05$.

2.10.1 Análisis de la modificación de proteínas recombinantes por lípidos electrófilos.

Las proteínas recombinantes se incubaron durante 1 hora en presencia de vehículo (DMSO) o eicosanoides electrófilos. Las proteínas se purificaron en mini-columnas de fase reversa (ZipTip C18) y se eluyeron con acetonitrilo 50%. En algunos casos se procedió a la digestión con tripsina de las muestras durante 4 horas a 37°C seguida de purificación en ZipTip.

Las muestras obtenidas fueron analizadas mediante espectrometría de masas por MALDI-TOF para la obtención de la masa de la proteína completa o de la huella peptídica. El análisis de la modificación de la proteína completa fue llevado a cabo en el Servicio de Proteómica del Centro de Investigaciones Biológicas. Las proteínas fueron co-cristalizadas en una solución saturada de ácido sinapínico en acetonitrilo/agua (1:2) con ácido trifluoroacético (TFA) 0,1%. Se usó como calibración externa la mezcla de proteínas Estándar II suministrada por Bruker Daltonics (Bremen, Alemania) y las muestras fueron analizadas en modo lineal.

Para el análisis de la huella peptídica los péptidos procedentes de la digestión con tripsina fueron co-cristalizados en una solución saturada de ácido α -ciano-4-hidroxi-cinámico en acetonitrilo/agua (1:2) con TFA 0,1%. Se usó como calibración externa una mezcla de péptidos que contenían angiotensina (m/z 1046,5), corticotropina (m/z 2465,2), y la matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico, m/z 379). Las muestras fueron analizadas en modo reflectron. Los espectros fueron obtenidos en un BIFLEX III tiempo de vuelo (Bruker-Franzen Analytik, Bremen, Alemania). En algunos casos se llevó a cabo MALDI-TOF-TOF para la obtención de la secuencia de determinados péptidos. El análisis de los péptidos seleccionados se realizó en el Parque Científico de Madrid usando un MALDI-TOF acoplado a un espectrómetro 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, Framingham, MA). Los espectros obtenidos fueron procesados usando el programa Mascot. Los resultados obtenidos se aceptaron siempre y cuando existiera una significación estadística $p < 0,05$.

2.11 Microscopía.

Las células se sembraron en cubreobjetos de cristal y fueron posteriormente tratadas. Después, se fijaron en formaldehído 3,5% en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las células se permeabilizaron con tritón X-100 (0,05%). Se bloquearon los cubres con BSA 1% y posteriormente se incubaron con Alexa 488-estreptavidina 1 μ g/ml en PBS durante 30 minutos. Los cubres se montaron en portaobjetos usando Fluorsafe (Calbiochem) como medio de montaje. Las células se observaron en un microscopio confocal Leica (Leica TCS-SP2-AOBS) o en un microscopio de fluorescencia acoplado a una cámara CCD (Zeiss Axioplan CCD Leica DCF 350 FX), según se indica, en el servicio de microscopía del CIB.

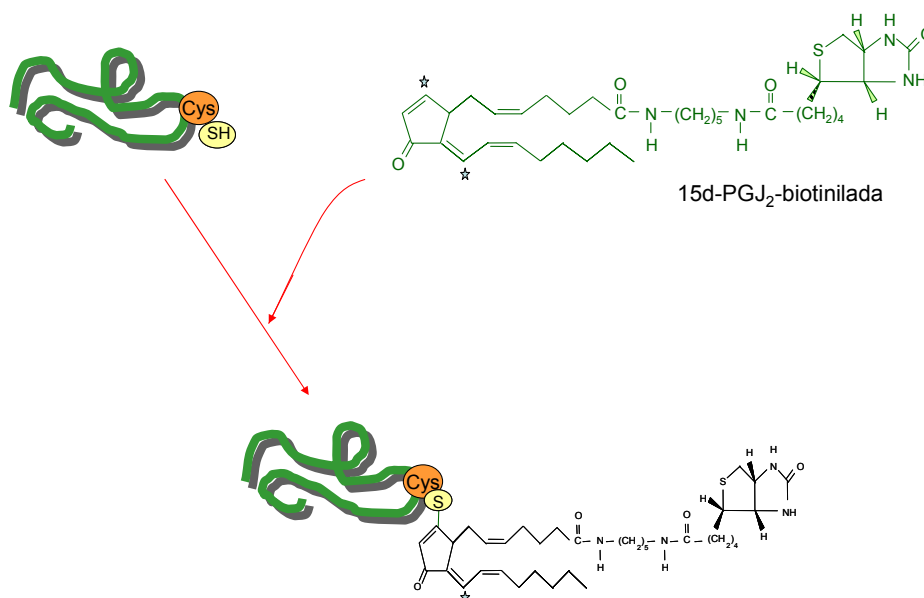
2.12 Análisis estadístico.

Cada experimento descrito se ha llevado a cabo un mínimo de tres veces, a no ser que se indique lo contrario. Los datos se expresan como media de los datos \pm error estándar de la media. El nivel de significación estadística se definió como $p < 0,05$ y la comparación entre condiciones se realizó mediante el *test t Student*.

1. CARACTERIZACIÓN DE LA UNIÓN DE PROSTAGLANDINAS CICLOPENTENONAS BIOTINILADAS A PROTEÍNAS.

Los lípidos electrófilos, generados frecuentemente por la oxidación de otros lípidos, poseen la capacidad de reaccionar con grupos tioles o amino de las proteínas alterando su estructura o función. Entre estos lípidos electrófilos destacamos las prostaglandinas ciclopentenonas, en concreto, la 15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ prostaglandina J_2 y la prostaglandina A_1 . En este estudio hemos empleado análogos biotinilados de estos compuestos para identificar posibles proteínas diana de estos prostanoides tal y como se describe en los apartados “Material y métodos” y “Objetivos” de esta tesis.

Como hemos descrito anteriormente, estos compuestos poseen la capacidad de formar aductos covalentes con grupos tioles, tanto con el glutatión (GSH), como con proteínas a través de carbonos electrófilos presentes o próximos a su anillo ciclopentano (marcados con asteriscos) mediante un proceso denominado adición de Michael (esquema 7).



Esquema 9. Adición de Michael. Unión de 15d-PGJ₂-B a un grupo -SH de una proteína.

1.1 Las cyPG biotiniladas se unen a proteínas de forma estable.

Mediante el tratamiento de fibroblastos de ratón NIH-3T3 con dosis variables de ambos prostanoides biotinilados, nos propusimos explorar la permeabilidad celular de estos compuestos y su facultad para formar aductos con proteínas. Los lisados celulares procedentes de los tratamientos con 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B fueron procesados mediante Western blot con estreptavidina peroxidasa.

Como se puede observar en la figura 2, en las células no tratadas se observaron polipéptidos biotinilados de peso molecular aparente de 120 y 90 kDa, que corresponden a proteínas biotiniladas endógenas. En las células tratadas con cyP biotinilados se observó la aparición de numerosas bandas polipeptídicas biotiniladas, indicativa de la unión estable de estos compuestos a proteínas. Sin embargo, se constataron importantes diferencias cuantitativas en la unión de cyP biotinilados a polipéptidos celulares. La incorporación de 15d-PGJ₂-B fue más eficiente que la de PGA₁-B. Por lo cual, en los siguientes experimentos usamos una concentración de 5 μ M de 15d-PGJ₂-B y 60 μ M de PGA₁-B para conseguir un grado de intensidad similar de la incorporación de estos compuestos en proteínas celulares.

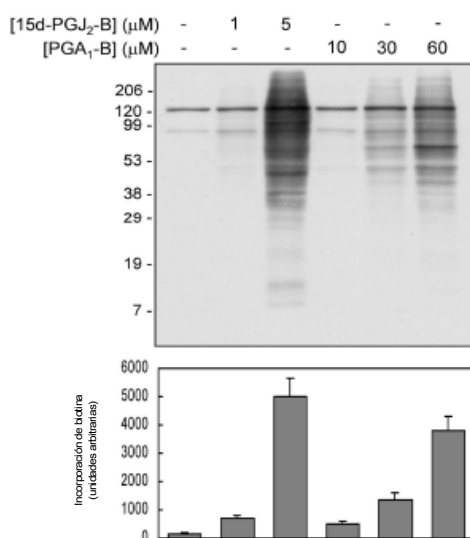


Figura 2. Incorporación de cyP biotinilados a fibroblastos NIH-3T3.

Fibroblastos NIH-3T3 fueron incubados con las concentraciones indicadas de cyP biotinilados. La incorporación de biotina fue analizada posteriormente por Western blot con estreptavidina acoplada a peroxidasa. La señal de biotina fue estimada mediante densitometría. Los resultados mostrados en el panel inferior son valores medios \pm error estándar recogidos de 4 experimentos independientes.

1.2 Distribución intracelular de 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B.

Con el objetivo de profundizar en la naturaleza de la interacción de prostaglandinas con proteínas celulares, exploramos su distribución celular. Para ello utilizamos dos tipos celulares diferentes: fibroblastos de ratón NIH-3T3 y células HeLa, que tratamos con vehículo (DMSO) o prostaglandinas biotiniladas (15d-PGJ₂-B y PGA₁-B) (Fig. 3), para posteriormente detectar la presencia de biotina mediante microscopía de fluorescencia CCD y confocal.

Como podemos observar, en las células tratadas con vehículo, se aprecia una leve señal de fluorescencia, que es compatible con la presencia de proteínas biotiniladas endógenas. En las células incubadas con ambas prostaglandinas biotiniladas, sí que se observó un incremento de fluorescencia, cuya distribución indica que ambos compuestos poseen la capacidad de entrar en el interior celular, y de unirse a estructuras proteicas citosólicas y nucleares. Es interesante destacar que su distribución fue diferente según el tipo celular estudiado. En el caso de los fibroblastos, la distribución de 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B fue fundamentalmente citosólica, como se puede observar en la figura 3A; mientras que en células HeLa la distribución resultó ser más homogénea, con predominio en el núcleo (Fig. 3B).

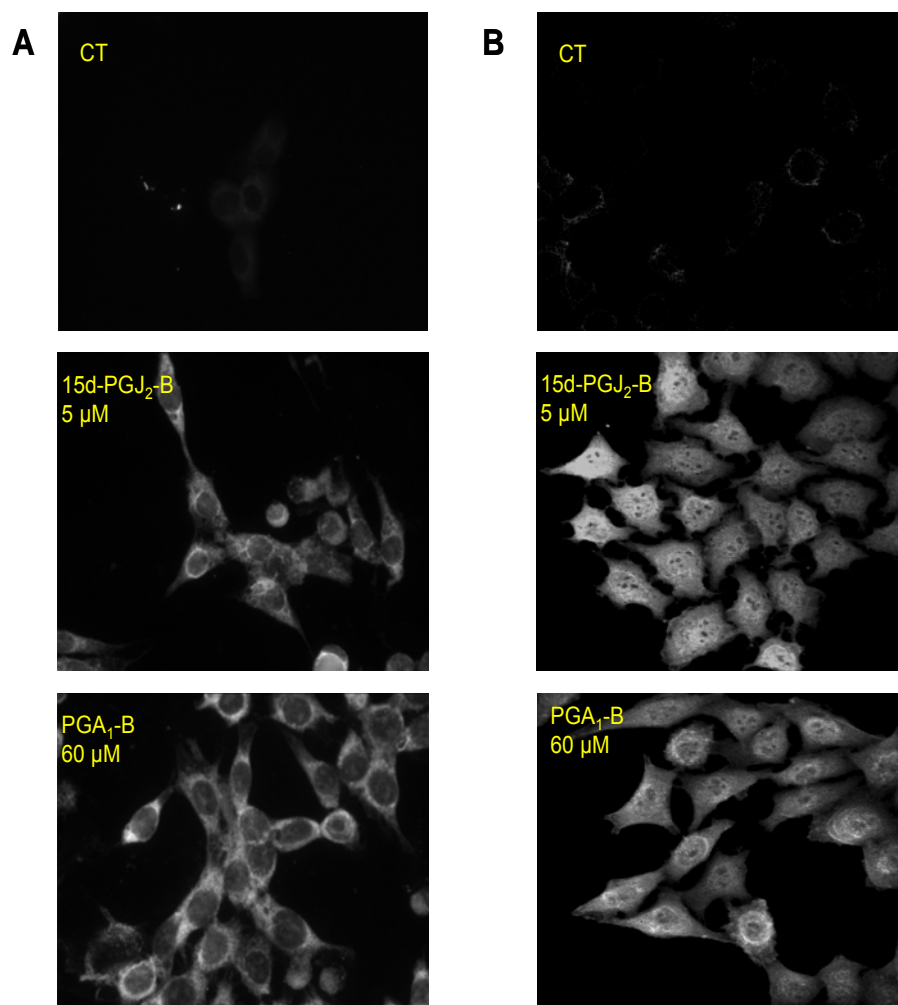


Figura 3. Distribución intracelular de 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B en fibroblastos NIH-3T3 y HeLa. (A) Imágenes de microscopía de fluorescencia CCD de fibroblastos NIH-3T3 tratados durante 2 horas con vehículo (DMSO), 15d-PGJ₂-B 5 μM o PGA₁-B 60 μM. (B) Imágenes de microscopía confocal (proyecciones totales) de células HeLa tratadas durante 2 horas con vehículo (DMSO) o 15d-PGJ₂-B 5 μM o PGA₁-B 60 μM. En ambos casos la detección de la biotina se llevó a cabo con estreptavidina-Alexa 488.

1.3 Caracterización de los efectos biológicos de los análogos biotinilados de las prostaglandinas 15d-PGJ₂ y PGA₁.

Con la finalidad de comprobar si estos compuestos son herramientas válidas para la identificación de dianas implicadas en los efectos biológicos de las cyPG, exploramos la capacidad de los análogos biotinilados de la 15d-PGJ₂ y PGA₁ para reproducir los efectos biológicos de los prostanoideos no biotinilados. Así, el tratamiento de células mesangiales de rata (RMC) con PGA₁-B indujo la expresión de la proteína de choque térmico HSP 70 (Heat shock protein 70) de manera similar a la del compuesto original aunque necesitó concentraciones más altas (Fig. 4).

Trabajos previos en el laboratorio han demostrado que 15d-PGJ₂ y su análogo biotinilado (Stamatakis, 2006) ejercen efectos similares sobre la inducción de HSP 70 y la inhibición de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Por ello, analizamos el efecto de la PGA₁ y la PGA₁-B sobre la inducción de la iNOS. Como se puede observar en la figura 4, concentraciones bajas (10-30 µM) de ambas prostaglandinas amplificaron la inducción de la iNOS, aunque con distinta intensidad. Si embargo, tanto PGA₁ como PGA₁-B inhibieron la inducción de la proteína iNOS en RMC activadas por citoquinas a una concentración de 60 µM.

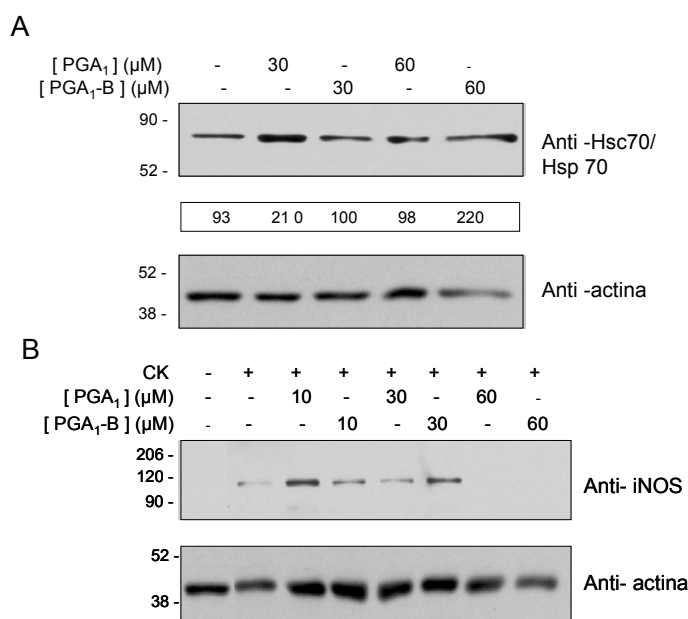


Figura 4. Efectos biológicos de la PGA₁ biotinilada. (A) Las RMC se trataron durante 16 h con las concentraciones indicadas de PGA₁ o PGA₁-B y los niveles de las proteínas de choque térmico (inducible y constitutiva, HSP 70 y HSC 70, respectivamente) y de actina como control se estimaron mediante inmunoblot. Los valores que se muestran representan el cociente entre las intensidades de las señales Hsp 70/Hsc 70 y de actina para cada calle. (B) Las RMC se pre-trataron en ausencia o presencia de las concentraciones indicadas de PGA₁ o PGA₁-B durante 2 h. A continuación, las células se estimularon con citoquinas (Ck; TNF- α , 37 ng/ml y IL-1 β , 3 ng/ml) según se indica durante 16 horas, y los niveles de la proteína iNOS se monitorizaron mediante inmunoblot. La especificidad de los cambios observados en las proteínas de interés, se comprobaron mediante Western blot con anti-actina.

Estas diferencias observadas para una y otra cyPG podrían deberse a la presencia de la molécula de biotina en la estructura de la PGA₁-B. Además, cuantificamos los niveles de nitritos acumulados durante el tratamiento con PGA₁ y su análogo biotinilado. Como podemos observar en la figura 5, el tratamiento con citoquinas produjo un aumento significativo en los niveles de NO₂. Sin embargo, se redujo la inducción de nitritos tanto con el tratamiento con PGA₁ como con PGA₁-B, aunque de nuevo con distinta potencia. Con PGA₁ se observaron efectos inhibidores a concentraciones de 30 μM, mientras que con PGA₁-B se comenzaron a advertir estos efectos con tratamientos a concentraciones de 60 μM (Fig. 5).

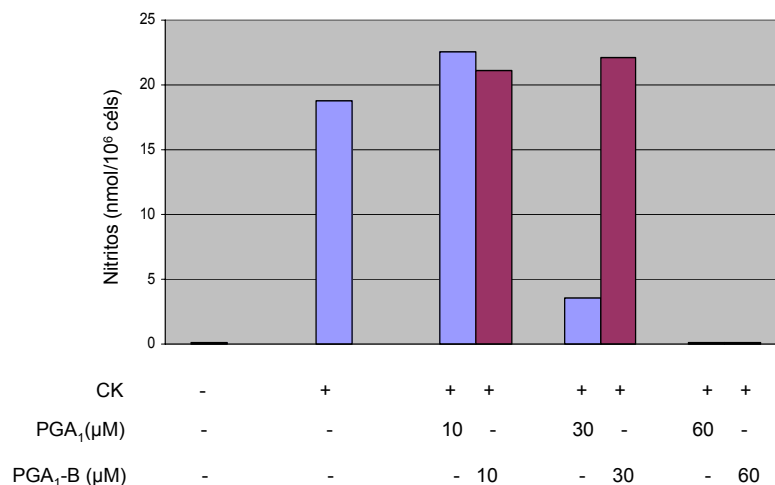


Figura 5. Efecto de PGA₁ y PGA₁-B sobre la generación de NO en células mesangiales. Células mesangiales fueron activadas con Ck en presencia o ausencia de PGA₁ o PGA₁-B a las concentraciones indicadas durante 16 horas y la generación de NO se estimó determinando los niveles de nitritos en el sobrenadante de cultivo mediante el reactivo de Griess.

Estas observaciones indican que ambas prostaglandinas biotiniladas son herramientas válidas para el estudio de algunos de los efectos biológicos y las posibles dianas de su compuesto original.

1.4 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B modifican en células intactas polipéptidos celulares de forma selectiva.

En los tratamientos de células NIH-3T3 con ambas prostaglandinas biotiniladas pudimos observar cómo los patrones de marcaje obtenidos no fueron idénticos. En ellos, se aprecia la presencia de bandas polipeptídicas biotiniladas más intensas en una u otra condición, como se muestra en los perfiles densitométricos correspondientes a cada calle del gel (Fig. 6). Algunas de las bandas en las que se observan diferencias más marcadas en cuanto a la intensidad de la señal de biotina se muestran señaladas mediante flechas (Fig. 6). Estos resultados podrían indicar una cierta selectividad en la incorporación de estos prostanoides a proteínas celulares.

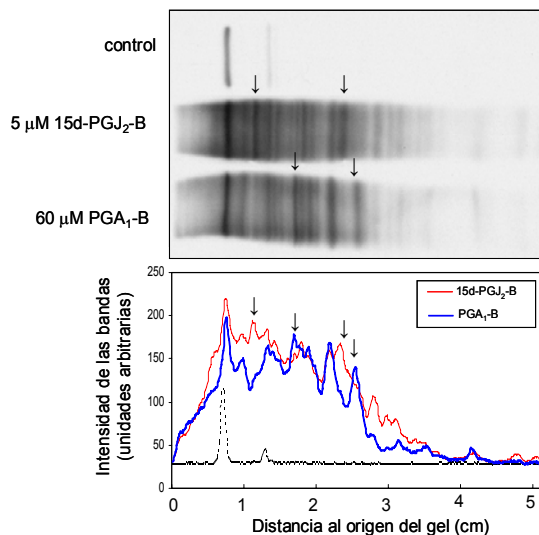


Figura 6. Diferencias cualitativas en la unión de cyP biotinilados a proteínas celulares de NIH-3T3. Las muestras corresponden a lisados totales de células control o tratadas con 5 μM 15d-PGJ₂-B o 60 μM PGA₁B, resueltos posteriormente por SDS-PAGE y Western blot. Los patrones de intensidad fueron obtenidos para cada calle mediante densitometría y se muestran en el panel inferior. Las flechas indican bandas de polipéptidos en las que se aprecian las diferencias más evidentes en la intensidad de la señal de biotina.

Con el fin de verificar estas diferencias en cuanto a la selectividad de la unión de 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B a proteínas celulares procedimos a realizar electroforesis en 2 dimensiones. El análisis de lisados de células control mostró

la presencia de las proteínas biotiniladas endógenas (marcadas mediante flechas, figura 7). Por otro lado, el análisis de las células tratadas con ambos prostanoides mostró señales de biotina comunes a 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B (marcadas mediante óvalos, figura 7). También se pudo observar la presencia de “manchas” selectivamente marcadas o con una diferencia de intensidad notable en una y otra condición (señaladas mediante cajas con líneas discontinuas).

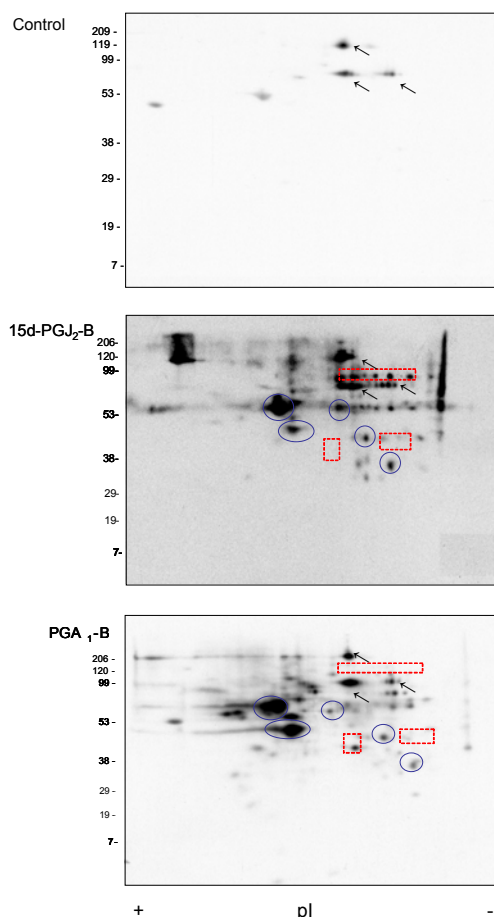


Figura 7. Western Blot de lisados celulares de NIH-3T3 tratados en ausencia o presencia de 5 μ M 15d-PGJ₂ o 60 μ M PGA₁B. Las proteínas celulares fueron resueltas mediante electroforesis en 2 dimensiones usando tiras de isoelectroenfoque de pH 3-10 y seguida de detección de biotina. Las proteínas endógenas biotiniladas están marcadas mediante flechas. Las proteínas que aparecen marcadas en ambas condiciones están señaladas con círculos. Las que aparecen de forma selectiva están rodeadas por rectángulos de línea discontinua marcada.

El conjunto de estas observaciones apoya la existencia de selectividad en la modificación de proteínas por 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B en células intactas.

1.5 Modificación de proteínas por 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B en lisados celulares.

Como hemos visto en apartados anteriores, la unión de ambas prostaglandinas con estructura ciclopentenona a proteínas celulares presenta tanto diferencias cuantitativas como cualitativas. Estas diferencias podrían ser debidas en parte a una diferente acumulación intracelular o una distinta reactividad de ambos prostanoides frente a tioles celulares. Para analizar estas posibilidades exploramos la unión de 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B a proteínas en lisados celulares. Como se observa en la figura 8, las diferencias cuantitativas y cualitativas observadas anteriormente en la incorporación de ambos prostanoides a proteínas en células intactas, se reducen cuando son los lisados celulares los que se tratan con ambos prostanoides. En este caso, las diferencias en la intensidad de la señal de biotina tan sólo son estadísticamente significativas a las concentraciones más bajas de cyP. Este análisis podría indicarnos que factores determinados por la integridad celular son importantes para la modificación diferencial de proteínas por cyP.

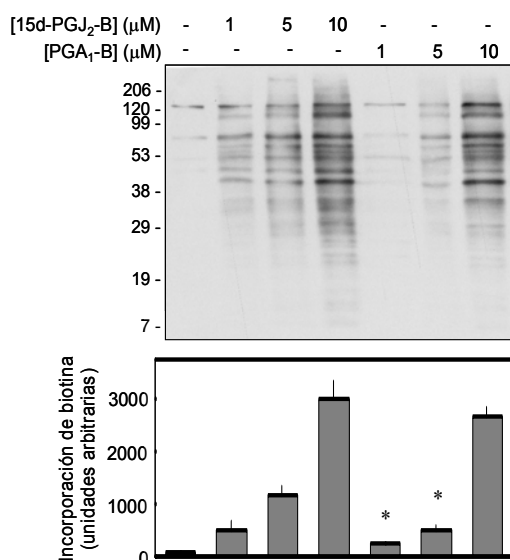


Figura 8. Incorporación de prostaglandinas biotiniladas a proteínas de extractos celulares aislados de fibroblastos. Lisados celulares aislados fueron incubados con las concentraciones indicadas de 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B y la incorporación de biotina fue ensayada como se describe en la figura 2. Los resultados son la media ± S.E.M de valores obtenidos en 5 ensayos (*P<0,05 según test t-Student).

1.6 Efecto del glutatión (GSH) en la unión de cyPG a proteínas.

1.6.1 Efecto de la modulación de la síntesis de GSH sobre la modificación de proteínas celulares por cyPG biotiniladas.

La concentración intracelular de GSH ha sido propuesta como un factor fundamental en la regulación de los efectos mediados por prostaglandinas ciclopentenonas (Noyori, 1993). Por ello, nos hemos planteado explorar si el GSH podría afectar a la intensidad o a la selectividad en la modificación de proteínas por cyP biotinilados, y cómo podría afectar a la localización subcelular de las mismas. Como se ha mostrado en el apartado anterior y se aprecia en la figura 9, la incorporación de 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B a proteínas en extractos celulares aislados es similar en ausencia de GSH.

Por otro lado, la adición de GSH a concentraciones dentro del rango en el cual se encuentra en el interior celular, reduce la incorporación de cyP a proteínas en lisados celulares (Fig. 9A). Además, esta inhibición afecta de forma más marcada a la unión de PGA₁-B y sobre todo a determinadas bandas polipeptídicas (marcadas mediante flechas, Fig. 9A y 9B). El análisis de estos efectos mediante densitometría (Fig. 9B), confirma que la adición de GSH altera el patrón de incorporación de ambas prostaglandinas a proteínas celulares, siendo más marcadas estas diferencias en el caso de PGA₁-B. Estas observaciones sugieren que los niveles intracelulares de GSH podrían influir en la modificación diferencial de ciertas proteínas por 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B en células intactas.

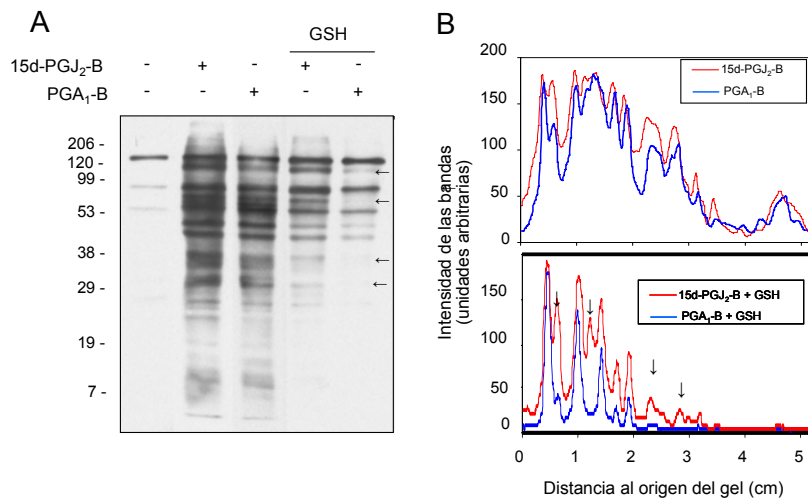


Figura 9. Efecto del GSH en la unión de cyP biotinilados a proteínas in vitro. (A) Lisados celulares de fibroblastos NIH-3T3 fueron incubados con concentraciones de 10 μ M de 15d-PGJ₂-B o PGA₁-B en ausencia o en presencia de 2 mM GSH. Las bandas señaladas mediante flechas indican posibles proteínas celulares en las cuales la presencia de GSH ha reducido la incorporación de cyP biotinilados. La imagen que se muestra es representativa de 4 ensayos diferentes. (B) Patrones densitométricos obtenidos para cada calle.

Para comprobar esta hipótesis, empleamos estrategias para modificar los niveles de GSH intracelular. En primer lugar, realizamos pretratamientos en fibroblastos NIH-3T3 con un inhibidor de la síntesis de GSH: la butionina sulfoximina (BSO). Este inhibidor indujo un incremento en la incorporación de cyP biotinilados a proteínas en forma dependiente de la concentración empleada (Fig. 10 A y B). Una cuantificación de este efecto se presenta en la figura 10C. Además, el aumento fue más marcado en algunas bandas polipeptídicas concretas (señaladas mediante flechas en la figura 10). Por otro lado, el pretratamiento de las células con N-acetil-cisteína (NAC), que proporciona un precursor en la síntesis de GSH, redujo la incorporación de cyP biotinilados a proteínas celulares, más intensamente en el caso de PGA₁-B

(Fig. 10D). Estos resultados muestran por primera vez la existencia de una reactividad diferencial de estos prostanoides con respecto a proteínas celulares que depende de la presencia de tioles celulares solubles. De esta manera podría surgir una cierta selectividad en la modificación de proteínas por cyP.

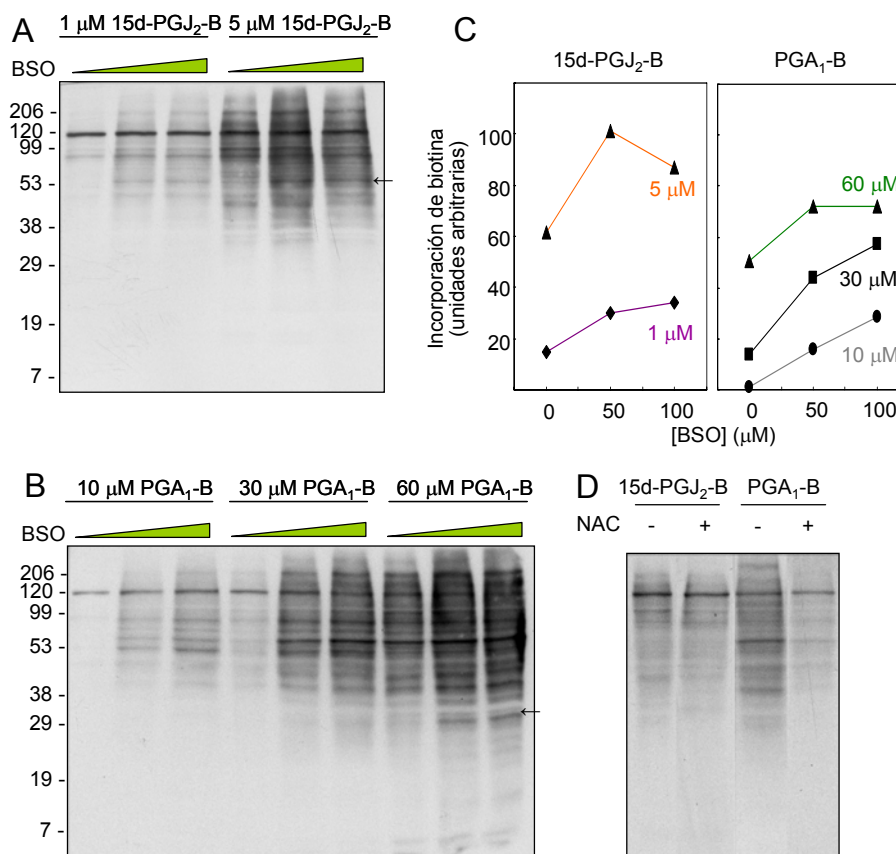


Figura 10. La modulación de los niveles celulares de GSH afecta a la unión de cyP biotiniladas a proteínas en células. Fibroblastos NIH-3T3 fueron preincubados con BSO (a 0, 50 ó 100 μ M) en medio sin suero durante 16 horas, antes del tratamiento con 15d-PGJ₂-B o PGA₁-B a las concentraciones indicadas durante 2 horas. La incorporación de cyP biotinilados a proteínas celulares fue observada mediante Western blot con estreptavidina peroxidasa y detección mediante quimioluminiscencia. La intensidad de la señal de biotina fue cuantificada mediante digitalización de las imágenes y los resultados se muestran en el panel C. (D) Los fibroblastos fueron incubados con 5 mM N-acetil-cisteína (NAC) durante 16 horas. La posterior incubación con 15d-PGJ₂-B (5 μ M) y PGA₁-B (60 μ M) fue llevada a cabo en medio sin suero y sin NAC. Los paneles mostrados son representativos de tres experimentos con resultados similares.

Los cambios observados en determinadas bandas podrían indicar que existen determinadas proteínas cuya modificación por cyP es más sensible a la presencia de GSH, es por ello, por lo que nos propusimos estudiar más a fondo este fenómeno con proteínas recombinantes.

1.6.2 Efecto del GSH en la unión de cyP a proteínas recombinantes *in vitro*.

En trabajos previos realizados en el laboratorio se ha caracterizado la unión de cyP a diversas proteínas tanto en células intactas como en ensayos *in vitro*. Entre estas dianas se encuentran la subunidad p50 del factor de transcripción NF- κ B (Cernuda-Morollón, 2001), c-Jun (Pérez-Sala, 2003), H-Ras (Renedo, 2007) o GSTP1-1 (Sánchez-Gómez, 2007). Por ello, decidimos emplear una serie de proteínas recombinantes purificadas para explorar cómo los niveles de GSH podían afectar a la unión de cyP a proteínas concretas. En primer lugar, analizamos la incorporación de 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B a c-Jun, GSTP1-1 y H-Ras en ensayos de dosis-respuesta.

Como se puede observar en la figura 11, la 15d-PGJ₂-B es capaz de formar aductos covalentes con c-Jun y H-Ras de forma más eficaz que PGA₁-B; sin embargo, la intensidad de la modificación es similar en el caso de GSTP1-1. Estas observaciones indican que la eficiencia en la modificación de proteínas por parte de las cyP depende tanto de la proteína diana, como de la estructura de los cyP. En el caso de H-Ras, la incubación con PGA₁-B dio lugar a dos bandas definidas en el análisis con estreptavidina–peroxidasa (señaladas mediante las dos flechas superiores en la figura 11C), las cuales poseen una movilidad electroforética menor a la banda correspondiente a H-Ras sin modificar (señalada mediante la flecha inferior). Este patrón indica que PGA₁-B podría unirse a varios sitios en la proteína H-Ras, dando lugar a diversos aductos, como estudiaremos más adelante.

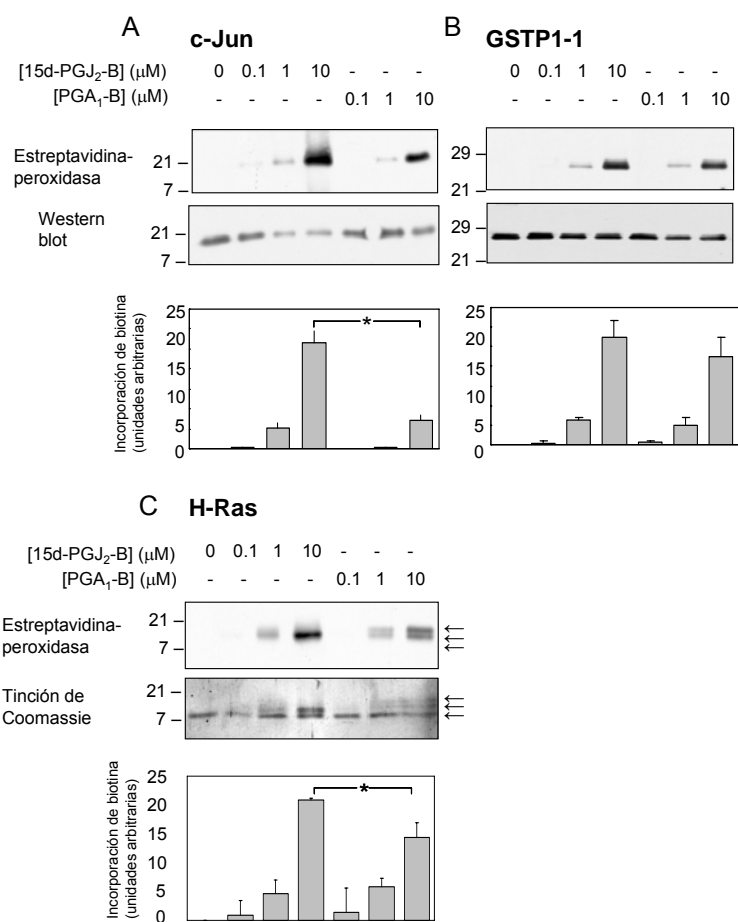


Figura 11. Modificación de varias proteínas recombinantes por 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B. c-Jun (5 μM), GSTP1-1 (2,5 μM) y H-Ras (5 μM) recombinantes fueron incubadas con las concentraciones indicadas de cyP ó DMSO. La formación de aductos covalentes entre cyP biotinilados y las proteínas fue estimada mediante Western blot con estreptavidina-peroxidasa. Los resultados que se presentan son valores medios ± S.E.M. de valores obtenidos en 3 ensayos (*p<0,05, según test t-Student).

A continuación exploramos el efecto del GSH, a concentraciones dentro del rango en el que se encuentra en la célula (0,5 – 2 mM). En el caso de GSTP1-1, el GSH redujo, de forma muy evidente, la incorporación de 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B a la proteína a concentraciones bajas (0,5 mM) (Fig. 12A); sin

embargo, se necesitaron concentraciones mucho más altas (2 mM) para disminuir de forma notable el marcaje en c-Jun (Fig.12B). Por otro lado, el GSH redujo la incorporación de cyP en H-Ras a medida que aumentaba la concentración del mismo (Fig. 12C). Como se puede observar, el GSH redujo la unión de PGA_1-B a GSTP1-1 y a H-Ras de manera más eficaz que la unión de 15d-PGJ₂-B. La estructura de los distintos cyP podría ser uno de los factores que influyen en que el GSH afecte de manera diferente a la unión de cyP a diversas proteínas.

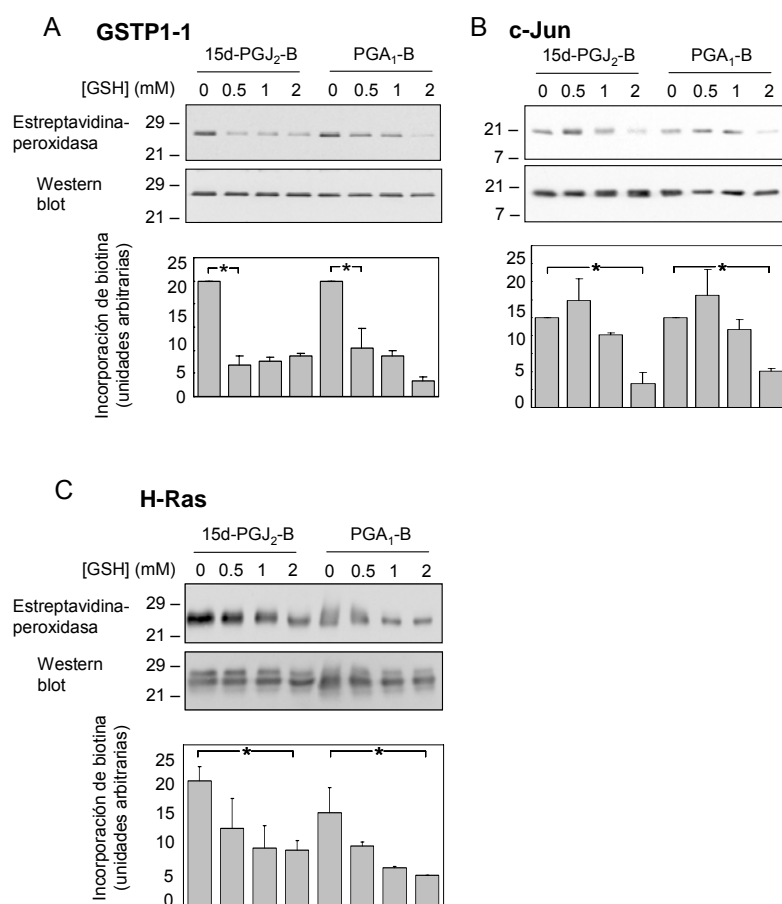


Figura 12. Efectos de los niveles de GSH en la unión de cyP biotinilados a proteínas recombinantes. Las proteínas recombinantes GSTP1-1 (2,5 μ M), c-Jun (5 μ M) y H-ras (5 μ M) fueron incubadas con 15d-PGJ₂-B o PGA₁-B (10 μ M) en presencia de las concentraciones indicadas de GSH y la unión de biotina fue analizada mediante Western blot. Los resultados de la estimación de biotina están expresados en unidades arbitrarias con respecto a los valores obtenidos en ausencia de GSH. Los resultados son valores medios \pm S.E.M. de valores obtenidos en 3 ensayos (*p<0,05, según test t-Student).

Estos resultados muestran que la susceptibilidad de distintas proteínas al efecto de GSH es diferente y pueden contribuir a explicar el efecto del GSH sobre la selectividad en la modificación de proteínas por prostaglandinas ciclopentenonas.

2. ESTUDIO DE LA MODIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA H-RAS POR 15d-PGJ₂ Y PGA₁.

Como hemos observado anteriormente, las proteínas H-Ras pueden ser modificadas por varios tipos de eicosanoides electrófilos, como las prostaglandinas 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B. Basándonos en las evidencias anteriores, hemos llevado a cabo un estudio más detallado mediante técnicas más resolutivas que nos permitan analizar la selectividad en la incorporación de cyP a la estructura de H-Ras.

2.1 Análisis de la interacción de 15d-PGJ₂ y PGA₁ con H-Ras mediante espectrometría de masas.

La incubación de la proteína H-Ras recombinante con vehículo (DMSO) (Fig. 13), dio lugar a un pico mayoritario con una masa aproximada de 21298, el cual se corresponde con el peso molecular de la proteína recombinante no modificada. El tratamiento de H-Ras con 15d-PGJ₂ (masa molecular 316.4 kDa) nos permitió observar un aducto principal de masa 21617 kDa, el cual podría corresponder a la proteína unida a una molécula de 15d-PGJ₂ y un pico minoritario a 21299 que correspondería con la fracción de proteína no modificada. Tras el tratamiento de H-Ras con PGA₁ (masa molecular 336.5 kDa) pudimos advertir hasta 3 aductos con diferentes masas: 21640, 21978 y 22318, compatibles con la adición de una, dos o 3 moléculas de PGA₁, respectivamente, además del pico perteneciente a la proteína sin modificar.

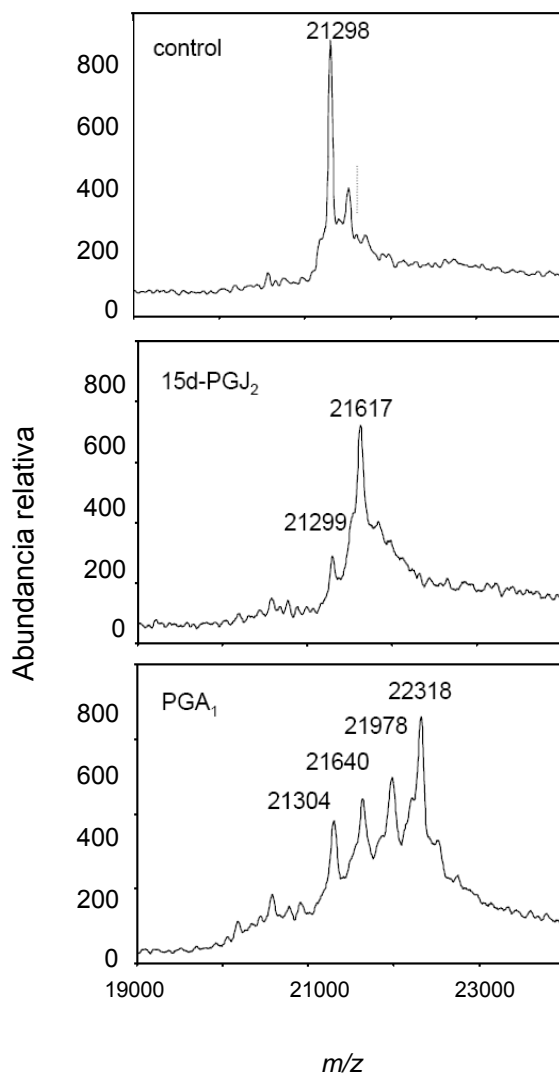


Figura 13. Análisis mediante espectrometría de masas MALDI-TOF de la interacción de 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B con H-Ras. La proteína recombinante (5 μ M) fue incubada durante 1 hora a temperatura ambiente en presencia de vehículo (DMSO) o de los cyP indicados a una concentración de 50 μ M. Después de la purificación en microcolumnas ZipTip, H-Ras fue analizada mediante MALDI-TOF MS. Los resultados son representativos de 3 ensayos con resultados similares.

2.2 15d-PGJ₂ y PGA₁ modifican selectivamente distintos residuos de cisteína de H-Ras *in vitro*.

Con el fin de intentar profundizar en la diferente modificación de proteínas Ras por 15d-PGJ₂ y PGA₁, analizamos mediante MALDI-TOF MS péptidos procedentes de la digestión con tripsina de H-Ras incubada con vehículo o cada uno de los prostanoideos (Fig. 14). El listado teórico de todos los péptidos trípticos de H-Ras control nos sirvió de base para estudiar posteriormente los péptidos generados en presencia de los cyP. Pudimos observar la presencia de péptidos cuya m/z era compatible con la presencia de aductos proteína-cyP.

Algunos de los péptidos modificados están marcados con asteriscos en la figura 14 y se presentan más detalladamente en la tabla 1. Los posibles sitios de modificación detectados están situados próximos al carboxilo terminal de la proteína en el péptido que contiene las cisteínas 181 y 184 o bien en los péptidos que contienen la cisteína 118, que está localizada en el sitio de unión a GTP de la proteína. Las intensidades relativas de los péptidos modificados fueron diferentes dependiendo del cyP usado. Después del tratamiento de H-Ras con 15d-PGJ₂, las especies más abundantes detectadas comprenden el grupo de péptidos de m/z 1979.2, 1995.2 y 2011.2. Estos datos son compatibles con la unión de 15d-PGJ₂ al péptido 170-185, que contiene las cisteínas 181 y 184.

Por otro lado, el tratamiento de H-Ras con PGA₁ dio lugar a una serie de péptidos cuya m/z se correspondía con la modificación de las cisteínas 118, 181 y/o 184. En este caso, la especie mayoritaria detectada fue el péptido con una m/z de 984.8 que se corresponde con la modificación de la cisteína 118.

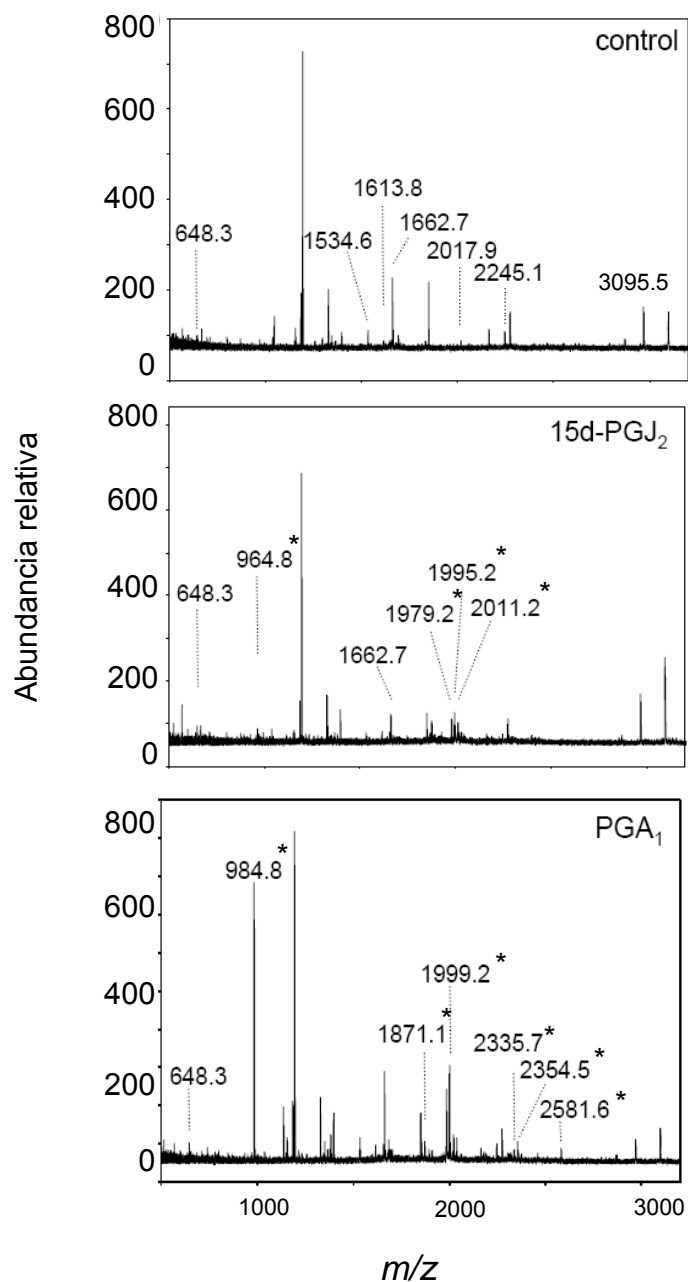


Figura 14. Análisis mediante MALDI-TOF MS de digestiones trípticas de H-Ras modificada por cyP. H-Ras fue incubada con los prostanoides indicados y digerida con tripsina. La mezcla de péptidos resultante se purificó en ZipTip y se analizó mediante MALDI-TOF MS. Se muestran los valores monoisotópicos (m/z) de algunos de los picos más destacados. Los asteriscos indican la m/z de péptidos compatible con la adición de una o dos moléculas de cyP. Los resultados son representativos de 2 ensayos diferentes.

En la siguiente tabla se indican los valores de m/z y la posición teórica en la secuencia de la proteína de H-Ras, de péptidos que aparecen en las digestiones de la proteína incubada con 15d-PGJ₂ o PGA₁, cuyas masas son compatibles con la de péptidos modificados teóricos procedentes de digestión triptica.

Observamos péptidos con una m/z compatible con la adición de una molécula de 15d-PGJ₂ (+316.5) que contenían la cisteína 118 (CDLAAR; m/z = 964.81) y péptidos que contenían las cisteínas 181 y 184 (.....CMSCK), con unas masas de 1979.23, 1995.23 y 2011.23 respectivamente. En lo que respecta a la modificación con PGA₁, localizamos péptidos que contenían una m/z compatible con la adición de PGA₁ (+336.5) en cuya secuencia poseían la cisteína 118 (CDLAAR) con una m/z de 984.81 y 2581.63 respectivamente; y péptidos que contenían la cisteína 181 y 184 (.....CMSCK), con unas masas de 1871.13 y 1999.23 compatibles con la adición de una molécula de PGA₁ y péptidos con masas de 2335.73 compatibles con la adición de dos moléculas de PGA₁.

m/z teórico	m/z experimental			Posición	Secuencia
	Control	+15d-PGJ ₂ (316.5)	+PGA ₁ (336.5)		
648.3	648.2	964.81	984.81	118-123	CDLAAR
681.4	681.4	-	-	165-169	QHKLR
712.3	712.1	-	-	69-73	DQYMR
801.4	801.3	-	-	129-135	QAQDLAR
955.6	955.5	-	-	6-16	LVVVGAGGVGK
1194.5	1194.5	-	-	87-97	SFEDIHQYR
1328.6	1328.5	-	-	136-147	SYGIPYIETSAK
1388.7	1388.4	-	-	105-117	DSDDVPMVLVGNK
1397.7	1397.6	-	-	150-161	QGVEDAFYTLVR
1534.6	1534.4	-	-	171-185	LNPPDESGPGCMSCK
1607.9	1607.7	-	-	1-16	MTEYKLVVVGAGGVGK
1615.8	1615.7	-	-	107-117	VKSDDDVPMVLVGNK
1662.7	1662.73	1979.23	1999.23	170-185	KLNPPDESGPGCMSCK
"	-	1995.23	-	170-185	KLNPPDESGPGCMSCK (+O)
"	-	2011.23	-	170-185	KLNPPDESGPGCMSCK (+2O)
"	-	-	2335.73	105-123	KLNPPDESGPGCMSCK (+2cyP)
1692.8	1692.8	-	-	89-101	SFEDIHQYREQIK
1848.9	1848.9	-	-	89-102	SFEDIHQYREQIKR
2018.0	2017.7	-	2354.47	105-123	DSDDVPMVLVGNKCDLAAR
2111.1	2111.1	-	-	129-147	QAQDLARSYGIPYIETSAK
2245.1	2244.8	-	2581.63	105-123	VKSDDDVPMVLVGNKCDLAAR
2368.2	2368.0	-	-	129-149	QAQDLARSYGIPYIETSAKTR
2446.2	2445.9	-	-	148-167	TRQGVEDAFYTLVREIRQHK
2458.3	2458.1	-	-	150-169	QGVEDAFYTLVREIRQHKLR
2715.5	2715.4	-	-	148-169	TRQGVEDAFYTLVREIRQHKLR
2869.4	2869.4	-	-	43-68	QVVIDGETCLLDILDTAGQEEYSAMR
2967.4	2967.1	-	-	17-41	SALTIQLIQNHVDEYDPTIEDSYR
3095.5	3095.5	-	-	17-42	SALTIQLIQNHVDEYDPTIEDSYRK

Tabla 1. Resumen de la m/z calculada y observada de los péptidos potencialmente modificados por 15d-PGJ₂ y PGA₁, su posición en la secuencia de H-Ras y su secuencia. Para H-Ras tratada con prostaglandinas, sólo se muestran los péptidos cuya m/z observada es compatible con péptidos modificados por cada uno de los cyP. Los residuos de cisteína aparecen señalados en rojo. +O, m/z compatible con la adición de oxígeno; +2 cyP, m/z compatible con la adición de 2 moléculas de cyP.

Las diferencias cuantitativas y cualitativas observadas en los mapas peptídicos se resumen en la figura 15, en la que se muestran las intensidades relativas de los péptidos modificados que contienen la cisteína 118 o la cisteína 181 y la 184, ambos con una molécula de cyP; o la cisteína 181 y 184 y dos moléculas de cyP. Estos resultados sugieren que la 15d-PGJ₂ se une preferentemente al

péptido que contiene las cisteínas 181 y la 184, mientras que la PGA_1 lo hace en el que contiene la cisteína 118.

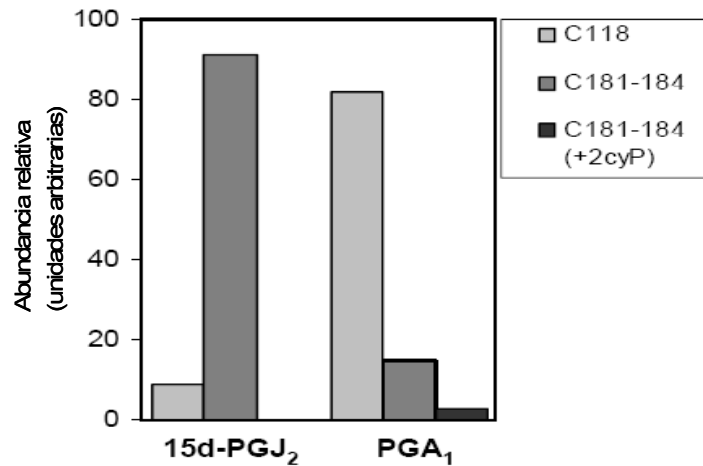


Figura 15. Intensidades relativas correspondientes a los péptidos modificados de H-Ras por 15d-PGJ₂ y PGA₁. Las intensidades de los diferentes picos correspondientes a los péptidos han sido normalizadas con respecto a la intensidad de uno de los péptidos no modificados ($m/z = 3095.5$), y a continuación se han expresado como porcentaje de la suma de la intensidad de todos los picos modificados en cada ensayo. Los resultados son los valores medios de al menos dos determinaciones. C118 y C181-184 indican picos compatibles con la adición de una molécula de cyP a péptidos que contienen la cisteína 118 o la cisteína 181 y 184, respectivamente. C181-184 (+2cyP) son picos compatibles con la unión de dos moléculas de cyP a péptidos que contienen las cisteínas 181 y 184.

La identidad de los péptidos mayoritarios modificados fue confirmada mediante el análisis de los correspondientes picos por MALDI-TOF-TOF MS-MS (Fig. 16). El análisis del péptido de masa 984.8 procedente del tratamiento de H-Ras con PGA_1 nos permitió obtener la secuencia del mismo (CDLAAR), en la cual encontramos la cisteína 118. La masa del péptido (m/z 648.3) se vio incrementada en 336.5 daltons, que se corresponde con la adición de una molécula de PGA_1 . Este incremento de masa fue observado en los iones b2-H₂O, b3-H₂O, b4-H₂O e y6, lo cual indica la modificación de la cisteína 118.

La identidad del péptido mayoritario modificado por 15d-PGJ₂, había sido confirmada previamente mediante experimentos de mutagénesis (Oliva, 2003).

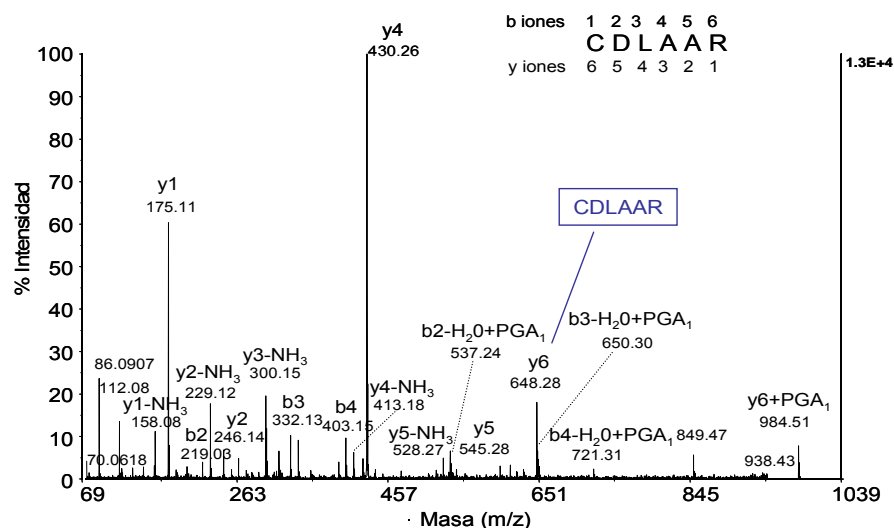


Figura 16. Análisis mediante MALDI-TOF-TOF MS de péptidos modificados. El péptido con m/z 984.8 de H-Ras tratada con PGA₁ fue secuenciado mediante MS-MS. La secuencia obtenida está recuadrada en azul.

2.3 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B modifican selectivamente H-Ras tanto *in vitro* como en células.

Los resultados mostrados en los apartados anteriores nos indican que cyP con diferente estructura se unen preferentemente a distintos residuos de cisteína en H-Ras *in vitro*. Con el fin de explorar la potencial modificación diferencial de proteínas H-Ras por eicosanoides en sistemas biológicos, usamos los análogos biotinilados de 15d-PGJ₂ y de PGA₁.

En primer lugar confirmamos que ambos compuestos biotinilados poseen la misma reactividad hacia H-Ras *in vitro* que los no biotinilados. La 15d-PGJ₂-B (masa 626) forma un aducto simple con H-Ras, mientras que PGA₁-B (masa 661) es capaz de formar dos o tres aductos según pudimos detectar mediante MALDI-TOF MS MS (Fig. 17). Estos patrones son análogos a los observados con los compuestos sin biotinar (Fig.13)

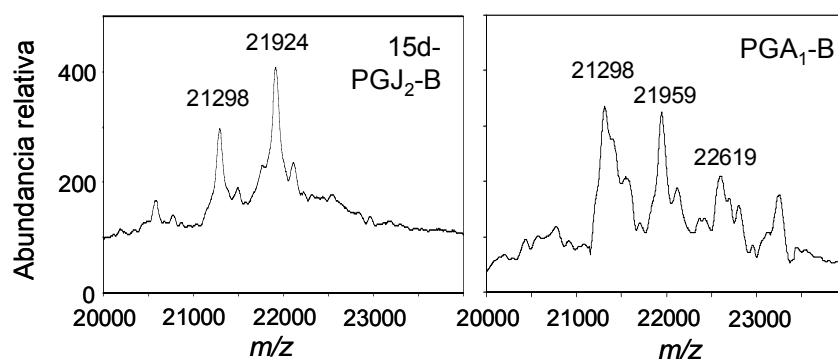


Figura 17. Modificación de H-Ras por 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B *in vitro*. H-Ras (5 μM) fue incubada con 15d-PGJ₂-B o PGA₁-B (50 μM) y analizada mediante MALDI-TOF MS.

Posteriormente ensayamos la unión de los cyP biotinilados a H-Ras en células. Previamente hemos descrito que ambas ciclopentenonas biotiniladas forman aductos estables con proteínas celulares en células intactas pero con una potencia diferente. Por ello, tratamos en primer lugar células COS-7 con varias concentraciones de cyP biotinilados para observar en qué condiciones obteníamos una intensidad de la incorporación de biotina en proteína total que fuera similar con ambas cyPG (resultados no mostrados). En función de las señales detectadas escogimos 3 μM de 15d-PGJ₂-B y 30 μM de PGA₁-B para realizar los experimentos siguientes, puesto que, como se observa en la figura 18A, en estas condiciones, la modificación de proteínas celulares es similar. Posteriormente, transfectamos las células COS-7 con el plásmido pCEFL-AU5 o pCEFL-AU5-H-Ras y las incubamos con ambos prostanoides biotinilados.

En las células transfectadas observamos una señal de biotina correspondiente a la unión de 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B a la proteína H-Ras, la cual estaba ausente en células no transfectadas con el plásmido de H-Ras (Fig. 18B). Similares resultados obtuvimos en células HeLa y NIH-3T3 (resultados no mostrados).

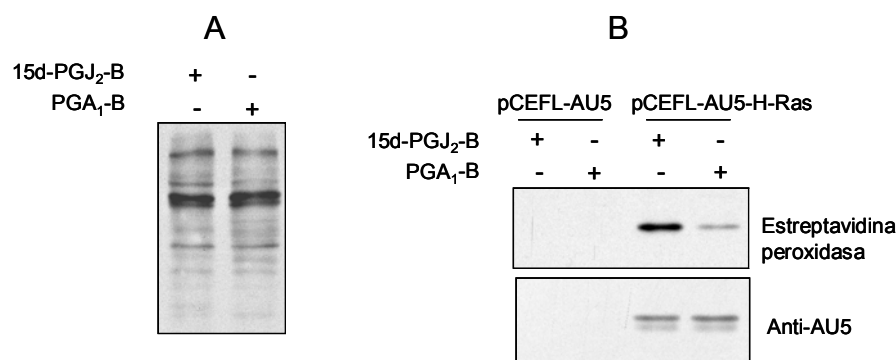


Figura 18. Modificación de H-Ras por 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B en células. (A) Células COS-7 fueron incubadas con 15d-PGJ₂-B (3 μM) o PGA₁-B (30 μM). La incorporación estable de estos compuestos a proteínas fue observada mediante SDS-PAGE y Western blot. (B) Células COS-7 transfectadas con el plásmido pCEFL-AU5 o pCEFL-AU5-H-Ras fueron incubadas con 15d-PGJ₂-B (3 μM) o PGA₁-B (30 μM) y la incorporación de biotina fue detectada mediante Western blot con estreptavidina peroxidasa y ECL. Los niveles de AU5-H-Ras fueron estimados también mediante inmunoblot. Los resultados mostrados son representativos de 4 ensayos.

2.4 Estudio de la repercusión funcional de la modificación de H-Ras por cyP en células.

Para explorar la posible modificación diferencial de H-Ras por distintos prostanoides en células intactas, transfectamos células COS-7 con el plásmido que codifica la forma salvaje de H-Ras (H-Ras wt), o con los plásmidos que codifican formas mutantes de H-Ras en las que la cisteína 118 o la cisteína 184 han sido sustituidas por serinas (C118S o C184S, respectivamente).

Posteriormente tratamos las células con 15d-PGJ₂-B o PGA₁-B. Curiosamente, la unión de 15d-PGJ₂-B a H-Ras se redujo considerablemente cuando las células se transfectaron con el mutante de H-Ras en la cisteína 184, mientras que la mutación en la cisteína 118 no tuvo efecto alguno (Fig. 19A). Por otro lado, la unión de PGA₁-B a H-Ras se redujo parcialmente tanto en el mutante de la cisteína 184 como de la 118. Esto indicaría que la unión de 15d-PGJ₂-B a H-Ras se llevaría a cabo fundamentalmente en la cisteína 184, mientras que PGA₁-B podría unirse en la cisteína 118 o en la 184. Estas observaciones indican que en la unión de cyP biotinizados a cisteínas de H-Ras existe una cierta modificación diferencial en células vivas.

Previamente, se había descrito que la modificación de proteínas H-Ras por 15d-PGJ₂ estaba asociada con un incremento de los niveles de Ras unido a GTP en células intactas según se estima mediante la unión a GST-RBD inmovilizada, una proteína de fusión que contiene el dominio de unión de Raf a GTP-Ras (Oliva, 2003). Por ello, exploramos a continuación los efectos de 15d-PGJ₂ y PGA₁ sobre los niveles de Ras presente en su conformación activa, es decir, capaz de unirse a GST-RBD, en células HeLa. Este trabajo fue realizado gracias a una colaboración con el grupo de Dr. José María Rojas del Instituto de Salud Carlos III (Majadahonda, Madrid).

Las células fueron transfectadas con vectores de expresión que codifican la forma salvaje (wt) de H-Ras o los mutantes en la cisteína 118 (C118S) y 184 (C184S) (Fig. 19B). Como podemos observar, ambos cyP indujeron un incremento en la proporción de H-Ras presente en su conformación activa aunque menor que el inducido por el factor de crecimiento epidérmico (EGF). La activación de H-Ras asociada al tratamiento con PGA₁ fue claramente menor en el mutante en la cisteína 118. Sin embargo, este mutante fue activado por 15d-PGJ₂ con una intensidad similar a la de la forma salvaje de H-Ras. La activación de H-Ras en los mutantes en la cisteína 184 se redujo sobre todo en aquellas células que habían sido tratadas con 15d-PGJ₂, mientras que en células tratadas con PGA₁, el mutante fue activado ligeramente. Estos resultados sugieren que la modificación de H-Ras en células por distintos cyP podría tener distintas consecuencias funcionales.

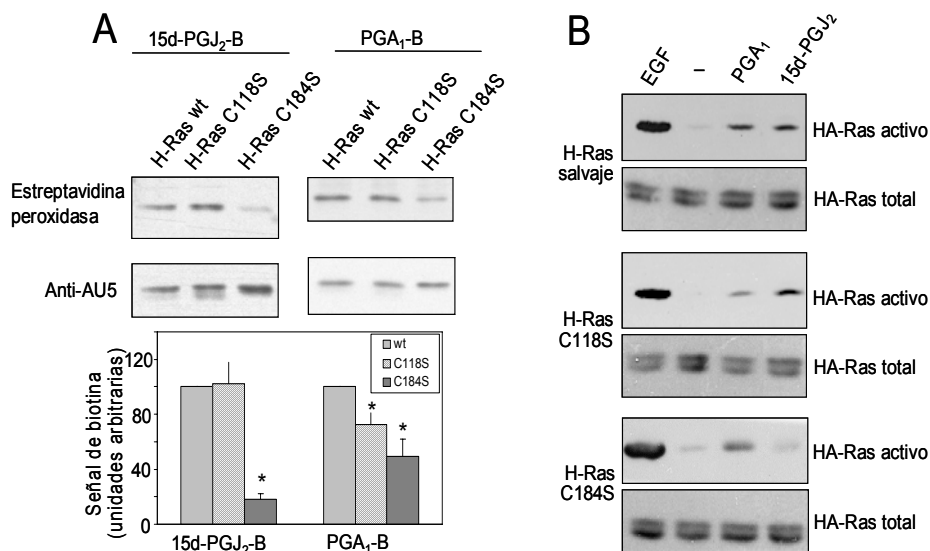


Figura 19. Modificación y activación de H-Ras salvaje y mutada por cyP. (A) Células COS-7 fueron transfectadas transitoriamente con los plásmidos pCEFL-AU5-H-Ras wt, pCEFL-AU5-H-Ras C118S o pCEFL-AU5-H-Ras C184S y tratadas con 3 μ M 15d-PGJ₂-B o 30 μ M PGA₁-B. La incorporación de ambos cyP biotinilados a las formas salvajes (wt) y mutadas de H-Ras fue ensayada como se describe en la figura anterior. Los niveles de H-Ras totales fueron estimados mediante Western blot con anticuerpo anti-AU5. Las exposiciones con ECL fueron cuantificadas. Los cocientes entre las intensidades de la biotina y la señal de la proteína son expresados como porcentaje de los valores obtenidos para la forma salvaje de H-Ras. Los resultados son la media \pm error estándar de 4 determinaciones (* p < 0.05 por el test t-Student con respecto a H-Ras forma salvaje). (B) Células HeLa fueron transfectadas pCEFL-HA-H-Ras, cultivadas en medio sin suero durante 18 horas y posteriormente incubadas con vehículo (-), 100 nM EGF, 3 μ M 15d-PGJ₂ o 10 μ M PGA₁ durante 10 minutos. H-Ras fue recuperada en su conformación activa de los lisados celulares mediante unión a GST-RBD inmovilizada. La detección se llevó a cabo mediante inmunoblot con el anticuerpo monoclonal anti-HA. Los niveles de expresión de las proteínas Ras transfectadas fueron estimados mediante Western blot de los extractos celulares con anti-HA (paneles inferiores).

3. ESTUDIO DE LAS PROTEÍNAS MODIFICADAS SELECTIVAMENTE POR PROSTAGLANDINAS CICLOPENTENONAS BIOTINILADAS EN CÉLULAS INTACTAS.

Como hemos podido comprobar en los apartados anteriores, existe una selectividad en la modificación de proteínas por 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B que se manifiesta tanto en células intactas, en las que cada cyP puede modificar polipéptidos diferentes, como en proteínas individuales, en las que cada cyP puede unirse preferentemente a distintos sitios. La identificación de las dianas de modificación selectiva por una u otra prostaglandina podría proporcionar información sobre las características estructurales de las proteínas o de las cyP que determinan esta selectividad.

3.1 Abordajes para la obtención de fracciones enriquecidas en proteínas modificadas con 15d-PGJ₂-B o PGA₁-B.

3.1.1 Fraccionamiento subcelular.

Para profundizar en el conocimiento de las proteínas que resultan selectivamente modificadas por 15d-PGJ₂-B o por PGA₁-B intentamos en primer lugar obtener fracciones celulares potencialmente enriquecidas en alguna de las proteínas selectivamente modificadas por una u otra prostaglandina.

En experimentos de microscopía de fluorescencia, habíamos observado que la distribución intracelular de ambos cyP en fibroblastos era fundamentalmente citosólica (Fig. 3). Por ello, decidimos en primer lugar realizar fraccionamientos citosol-núcleo. Las fracciones citosólicas y nucleares de células NIH-3T3 tratadas con 15d-PGJ₂-B 5 µM o PGA₁-B 60 µM respectivamente se obtuvieron tal y como se describe en el apartado de “Material y métodos” (Fig. 20).

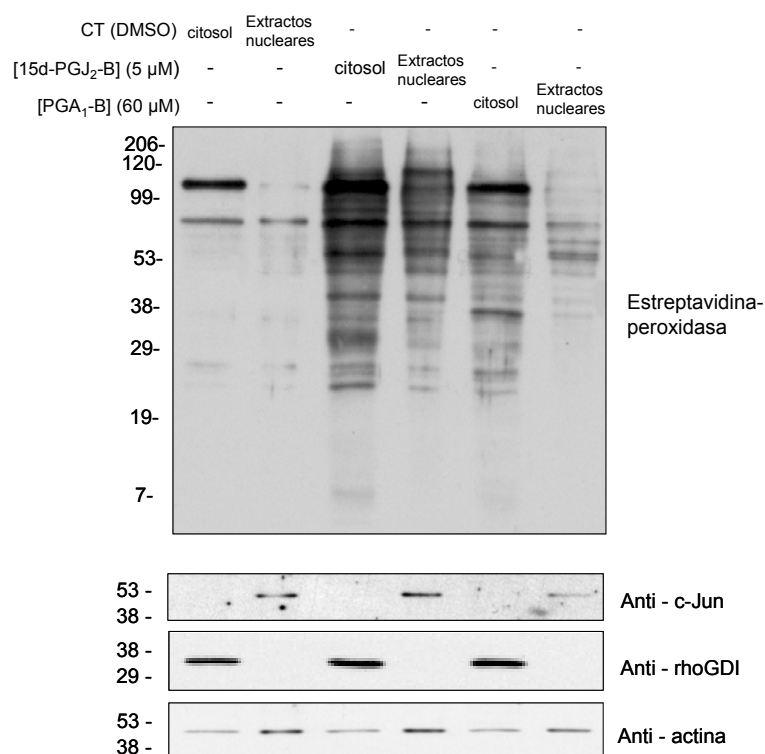


Figura 20. Fraccionamientos citosol-núcleo de fibroblastos NIH-3T3 tratados con cyP biotinilados. Fibroblastos de ratón NIH-3T3 fueron tratados con vehículo (DMSO), 15d-PGJ₂-B 5 μM o PGA₁-B 60 μM. Posteriormente se obtuvieron las fracciones citosólicas y los extractos nucleares. 5 μg de proteína se procesaron mediante Western blot y detección con estreptavidina acoplada a peroxidasa o con los anticuerpos que se indican. Las imágenes que se muestran son representativas de 4 experimentos con resultados similares.

Como se puede observar, la señal correspondiente a la biotina fue más intensa en las fracciones citosólicas, tratadas con 15d-PGJ₂-B o PGA₁-B, en concordancia con lo observado mediante microscopía de fluorescencia. Como control de los fraccionamientos incubamos las membranas con anticuerpos frente a proteínas cuya localización subcelular es conocida. Así pues, usamos anti c-Jun como control de proteínas nucleares, anti RhoGDI como control de proteínas citosólicas y anti actina como control de carga de proteína total.

Con el fin de establecer un procedimiento sencillo para la purificación e identificación de algunas de las dianas citosólicas, decidimos realizar fraccionamientos S100-P100 para separar las fracciones soluble y de membrana. Así pues, tratamos células NIH-3T3 con ambos prostanoides y procedimos a obtener las fracciones citosólicas y de membrana tal y como se describe en el apartado “Material y métodos” y las analizamos mediante Western blot con estreptavidina peroxidasa (Fig. 21). Pudimos observar cómo la señal de biotina se localizaba principalmente en las fracciones de membrana. En las muestras tratadas con vehículo (DMSO) únicamente se detectaron las proteínas biotiniladas endógenas. Este segundo fraccionamiento nos permitió advertir en las fracciones citosólicas, proteínas selectivamente modificadas por una u otra prostaglandina de manera más clara en el caso de $\text{PGA}_1\text{-B}$ (marcadas con flechas).

Como control del fraccionamiento se usaron anticuerpos anti β -integrina, como control de proteína de membrana; anti RhoGDI como control de proteína citosólica y anti actina como control de proteína total. Para hacer más evidentes las diferencias en la unión de las prostaglandinas observadas en este fraccionamiento obtuvimos los perfiles densitométricos de las fracciones citosólicas (Fig. 22). En el citosol de células tratadas con $\text{PGA}_1\text{-B}$ aparecen algunas bandas que no se detectaron en la misma fracción de células tratadas con $15\text{d-PGJ}_2\text{-B}$ (marcadas mediante flechas). En concreto, cabe destacar la presencia de 3 bandas polipeptídicas con un tamaño aproximado de 35, 45 y 70 kDa. Estas bandas podrían por tanto, contener polipéptidos que se modificaran selectivamente por $\text{PGA}_1\text{-B}$. Por el contrario, algunos polipéptidos aparecen selectivamente marcados en la fracción citosólica de células tratadas con $15\text{d-PGJ}_2\text{-B}$.

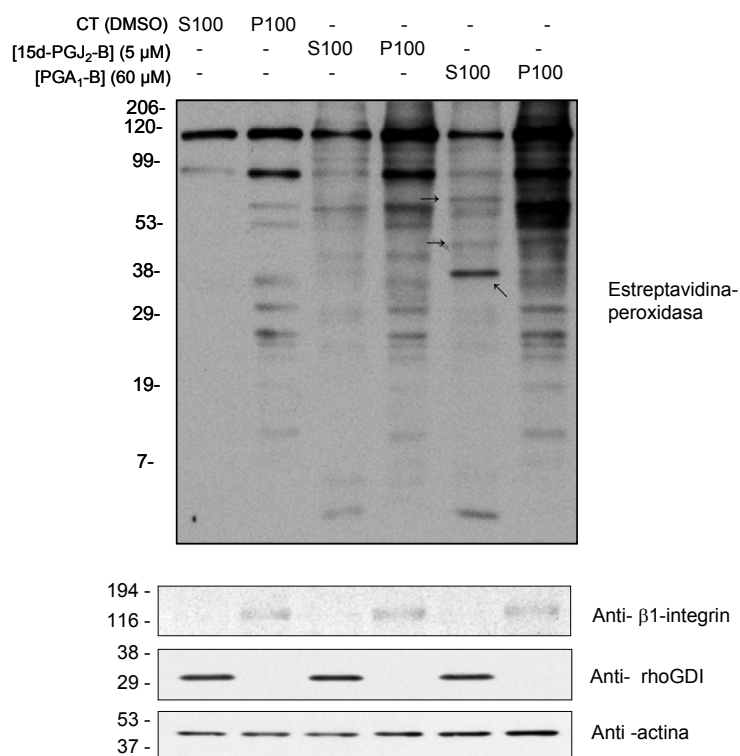


Figura 21. Fraccionamientos citosol-membrana de fibroblastos NIH-3T3 tratados con cyP biotinilados. Se realizaron fraccionamientos citosol-membrana de fibroblastos NIH-3T3 tratados con 5 μM 15d-PGJ₂-B y 60 μM PGA₁-B. El análisis posterior se realizó mediante Western blot y detección con estreptavidina-peroxidasa o con los anticuerpos que se indican. En él podemos observar la presencia de bandas polipeptídicas modificadas selectivamente por PGA₁-B (S100, fracción soluble; P100, fracción de membrana).

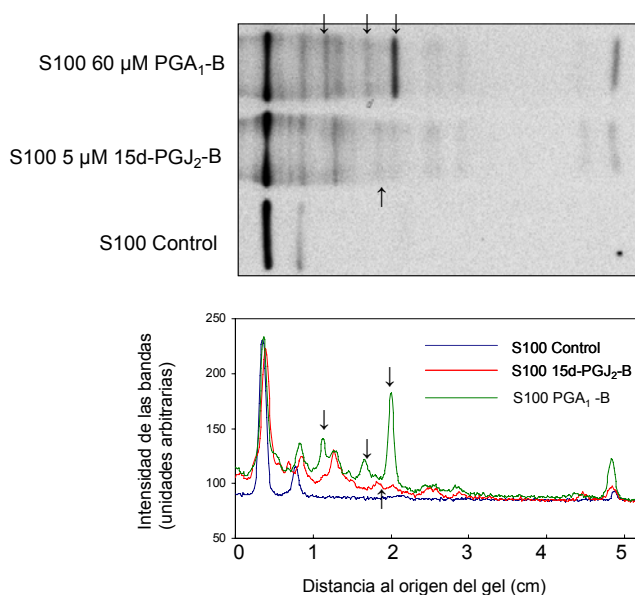


Figura 22. Diferencias cualitativas en la unión de cyP biotinilados a proteínas enriquecidas en fracciones S100 de NIH-3T3. Las muestras corresponden a fracciones S100 de fibroblastos NIH-3T3 control o tratados con 5 μM 15d-PGJ₂-B ó 60 μM PGA₁-B resueltas posteriormente por SDS-PAGE y Western blot. Se muestran los patrones densitométricos para cada calle. Las flechas indican bandas de polipéptidos en las que se aprecian las diferencias más evidentes de la señal de biotina.

3.1.2 Cromatografía en avidina agarosa.

Con el fin de intentar enriquecer las fracciones con las proteínas modificadas por los correspondientes cyP biotinilados para proceder a la identificación de dianas selectivas, realizamos cromatografía en avidina-agarosa de las fracciones S100 (Fig. 23).

Los eluidos fueron analizados por duplicado en geles diferentes, uno de ellos fue teñido con Coomassie coloidal y el otro se analizó mediante Western blot con estreptavidina-peroxidasa.

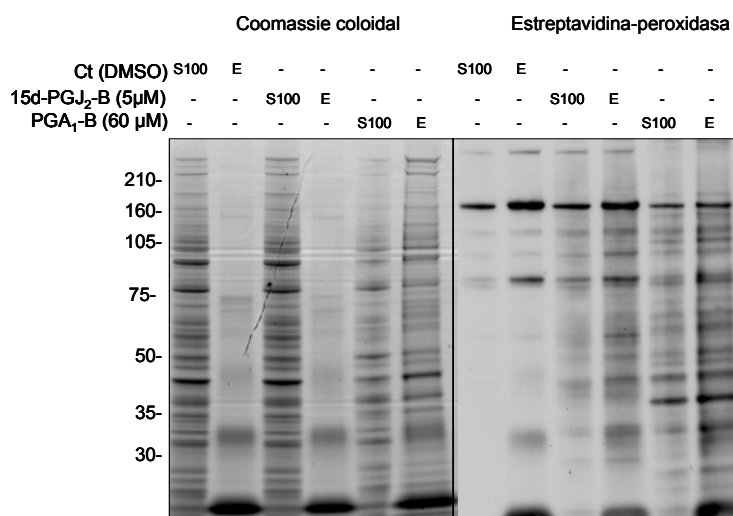


Figura 23. Cromatografía en avidina-agarosa. Las proteínas modificadas por cyP biotinilados procedentes de fracciones S100 fueron purificadas mediante cromatografía en avidina-agarosa. El análisis fue llevado a cabo mediante SDS-PAGE y Western blot con estreptavidina acoplada a peroxidasa (E, Eluido). Los datos mostrados son representativos de 3 experimentos con resultados similares.

Coincidiendo con los resultados de la figura 21, la intensidad de la señal de biotina fue superior en las fracciones S100 procedentes de células tratadas con PGA₁-B que con 15d-PGJ₂-B.

Como pudimos observar, en ambos casos la neutravidina retuvo eficazmente las proteínas biotiniladas. Sin embargo, dicha retención fue superior en proteínas potencialmente modificadas por PGA₁-B como se aprecia en la tinción de proteína total de los eluidos.

3.2 Identificación de proteínas modificadas por $\text{PGA}_1\text{-B}$ mediante espectrometría de masas.

Para proceder a la identificación de las dianas de $\text{PGA}_1\text{-B}$, y con ello de las dianas potencialmente selectivas, procedimos a cortar las bandas de las calles correspondientes al eluido de las fracciones S100 tratadas con $\text{PGA}_1\text{-B}$, tal y como se detalla en la figura 24. El estudio de los polipéptidos presentes en cada banda fue llevado a cabo mediante digestión en gel con tripsina seguida de un análisis mediante HPLC y espectrometría de masas (LC/MS-MS).

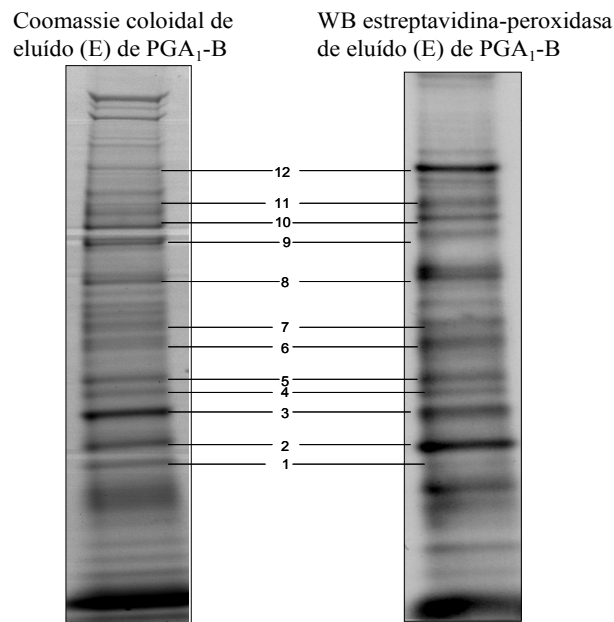


Figura 24. Correspondencia entre las señales de biotina y las bandas de proteína de las fracciones S100 de células tratadas con $\text{PGA}_1\text{-B}$. Las fracciones S100 de fibroblastos NIH-3T3 tratados con $\text{PGA}_1\text{-B}$ fueron purificadas mediante cromatografía en avidina-agarosa y analizadas como se ha descrito en la figura 23. A continuación diversas porciones del gel fueron cortadas y analizadas mediante espectrometría de masas LC/MS-MS. Los números indican la posición de las bandas que se escindieron del gel para su análisis.

A continuación, se muestran en detalle los resultados obtenidos en el análisis de las bandas correspondientes mediante espectrometría de masas LC/MS-MS

(tabla 3). Las identificaciones se aceptaron como significativas si cumplían los criterios que se especifican en el apartado “Material y métodos”.

Número de acceso de Swiss-Prot	Proteína	Número de banda	Peso molecular	pl teórico	número de péptidos identificados	péptidos identificados por LC/MS-MS	masa
P06151	L-lactato deshidrogenasa cadena A	1	36686	7,77	9	K.QVDSAYEVK.L K.GEMMDLQHGSLFLK.T	1249,56 1636,66
P68040	Proteína G, subunidad beta 2	1	35055	7,57	2	R.VWQVTIGTR K.IIVDELKQEVISTSSK.A	1058,54 1787,83
P16858	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	2	35941	8,45	8	R.VVDLMAYMASKE K.IVSNASCCTNCLAPLAK.V	1555,54 1818,84
Q99K85	Fosfoserina aminotransferasa	2	40732	8,15	8	K.LPHSVLLEIQK.Q R.ASLYNAVTTEDVEKL	1275,72 1538,68
P60710	Actina	3	42052	5,29	9	R.AVFPSIVGRPR.H K.IWHHTFYNELR.V	1198,76 1515,81
P09411	Fosfoglicerato kinasa 1	4	44776	7,52	12	K.LGDVYVNDAFGTAHRA R.FHVEEGK.GK.D	1633,67 1158,5
P54071	Isocitrat deshidrogenasa [NADP], precursor mitocondrial	4	58712	8,4	3	K.TIEAEAAGTVTR.H K.DLAGCIHLSNVK.L	1354,62 1382,6
P68369	Tubulina cadena alfa-1	5	50102	4,94	8	K.VGINYQPPTVPGDLAK.V K.TIGGGDDSFNTFFSETGAGK.H	1823,87 2006,75
P99024	Tubulina cadena beta-5	5	49639	4,96	8	R.AILVDLEPGTMDSVR.S R.ALTVPELTQQVFDK.N	1630,82 1658,89
P10126	Factor de elongación 1	5	50281	9,23	9	K.IGGIGVPPVGR.V K.STTTGHLIYK.C	1024,55 1119,52
P17182	Alfa enolasa	5	46980	6,3	4	K.GVSAVEHINK.T R.YITPDQLADLYK.S	1180,53 1438,63
P06745	Glucosa-6-fosfato isomerasa	6	62597	7,85	7	K.TFTTQETITNAETAK.E K.TLASLSPETSLFIASK.T	1654,74 1776,84
Q61753	D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa	6	56454	6,13	4	K.VLISDSLDPCCR.K R.AGTGVNDVLEAATR.K	1433,56 1487,6
Q8JZK9	Hidroximetilglutaril-CoA sintasa, citoplásmica	6	57532	5,65	3	K.VTQDATPGSALDK.I R.MFLNDFLNDQNR.D	1301,65 1541,56
Q61553	Fascina	6	54240	6,21	4	K.YLTAFAFGFK.V R.LSCFAQSVSPAELK.W	1145,5 1422,59
Q9D0F9	Fosfoglucomutasa-1	7	61348	6,32	3	R.IAAANGIGR.L K.TIEEYAIICPDLK.V	841,44 1450,7
P63017	Proteína similar a proteína de choque térmico 71 kDa (Heat shock cognate 71 kDa protein)	8	71055	5,37	12	K.NQTAKEEFHQQK.E R.IINEPTAAAIYGLDKK.V	1744,68 1786,85
P11499	Proteína de choque térmico 90, subunidad-beta (Heat shock protein HSP 90-beta)	9	83142	4,97	18	K.HLEINPDHPIVETLR.Q R.NPDDITQEEYGEFYK.S	1781,81 1846,87
P07901	Proteína de choque térmico 90, subunidad-alfa (Heat shock protein HSP 90-alpha)	9	84604	4,93	16	R.ALLFIPR.R R.ADHGEPGR.G	828,46 950,4
P58252	Factor de elongación 2	10	96091	6,42	19	R.GHVFEESQVAGTPMFVVK.A K.ARPFPDGLAEDIDKGEVSAR.Q	1976,8 2141,91
Q11011	Aminopeptidasa sensible a puromicina	10	103262	5,61	9	R.YAAVTQFEATDAR.R R.DADSIHQYLLQR.K	1441,55 1457,64
Q08153	ATPasa transitoria de retículo endoplásmico	10	89353	5,14	9	M.ASGADSKGDDLSTAILK.Q K.MTNGFSGADLTEICQR.A	1689,71 1814,68
Q08113	Precursor de endoplasmína	10	92418	4,88	9	K.GVVDSDLLPLNVSRE R.FQSSHSTDTSLDQYVER.M	1484,65 2248,86
Q61316	Proteína de choque térmico 70- subunidad 4 (Heat shock protein HSP 70 protein 4)	11	94073	5,15	17	R.NFTTEQVMTAMLLSK.L R.SVMDATQIAGLNCLR.L	1597,63 1663,7
Q61699	Proteína de choque térmico 105 (Heat shock protein 105)	11	96809	5,39	8	K.AEDVSAIEVGGATR.I R.GCALQCAILSPAFLK.V	1486,67 1534,74
Q8BGQ7	Alanil-tRNA sintetasa	11	106958	5,45	5	K.VGAEDADGIDMAYR.V R.TITVALADGGRPDNTGR.G	1497,55 1712,79
P57780	Alfa-actinina-4	11	104911	5,25	7	R.FAIQDISVEETSAK.E K.CQLEINFNTLQTK.L	1536,63 1607,7
Q7TPR4	Alfa-actinina-1	11	103004	5,23	7	R.LAILGHNESK.I K.SIVNYKPK.I	1292,67 947,49
Q88990	Alfa-actinina-3	11	102978	5,31	4	K.LMLLLEVISGER.L K.LRLSHRPAFMPSEGLK.L	1387,7 1740,69
Q02053	Enzima E1 1 activadora de ubiquitina	12	117734	5,43	8	R.YDQGVAVFGSDFQEK.L R.NEEDATELVGLAQAVNAR.S	1688,63 1898,77
Q9EPL8	Importina-7	12	119804	4,7	2	K.AFAVGVQVLLK.V K.SDQNLQTALELTR.R	1271,67 1487,66

Tabla 3. Proteínas identificadas mediante LC/MS-MS. Fracciones S100 de fibroblastos NIH-3T3 tratados con PGA₁-B fueron purificadas mediante cromatografía en avidina –agarosa. Las bandas de polipéptidos que se indican en la figura 24 fueron cortadas del gel, tripsinizadas y analizadas mediante espectrometría de masas LC-MS/MS. Todos los datos mostrados fueron estadísticamente significativos (p<0,05).

Además, algunas de las bandas mostradas en la figura 24 se analizaron mediante digestión con tripsina y espectrometría de masas (MALDI-TOF). Algunos de los espectros correspondientes a estos análisis se muestran en la figura 25. Las tablas que complementan la figura muestran los principales péptidos identificados mediante dicho análisis, que como se puede observar, resultaron en la identificación de la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (banda 2), el factor de elongación 1 (banda 5) y la proteína de choque térmico de 90 kDa (banda 9). Estos resultados confirman los obtenidos mediante LC-MS/MS para estas proteínas (tabla 3).

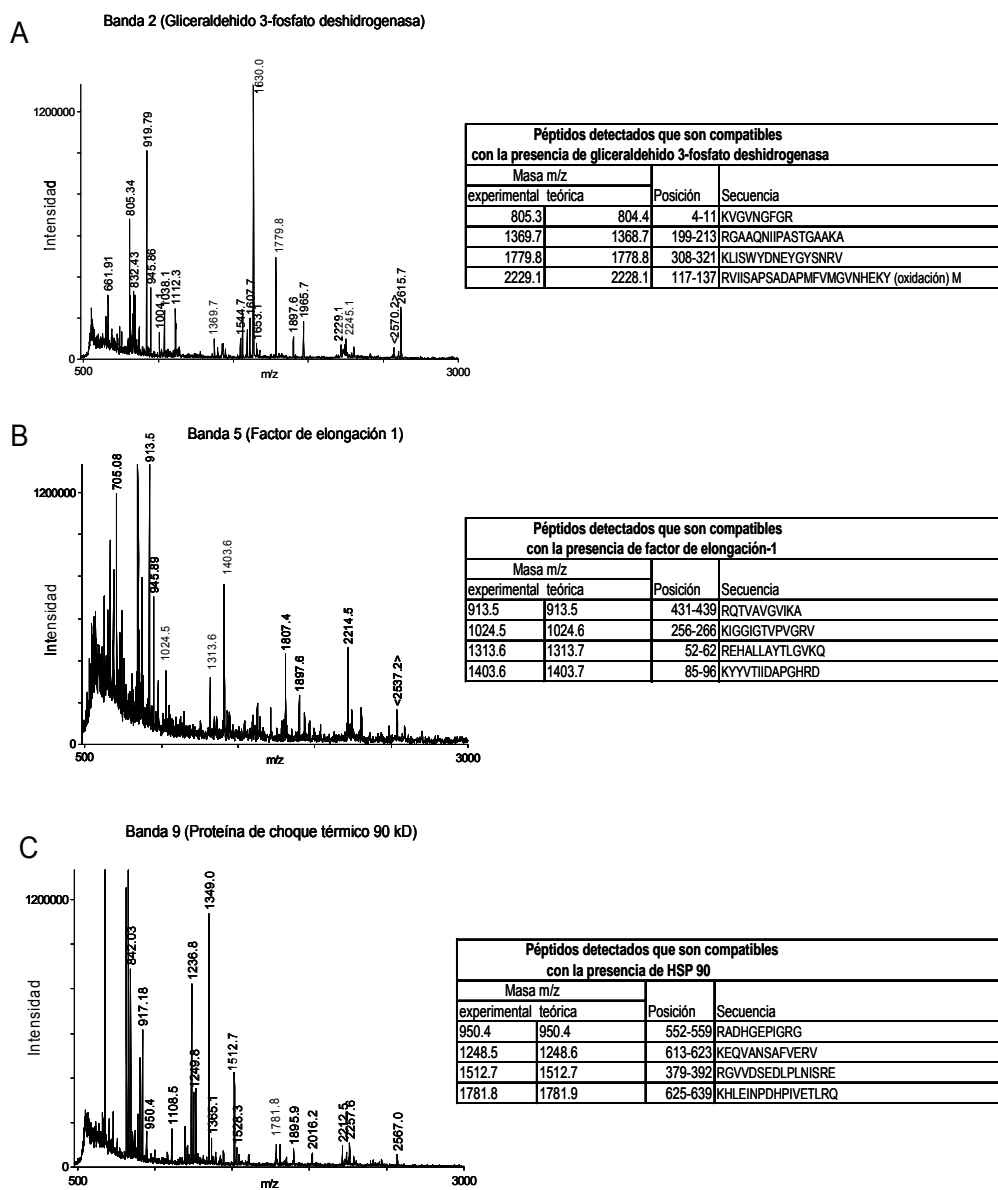


Figura 25. Análisis mediante MALDI-TOF MS de digestiones tripticas de las bandas 2, 5 y 9. A la izquierda de la figura se presentan los espectros resultantes del análisis de las bandas 2, 5 y 9 y a la derecha los principales péptidos detectados para cada proteína. A) Banda 2, gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa; B) banda 5, factor de elongación 1; C) banda 9. Proteína de choque térmico 90 (HSP 90); D). Las listas de péptidos procedentes de la digestión con tripsina fueron analizadas en la base de datos Swissprot usando el programa Mascot (Matrix Science, versión 2.0.02).

3.3 Validación de las posibles proteínas diana de PGA₁-B identificadas.

Análisis de la cromatografía en avidina mediante inmunoblot

Con la finalidad de verificar la especificidad de la técnica empleada para enriquecer las proteínas biotiniladas mediante cromatografía en resina de avidina-agarosa, comprobamos que dicha unión era dependiente de la presencia de la biotina. Por ello, empleamos Western blot con anticuerpos específicos para confirmar que las proteínas identificadas resultaban retenidas en la resina cuando las células habían sido tratadas con PGA₁-B, pero no en el caso de las muestras control.

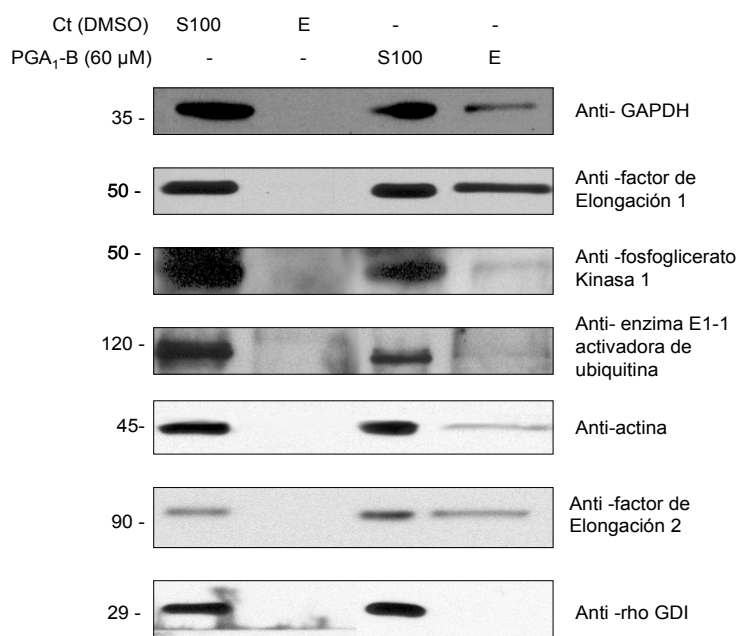


Figura 26. Análisis mediante Western blot de los eluidos empleados para la identificación de proteínas mediante espectrometría de masas. Las fracciones S100 y los eluidos (E) resultantes de la cromatografía en la resina de avidina-agarosa de fibroblastos NIH-3T3 tratados con vehículo (DMSO) o PGA₁-B fueron analizadas mediante SDS-PAGE y Western blot con anticuerpos específicos frente a algunas de las proteínas identificadas. Los datos son representativos de 2 ensayos diferentes.

Como se observa en la figura 26, la retención en avidina-agarosa de varias de las proteínas identificadas previamente parece altamente específica. En concreto, GAPDH, el factor de elongación 1 y 2, la fosfoglicerato kinasa y la enzima E1 activadora de ubiquitina se detectaron sólo en el eluido de las células tratadas con PGA₁-B. Se usó como control negativo a la proteína Rho GDI, la cual no se modifica por PGA₁-B y no resultó retenida.

Estos resultados nos indican que las proteínas identificadas son claros candidatos para la modificación por PGA₁-B, y sugiere que algunos efectos de los cyP pueden estar mediados por algunas de las dianas identificadas.

Análisis mediante inmunoprecipitación (IP)

Como hemos observado, varias de las proteínas identificadas resultan específicamente retenidas en avidina. Sin embargo, esta retención puede ser el resultado de la modificación directa por la prostaglandina biotinilada, o de la interacción con alguna de las dianas. Con la finalidad de confirmar dianas para la modificación directa por PGA₁-B, decidimos realizar ensayos de inmunoprecipitación para posteriormente detectar la incorporación de biotina mediante Western blot con estreptavidina-peroxidasa en algunas de las proteínas detectadas mediante espectrometría de masas.

Observamos que en los inmunoprecipitados obtenidos tanto con anti-GAPDH, como con anti-factor de elongación 1, como proteínas representativas, se detectaba una señal de biotina que co-migraba con la proteína inmunoprecipitada correspondiente (Fig. 27). Esta señal aparecía en muestras procedentes de células tratadas con PGA₁-B, pero no en las muestras control. Estos resultados sugieren que al menos en el caso de estas dos proteínas se ha producido la modificación directa por PGA₁-B.

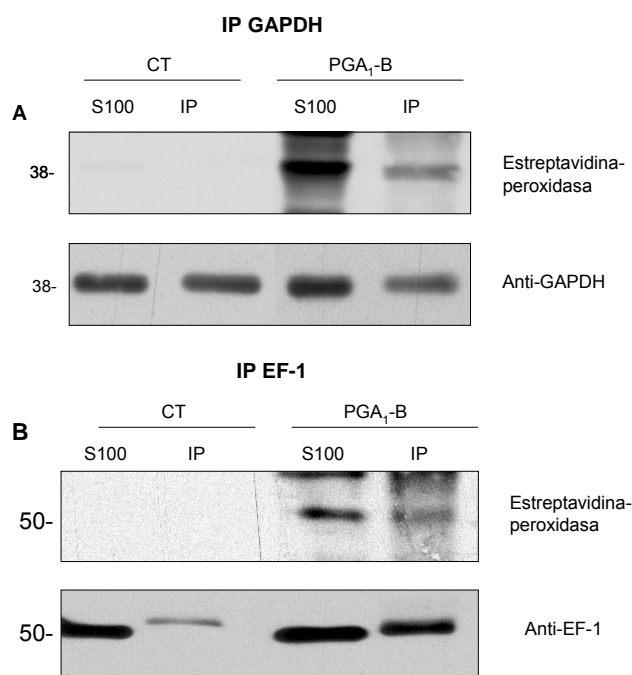
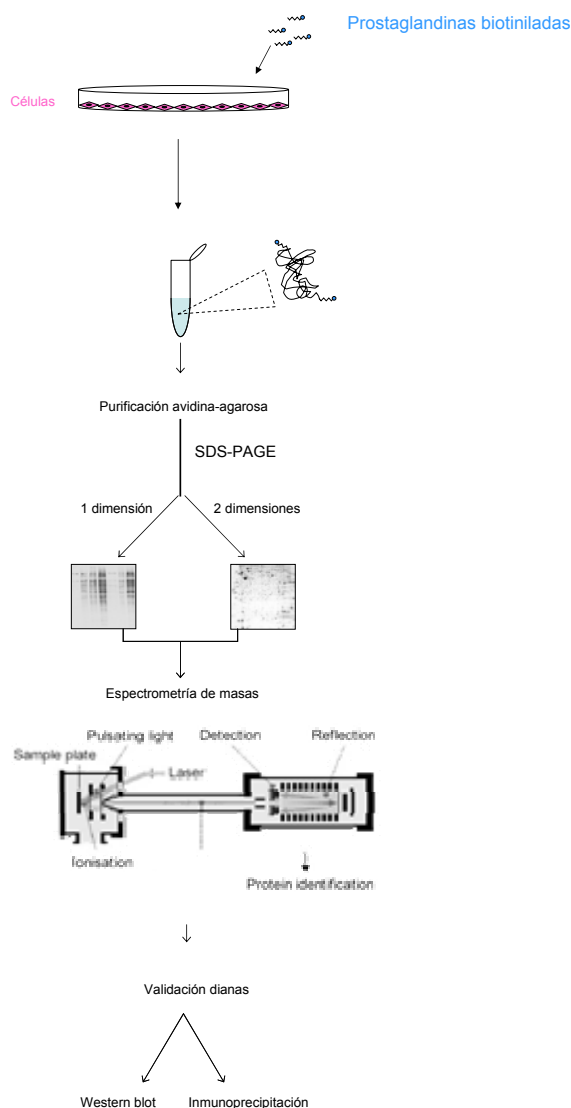


Figura 27. Inmunoprecipitación de gliceraldehido 3-fosfodeshidrogenasa y factor de elongación 1. Proteína presente en 50 μ g de fracciones S100 de NIH-3T3 tratados con vehículo (DMSO) o PGA₁-B fue inmunoprecipitada con anticuerpos anti-GAPDH (A) o anti factor de elongación 1 (B) tal y como se describe en el apartado “Material y métodos”. La proteína inmunoprecipitada fue procesada en geles de SDS-PAGE seguidos de un posterior análisis mediante Western blot con estreptavidina-peroxidasa (paneles superiores) y con los anticuerpos correspondientes (paneles inferiores).

A continuación se muestra el esquema seguido que nos ha permitido identificar algunas de las proteínas dianas de PGA_1 -B.



Esquema 10. Diagrama del flujo del desarrollo experimental para la identificación de dianas de PGA_1 -B. Las células se trataron con prostaglandinas biotiniladas, las cuales pueden provocar ciertos efectos dependientes e independientes de la modificación de proteínas. Las proteínas diana se purificaron por afinidad en resina de avidina. Las proteínas eluidas se analizaron mediante electroforesis en una dimensión (1D) o en dos dimensiones (2D), se aislaron, digirieron con tripsina y se identificaron por espectrometría de masas MALDI-TOF MS y LC/MS-MS. Una vez identificadas, las posibles dianas se confirmaron mediante inmunoblot con anticuerpos específicos contra las proteínas de interés e inmunoprecipitación con anticuerpos específicos y WB con estreptavidina peroxidasa.

3.4 Identificación y caracterización de una diana selectiva de PGA₁-B: la aldosa reductasa.

Las fracciones S100 de fibroblastos NIH-3T3 tratados con cyP biotinilados, presentaban en la región de peso molecular aproximado de 35 kDa, una banda polipeptídica cuya señal de biotina era mucho mayor en las muestras tratadas con PGA₁-B que con 15d-PGJ₂-B (Fig. 22). Como pudimos observar posteriormente en el análisis tanto por espectrometría de masas MALDI-TOF como por LC-MS/MS, la proteína mayoritaria identificada en esta región del gel (banda 2, Fig. 24 tabla 3), fue la gliceradehído 3-fosfato deshidrogenasa.

Así pues, decidimos comprobar si la proteína responsable de la intensa señal de biotina que observábamos de manera selectiva en las fracciones S100 de células tratadas con PGA₁-B se correspondía con la proteína gliceradehído 3-fosfato deshidrogenasa. Para ello, llevamos a cabo ensayos de inmunoprecipitación de fracciones S100 de células control o tratadas con los dos cyP biotinilados usando anticuerpos específicos anti-GAPDH retenidos en resina proteína G-agarosa, seguidos de un posterior análisis por Western blot con estreptavidina-peroxidasa y anti-GAPDH (Fig. 28).

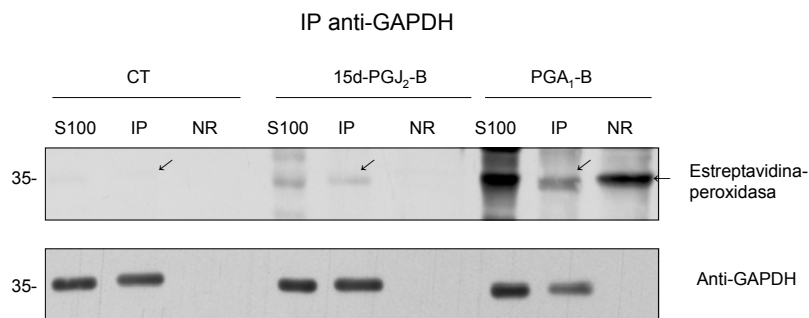


Figura 28. Análisis de la incorporación de cyP biotinilados a GAPDH. Se inmunoprecipitó proteína GAPDH presente en fracciones S100 de fibroblastos NIH-3T3 tratados con vehículo (DMSO), 5 μ M 15d-PGJ₂-B ó 60 μ M PGA₁-B. Alícuotas de las fracciones S100, de los inmunoprecipitados (IP) y de las proteínas no retenidas (NR) fueron procesadas mediante SDS-PAGE y Western blot con estreptavidina acoplada a peroxidasa y anticuerpos anti-GAPDH.

Según se aprecia en la figura 28, la inmunoprecipitación de GAPDH resultó prácticamente cuantitativa. En estas condiciones, una débil señal de biotina está presente en las fracciones inmunoprecipitadas, procedentes de células tratadas tanto con 15d-PGJ₂- B como con PGA₁- B (Fig. 28, panel superior, marcada mediante flechas en diagonal), lo cual indica que GAPDH podría modificarse por ambos prostanoides, si bien su modificación parece ser más intensa con PGA₁-B. La GAPDH, por tanto, podría contribuir a la aparición de la banda de 35 kDa.

Sin embargo, el componente más importante de la señal de biotina de la banda de 35 kDa presente en las fracciones S100 permanece en la fracción no retenida en la inmunoprecipitación (Figura 28, panel superior, marcada mediante una flecha horizontal, NR). Esto nos sugeriría que la modificación de una o varias proteínas diferentes de la GAPDH sería la responsable de la intensa señal de biotina presente en las fracciones S100 de células tratadas con PGA₁-B.

Cabe destacar que la GAPDH es una de las proteínas citosólicas más abundantes, por lo cual podría “enmascarar” la presencia de otras dianas de PGA₁-B menos abundantes. Debido a que en los sobrenadantes (NR) de la IP con anti-GAPDH, esta proteína era indetectable, pero mantenían la intensa señal de biotina alrededor de 35 kDa, decidimos emplear una etapa de “inmunodepleción” (Fig. 29) de dicha proteína como paso previo a la purificación mediante cromatografía en avidina-agarosa para identificar posibles dianas de PGA₁-B potencialmente menos abundantes que la GAPDH, pero que podrían resultar modificadas en mayor proporción.

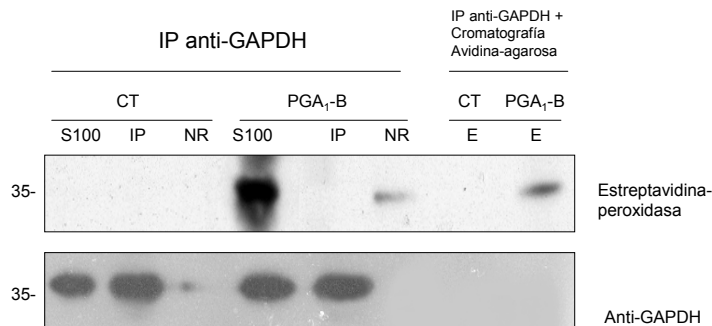


Figura 29. “Inmunodepleción” de GAPDH de fracciones S100 de fibroblastos NIH-3T3 tratados con PGA_1-B . La proteína gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa procedente de fracciones S100 fue capturada por inmunoprecipitación con anticuerpos anti-GAPDH, las fracciones no retenidas de dichas IP fueron sometidas a cromatografía en avidina-agarosa. El análisis fue realizado mediante SDS-PAGE y Western blot con estreptavidina-peroxidasa y anticuerpos específicos frente a GAPDH. (E, eluidos; NR, fracciones no retenidas). Se muestra una exposición corta en la que todavía no es detectable la señal de biotina de GAPDH.

Una vez llevada a cabo la cromatografía mediante avidina-agarosa, pudimos comprobar que la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa había sido completamente eliminada (Panel inferior, figura 29). Sin embargo, la señal intensa de la biotina seguía manteniéndose en el rango de los 35 kDa. Así pues, realizamos una tinción con Coomassie coloidal de las fracciones de interés para cortar y digerir las bandas presentes en el rango de 35-37 kDa, y realizar posteriormente un análisis mediante digestión triptica y espectrometría de masas tanto por MALDI-TOF como por LC/MS-MS (Fig. 30).

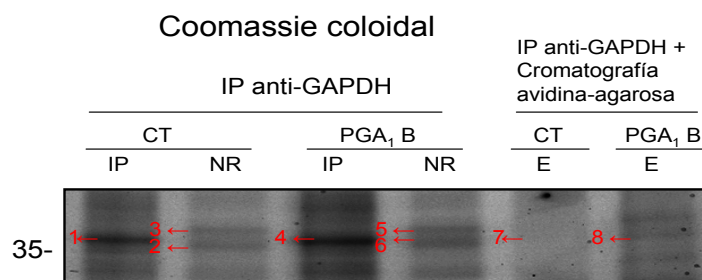


Figura 30. Tinción de Coomassie coloidal de la región 35-37 kDa de las distintas fracciones de los ensayos de “inmunodepleción” con anti-GAPDH. Bandas presentes en la región entre 35-37 kDa, señaladas mediante flechas y numeradas, fueron cortadas del gel y digeridas con tripsina. Posteriormente se llevó a cabo un análisis mediante espectrometría de masas mediante MALDI-TOF y LC/MS-MS.

GAPDH fue la única proteína detectada mediante espectrometría de masas en las fracciones inmunoprecipitadas con el anticuerpo específico frente a la proteína (bandas 1 y 4, Fig. 30); y no fue detectada ni en las fracciones no retenidas de las inmunoprecipitaciones ni en los eluidos resultantes de la cromatografía de estas fracciones no retenidas en avidina-agarosa.

En las fracciones no retenidas en la inmunoprecipitación con anti-GAPDH se encontraron entre otras proteínas aldosa reductasa (AR), anexina A3 y alcohol deshidrogenasa. Por otro lado, aldosa reductasa fue la proteína mayoritaria detectada tras la purificación en avidina-agarosa de las proteínas modificadas por PGA₁-B que no habían inmunoprecipitado con el anticuerpo anti-GAPDH. (Tabla 4). Sin embargo, en este caso, los parámetros de la identificación no alcanzaron significación estadística. Por ello, procedimos a confirmar la modificación selectiva de la aldosa reductasa por PGA₁-B mediante estrategias diferentes: Western blot de la cromatografía en avidina agarosa de fracciones S100 de fibroblastos NIH-3T3 tratados con PGA₁-B y electroforesis en 2 dimensiones.

Número de acceso Swiss-Prot	Proteína	Numero de banda	Peso molecular	Significancia	pl teórico	Número péptidos identificados	Péptidos identificados mediante LC/MS-MS	masa
P16858	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	1	35656	p<0,05	8,45	7	R.VPTPNVSVWDLTCR.L K.IVSNASCTTNCLAPLAK.V	1555,72 1818,82
O35639	Anexina A3	2	36217	p<0,05	5,33	4	K.SLGDDISSETSGDFR.K K.GTGTDEDALIEILTTR.S	1584,62 1703,78
P45376	Aldosa reductasa	2	35578	p<0,05	6,79	6	K.VAIDLGYR.H K.RQDLFIVSK.L	905,46 1104,57
Q9J116	Alcohol deshidrogenasa	2	36433	p<0,05	6,87	1	TASSVLLHTGQK.M	1282,65
Q99K85	Fosfoserina aminotransferasa	3	40447	p<0,05	8,15	3	R.GLGISVLEMSHR.S R.ASLYNAVTTEDVEK.L	1313,63 1538,68
P16858	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	4	35656	p<0,05	8,45	9	K.QASEGPLK.G R.VVDLMAYMASK.E	828,42 1258,53
P45376	Aldosa reductasa	5	35578	p<0,05	6,79	3	K.RQDLFIVSK.L K.SPPGQVTEAVK.V	1104,63 1111,54
Q99K85	Fosfoserina aminotransferasa	6	40447	p<0,05	8,15	7	K.FGTVNIVHPK.L K.IIGNTENLV.R	1110,56 1127,59
Q93092	Transaldolasa	6	37387	p<0,05	6,57	1	K.ALAGCDFLTISP.K.L	1391,66
Q9D3N2	Dominio 5 de unión a calcio	7	159836	p>0,05	4,91	1	K.GVILFSQR.E	918,52
P45376	Aldosa reductasa	8	35578	p>0,05	6,79	1	K.TIGVSNFNPLQIER.I	1586,79

Tabla 4. La tabla muestra las proteínas identificadas mediante MALDI-TOF y LC/MS-MS en bandas procedentes de fracciones S100 de fibroblastos NIH-3T3 tratados con PGA₁-B inmunoprecipitadas con anti-GAPDH y purificadas mediante cromatografía en avidina-agarosa.

Así pues, fracciones S100 de NIH-3T3 tratadas con 15d-PGJ₂-B o PGA₁-B fueron purificadas mediante cromatografía en avidina-agarosa. Las proteínas retenidas en la resina fueron procesadas en geles de SDS-PAGE y analizadas mediante inmunoblot con un anticuerpo específico frente a la aldosa reductasa (Fig. 31).

La aldosa reductasa estaba presente en los eluidos de fracciones S100 procedentes de células tratadas con PGA₁-B.

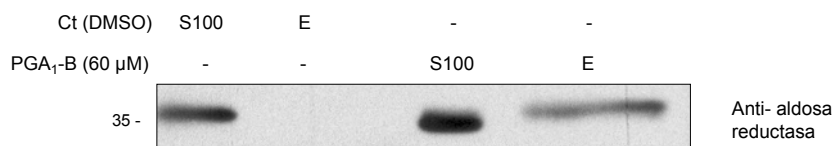


Figura 31. Cromatografía en avidina-agarosa. Fracciones S100 de NIH-3T3 tratadas con vehículo (DMSO) o PGA₁-B (60 μM) fueron enriquecidas mediante cromatografía en avidina-agarosa. Los eluidos (E) fueron analizados mediante SDS-PAGE y Western blot con anticuerpos específicos frente a aldosa reductasa.

A continuación, procedimos a confirmar la modificación selectiva de la aldosa reductasa por PGA₁-B mediante estrategias diferentes como la electroforesis en 2 dimensiones (Fig. 32). Para ello, 300 μg de proteína procedente de lisados totales tratados con DMSO ó cyP biotinilados fueron resueltos por duplicado. Uno de los geles obtenidos se sometió a tinción de proteína total y el gel duplicado fue sometido a Western blot con estreptavidina-peroxidasa. En torno a la región de 37 kDa aparecieron unas señales de biotina cuya intensidad era superior en las células tratadas con PGA₁-B que con 15d-PGJ₂-B (Fig.32). De ellas, la más intensa (señalada mediante un círculo) fue cortada del gel, tripsinizada y analizada mediante MALDI-TOF MS. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5.

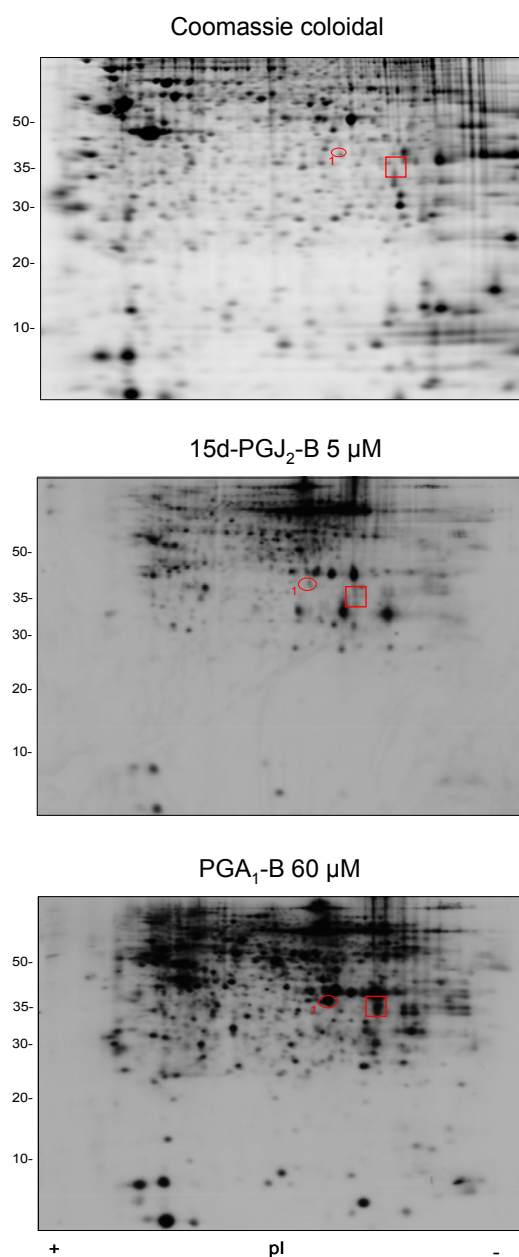


Figura 32. Electroforesis en 2 dimensiones. Lisados totales de células NIH-3T3 fueron sometidos a isoelectroenfoque en tiras de 16 cm (pI 3-10) y la segunda dimensión fue llevada a cabo en geles de SDS-poliacrilamida de 16 cm. Aparecen señaladas “manchas” de la región de 37 kDa, cuya intensidad es superior en las células tratadas con PGA₁-B que con 15d-PGJ₂-B. La “mancha” señalada mediante un círculo fue cortada del gel, sometida a tripsinización y analizada mediante MALDI-TOF MS.

Número de acceso Swiss-Prot	Proteína	Número de mancha	Peso molecular	pI teórico	Número de péptidos identificados
P45377	Aldosa reductasa-proteína relacionada 2	1	36309	5,98	16

Tabla 5. Proteína identificada mediante MALDI-TOF MS procedente de la “mancha” de la región de 37 kDa señalada en la figura 32 (número 1).

La proteína identificada resultó ser una isoforma de la aldosa reductasa. Este tipo de análisis permite sugerir la selectividad en la modificación de esta proteína por $\text{PGA}_1\text{-B}$. La proteína identificada mediante espectrometría de masas fue confirmada mediante Western blot con un anticuerpo específico (Fig. 33).

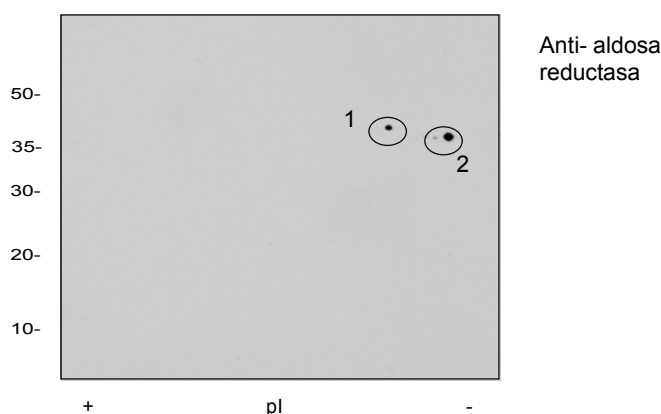


Figura 33. Detección de la aldosa reductasa en geles 2D mediante inmunoblot. Lisados totales de células NIH-3T3 tratados con $60 \mu\text{M}$ $\text{PGA}_1\text{-B}$ fueron analizados mediante electroforesis en 2 dimensiones y Western blot con un anticuerpo específico frente a aldosa reductasa.

Como se puede observar en el Western blot de la figura 33, aparecieron 2 señales con el anticuerpo anti aldosa reductasa. La señal número 1 coincide con la región picada del gel y analizada mediante MALDI-TOF MS (Fig. 32, tabla 5), que fue identificada como la aldosa reductasa proteína relacionada 2

(P45377). La señal número 2 también coincide con una señal de biotina que es más intensa en las células tratadas con $\text{PGA}_1\text{-B}$ que con $15\text{d-PGJ}_2\text{-B}$ (Fig. 32, marcada mediante un cuadrado).

Como hemos descrito anteriormente, el análisis mediante espectrometría de masas LC-MS/MS de la banda de proteína mayoritaria detectada tras la purificación en avidina-agarosa de las proteínas modificadas por $\text{PGA}_1\text{-B}$ que no habían inmunoprecipitado con el anticuerpo anti-GAPDH (tabla 4), había dado lugar a la aldosa reductasa (P45376). Es posible por tanto, que la señal número 2 pudiera corresponder a dicha isoforma. El estudio de las diversas isoformas de AR que se expresan en fibroblastos NIH-3T3 y de su posible modificación por cyP será objeto de futuros trabajos.

3.5 Puesta a punto de sistemas de expresión de la aldosa reductasa en células eucariotas.

Con la finalidad de expresar la proteína aldosa reductasa en distintos modelos celulares, preparamos la construcción pCEFL-AU5-AKRB10 wt (un plásmido para la expresión de una de las isoformas, la AKRB10, en células de mamífero) tal y como se describe en el apartado “Material y métodos” de esta tesis. Por otro lado, en trabajos previos existen evidencias de que la cisteína 298 es el residuo principal de la modificación por diversos agentes como el GSH, HNE y NO principalmente. Así pues, decidimos construir también una forma mutante (pCEFL-AU5-AKRB10 C298S) en la cual sustituimos el residuo de cisteína en la posición 298 por serina que pudiera servir como herramienta para estudiar el papel de esta cisteína en la modificación de la AR por $\text{PGA}_1\text{-B}$.

En primer lugar llevamos a cabo experimentos de transfección transitoria en fibroblastos NIH-3T3, ya que se trataba del modelo experimental en el cual se había detectado una selectividad en la modificación de la AR por $\text{PGA}_1\text{-B}$. Las pruebas realizadas en dicho modelo celular no dieron lugar a niveles de expresión detectables mediante Western blot con anticuerpos frente al epítipo AU5 (resultados no mostrados).

Por ello, decidimos analizar los niveles de proteína endógena en varias líneas celulares disponibles en el laboratorio para escoger una línea celular con niveles bajos o indetectables de AR para evitar la interferencia de la proteína endógena en nuestros ensayos. En concreto, se usaron células Jurkat, células HEK 293, células MCF-7, células NRK y células CHO (Fig. 34).

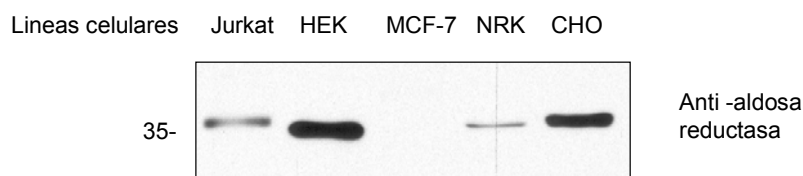


Figura 34. Niveles de expresión de aldosa reductasa en diferentes líneas celulares. 20 μ g de proteína procedente de lisados totales de cada línea celular fueron analizados mediante SDS-PAGE y Western blot con anticuerpos anti aldosa reductasa.

Como se puede observar en la figura 34, las células MCF-7 no presentaron niveles de expresión detectables de aldosa reductasa. Es por ello, por lo que decidimos elegir dicho tipo celular para realizar ensayos de expresión de aldosa reductasa exógena a partir de las construcciones preparadas de aldosa reductasa wt y aldosa reductasa C298S.

En primer lugar realizamos transfecciones transitorias con diferentes cantidades de plásmido pCEFL-AU5-AKRB10 wt y observamos la expresión de la proteína mediante Western blot con anticuerpos anti aldosa reductasa (Fig. 35A). Los niveles de aldosa reductasa fueron detectables en las células transfectadas con 1 ó 2 μ g de plásmido.

La AR exógena también se pudo detectar mediante inmunoblot con anticuerpos anti-AU5. La construcción salvaje y la mutante C298S dieron lugar a niveles similares AR en estas células (Fig. 35B).

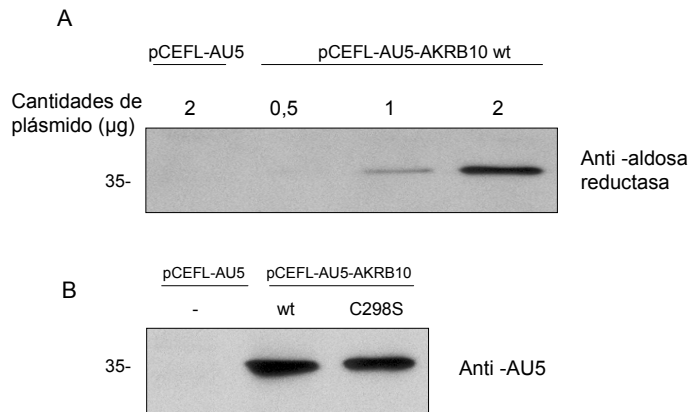


Figura 35. Niveles de expresión de aldosa reductasa en células MCF-7. A) Cantidades indicadas de plásmido fueron transfectadas en células MCF-7. Posteriormente, los niveles de aldosa reductasa fueron analizados mediante Western blot con anticuerpos anti aldosa reductasa, o anticuerpos anti-AU5 (B).

Dado que la expresión del epítipo AU5 era aceptable en las células transfectadas con la forma wt y mutante, decidimos llevar a cabo ensayos de inmunoprecipitación (IP) con anticuerpos anti-AU5 a partir de lisados celulares de células transfectadas con la forma salvaje y mutante de la AR y tratadas posteriormente con PGA₁-B a una concentración de 30 µM. De esta manera queríamos observar la incorporación de biotina a la proteína y si la cisteína 298 era el principal sitio de unión de PGA₁-B.

Los ensayos de IP llevados a cabo no nos permitieron detectar una incorporación de biotina en la AR exógena. Estos resultados podrían indicar que la modificación de la AR por PGA₁-B puede estar sujeta a factores relacionados con el tipo celular, o que la proteína expresada de manera exógena no adopta una localización o conformación adecuada. Estas posibilidades serán objeto de estudio detallado en el futuro para dilucidar la relevancia de la modificación de AR por cyP.

1. MODIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE NIH-3T3 POR 15d-PGJ₂-B Y PGA₁-B.

Las acciones biológicas de los cyP se deben en parte a su capacidad para unirse covalentemente a proteínas. Nuestros resultados indican que dicha unión depende de las estructuras de estos lípidos electrófilos y de las proteínas dianas y de la presencia en el medio de tioles celulares como el glutathione, principalmente. En primer lugar era interesante comprobar la capacidad de estos compuestos para entrar en el interior celular. Estudios previos con prostaglandinas radiactivas habían demostrado que entraban en el interior celular. En ellos, se había observado que prostaglandinas ciclopentenonas, en concreto, PGA₂ y Δ^{12} -PGJ₂ marcadas radiactivamente, presentaban una distinta distribución intracelular en células L-1210. La enona sencilla (PGA₂) se distribuía de manera uniforme tanto en el citoplasma como en el núcleo de células L-1210, mientras que Δ^{12} -PGJ₂ lo hacía principalmente en el núcleo (Narumiya, 1987).

A partir de estas evidencias, nosotros usamos como herramientas de trabajo análogos biotinilados de las prostaglandinas ciclopentenonas PGA₁ y 15d-PGJ₂, para analizar mediante microscopía de fluorescencia la distribución intracelular en fibroblastos NIH-3T3 y células HeLa. En estos estudios, pudimos observar que ambos compuestos entraban en la célula, y eran capaces de unirse a proteínas citosólicas y nucleares. En fibroblastos NIH-3T3 la señal de biotina se distribuyó fundamentalmente en el citosol, mientras que en células HeLa la distribución resultó ser más homogénea, con cierto predominio nuclear.

Es interesante destacar, que en función de los efectos biológicos observados, se había propuesto que las cyPG podrían distribuirse preferentemente en distintos compartimentos celulares dependiendo del tipo celular (Straus, 2000). Sin embargo, hasta ahora no se había obtenido evidencia bioquímica de esta posibilidad.

1.1 15d-PGJ₂-B modifica de manera más intensa proteínas celulares que PGA₁-B.

Como ya hemos descrito anteriormente, ambos cyP pueden unirse a diferentes estructuras polipeptídicas. El mecanismo más probable para esta incorporación es una adición de Michael en la cual los carbonos electrófilos de las prostaglandinas reaccionan con los grupos SH- libres de las cisteínas de las proteínas. Las cyPG podrían también reaccionar con grupos amino formando bases de Schiff, aunque hasta la fecha, no hay aductos documentados de cyPG con residuos distintos de cisteínas. Nosotros, hemos observado diferencias en la unión de las cyPG a polipéptidos dependiendo del compuesto estudiado. La prostaglandina 15d-PGJ₂-B resulta más efectiva que PGA₁-B a la hora de modificar proteínas celulares. En nuestras condiciones experimentales se requieren concentraciones de 5 a 10 veces superiores de PGA₁-B para lograr una intensidad en la señal de biotina de los polipéptidos modificados comparable a la de la 15d-PGJ₂-B. Estas observaciones guardan correlación con la diferente potencia observada en los efectos biológicos de los cyP no biotinilados en diversos modelos experimentales, como en la inhibición de IκB kinasa (Rossi, 2000), la inhibición en la unión de NF-κB a DNA (Straus, 2000), o la inducción de apoptosis (Liu, 2003)

En estos trabajos se observa que es necesario emplear una concentración más elevada de PGA₁ para obtener efectos biológicos similares a los de 15d-PGJ₂. Por otro lado, la incubación de células intactas con análogos biotinilados de estos prostanoides da lugar a patrones de marcaje diferentes en geles de electroforesis en una y dos dimensiones procesados mediante Western blot con estreptavidina-peroxidasa. En ellos pudimos observar la presencia de bandas y de “manchas” de polipéptidos que se modificarían selectivamente por una y otra prostaglandina. Estas diferencias entre 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B podrían deberse, entre otras causas, a la estructura de dienona de la 15d-PGJ₂-B, la cual posee dos carbonos electrófilos capaces de reaccionar con tioles celulares libres.

Otros factores podrían contribuir a esta selectividad, como es el caso de la permeabilidad de las membranas celulares a cada compuesto, su distribución intracelular o las alteraciones en la expresión proteica inducida por los tratamientos.

1.2 Comprobación de los efectos biológicos de la 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B.

Una vez explorada la capacidad de ambos compuestos para entrar en el interior celular y modificar polipéptidos celulares, era necesario confirmar que los análogos biotinilados empleados (15d-PGJ₂-B y PGA₁-B) ejercen efectos biológicos similares a los de los compuestos originales, para proceder después a la identificación de posibles dianas relevantes para su mecanismo de acción. En el caso de PGA₁-B, se pudo comprobar que, al igual que el compuesto no biotinilado, inducía determinadas respuestas celulares dependientes de la modificación de proteínas, como la inhibición de la inducción de la iNOS en respuesta a citoquinas o la inducción de HSP 70 en células mesangiales. La iNOS es una proteína pro-inflamatoria cuya expresión puede ser modulada por cyP (Kwon, 1999; Ricote, 1998). Nosotros observamos que tanto PGA₁ como PGA₁-B inhibieron la expresión de la proteína iNOS y la generación de NO a dosis altas (60 µM), mientras que PGA₁, pero no PGA₁-B mostró un efecto inhibitorio de la generación de NO a dosis de 30 µM. Estas diferencias observadas para una y otra cyPG podrían deberse a la presencia de la molécula de biotina en la estructura de la prostaglandina. En trabajos previos del laboratorio se había comprobado que los efectos observados con 15d-PGJ₂-B eran similares a los del compuesto sin biotinilar (Stamatakis, 2006). En ellos, concentraciones micromolares de 15d-PGJ₂ inhibieron la expresión de iNOS, COX-2 e ICAM-1 en respuesta a citoquinas. Compuestos con estructura ciclopentenona, similar a la de 15d-PGJ₂, que no activan PPAR, ejercieron efectos similares en la inhibición de COX-2 e ICAM-1 (Sánchez-Gómez, 2004). Esto indicaba que el doble enlace endocíclico del anillo ciclopentano es fundamental en el mecanismo de acción de cyP. Por otra parte, el uso de antagonistas de PPAR como la 2-cloro-5-nitro-*N*-fenilbenzamida (GW9662) no redujo la inhibición en la inducción de iNOS por 15d-PGJ₂. Esto sugiere que

algunos de los efectos mediados por este cyP en este modelo experimental serían independientes de la activación de PPAR, y dependientes de la modificación de proteínas.

1.3 El GSH regula la unión de cyP a proteínas.

Uno de los principales factores que puede influir en la unión de cyP a proteínas es la presencia de tioles en el medio. El GSH es el tiol celular más abundante, y su función como agente detoxificante y antioxidante se ha descrito ampliamente en procesos fisiológicos (Fraternale, 2006). Es ampliamente conocido también el papel del GSH en la adquisición de resistencia a ciertas drogas anicancerígenas. Las glutation-S-transferasas (GST) son las enzimas encargadas de conjugar GSH con una amplia variedad de sustratos; estas enzimas desempeñan un papel fundamental en el metabolismo de prostaglandinas, así como en la regulación de las cascadas de señalización iniciadas por las MAP quinasas (Townsend, 2003). Además, diversas prostaglandinas ciclopentenonas pueden inhibir la actividad de GST y alterar la síntesis de GSH (Paumi, 2004; van Iersel, 1997).

Resultados obtenidos en el laboratorio han identificado al GSH como un elemento regulador importante en la unión de cyP a proteínas (Gayarre, 2005). Las diferencias observadas en la modificación de proteínas por 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B en células intactas se reducen en los ensayos llevados a cabo *in vitro* usando lisados celulares. Pero estas diferencias en la selectividad y en la intensidad de la unión de cyP a polipéptidos aparecen de nuevo cuando los lisados celulares se incuban en presencia de concentraciones fisiológicas de GSH. El papel regulador que ejercería el GSH sobre la unión de prostaglandinas ciclopentenonas a proteínas podría deberse a la formación de aductos GSH-cyP, un proceso que puede ocurrir de manera enzimática mediante la acción de la GST, o no enzimática lo cual conllevaría un descenso de los niveles de cyP libres. La conjugación con GSH favorecería la detoxificación de estos lípidos, permitiendo así la atenuación de sus efectos

biológicos (Alexander, 2006; Paumi, 2004). Estudios recientes han demostrado que la eliminación de estos conjugados en células podría ocurrir a través de la vía de proteínas resistentes a fármacos (MRP-1 y MRP-2) (Akimaru, 1996; Ishikawa, 1998). Nuestras observaciones sugieren que en células intactas existe una correlación inversa entre los niveles de GSH y la unión de cyP a proteínas. La reducción de los niveles de GSH mediante inhibidores de su síntesis, como la butionina sulfoximina que inhibe a la γ -glutamil cisteína sintasa dio lugar un incremento en la modificación de proteínas por 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B. Estas observaciones de nuevo guardan correlación con los efectos biológicos de los cyP. Se ha observado que la butionina sulfoximina potencia el efecto de 15d-PGJ₂ sobre el aumento de actividad del factor de transcripción Nrf2 (Zhang, 2004) y el incremento de apoptosis celular en células endoteliales humanas (Levonen, 2001), mientras que el suplemento con sustratos para la síntesis de GSH, como la N-acetil-cisteína, supuso una disminución en la incorporación de cyP a polipéptidos celulares (Chen, 2003).

Como pudimos comprobar tanto en lisados celulares como *in vitro*, la unión de PGA₁-B a proteínas es más dependiente de los niveles de GSH, que la de 15d-PGJ₂-B. Esto podría deberse a que PGA₁ es una enona simple, las cuales forman aductos mucho más estables con GSH que las dienonas como 15d-PGJ₂ (Noyori, 1993). De esta forma, el equilibrio GSH-cyP estaría más desplazado hacia la formación de aductos en el caso de la PGA₁-B, con lo cual habría menos PGA₁-B libre para interaccionar con proteínas. En efecto, se ha observado que la proporción de cyPG libres frente a las conjugadas con GSH es mayor en el caso de las dienonas que en las enonas sencillas (Suzuki, 1997). El GSH también ejerce efectos directos sobre la distribución intracelular de cyP. De hecho, se ha postulado que la concentración de GSH y/o la actividad de GST puede determinar el predominio citosólico o nuclear de efectos biológicos de las cyPG, como la inhibición de la vía de NF- κ B (Straus, 2000).

En cuanto a la modificación de proteínas recombinantes *in vitro* por cyP biotinilados, la presencia de GSH dio lugar a un descenso en la incorporación de cyP a la proteína estudiada. En primer lugar, la unión de ambos cyP a

GSTP1-1 se redujo de manera considerable con concentraciones bajas de GSH. Esto podría deberse a la formación de aductos GSH-cyP, que reducirían la presencia de cyP libres en el medio. Además, el GSH podría inducir un cambio conformacional en la proteína impidiendo por motivos estéricos el acceso de las cyP a la cisteína reactiva. De hecho, la cisteína 47 ha sido descrita en el ser humano como la implicada en la reacción con aceptores de Michael (van Iersel, 1997). Esta cisteína resulta ser reactiva en la enzima libre, pero no unida a GSH o a conjugados de GSH.

Por otro lado, el GSH redujo la unión de 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B a c-Jun a concentraciones altas. La cisteína 269 está localizada en el dominio de unión de c-Jun a DNA, en la región más próxima que contacta con el DNA, y se ha descrito que está implicada en la reacción con cyP (Pérez-Sala, 2003), y también es susceptible de glutationilación (Klatt, 1999). La unión de 15d-PGJ₂ a c-Jun inhibe su unión a DNA. Estas observaciones sugieren que algunos efectos de cyP sobre AP-1 podrían ser independientes de la activación de PPAR. En el caso de H-Ras, la presencia de GSH a concentraciones del rango 1-2 mM también disminuyó la incorporación de cyP biotiniladas. También se ha descrito que H-Ras puede glutationilarse en varios sitios (Mallis, 2001). Como veremos más adelante, diversos cyP son capaces de modificar distintos residuos de cisteína en H-Ras. Como hemos podido comprobar, en H-Ras y GSTP1-1, la inhibición por 2 mM de GSH es más intensa con PGA₁-B que con 15d-PGJ₂-B.

Otro de los ejemplos en los cuales el GSH regula la unión de cyPG a proteínas y que ha sido estudiado en nuestro laboratorio, lo encontramos en la subunidad p50 de factor de transcripción NF-κB. En experimentos previos, se observó que el GSH mejora la unión al DNA de p50 *in vitro* (Cernuda-Morollón, 2001). Ésto, podría deberse a que el GSH mantendría el estado reducido de los residuos de cisteína implicados en la unión a DNA. En experimentos llevados a cabo en el laboratorio hemos observado que concentraciones bajas de GSH o de otro agente reductor favorecen la unión de cyPG biotiniladas a p50 (Gayarre, 2006a).

Aunque la unión de cyP a tioles solubles celulares es reversible, se ha postulado que la unión a proteínas celulares es irreversible en condiciones fisiológicas (Noyori, 1993; Suzuki, 1997). Se han descrito varios factores que podrían estar implicados en la estabilización del aducto cyP-proteína, como el descenso de la motilidad molecular de las cyP en estructuras poliméricas en comparación con los tioles solubles (Noyori, 1993), un bajo pKa en los residuos de cisteína o la naturaleza de los aminoácidos colindantes con la cisteína modificada. Estos factores podrían afectar a la estabilidad y quizá también a la selectividad en la modificación de proteínas por estos prostanoides.

1.4 Modificación selectiva de H-Ras por 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B.

Como hemos visto en los apartados anteriores, las características estructurales de cada proteína y de los cyP influyen en la modificación de polipéptidos por estos lípidos electrófilos. La proteína H-Ras constituye un ejemplo de ello puesto que cyP con distinta estructura dan lugar a diferentes aductos con H-Ras. Evidencias previas obtenidas en nuestro laboratorio han demostrado que la unión de cyP a esta proteína se asocia con una activación de las cascadas de señalización dependientes de Ras (Oliva, 2003).

En la incorporación de cyP a H-Ras están implicadas una serie de cisteínas susceptibles de ser modificadas por oxidantes o por derivados lipídicos. H-Ras posee 4 cisteínas expuestas en su superficie (cisteína 118, 181, 184 y 186) que pueden ser modificadas por oxidantes *in vitro* e *in vivo* (Mallis, 2001). La cisteína 186 es sitio de isoprenilación. La cisteína 118, que se encuentra en el sitio de unión del nucleótido, puede ser nitrosilada y este fenómeno está directamente relacionado con la activación de Ras debido al intercambio de GDP por GTP (Heo, 2006). Las cisteínas 181 y 184 son lugares de palmitoilación (Hancock, 1989), modificación fundamental para el anclaje de la proteína a la membrana plasmática y su localización subcelular (Rocks, 2005). Sin embargo, la contribución de estas dos cisteínas a la localización de H-Ras y a su señalización no es equivalente (Roy, 2005). La unión del mutante

C184S a la membrana plasmática es similar a la de la forma salvaje, mientras que el mutante C181 se localiza principalmente en el aparato de Golgi.

Nuestros estudios llevados a cabo *in vitro* han demostrado que 15d-PGJ₂ forma principalmente un aducto con H-Ras mientras que PGA₁ puede dar lugar a varios aductos. Por otra parte, los análogos biotilados de 15d-PGJ₂ y PGA₁ muestran la misma selectividad en la unión que las prostaglandinas no modificadas. 15d-PGJ₂-B forma un aducto mayoritario cuya masa se corresponde con la adición de una molécula de cyP, y PGA₁-B es capaz de formar dos o tres aductos. En digestiones tripticas de H-Ras incubada con 15d-PGJ₂ observamos un péptido de muy baja intensidad con una *m/z* compatible con la adición de una molécula de 15d-PGJ₂ (+316.5) que contenía la cisteína 118 y péptidos que contenían las cisteínas 181 y 184. Las intensidades relativas de los péptidos analizados nos indicaron que 15d-PGJ₂ se une preferentemente a la región C-terminal de H-Ras la cual contiene las cisteínas 181 y 184. La estructura de dienona de la 15d-PGJ₂ podría ser una de las causas de una mejor interacción con el extremo carboxilo de la proteína. En el caso de PGA₁ localizamos péptidos que presentaban una *m/z* compatible con la adición de PGA₁ (+336.5) en cuya secuencia poseían la cisteína 118; y péptidos que contenían la cisteína 181 y 184, compatibles con la adición de una o dos moléculas de PGA₁. Las intensidades relativas de los péptidos nos mostraron que PGA₁ se une preferentemente a la cisteína 118, que es adyacente al sitio de unión de GTP. La estructura de enona sencilla de PGA₁ y la orientación de las cadenas laterales podrían ser unas de las razones por la que esta prostaglandina tiene un mejor acceso a la cisteína 118 que 15d-PGJ₂. Experimentos similares se llevaron a cabo con otros prostanoides con diversas estructuras y se pudo comprobar también la formación de diferentes aductos con H-Ras (Renedo, 2007).

Estas observaciones guardan relación con las llevadas a cabo en experimentos previos realizados en el grupo con mutantes de H-Ras C118S y C184S, en las cuales se demostró que 15d-PGJ₂ fue incapaz de unirse a H-Ras C184S y activar las cascadas de señalización iniciadas por Ras, mientras que sí hubo

unión de la prostaglandina e inducción de la activación de H-Ras en el mutante C118S (Oliva, 2003).

Las proteínas Ras participan en la señalización de numerosos estímulos que regulan la proliferación, diferenciación y muerte celular. Para que Ras alcance su forma activa, es necesaria la presencia de factores intercambiadores de nucleótidos (GEF), que favorezcan la liberación de GDP y la unión de Ras a GTP. Uno de los mecanismos de activación de Ras es la unión de ligandos externos como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) a sus receptores, generando la dimerización del receptor.

Además, H-Ras puede activarse por modificación directa de la cisteína 118 por NO en linfocitos T (Lander, 1997) o por especies reactivas de O₂ (Heo, 2006), que afectan al intercambio de GDP por GTP.

Resultados obtenidos en colaboración con el grupo del Dr. J. M. Rojas muestran que existe una correlación entre la modificación de H-Ras por 15d-PGJ₂ y PGA₁ y su capacidad para incrementar los niveles de Ras activo en células. El tratamiento con 15d-PGJ₂ de células transfectadas con H-Ras C184S, no dio lugar a un aumento de los niveles de proteína activa. Mientras, el tratamiento con PGA₁ de células transfectadas con H-Ras C118S, generó una activación inferior con respecto a la del wt. Una de las causas por las que la modificación de H-Ras por 15d-PGJ₂ y PGA₁ podría dar lugar a un incremento de los niveles de H-Ras activo, podría ser a que la unión de cyPG estabilizara la conformación de H-Ras en la cual no posee unidos grupos palmíticos, manteniéndose así en las regiones de la membrana pobres en colesterol. En experimentos previos en el laboratorio, hemos observado que la solubilización selectiva con Tritón X-100 de fracciones de membrana aumentó la extracción de proteínas H-Ras en células tratadas con 15d-PGJ₂ ó PGA₁ con respecto a células control. Esto podría indicar que la modificación de H-Ras por cyPG estabilizaría su localización en los microdominios de membrana menos ricos en colesterol (resultados no mostrados) (Renedo, 2007)

Nuestros resultados constituyen la primera evidencia de que prostanoïdes con distinta estructura se unen a distintos sitios en una proteína. La diferente estructura de los cyP empleados, así como la de la proteína diana, hacen que la modificación de proteínas por prostaglandinas ciclopentenonas sea un fenómeno selectivo como ampliaremos a continuación.

2. ESTUDIO DE LA MODIFICACIÓN SELECTIVA DE PROTEÍNAS CELULARES DE FIBROBLASTOS NIH-3T3 POR 15d-PGJ₂-B O PGA₁-B.

Como hemos visto en los apartados anteriores, la unión de cyPG biotiniladas a células intactas, dio lugar a un patrón en el cual pudimos observar la presencia de polipéptidos que se modificarían selectivamente por 15d-PGJ₂-B ó PGA₁-B. Una de las causas podría ser la diferente estructura de la prostaglandinas ciclopentenonas. La 15d-PGJ₂ posee tres carbonos electrófilos, dos de los cuales se ha demostrado que pueden reaccionar con tioles libres (Atsmon, 1990; Pérez-Sala, 2003), mientras que PGA₁ posee un carbono electrófilo. Así pues, con la finalidad de identificar posibles proteínas modificadas selectivamente por una u otra prostaglandina realizamos fraccionamientos citosol-núcleo y citosol-membrana a partir de fibroblastos NIH-3T3 tratados con cyP biotinilados. En los fraccionamientos citosol-núcleo, la señal de biotina se localizó principalmente en el citosol, en concordancia con lo observado en microscopía de fluorescencia. Sin embargo, fue en los fraccionamientos citosol-membrana donde pudimos observar de manera más obvia la presencia de posibles bandas correspondientes a proteínas que se modificarían selectivamente por 15d-PGJ₂-B o por PGA₁-B. Nos llamó la atención una serie de bandas con un tamaño aproximado de unos 35, 45 y 70 kDa, en la fracción S100 de fibroblastos NIH-3T3 tratados con PGA₁-B, cuya señal de biotina era mucho más intensa que la observada en la fracción S100 de células tratadas con 15d-PGJ₂-B. También destacó la presencia de otras bandas en la fracción S100 de células NIH-3T3 tratadas con 15d-PGJ₂-B que podrían ser dianas selectivas de este cyP. Con la intención de identificar algunas de las proteínas marcadas selectivamente por PGA₁-B, decidimos enriquecer aquellos polipéptidos modificados con cyP biotinilados realizando cromatografía en avidina-agarosa seguida de un posterior análisis mediante espectrometría de masas mediante MALDI-TOF y LC/MS-MS.

El uso de avidina retenida en resina de agarosa nos permitió enriquecer aquellas proteínas que habían incorporado cyP biotinilados. Una de las limitaciones de dicho procedimiento radica en que en la resina de avidina-agarosa, podrían quedar retenidas inespecíficamente proteínas muy abundantes o proteínas que permanezcan asociadas con proteínas biotiniladas en las condiciones del ensayo. Por otra parte es necesario comentar que los análisis de espectrometría de masas mediante MALDI-TOF y LC/MS-MS no nos permitieron detectar péptidos con cisteínas en su secuencia que hubieran incorporado una molécula de cyPG debido a que los programas empleados carecían de funciones que permitieran detectar péptidos con dichas modificaciones.

Por ello, la identificación de las proteínas fue validada mediante Western blot e inmunoprecipitación con anticuerpos específicos frente a la proteína. El Western blot nos permitió descartar problemas de retención inespecífica de proteínas abundantes, y la inmunoprecipitación detectar la modificación directa de las proteínas de interés. Existen trabajos previos en la identificación de dianas de lípidos electrófilos mediante abordajes proteómicos (Aldini, 2007; Landar, 2006; Stamatakis, 2006). En ellos se han estudiado fundamentalmente proteínas modificadas por 15d-PGJ₂, mediante electroforesis en dos dimensiones. El análisis mediante LC/MS-MS de posibles proteínas diana de PGA₁-B, resultó novedoso en cuanto al estudio de modificación de proteínas por lípidos electrófilos. Esta técnica únicamente se había empleado hasta ahora para el análisis de la estructura de eicosanoides (Murphy, 2005), así como la formación de aductos entre el glutatión y oxieicosanoides (Murphy, 2002).

En comparación con el análisis mediante MALDI-TOF, el análisis mediante LC/MS-MS nos ha ofrecido una gran sensibilidad a la hora de identificar proteínas susceptibles de ser modificadas por PGA₁-B. Ello nos ha permitido también identificar un número más amplio de proteínas y sobre todo proteínas menos abundantes que en estudios previos. Entre las ventajas de este abordaje destaca la obtención de la secuencia de aminoácidos de algunos de los péptidos pertenecientes a estas proteínas. Todas las proteínas detectadas poseen en su secuencia de aminoácidos cisteínas sensibles a la modificación por estos

prostanoides mediante adición de Michael. En la modificación de las mismas, es fundamental la accesibilidad del residuo de cisteína, así como las características estructurales. Dichas modificaciones podrían causar alteraciones estructurales y funcionales en la proteína diana.

2.1 Proteínas modificadas por PGA₁-B.

Mediante el análisis por espectrometría de masas de posibles dianas de PGA₁-B identificamos una amplia variedad de proteínas con muy diversas funciones, como proteínas estructurales, enzimas, proteínas de estrés, etc.

Entre las proteínas estructurales detectadas en el análisis de las fracciones S100 de NIH-3T3 mediante LC-MC/MS cabe destacar la actina, tubulina (cadena alfa-1 y beta-5), fascina y actinina (subunidad alfa 1, 3 y 4), entre otras. Recientemente se han identificado en células mesangiales otra serie de proteínas modificadas por 15d-PGJ₂ como la vimentina, que desempeñan funciones vitales en el mantenimiento de la estructura del citoesqueleto. La actina y la tubulina también han sido identificadas como dianas de 15d-PGJ₂ (Stamatakis, 2006).

La actina es uno de los componentes fundamentales del citoesqueleto, y su posible modificación podría llevar consigo cambios tanto en la estructura celular, como en sus funciones vitales de movilidad y división. Durante los últimos años se ha postulado que la cisteína 374 (C374) localizada en el extremo carboxilo de la actina es diana de lípidos electrófilos como el HNE y aldehidos α,β -insaturados (Aldini, 2005; Dalle-Donne, 2007). La proteólisis de los tres últimos aminoácidos pertenecientes a extremo C-terminal, entre los que se encuentra la C374, altera la polimerización de los filamentos de actina (Mossakowska, 1993). La modificación del extremo carboxilo por varios agentes genera una desestructuración de los filamentos de actina tanto en células (Wang, 2001), como *in vitro* (Dalle-Donne, 2003; Stournaras, 1990). En experimentos llevados a cabo en el laboratorio, pudimos observar mediante técnicas de microscopía electrónica que el tratamiento *in vitro* de filamentos de

actina con 15d-PGJ₂ o HNE, dio lugar a filamentos más cortos y con la estructura alterada. Muestras tratadas con 15d-PGJ₂-B fueron incubadas con estreptavidina oro, permitiendo una mejor visualización de la unión de la prostaglandina a los filamentos de actina (Gayarre, 2006b).

La actinina, la cual guarda una gran similitud con la actina, es una proteína multifuncional. Entre sus funciones principales destaca la regulación de la actividad de múltiples receptores; es la encargada además, de anclar gran cantidad de proteínas de membrana al citoesqueleto, y sirve de mediadora en muchas de las cascadas de señalización llevadas a cabo en el citosol (Otey, 2004).

También identificamos enzimas encargadas de catalizar múltiples reacciones, como la L-lactato deshidrogenasa, gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), glucosa 6-fosfato isomerasa y alanil-tRNA sintetasa principalmente. La GAPDH es una enzima clave en la glucólisis (Sirover, 1997), en la regulación del citoesqueleto (Schmitz, 2002; Tisdale, 2002), en la fusión de membranas y su transporte (Glaser, 1995; Robbins, 1995), y se ha visto asociada a proteínas G de bajo peso molecular (Doucet, 1991; Tisdale, 2004). También se ha sugerido el papel de GAPDH en la activación de la transcripción en neuronas (Morgenegg, 1986), en la exportación de RNA nuclear (Singh, 1993) y en la reparación de DNA (Dastoor, 2001). Se ha relacionado la oxidación de algunas de las cisteínas presentes en su estructura con procesos de isquemia y reperfusión (Eaton, 2002). Se ha postulado que GAPDH es susceptible de modificación postraduccional por ácidos grasos nitrados *in vivo* (Batthyany, 2006) y que la nitrosilación de la cisteína 149, la cual forma parte del dominio catalítico de esta enzima, causa su inactivación (Mohr, 1996; Szweda, 1993). Así pues, la modificación directa por PGA₁-B podría producir alteraciones funcionales en la enzima similares a las anteriormente descritas.

Entre las potenciales dianas identificadas, también encontramos proteínas fundamentales en la inducción de la respuesta a estrés térmico, como la HSP 90 y HSP 70. La HSP 90 es la chaperona con actividad ATPasa más importante en

células en reposo. En estas situaciones, HSP 90 se encuentra unida a HSF-1 (heat shock factor) manteniéndolo inactivo (Soti, 2005). Cuando HSF-1 se disocia de HSP 90, se activa e induce la síntesis de otras chaperonas. Se ha observado que la modificación de la HSP 90 por NO altera su actividad ATPasa (Martínez-Ruiz, 2005), así pues, la modificación por cyP podría de alguna manera cambiar la actividad de esta proteína en respuesta a procesos de estrés celular o su interacción con otras proteínas cuya función regula como el receptor de glucocorticoides (Li, 2005) o la eNOS (Fleming, 1999).

También hemos identificado proteínas con actividad GTPasa como los factores de elongación 1 y 2 (EF-1 y EF-2, respectivamente). Éstos, desempeñan un papel fundamental en la traducción de proteínas. Su función principal es la de promover la unión de GTP al tRNA en el ribosoma. Se ha descrito que la cisteína 411 del factor de elongación 1 puede sufrir glutationilación (Hamnell-Pamment, 2005). La modificación de EF-1 y 2 por PGA_1 podría alterar la síntesis de proteínas.

Entre las proteínas identificadas cabe destacar también a la enzima E1-1 activadora de ubiquitina. Se trata de una proteína que cataliza el paso principal para la ubiquitinación de proteínas para su posterior degradación por el proteasoma. Dicha enzima es la responsable de la activación de la ubiquitina, la primera fase de la ubiquitinación. La enzima E1, hidroliza ATP y adenila la glicina presente en el extremo C terminal de la ubiquitina, uniendo posteriormente dicho residuo a la cisteína del sitio activo de la enzima E1. Es conocido que en procesos cancerígenos está alterado el proceso de degradación de proteínas mediado por la ubiquitinación (Burger, 2004). Esta enzima es susceptible de glutationilación (Fratelli, 2003) y la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) induce la inactivación de la misma debido a la formación de puentes disulfuro intramoleculares (Bossis, 2006). Modificaciones posttraduccionales de dicha enzima por cyP podría alterar la función, localización y tráfico de proteínas, además de procesos de señalización que dependen de ubiquitinación.

Se ha descrito que las cyPG pueden interaccionar con otros componentes del proteasoma. En concreto, se ha observado que 15d-PGJ₂ está implicada en el aumento en la expresión de la subunidad de 20 S y 19 S del proteasoma y de otros genes implicados en el mecanismo de ubiquitinación de proteínas como la ubiquitin hidrolasa UCH1-L1 o SMURF2 (Wang, 2006). Además 15d-PGJ₂ inhibe la actividad de la subunidad 26 S del proteasoma encargada de degradar proteínas ubiquitinadas (Ishii, 2005). Otros cyP, como la Δ^{12} -PGJ₂, inhiben a la enzima ubiquitin hidrolasa UCH-L1 causando la agregación de proteínas ubiquitinadas (Li, 2004). Estas acciones podrían estar implicadas en algunos de los efectos anti-inflamatorios de los cyP.

2.2 PGA₁-B modifica selectivamente la aldosa reductasa.

La existencia de dianas selectivas de prostanoides como 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B podría sugerir la posibilidad de diseñar compuestos basados en la estructura de los cyP que modificaran selectivamente ciertas proteínas y tuvieran un cierto interés bioquímico y farmacológico. La diana más destacada, la observamos en fracciones S100 de células tratadas con PGA₁-B, y posee un tamaño aproximado de 35 kDa. La intensidad en la señal de biotina de esta banda era muy superior a la de esta región en las fracciones S100 tratadas con 15d-PGJ₂-B.

En un principio, el análisis de la banda del gel correspondiente a fracciones S100 purificadas en cromatografía de avidina agarosa, dio lugar a la identificación de la enzima gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa. Sin embargo, mediante ensayos de inmunoprecipitación comprobamos que, aunque la proteína GAPDH era una de las dianas de PGA₁-B, la intensa señal de biotina presente en la región de 35 kDa no estaba presente en las fracciones inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti-GAPDH, pero sí en la fracción no retenida de la misma, en la cual, la GAPDH ya no era detectable. Así pues, la GAPDH no parecía que fuera la responsable de la señal que observábamos selectivamente en las fracciones S100 de NIH-3T3 tratados con PGA₁-B. Una de las posibles razones por la cual tan sólo apareció como significativa la

GAPDH en el análisis por LC/MS-MS, podría ser que la GAPDH es una de las proteínas citosólicas más abundantes, enmascarando así la presencia de otras dianas de PGA₁-B menos abundantes.

Sin embargo, los ensayos de inmunoprecipitación nos permitieron obtener fracciones carentes de GAPDH para proseguir con la identificación de dianas menos abundantes. El análisis posterior de la banda presente en esa región mediante espectrometría de masas LC/MS-MS resultó en la identificación de la aldosa reductasa (AR). Puesto que los parámetros obtenidos no fueron significativos, decidimos confirmar la aldosa reductasa como proteína marcada selectivamente por la PGA₁-B. Mediante Western blot con anticuerpos específicos anti-aldosa, corroboramos la presencia de AR en las fracciones en las que había sido detectada por LC/MS-MS. Además, realizamos Western blot de muestras procesadas mediante electroforesis en 2 dimensiones y pudimos observar la presencia de dos señales. Una de ellas coincide con una isoforma de la AR (la aldosa reductasa proteína relacionada 2) que se modifica selectivamente por PGA₁-B según hemos podido comprobar mediante digestión con tripsina y MALDI-TOF MS. La segunda señal podría pertenecer a la propia AR ya que ésta es la que se detecta en el análisis mediante espectrometría de masas LC-MS/MS de los geles monodimensionales.

La AR es una proteína con importantes implicaciones en la fisiopatología de los procesos inflamatorios y de la diabetes. Estudios de varios grupos han demostrado que la AR es susceptible de modificarse por varios agentes nucleofílicos como el HNE, NO, o el GSH (Chandra, 1997; Petrash, 2004) y han identificado a la cisteína 298 como el residuo más sensible a dichas modificaciones. Ésto, podría causar la inhibición en la actividad enzimática de la AR (Bohren, 1993; Petrash, 1992).

En un intento por explorar la importancia de la modificación de la aldosa reductasa por PGA₁-B generamos vectores de expresión de esta proteína. Sin embargo, estas herramientas no nos han permitido detectar la incorporación de PGA₁-B en los modelos celulares empleados en esta tesis: fibroblastos NIH-

3T3 y células MCF-7. Varios factores podrían conducir a un resultado negativo, entre ellos, un inadecuado plegamiento o localización subcelular de la proteína expresada en células, o una interacción con proteínas endógenas en el caso de células MCF-7, que alterara la accesibilidad de los grupos tioles. En este sentido, es conocido que la aldosa reductasa puede establecer puentes disulfuro intramoleculares en condiciones oxidativas (Cecconi, 1998).

Por lo tanto, será necesario un estudio detallado tanto en diversos modelos celulares como *in vitro* para caracterizar las implicaciones de la modificación de la AR por cyP y explorar su posible interés como diana terapéutica.

Este trabajo, en el que hemos estudiado la modificación de proteínas por prostaglandinas ciclopentenonas, nos ha permitido obtener las siguientes conclusiones:

1. Las prostaglandinas ciclopentenonas 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B son capaces de entrar en el interior celular y unirse a estructuras polipeptídicas. Su distribución intracelular es variable dependiendo del tipo celular observado.
2. Los cyP biotinilados inducen un incremento en los niveles de la proteína de choque térmico HSP 70. Además, inhiben la expresión de la iNOS en células mesangiales activadas por citoquinas.
3. 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B modifican proteínas celulares con diferente intensidad.
4. Los patrones de proteínas modificadas que se obtienen con los prostanoides biotinilados son distintos entre sí y diferentes del patrón de tinción de la proteína total, lo cual indica que no todas las cisteínas accesibles de las proteínas son modificadas por estos compuestos.
5. Los niveles de GSH pueden modular la unión de cyPG a proteínas y contribuir a la selectividad de la modificación.
6. 15d-PGJ₂-B y PGA₁-B forman distintos aductos con la proteína H-Ras. 15d-PGJ₂ y PGA₁ modifican selectivamente distintos residuos de cisteínas de la estructura de H-Ras. 15d-PGJ₂ forma un aducto mayoritario, uniéndose preferentemente al péptido que contiene las cisteínas 181-184, mientras que PGA₁ puede formar varios aductos, uniéndose preferentemente a la cisteína 118.

7. La modificación de H-Ras por cyP guarda correlación con un aumento de los niveles de H-Ras en su conformación activa.
8. Las fracciones citosólicas de fibroblastos NIH-3T3 contienen polipéptidos que se modifican selectivamente por 15d-PGJ₂-B ó PGA₁-B.
9. El empleo de cromatografía de afinidad en avidina-agarosa en combinación con LC-MS/MS ha permitido la identificación de proteínas que son dianas potenciales para la modificación por PGA₁-B.
10. Entre las posibles dianas de PGA₁-B destacan proteínas estructurales como la actina, tubulina, fascina y actinina; enzimas como la L-lactato deshidrogenasa, gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), glucosa 6-fosfato isomerasa, alanil-tRNA sintetasa y la enzima E1-1 activadora de ubiquitina principalmente; proteínas fundamentales en la inducción de la respuesta a estrés térmico, como la HSP 90 y HSP 70. También se han identificado proteínas con actividad GTPasa como los factores de elongación 1 y 2.
11. Mediante experimentos de inmunoprecipitación (IP) y Western blot hemos confirmado que la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa y el factor de elongación 1 son dianas de modificación directa por PGA₁-B.
12. La proteína que muestra una modificación selectiva más clara por PGA₁-B en comparación de 15d-PGJ₂ ha sido identificada como la aldosa reductasa (P54376).

- Akimaru K, Kuo, M.T., Furuta, K., Suzuki, M., Noyori, R., Ishikawa, T. (1996) Induction of MRP/GS-X pump and cellular resistance to anticancer prostaglandins. *Cytotechnology* **19**:221-227.
- Aldini G, Carini, M., Vistoli, G., Shibata, T., Kusano, Y., Gamberoni, L., Dalle-Donne, I., Milzani, A., Uchida, K. (2007) Identification of actin as a 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 target in neuroblastoma cells: mass spectrometric, computational, and functional approaches to investigate the effect on cytoskeletal derangement. *Biochemistry* **46**:2707-2718.
- Aldini G, Dalle-Donne, I., Vistoli, G., Maffei Facino, R., Carini, M. (2005) Covalent modification of actin by 4-hydroxy-trans-2-nonenal (HNE): LC-ESI-MS/MS evidence for Cys374 Michael adduction. *J Mass Spectrom* **40**:946-954.
- Alexander RL, Bates, D.J., Wright, M.W., King, S.B, Morrow, C.S. (2006) Modulation of nitrated lipid signaling by multidrug resistance protein 1 (MRP1): glutathione conjugation and MRP1-mediated efflux inhibit nitrooleic acid-induced, PPARgamma-dependent transcription activation. *Biochemistry* **45**:7889-7896.
- Alvarez-Maqueda M, El Bekay, R., Alba, G., Monteseirín, J., Chacón, P., Vega, A., Martín-Nieto, J., Bedoya, F.J., Pintado, E., Sobrino, F. (2004) 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 induces heme oxygenase-1 gene expression in a reactive oxygen species-dependent manner in human lymphocytes. *JBiolChem* **279**:21929-21937.
- Amici C, Sistonen, L., Santoro, M.G., Morimoto, R.I. (1992) Antiproliferative prostaglandins activate heat shock transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:6227-6231.
- Atsmon J (1990) Conjugation of 9-deoxy-delta 9, delta 12(E)-prostaglandin D2 with intracellular glutathione and enhancement of its antiproliferative activity by glutathione depletion. *Cancer Res* **50**:1879-1885.
- Barbacid M (1987) Ras genes. *Annu Rev Biochem* **56**:779-827.
- Barrett WC, DeGnove, J.P., König, S., Fales, H.M., Keng, Y.F., Zhang, Z.Y., Yim, M.B., Chock, P.B. (1999) Regulation of PTP1B via

- glutathionylation of the active site cysteine 215. *Biochemistry* **38**:6699-6705.
- Batthyany C, Schopfer, F.J., Baker, P.R., Durán, R., Baker, L.M., Huang, Y., Cerveñansky, C., Branchaud, B.P., Freeman, B.A. (2006) Reversible post-translational modification of proteins by nitrated fatty acids in vivo. *J Biol Chem* **281**:20450-20463.
- Berenbaum F (2004) COX-3: fact or fancy? *Joint Bone Spine* **71**:451-453.
- Berry EB, Keelan, J.A., Helliwell, R.J., Gilmour, R.S., Mitchell, M.D. (2005) Nanomolar and micromolar effects of 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 on amnion-derived WISH epithelial cells: differential roles of peroxisome proliferator-activated receptors gamma and delta and nuclear factor kappa B. *Mol Pharmacol* **68**:169-178.
- Bhattacharya M, Babwah, A.V., Ferguson, S.S. (2004) Small GTP-binding protein-coupled receptors. *Biochem Soc Trans* **32**:1040-1044.
- Bickley JF, Ciucci, A., Evans, P., Roberts, S.M., Ross, N. and Santoro, G.M. (2004) Reactions of some cyclopentenones with selected cysteine derivatives and biological activities of the product thioethers. *BioorgMedChem* **12**:3221-3227.
- Birukov KG, Bochkov, V.N., Birukova, A.A., Kawkitinarong, K., Rios, A., Leitner, A., Verin, A.D., Bokoch, G.M., Leitinger, N., Garcia, J.G. (2004) Epoxycyclopentenone-containing oxidized phospholipids restore endothelial barrier function via Cdc42 and Rac. *Circ Res* **95**:892-901.
- Bishop-Bailey D, Wray, J. (2003) Peroxisome proliferator-activated receptors: a critical review on endogenous pathways for ligand generation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **71**:1-22.
- Bivona TG, Quatela, S.E., Bodemann, B.O., Ahearn, I.M., Soskis, M.J., Mor, A., Miura, J., Wiener, H.H., Wright, L., Saba, S.G., Yim, D., Fein, A., Pérez de Castro, I., Li, C., Thompson, C.B., Cox, A.D., Philips, M.R. (2006) PKC regulates a farnesyl-electrostatic switch on K-Ras that promotes its association with Bcl-XL on mitochondria and induces apoptosis. *Mol Cell* **21**:481-493.

- Bohren KM, Gabbay, K.H. (1993) Cys298 is responsible for reversible thiol-induced variation in aldose reductase activity. *Adv Exp Med Biol* **328**:267-277.
- Bos JL (1989) ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* **49**:4682-4689.
- Bossis G, Melchior, F. (2006) Regulation of SUMOylation by reversible oxidation of SUMO conjugating enzymes. *Mol Cell* **21**:349-357.
- Burger AM, Seth, A.K. (2004) The ubiquitin-mediated protein degradation pathway in cancer: therapeutic implications. *Eur J Cancer* **40**:2217-2229.
- Capdevila JH, Falck, J.R. (2001) The CYP P450 arachidonic acid monooxygenases: from cell signaling to blood pressure regulation. *Biochem Biophys Res Commun* **285**:571-576.
- Cappiello M, Voltarelli, M., Cecconi, I., Vilaro, P.G., Dal Monte, M., Marini, I., Del Corso, A., Wilson, D.K., Quiocho, F.A., Petrash, J.M., Mura, U. (1996) Specifically targeted modification of human aldose reductase by physiological disulfides. *J Biol Chem* **271**:33539-33544.
- Carper D, Kaneko, M., Stark, H., Hohman, T. (1990) Increase in aldose reductase mRNA in dog lens epithelial cells under hypertonic conditions. *Exp Eye Res* **50**:743-749.
- Castrillo A, Diaz-Guerra, M.J., Hortelano, S., Martin-Sanz, P., Bosca, L. (2000) Inhibition of IkappaB kinase and IkappaB phosphorylation by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) in activated murine macrophages. *Mol Cell Biol* **20**:1692-1698.
- Ceaser EK, Moellering, D.R., Shiva, S., Ramachandran, A., Landar, A., Venkartraman, A., Crawford, J., Patel, R., Dickinson, D.A., Ulasova, E., Ji, S., Darley-USmar, V.M. (2004) Mechanisms of signal transduction mediated by oxidized lipids: the role of the electrophile-responsive proteome. *Biochem Soc Trans* **32**:151-155.
- Cecconi I, Moroni, M., Vilaro, P.G., Dal, Monte, M., Borella, P., Rastelli, G., Costantino, L., Garland, D., Carper, D., Petrash, J.M., Del Corso, A., Mura, U. (1998) Oxidative modification of aldose reductase

- induced by copper ion. Factors and conditions affecting the process. *Biochemistry* **37**:14167-14174.
- Cernuda-Morollón E, Pineda-Molina, E., Cañada, F.J., and Pérez-Sala. D. (2001) 15-deoxy-delta-12,14-prostaglandin J₂ inhibition of NF-kB DNA binding through covalent modification of the p50 subunit. *J Biol Chem* **276**:35530-35536.
- Colville-Nash PR, Qureshi, S.S., Willis, D., Willoughby, D.A. (1998) Inhibition of inducible nitric oxide synthase by peroxisome proliferator-activated receptor agonists: correlation with induction of heme oxygenase 1. *J Immunol* **161**:978-984.
- Combs CK, Johnson, D.E., Karlo, J.C., Cannady, S.B., Landreth, G.E. (2000) Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease: inhibition of beta-amyloid-stimulated proinflammatory responses and neurotoxicity by PPARgamma agonists. *J Neurosci* **20**:558-567.
- Cotgreave IA, Gerdes, R.G. (1998) Recent trends in glutathione biochemistry. Glutathione-protein interactions; a molecular link between oxidative stress and proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* **242**:1-9.
- Cracowski JL, Durand, T. (2006) Cardiovascular pharmacology and physiology of the isoprostanes. *Fundam Clin Pharmacol* **20**:417-427.
- Chandra A, Srivastava, S., Petrash, J.M., Bhatnagar, A., Srivastava, S.K. (1997) Modification of aldose reductase by S-nitrosoglutathione. *Biochemistry* **36**:15801-15809.
- Chen JX, Berry, L.C., Christman, B.W., Meyrick, B. (2003) Glutathione mediates LPS-stimulated COX-2 expression via early transient p42/44 MAPK activation. *J Cell Physiol* **197**:86-93.
- Chinery R, Coffey, R.J., Graves-Deal, R., Kirkland, S.C., Sanchez, S.C., Zackert, W.E., Oates, J.A., Morrow, J.D. (1999) Prostaglandin J₂ and 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J₂ induce proliferation of cyclooxygenase-depleted colorectal cancer cells. *Cancer Res* **59**:2739-2746.
- Choy E, Chiu, V.K., Silletti, J., Feoktistov, M., Morimoto, T., Michaelson, D., Ivanov, I.E., Philips, M.R. (1999) Endomembrane trafficking of

- ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell* **98**:69-80.
- Chung SW, Kang, B.Y., Kim, S.H., Pak, Y.K., Cho, D., Trinchieri, G., Kim, T.S. (2000) Oxidized low density lipoprotein inhibits interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages via direct interactions between peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and nuclear factor-kappa B. *J Biol Chem* **275**:32681-32687.
- Dalle-Donne I, Carini, M., Vistoli, G., Gamberoni, L., Giustarini, D., Colombo, R., Maffei Facino, R., Rossi, R., Milzani, A., Aldini, G. (2007) Actin Cys374 as a nucleophilic target of alpha,beta-unsaturated aldehydes. *42*(583-598).
- Dalle-Donne I, Giustarini, D., Rossi, R., Colombo, R., Milzani, A. (2003) Reversible S-glutathionylation of Cys 374 regulates actin filament formation by inducing structural changes in the actin molecule. *Free Radic Biol* **34**:23-32.
- Dastoor Z, Dreyer, J.L. (2001) Potential role of nuclear translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in apoptosis and oxidative stress. *J Cell Sci* **114**:1643-1653.
- Delerive P, De Bosscher, K., Besnard, S., Vanden Berghe, W., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., Fruchart, J.C., Tedgui, A., Haegeman, G., Staels, B. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem* **274**:32048-32054.
- DeLeve LD, Kaplowitz, N. (1991) Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol Ther* **52**:287-305.
- Deneke SM, Fanburg, B.L. (1989) Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol* **257**:163-173.
- Diab A, Deng, C., Smith, J.D., Hussain, R.Z., Phanavanh, B., Lovett-Racke, A.E., Drew, P.D., Racke, M.K. (2002) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **168**:2508-2515.

- Dianzani MU (2003) 4-hydroxynonenal from pathology to physiology. *Mol Aspects Med* **24**:263-272.
- Doucet JP, Tuana, B.S. (1991) Identification of low-molecular-weight GTPbinding proteins and their sites of interaction in subcellular-fractions from skeletal muscle. *J Biol Chem* **266**:17613–17620.
- Downward J (2003) Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **3**:11-22.
- Dubois RN (2000) Review article: cyclooxygenase--a target for colon cancer prevention. *Aliment Pharmacol Ther* **14**:64-67.
- Eaton P, Fuller, W., Shattock, M.J. (2002a) S-thiolation of HSP27 regulates its multimeric aggregate size independently of phosphorylation. *J Biol Chem* **277**:21189-21196.
- Eaton P, Wright, N., Hearse, D.J., Shattock, M.J. (2002b) Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase oxidation during cardiac ischemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* **34**:1549-1560.
- Eriksson EE (2004) Mechanisms of leukocyte recruitment to atherosclerotic lesions: future prospects. *Curr Opin Lipidol* **15**:553-558.
- Erl W, Weber, C., Zerneck, A., Neuzil, J., Vosseler, C.A., Kim, H.J., Weber, P.C. (2004) Cyclopentenone prostaglandins induce endothelial cell apoptosis independent of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Eur J Immunol* **34**:241-250.
- Esteban LM, Vicario-Abejon, C., Fernandez-Salguero, P., Fernandez-Medarde, A., Swaminathan, N., Yienger, K., Lopez, E., Malumbres, M., McKay, R., Ward, J.M., Pellicer, A., Santos, E. (2001) Targeted genomic disruption of H-ras and N-ras, individually or in combination, reveals the dispensability of both loci for mouse growth and development. *Mol Cell Biol* **21**:1444-1452.
- Fahmi H, Di Battista, J.A., Pelletier, J.P., Mineau, F., Ranger, P., Martel-Pelletier, J. (2001) Peroxisome proliferator--activated receptor gamma activators inhibit interleukin-1beta-induced nitric oxide and matrix metalloproteinase 13 production in human chondrocytes. *Arthritis Rheum* **44**:595-607.
- Fantappiè O, Masini, E., Sardi, I., Raimondi, L., Bani, D., Solazzo, M., Vannacci, A., Mazzanti, R. (2002) The MDR phenotype is

- associated with the expression of COX-2 and iNOS in a human hepatocellular carcinoma cell line. *Hepatology* **35**:843-852.
- Fitzpatrick FA, Wynalda, M.A. (1983) Albumin-catalyzed metabolism of prostaglandin D2. Identification of products formed in vitro. *J Biol Chem* **258**:11713-11718.
- Fleming I, Busse, R. (1999) Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovasc Res* **43**:532-541.
- Forman BM, Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R.P., Spiegelman, B.M., Evans, R.M. (1995) 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* **83**:803-812.
- Fratelli M, Demol, H., Puype, M. (2002) Identification by redox proteomics of glutathionylated proteins in oxidatively stressed human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:3505-3510.
- Fratelli M, Demol, H., Puype, M., Casagrande, S., Villa, P., Eberini, I., Vandekerckhove, J., Gianazza, E., Ghezzi, P. (2003) Identification of proteins undergoing glutathionylation in oxidatively stressed hepatocytes and hepatoma cells. *Proteomics* **3**:1154-1161.
- Fraternale A, Paoletti, M.F., Casabianca, A., Oiry, J., Clayette, P., Vogel, J.U., Cinatl, J. Jr., Palamara, A.T., Sgarbanti, R., Garaci, E., Millo, E., Benatti, U., Magnani, M. (2006) Antiviral and immunomodulatory properties of new pro-glutathione (GSH) molecules. *Curr Med Chem* **13**:1749-1755.
- Funk CD (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* **294**:1871-1875.
- Gayarre J, Avellano, M. I., Sánchez-Gómez, F. J., Carrasco, M. J., Cañada, F.J., Pérez-Sala, D. (2006a) Modification of proteins by cyclopentenone prostaglandins is differentially modulated by GSH in vitro. *ANYAS*.
- Gayarre J, Sánchez, D., Sánchez-Gómez, F.J., Terrón, M.C., Llorca, O., Pérez-Sala, D. (2006b) Addition of electrophilic lipids to actin alters filament structure. *Biochem Biophys Res Commun* **394**:1387-1393.
- Gayarre J, Stamatakis, K., Renedo, M., Pérez-Sala, D. (2005) Differential selectivity of protein modification by the cyclopentenone

- prostaglandins PGA_1 and 15-deoxy-delta 12,14-PGJ₂: Role of glutathione. *FEBS letters* **579**:5803-5808.
- Gibb W (1998) The role of prostaglandins in human parturition. *Ann Med* **30**:235-241.
- Gilroy DW, Colville-Nash, P.R., Willis, D., Chivers, J., Paul-Clark, M.J., Willoughby, D.A. (1999) Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med* **5**:698-701.
- Gilroy DW, Lawrence, T., Perretti, M., Rossi, A.G. (2004) Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **3**:401-416.
- Glaser PE, Gross, R.W. (1995) Rapid plasmenylethanolamine-selective fusion of membrane bilayers catalyzed by an isoform of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-discrimination between glycolytic and fusogenic roles of individual isoforms. *Biochemistry* **34**:12193–12203.
- Granström E (1980) Assay methods for prostaglandins and thromboxanes. *Adv Prostaglandin Thromboxane Res* **6**:69-76.
- Griffith OW, Meister, A. (1979) Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by butionine sulfoximine (S-n-butyl-homocysteine sulfoximine). *J Biol Chem* **254**:7558-7560.
- Hamnell-Pamment Y, Lind, C., Palmberg, C., Bergman, T., Cotgreave, IA. (2005) Determination of site-specificity of S-glutathionylated cellular proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **332**:362-369.
- Hancock JF, Magee, A.I., Childs, J.E., Marshall, C.J. (1989) All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell* **57**:1167-1177.
- Hancock JF, Parton, R.G. (2005) Ras plasma membrane signalling platforms. *Biochem J* **385**:1-11.
- Harrison DH, Bohren, K.M., Ringe, D., Petsko, G.A., Gabbay, K.H. (1994) An anion binding site in human aldose reductase: mechanistic implications for the binding of citrate, cacodylate, and glucose 6-phosphate. *Biochemistry* **33**:2011-2020.
- Harvath L (1991) Neutrophil chemotactic factors. *EXS* **59**:35-52.

- Heo J, Campbell, S.L. (2006) Ras regulation by reactive oxygen and nitrogen species. *Biochemistry* **45**:2200-2210.
- Hingorani SR, Tuveson, D.A. (2003) Ras redux: rethinking how and where Ras acts. *Curr Opin Genet Dev* **13**:6-13.
- Hirata Y, Hayashi, H., Ito, S., Kikawa, Y., Ishibashi, M., Sudo, M., Miyazaki, H., Fukushima, M., Narumiya, S., Hayaishi, O. (1988) Occurrence of 9-deoxy-delta 9,delta 12-13,14-dihydroprostaglandin D2 in human urine. *J Biol Chem* **263**:16619-16625.
- Ho EC, Lam, K.S., Chen, Y.S., Yip, J.C., Arvindakshan, M., Yamagishi, S., Yagihashi, S., Oates, P.J., Ellery, C.A., Chung, S.S., Chung, S.K. (2006) Aldose reductase-deficient mice are protected from delayed motor nerve conduction velocity, increased c-Jun NH2-terminal kinase activation, depletion of reduced glutathione, increased superoxide accumulation, and DNA damage. *Diabetes* **55**:1946-1953.
- Hoppe G, Chai, Y.C., Crabb, J.W., Sears, J. (2004) Protein s-glutathionylation in retinal pigment epithelium converts heat shock protein 70 to an active chaperone. *Exp Eye Res* **78**:1085-1092.
- Hortelano S, Castrillo, A., Alvarez, A.M., Boscá, L. (2000) Contribution of cyclopentenone prostaglandins to the resolution of inflammation through the potentiation of apoptosis in activated macrophages. *J Immunol* **165**:6525-6531.
- Hyndman D, Bauman, D.R., Heredia, V.V., Penning, T.M. (2003) The aldose reductase superfamily homepage. *Chem Biol Interact* **143-144**:621-631.
- Ikai K, Ujihara, M., Kashihara, M., Fukushima, M. (1987) Inhibition of the proliferation of transformed epidermal cells in culture by various prostaglandins. *J Invest Dermatol* **89**:69-72.
- Ishii T, Sakurai, T., Usami, H., Uchida, K. (2005) Oxidative modification of proteasome: identification of an oxidation-sensitive subunit in 26 S proteasome. *Biochemistry* **44**:13893-13901.
- Ishikawa T, Akimaru, K., Nakanishi, M., Tomokiyo, K., Furuta, K., Suzuki, M., Noyori, R. (1998) Anti-cancer-prostaglandin-induced cell-cycle arrest and its modulation by an inhibitor of the ATP-dependent

- glutathione S-conjugate export pump (GS-X pump). *Biochem J* **336**:569-576.
- Itoh K, Tong, K.I., Yamamoto, M. (2004) Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radic Biol Med* **36**:1208-1213.
- Iwata K, Matsuno, K., Nishinaka, T., Persson, C., Yabe-Nishimura, C. (2006) Aldose reductase inhibitors improve myocardial reperfusion injury in mice by a dual mechanism. *J Pharmacol Sci* **102**:37-46.
- Jiang C, Ting, A.T., Seed, B. (1998) PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* **391**:82-86.
- Johnson L, Greenbaum, D., Cichowski, K., Mercer, K., Murphy, E., Schmitt, E., Bronson, R.T., Umanoff, H., Edelman, W., Kucherlapati, R., Jacks, T. (1997) K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras. *Genes Dev* **11**:2468-2481.
- Kaiserova K, Srivastava, S., Hoetker, J.D., Awe, S.O., Tang, X.L., Cai, J., Bhatnagar, A. (2006) Redox activation of aldose reductase in the ischemic heart. *J Biol Chem* **281**:15110-15120.
- Kanaoka Y, Boyce, J.A. (2004) Cysteinyl leukotrienes and their receptors: cellular distribution and function in immune and inflammatory responses. *J Immunol* **173**:1503-1510.
- Kang HK, Lee, E., Pyo, H., Lim, S.J. (2005) Cyclooxygenase-independent down-regulation of multidrug resistance-associated protein-1 expression by celecoxib in human lung cancer cells. *Mol Cancer Ther* **4**:1358-1363.
- Kato T, Fukushima, M., Kurozumi, S., Noyori, R. (1986) Antitumor activity of delta 7-prostaglandin A1 and delta 12-prostaglandin J2 in vitro and in vivo. *Cancer Res* **46**:3538-3542.
- Kawahito Y, Kondo, M., Tsubouchi, Y., Hashiramoto, A., Bishop-Bailey, D., Inoue, K., Kohno, M., Yamada, R., Hla, T., Sano, H. (2000) 15-deoxy-delta(12,14)-PGJ(2) induces synoviocyte apoptosis and suppresses adjuvant-induced arthritis in rats. *J Clin Invest*, **106**:189-197.

- Kehrer JP, Biswal, S.S. (2000) The molecular effects of acrolein. *Toxicol Sci* **57**:6-15.
- Ketterer B, Christodoulides, L.G. (1994) Enzymology of cytosolic glutathione S-transferases. *Adv Pharmacol* **27**:35-69.
- Khalaf WF, White, H., Wenning, M.J., Orazi, A., Kapur, R., Ingram, D.A. (2005) K-Ras is essential for normal fetal liver erythropoiesis. *Blood* **105**:3538-3541.
- Kikawa Y, Narumiya, S., Fukushima, M., Wakatsuka, H., Hayaishi, O. (1984) 9-Deoxy-delta 9, delta 12-13,14-dihydroprostaglandin D2, a metabolite of prostaglandin D2 formed in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**:1317-1321.
- Kim IK, Lee, J.H., Sohn, H.W., Kim, H.S., Kim, S.H. (1993) Prostaglandin A2 and delta 12-prostaglandin J2 induce apoptosis in L1210 cells. *FEBS letters* **321**:209-214.
- Klatt P, Lamas, S. (2000) Regulación of protein function by S-glutathionylation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur J Biochem* **267**:4928-4944.
- Klatt P, Molina, E.P., De Lacoba, M.G., Padilla, C.A., Martinez-Galesteo, E., Barcena, J.A., Lamas, S. (1999) Redox regulation of c-Jun DNA binding by reversible S-glutathiolation. *FASEB J* **13**:1481-1490.
- Kobayashi Y, Ueki, S., Mahemuti, G., Chiba, T., Oyamada, H., Saito, N., Kanda, A., Kayaba, H., Chihara, J. (2005) Physiological levels of 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 prime eotaxin-induced chemotaxis on human eosinophils through peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligation. *J Immunol* **175**:5744-5750.
- Kondo M, Oya-Ito, T., Kumagai, T., Osawa, T., Uchida, K. (2001) Cyclopentenone prostaglandins as potential inducers of intracellular oxidative stress. *J Biol Chem* **276**:12076-12083.
- Kuhn H (2005) Biologic relevance of lipoxygenase isoforms in atherogenesis. *Expert Rev Cardiovasc Ther* **3**:1099-1110.
- Kwon G, Xu, G., Marshall, C.A., McDaniel, M.L. (1999) Tumor necrosis factor alpha-induced pancreatic beta-cell insulin resistance is mediated by nitric oxide and prevented by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 and aminoguanidine. A role for peroxisome

- proliferator-activated receptor gamma activation and inos expression. *J Biol Chem* **274**:18702-18708.
- Landar A, Shiva, S., Levonen, A.L., Oh, J.Y., Zaragoza, C., Johnson, M.S., Darley-USmar, V.M. (2006) Induction of the permeability transition and cytochrome c release by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 in mitochondria. *Biochem J* **394**:185-195.
- Lander HM, Hajjar, D.P., Hempstead, B.L., Mirza, U.A., Chait, B.T., Campbell, S., Quilliam, L.A. (1997) A molecular redox switch on p21(ras). Structural basis for the nitric oxide-p21(ras) interaction. *J Biol Chem* **272**:4323-4326.
- Lash LH (2005) Role of glutathione transport processes in kidney function. *Toxicol Appl Pharmacol* **204**:329-342.
- Latruffe N, Vamecq, J. (1997) Peroxisome proliferators and peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) as regulators of lipid metabolism. *Biochimie* **79**:81-94.
- Lee JL, Mukhtar, H., Bickers, D.R., Kopelovich, L., Athar, M. (2003) Cyclooxygenases in the skin: pharmacological and toxicological implications. *Toxicol Appl Pharmacol* **192**:294-306.
- León J, Guerrero, I., Pellicer, A. (1987) Differential expression of the ras gene family in mice. *Mol Cell Biol* **7**:1535-1540.
- Levonen AL (2001) Biphasic effects of 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 on glutathione induction and apoptosis in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**:1846-1851.
- Levonen AL, Landar, A., Ramachandran, A., Ceaser, E.K., Dickinson, D.A., Zanoni, G., Morrow, J.D., Darley-USmar, V.M. (2004) Cellular mechanisms of redox cell signalling: role of cysteine modification in controlling antioxidant defences in response to electrophilic lipid oxidation products. *Biochem J* **378**:373-382.
- Li D, Sánchez, E.R. (2005) Glucocorticoid receptor and heat shock factor 1: novel mechanism of reciprocal regulation. *Vitam Horm* **71**:239-262.
- Li M, Pascual, G., Glass, C.K. (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Mol Cell Biol* **20**:4699-4707.

- Li Z, Melandri, F., Berdo, I., Jansen, M., Hunter, L., Wright, S., Valbrun, D., Figueiredo-Pereira, M.E. (2004) Delta12-Prostaglandin J2 inhibits the ubiquitin hydrolase UCH-L1 and elicits ubiquitin-protein aggregation without proteasome inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* **319**:1171-1180.
- Liang X, Wu, L., Hand, T., Andreasson, K. (2005) Prostaglandin D2 mediates neuronal protection via the DP1 receptor. *J Neurochem* **92**:477-486.
- Lin TN, Cheung, W.M., Wu, J.S., Chen, J.J., Lin, H., Chen, J.J., Liou, J.Y., Shyue, S.K., Wu, K.K. (2006) 15d-prostaglandin J2 protects brain from ischemia-reperfusion injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**:481-487.
- Liu JD, Lin, S.Y., Ho, Y.S., Pan, S., Hung, L.F., Tsai, S.H., Lin, J.K., Liang, Y.C. (2003) Involvement of c-jun N-terminal kinase activation in 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2-and prostaglandin A1-induced apoptosis in AGS gastric epithelial cells. *Mol Carcinog* **37**:16-24.
- Lo AC, Cheung, A.K., Hung, V.K., Yeung, C.M., He, Q.Y., Chiu, J.F., Chung, S.S., Chung, SK. (2007) Deletion of aldose reductase leads to protection against cerebral ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab* **In press**.
- Mallis RJ, Buss, J.E., Thomas, J.A. (2001) Oxidative modification of H-ras: S-thiolation and S-nitrosylation of reactive cysteines. *Biochem J* **355**:145-153.
- Martínez-Ruiz A, Villanueva, L., González de Orduña, C., López-Ferrer, D., Higuera, M.A., Tarín, C., Rodríguez-Crespo, I., Vázquez, J., Lamas, S. (2005) S-nitrosylation of Hsp90 promotes the inhibition of its ATPase and endothelial nitric oxide synthase regulatory activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:8525-8530.
- Matsuo T, Matsumura, T., Sakai, M., Senokuchi, T., Yano, M., Kiritoshi, S., Sonoda, K., Kukidome, D., Pestell, R.G., Brownlee, M., Nishikawa, T., Araki, E. (2004) 15d-PGJ2 inhibits oxidized LDL-induced macrophage proliferation by inhibition of GM-CSF production via inactivation of NF-kappaB. *Biochem Biophys Res Commun* **314**:817-823.

- Milne GL, Morrow, J.D. (2006) Isoprostanes and related compounds: update 2006. *Antioxid Redox Signal* **8**:1379-1384.
- Mohr S, Hallak, H., de Boitte, A., Lapetina, E.G., Brüne, B. (1999) Nitric oxide-induced S-glutathionylation and inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J Biol Chem* **274**:9427-9430.
- Mohr S, Stamler, J.S., Brüne, B. (1996) Posttranslational modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by S-nitrosylation and subsequent NADH attachment. *J Biol Chem* **23**:4209-4214.
- Montuschi P, Barnes, P., Roberts, L.J. (2007) Insights into oxidative stress: the isoprostanes. *Curr Med Chem* **14**:703-717.
- Moos PJ, Edes, K., Cassidy, P., Massuda, E., Fitzpatrick, F.A. (2003) Electrophilic prostaglandins and lipid aldehydes repress redox-sensitive transcription factors p53 and hypoxia-inducible factor by impairing the selenoprotein thioredoxin reductase. *J Biol Chem* **278**:745-750.
- Mor A, Philips, M.R. (2006) Compartmentalized Ras/MAPK signaling. *Annu Rev Immunol* **24**:771-800.
- Morgenegg G, Winkler, G.C., Hubscher, U., Heizmann, C.W., Mous, J., Kuenzle, C.C. (1986) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a nonhistone protein and a possible activator of transcription in neurons. *J Neurochem* **47**:54-62.
- Morrow CS, Peclak-Scott, C., Bishwokarma, B., Kute, T.E., Smitherman, P.K., Townsend, A.J. (2006) Multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABCC1) mediates resistance to mitoxantrone via glutathione-dependent drug efflux. *Mol Pharmacol* **69**:1499-1505.
- Morrow JD (2000) The isoprostanes: their quantification as an index of oxidant stress status in vivo. *Drug Metab Rev* **32**:377-385.
- Mossakowska M, Moraczewska, J., Khaitlina, S., Strzelecka-Golaszewska, H. (1993) Proteolytic removal of three C-terminal residues of actin alters the monomer-monomer interactions. *Biochem J* **289**:897-902.
- Muñoz U, de Las Cuevas, N., Bartolomé, F., Hermida, O.G., Bermejo, F., Martín-Requero, A. (2005) The cyclopentenone 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2 inhibits G1/S transition and

- retinoblastoma protein phosphorylation in immortalized lymphocytes from Alzheimer's disease patients. *Exp Neurol* **195**:508-517.
- Murphy RC, Barkley, R.M., Zemski Berry, K., Hankin, J., Harrison, K., Johnson, C., Krank, J., McAnoy, A., Uhlson, C., Zarini, S. (2005) Electrospray ionization and tandem mass spectrometry of eicosanoids. *Anal Biochem* **346**:1-42.
- Murphy RC, Zarini, S. (2002) Glutathione adducts of oxyeicosanoids. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**:471-482.
- Musiek E, Gao, L., Milne, G., Han, W., Everhart, M.m Wang, D., Backlund, M., Dubois, R., Zanoni, G., Vidari, G., Blackwell, T. and Morrow, J. (2005a) Cyclopentenone isoprostanes inhibit the inflammatory response in macrophages. *J Biol Chem* **280**:35562-35570.
- Musiek ES, Milne, G.L., McLaughlin, B., Morrow, J.D. (2005b) Cyclopentenone eicosanoids as mediators of neurodegeneration: a pathogenic mechanism of oxidative stress-mediated and cyclooxygenase-mediated neurotoxicity. *Brain Pathol* **15**:149-158.
- Musiek ES, Yin, H., Milne, G.L., Morrow, J.D. (2005c) Recent advances in the biochemistry and clinical relevance of the isoprostane pathway. *Lipids* **40**:987-994.
- Narumiya S, FitzGerald, G.A. (2001) Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *J Clin Invest* **108**:25-30.
- Narumiya S, Ohno, K., Fukushima, M., Fujiwara, M. (1987) Site and mechanism of growth inhibition by prostaglandins. III. Distribution and binding of prostaglandin A2 and delta 12-prostaglandin J2 in nuclei. *J Pharmacol Exp Ther* **242**:306-311.
- Nencioni A, Lauber, K., Grünebach, F., Van Parijs, L., Denzlinger, C., Wesselborg, S., Brossart, P. (2003) Cyclopentenone prostaglandins induce lymphocyte apoptosis by activating the mitochondrial apoptosis pathway independent of external death receptor signaling. *J Immunol* **171**:5148-5156.
- Nosjean O, Boutin, J.A. (2002) Natural ligands of PPARgamma: are prostaglandin J(2) derivatives really playing the part? *Cell Signal* **14**:573-583.

- Noyori RaS, M. (1993) Organic synthesis of prostaglandins: advancing biology. *Science* **259**:44- 45.
- Oliva JL, Pérez-Sala, D., Castrillo, A., Martinez, N., Cañada, F.j., Boscá, L. and Rojas, J.M. (2003) The cyclopentenone 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J₂ binds to and activates H-Ras. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:4772-4777.
- Ookhtens M, Kaplowitz, N. (1998) Role of the liver in interorgan homeostasis of glutathione and cysteine. *Semin Liver Dis* **18**:313-329.
- Otey CA, Carpen, O. (2004) Alpha-actinin revisited: a fresh look at an old player. *Cell Motil Cytoskeleton* **58**:104-111.
- Parker J (1995) Prostaglandin A₂ protein interactions and inhibition of cellular proliferation. *Prostaglandins* **50**:359-375.
- Pastore A, Federici, G., Bertini, E., Piemonte, F. (2003) Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta* **333**:19-39.
- Paumi CM, Smitherman, P.K., Townsend, A.J., Morrow, C.S. (2004) Glutathione S-transferases (GSTs) inhibit transcriptional activation by the peroxisomal proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) ligand, 15-deoxy-delta 12,14prostaglandin J₂ (15-d-PGJ₂). *Biochemistry* **43**:2345-2352.
- Paumi CM, Wright, M., Townsend, A.J. and Morrow, C.S. (2003) Multidrug resistance protein (MRO) 1 and MRP3 attenuate cytotoxic and transactivating effects of the cyclopentenone prostaglandin, 15-deoxy-Δ12,14- prostaglandin J₂ in MCF7 breast cancer cells. *Biochemistry* **42**:5429-5437.
- Pawlowski JE, Huizinga, M., Penning, T.M. (1990) Cloning and sequencing of the cDNA for rat liver 3 alpha-hydroxysteroid/dihydrodiol dehydrogenase. *J Biol Chem* **266**:8820-8825.
- Penning TM (1993) Dihydrodiol dehydrogenase and its role in polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism. *Chem Biol Interact* **89**:1-34.
- Pérez-Sala D, Cernuda-Morollón, E. and Cañada, FJ. (2003) Molecular basis for the inhibition of AP-1 DNA binding by 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J₂. *J Biol Chem* **218**:51251-51260.

- Petrash JM (2004) All in the family: aldose reductase and closely related aldo-keto reductases. *Cell Mol Life Sci* **61**:737-749.
- Petrash JM, Harter, T.M., Devine, C.S., Olins, P.O., Bhatnagar, A., Liu, S., Srivastava, S.K. (1992) Involvement of cysteine residues in catalysis and inhibition of human aldose reductase. Site-directed mutagenesis of Cys-80, -298, and -303. *J Biol Chem* **267**:24833-24840.
- Pineda-Molina E, Klatt, P., Vázquez, J., Marina, A., García de Lacoba, M., Pérez-Sala, D., Lamas, S. (2001) Glutathionylation of the p50 subunit of NF-kappaB: a mechanism for redox-induced inhibition of DNA binding. *Biochemistry* **40**:14134-14142.
- Ramana K, Willis, MS., White, MD., Horton, JW., DiMaio, JM., Srivastava, D., Bhatnagar, A., Srivastava, SK. (2006) Endotoxin-induced cardiomyopathy and systemic inflammation in mice is prevented by aldose reductase inhibition. *Circulation* **114**:1838-1846.
- Ramana KV, Bhatnagar, A., Srivastava, S.K. (2004a) Aldose reductase regulates TNF-alpha-induced cell signaling and apoptosis in vascular endothelial cells. *FEBS letters* **570**:189-194.
- Ramana KV, Chandra, D., Srivastava, S., Bhatnagar, A., Aggarwal, B.B., Srivastava, S.K. (2003) Aldose reductase mediates mitogenic signaling in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **277**:32063–32070.
- Ramana KV, Friedrich, B., Srivastava, S., Bhatnagar, A., Srivastava, S.K. (2004b) Activation of nuclear factor-kappaB by hyperglycemia in vascular smooth muscle cells is regulated by aldose reductase. *Diabetes* **53**:2910-2920.
- Ramasamy R, Trueblood, N., Schaefer, S. (1998) Metabolic effects of aldose reductase inhibition during low-flow ischemia and reperfusion. *Am J Physiol* **275**.
- Rando RR (1996) Chemical biology of protein isoprenylation/methylation. *Biochim Biophys Acta* **1300**:5-16.
- Reddy S, Jones, A.D., Cross, C.E., Wong, P.S., Van Der Vliet, A. (2000) Inactivation of creatine kinase by S-glutathionylation of the active-site cysteine residue. *Biochem J* **347**:821-827.

- Reed D.J. O, S. (1977) The role of methionine in glutathione biosynthesis by isolated hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **77**:1257-1264.
- Renedo M, Gayarre, J., García-Domínguez, C.,| Andrea Pérez-Rodríguez, A., Prieto, A., Cañada, F.J., Rojas, J.M., Pérez-Sala, D. (2007) Modification and activation of Ras proteins by electrophilic prostanoids with different structure are site-selective. *Biochemistry* **46**:6607-6616.
- Ricote M, Li, A.C., Willson, T.M., Kelly, C.J., Glass, C.K. (1998) The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* **391**:79-82.
- Richman PG, Meister, A. (1975) Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J Biol Chem* **250**:1422-1426.
- Rittner HL, Hafner, V., Klimiuk, P.A. (1999) Aldose reductase functions as a detoxification system for lipid peroxidation products in vasculitis. *J Clin Invest*, **103**:1007–1013.
- Robbins AR, Ward, R.D., Oliver, C. (1995) A mutation in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase alters endocytosis in CHO cells. *J Cell Biol* **130**:1093–1104.
- Roberts LJ, Fessel, J.P., Davies, S.S. (2005) The biochemistry of the isoprostane, neuroprostane, and isofuran Pathways of lipid peroxidation. *Brain Pathol* **15**:143-148.
- Roberts LJn, Morrow, J.D. (2002) Products of the isoprostane pathway: unique bioactive compounds and markers of lipid peroxidation. *Cell Mol Life Sci* **59**:808-820.
- Rocks O, Peyker, A., Kahms, M., Verveer, P.J., Koerner, C., Lumbierres, M., Kuhlmann, J., Waldmann, H., Wittinghofer, A., Bastiaens, P.I. (2005) An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras isoforms. *Science* **307**:1746-1752.
- Rondeau JM, Tête-Favier, F., Podjarny, A., Reymann, J.M., Barth, P., Biellmann, J.F., Moras, D. (1992) Novel NADPH-binding domain revealed by the crystal structure of aldose reductase. *Nature* **355**:469-472.

- Rossi A, Kapahi, P., Natoli, G., Takahashi, T., Chen, Y., Karin, M., Santoro, M.G. (2000) Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of IkappaB kinase. *Nature* **403**:103-108.
- Rovin BH, Wilmer, W.A., Lu, L., Doseff, A.I, Dixon, C., Kotur, M., Hilbelink, T. (2002) 15-Deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 regulates mesangial cell proliferation and death. *Kidney Int* **61**:1293-1302.
- Roy S, Plowman, S., Rotblat, B., Prior, I.A., Muncke, C., Grainger, S., Parton, R.G., Henis, Y.I., Kloog, Y., Hancock, J.F. (2005) Individual palmitoyl residues serve distinct roles in H-ras trafficking, microlocalization, and signaling. *Mol Cell Biol* **25**:6722-6733.
- Samuelsson B (1979) Prostaglandins, thromboxanes, and leukotrienes: formation and biological roles. *Harvey Lect* **75**:1-40.
- Sánchez-Gómez FJ, Cernuda-Morollón, E., Stamatakis, K., and Pérez-Sala, D. (2004) Protein thiol modification by 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J₂ addition in mesangial cells: role in the inhibition of pro-inflammatory genes. *Mol Pharmacol* **66**:1349-1358.
- Sánchez-Gómez FJ, Gayarre, J., Avellano, M.I., Pérez-Sala, D. (2007) Direct evidence for the covalent modification of glutathione-S-transferase P1-1 by electrophilic prostaglandins: implications for enzyme inactivation and cell survival. *Arch Biochem Biophys* **457**:150-159.
- Sandig H, Andrew, D., Barnes, A.A., Sabroe, I., Pease, J. (2006) 9alpha,11beta-PGF2 and its stereoisomer PGF2alpha are novel agonists of the chemoattractant receptor, CRTH2. *FEBS letters* **580**:373-379.
- Santoro MG (1997) Antiviral activity of cyclopentenone prostanoids. *Trends Microbiol* **5**:276-281.
- Schmitz HD, Bereiter-Hahn, J. (2002) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase associates with actin filaments in serum deprived NIH 3T3 cells only. *Cell Biol Int* **26**:155-164.
- Serhan CN, Takano, T., Maddox, J.F. (1999) Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 and stable analogs on lipoxin A4 are potent inhibitors of

- acute inflammation. Receptors and pathways. *Adv Exp Med Biol* **447**:133-149.
- Shahabi NA, Chegini, N., Wittliff, J.L. (1987) Alterations of MCF-7 human breast cancer cell after prostaglandins PGA1 and PGF2 alpha treatment. *Exp Cell Biol* **55**:18-27.
- Shi ZZ, Osei-Frimpong J., Kala, G. (2000) Glutathione synthesis is essential for mouse development but not for cell growth in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:5101-5106.
- Shibata T, Kondo, M., Osawa, T., Shibata, N., Kobayashi, M., Uchida, K. (2002) 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2. A prostaglandin D2 metabolite generated during inflammatory processes. *J Biol Chem* **277**:10459-10466.
- Shibata T, Yamada, T., Ishii, T., Kumazawa, S., Nakamura, H., Masutani, H., Yodoi, J., Uchida, K. (2003) Thioredoxin as a molecular target of cyclopentenone prostaglandins. *J Biol Chem* **278**:26046-26054.
- Shiraki T, Kamiya, N., Shiki, S., Kodama, T.S., Kakizuka, A, Jingami, H. (2005) Alpha,beta-unsaturated ketone is a core moiety of natural ligands for covalent binding to peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* **280**:14145-14153.
- Singh R, Green, M.R. (1993) Sequencespecific binding of transfer-RNA by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Science* **259**:365-368.
- Sirover MA (1997) Role of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in normal cell function and in cell pathology. *J Cell Biochem* **66**:133-140.
- Soti C, Nagy, E., Giricz, Z., Vigh, L., Csermely, P. and Ferdinandy, P. (2005) Heat shock proteins as emerging therapeutic targets. *Br J Pharmacol* **146**:769-780.
- Srivastava S, Chandra, A., Ansari, N.H., Srivastava, S.K., Bhatnagar, A. (1998) Identification of cardiac oxidoreductase(s) involved in the metabolism of the lipid peroxidation-derived aldehyde-4-hydroxynonenal. *Biochem J* **329**:469-475.
- Stamatakis K, Pérez-Sala, D. (2006a) Prostanoids with cyclopentenone structure as tools for the characterization of electrophilic lipid-protein interactomes. *Ann N Y Acad Sci* **1091**:548-570.

- Stamatakis K, Sánchez-Gómez, F.J., Pérez-Sala, D. (2006b) Identification of novel protein targets for modification by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 in mesangial cells reveals multiple interactions with the cytoskeleton. *J Am Soc Nephrol* **17**:89-98.
- Stournaras C, Drewes, G., Blackholm, H., Merkle, I., Faulstich, H. (1990) Glutathionyl(cysteine-374) actin forms filaments of low mechanical stability. *Biochim Biophys Acta* **1037**:86-91.
- Straus DS, Glass, C.K. (2001) Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets. *Med Res Rev* **21**:185-210.
- Straus DS, Pascual, G., Li, M., Welch, J.S., Ricote, M., Hsiang, C.H., Sengchanthalangsy, L.L., Ghosh, G., Glass, C.K. (2000) 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:4844-4849.
- Su CG, Lewis, J.D. (2001) Antineoplastic and anti-inflammatory effects of PPAR ligands in colitis. *Gastroenterology* **121**:1019-1021.
- Subbanagounder G, Wong, J.W., Lee, H., Faull, K.F., Miller, E., Witztum, J.L., Berliner, J.A. (2002) Epoxyisoprostane and epoxy-cyclopentenone phospholipids regulate monocyte chemotactic protein-1 and interleukin-8 synthesis. Formation of these oxidized phospholipids in response to interleukin-1beta. *J Biol Chem* **277**:7271-7281.
- Suzuki M, Mori, M., Niwa, T., Hirata R., Furuta, K., Ishikawa, T., and Noyori, R. (1997) Chemical Implications for Antitumor and Antiviral Prostaglandins: Reaction of Δ^7 Prostaglandin A1 and Prostaglandin A1 Methyl Esters with Thiols. *J Am Chem Soc* **119**:2376-2385.
- Szweda LI, Uchida, K., Tsai, L., Stadtman, E.R. (1993) Inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase by 4-hydroxy-2-nonenal. Selective modification of an active-site lysine. *J Biol Chem* **268**:3342-3347.
- Tager AM, Luster, A.D. (2003) BLT1 and BLT2: the leukotriene B(4) receptors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **60**:123-134.

- Tammali R, Ramana, K.V., Singhal, S.S., Awasthi, S., Srivastava, S.K. (2006) Aldose reductase regulates growth factor-induced cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin e2 production in human colon cancer cells. *Cancer Res* **66**:9705-9713.
- Tilley SL, Coffman, T.M., Koller, B.H. (2001) Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *J Clin Invest* **108**:15-23.
- Tisdale EJ (2002) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is phosphorylated by protein kinase Ciota /lambda and plays a role in microtubule dynamics in the early secretory pathway. *J Biol Chem* **277**:3334-3341.
- Tisdale EJ, Kelly, C., Artalejo, C.R. (2004) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase interacts with Rab2 and plays an essential role in endoplasmic reticulum to Golgi transport exclusive of its glycolytic activity. *J Biol Chem* **279**:54046-54052.
- Tomlinson DR, Holmes, P.R., Mayer, J.H. (1982) Reversal, by treatment with an aldose reductase inhibitor, of impaired axonal transport and motor nerve conduction velocity in experimental diabetes mellitus. *Neurosci Lett* **31**:189-193.
- Townsend DM, Tew, K.D. (2003) The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* **22**:7369-7375.
- Trahey M, McCormick, F. (1987) A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science* **238**:542-545.
- Trivedi SG, Newson, J., Rajakariar, R., Jacques, T.S., Hannon, R., Kanaoka, Y., Eguchi, N., Colville-Nash, P., Gilroy, D.W. (2006) Essential role for hematopoietic prostaglandin D2 synthase in the control of delayed type hypersensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **53**:5179-5184.
- Tsujii M, Kawano, S., DuBois, R.N. (1997) Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:3336-3340.

- Umanoff H, Edelmann, W., Pellicer, A., Kucherlapati, R. (1995) The murine N-ras gene is not essential for growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:1709-1713.
- van Iersel ML, Ploemen, J.P., Lo Bello, M., Federici, G., van Bladeren, P.J. (1997) Interactions of alpha, beta-unsaturated aldehydes and ketones with human glutathione S-transferase P1-1. *Chem Biol Interact* **108**:67-78.
- Vander Jagt DL, Hunsaker, L.A. (2003) Methylglyoxal metabolism and diabetic complications: roles of aldose reductase, glyoxalase-I, betaine aldehyde dehydrogenase and 2-oxoaldehyde dehydrogenase. *Chem Biol Interact*, **143**:341–351.
- Vane JR, Bakhle, Y.S., Botting, R.M. (1998) Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **38**:97-120.
- Vitvitsky V, Thomas, M., Ghorpade, A., Gendelman, H.E., Banerjee, R. (2006) A functional transsulfuration pathway in the brain links to glutathione homeostasis. *J Biol Chem* **281**:35785-35793.
- Vunta H, Davis, F., Palempalli, U.D., Bhat, D., Arner, R.J., Thompson, J.T., Peterson, D.G., Reddy, C.C., Prabhu, K.S. (2007) The anti-inflammatory effects of selenium are mediated through 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 in macrophages. *J Biol Chem* **282**:17964-17973.
- Wada K, Nakajima, A., Blumberg, R.S. (2000) PPARgamma and inflammatory bowel disease: a new therapeutic target for ulcerative colitis and Crohn's disease. *Trends Mol Med* **7**:329-331.
- Wakabayashi N, Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Kang, M.I., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Kensler, T.W., Talalay, P. (2004) Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:2040-2045.
- Wang J, Boja, E.S., Tan, W., Tekle, E., Fales, H.M., English, S., Mieyal, J.J., Chock, P.B. (2001) Reversible glutathionylation regulates actin polymerization in A431 cells. *J Biol Chem* **276**:47763-47766.
- Wang Z, Aris, V.M., Ogburn, K.D., Soteropoulos, P., Figueiredo-Pereira, M.E. (2006) Prostaglandin J2 alters pro-survival and pro-death gene

- expression patterns and 26 S proteasome assembly in human neuroblastoma cells. *J Biol Chem* **281**:21377-21386.
- Whalen R, Boyer, T.D. (1998) Human glutathione S-transferases. *Semin Liver Dis* **18**:345-358.
- Wilmer WA, Dixon, C., Lu, L., Hilbelink, T., Rovin, B.H. (2001) A cyclopentenone prostaglandin activates mesangial MAP kinase independently of PPARgamma. *Biochem Biophys Res Commun* **281**:57-62.
- Wilson DK, Bohren, K.M., Gabbay, K.H., Quioco, F.A. (1992) An unlikely sugar substrate site in the 1.65 Å structure of the human aldose reductase holoenzyme implicated in diabetic complications. *Science* **257**:81-84.
- Willoughby DA, Moore, A.R., Colville-Nash, P.R. (2006) COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *Lancet* **355**:646-648.
- Wink DA, Mitchell, J.B. (1998) Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol* **25**:434-456.
- Zhang DD, Hannink, M. (2003) Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol Cell Biol* **23**:8137-8151.
- Zhang X, Lu, L., Dixon, C., Wilmer, W., Song, H., Chem, X. and Rovin B.H. (2004) Stress protein activación by the ciclopentenone prostaglandin 15-deoxi-delta12,14-prostaglandin J2 in human mesangial cells. *Kidney Int* **65**:798-810.
- Ziboh VA, Cho, Y., Mani, I., Xi, S. (2002) Biological significance of essential fatty acids/prostanoids/lipoxygenase-derived monohydroxy fatty acids in the skin. *Arch Pharm Res* **25**:747-758.
- Zingarelli B, Cook, J.A. (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a new therapeutic target in sepsis and inflammation. *Shock* **23**:393-399.