

**Departamento de Bioquímica y Biología
Molecular**



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

TESIS DOCTORAL

**Ciclo celular y neurodegeneración: implicación de la
E3 ubiquitina ligasa APC/C-Cdh1 en la
excitotoxicidad.**

**CAROLINA MAESTRE FERRÍN
2009**



UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

Edificio Departamental
Pza. Doctores de la Reina s/n,
Tel . 923 29 46 98 Fax . 923 29 45 79

D^a ÁNGELES ALMEIDA PARRA, Investigadora del Hospital Universitario de Salamanca y Profesora Asociada del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca y D. JUAN PEDRO BOLAÑOS HERNÁNDEZ, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.

AUTORIZAN:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada: **“Ciclo celular y neurodegeneración: implicación de la E3 ubiquitina ligasa APC/C-Cdh1 en la excitotoxicidad”**, que ha sido realizada bajo su dirección por la Licenciada en Biología D^a. Carolina Maestre Ferrín, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firman el presente documento en Salamanca a 10 de Julio de 2009.

Fdo: Ángeles Almeida Parra

Fdo: Juan Pedro Bolaños Hernández

**SR. DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA.**

INTRODUCCIÓN

1. Ciclo celular.

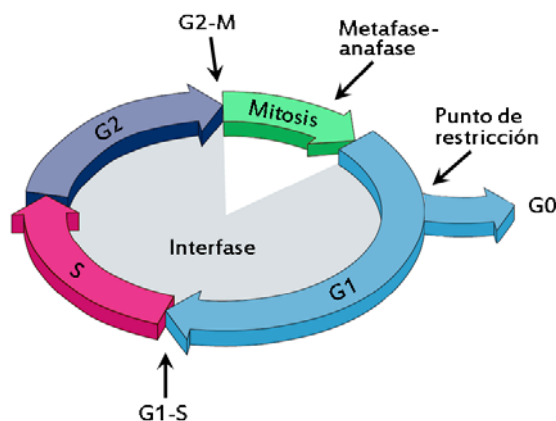
La división celular es un proceso esencial que permite el desarrollo de un individuo pluricelular adulto a partir de una única célula (el cigoto), así como la regeneración de los tejidos, que necesitan el reemplazo de las células que van perdiendo. Durante cada división, una célula madre da lugar a dos células hijas con la misma información genética, para lo cual ha de completar una serie de eventos ordenados y controlados estrictamente que, en conjunto, reciben el nombre de ciclo celular.

Durante el ciclo celular, todos los componentes de la célula madre deben duplicarse y repartirse entre las células hijas. El DNA ha de replicarse una única vez en cada ciclo y de forma exacta, y las cromátidas hermanas producidas han de segregarse a cada una de las células hijas, lo que requiere cambios en la condensación del DNA y en la organización del citoesqueleto.

El ciclo celular eucariótico consta de cuatro fases: G1, S, G2 y M (Esquema 1). Al conjunto de las fases G1, S y G2 se le denomina interfase. La replicación del DNA tiene lugar durante la **fase S** (de Síntesis), mientras que la segregación cromosómica se produce en la **fase M** (de Mitosis), la cual comprende, además de la mitosis o división nuclear, la citoquinesis o división celular propiamente dicha. Entre las fases M y S se distinguen los periodos G1 y G2 (del inglés *Gap*, intervalo). **G1** conecta la fase M con el inicio de la fase S del ciclo siguiente, y **G2** separa la fase S de la fase M posterior. Durante estos dos periodos la célula crece y comprueba que los eventos de la fase anterior se han producido adecuadamente, en cuyo caso se permite la transición a la siguiente fase del ciclo, de ahí la importancia de las transiciones G1/S y G2/M. La entrada de las células en un nuevo ciclo de división está determinada por señales externas y por la propia información interna de la célula, aunque las señales externas sólo afectan a la progresión del ciclo hasta un momento determinado de G1, conocido como **punto de restricción**, a partir del cual el control lo ejerce solamente la maquinaria del ciclo celular. En el punto de restricción, las células pueden

abandonar el ciclo, ya sea temporal o permanentemente, y entrar en una fase de arresto o fase quiescente, **G0**.

Durante el desarrollo se producen variaciones del ciclo celular básico, como en los primeros estadios embrionarios, donde el ciclo se produce muy rápido y carece de fases G1 y G2; la meiosis, donde tras una única fase S se producen dos divisiones celulares, dando lugar a gametos haploides; o la endorreduplicación, en la que la fase S no va seguida por mitosis.



ESQUEMA 1. Esquema general del ciclo celular. El ciclo celular consta de 4 fases: G1, S, G2 y M. Las tres primeras forman la interfase. La fase S comienza al iniciarse la replicación del DNA. La entrada en fase M se caracteriza por la rotura de la envuelta nuclear y la condensación cromosómica, mientras que la segregación de cromátidas hermanas marca la transición metafase-anafase. Las transiciones G1-S y G2-M dependen de la actividad de las kinasas dependientes de ciclina (Cdks), quienes fosforilan una gran variedad de sustratos; mientras que la transición metafase-anafase requiere la ubiquitinación y degradación de las ciclinas mitóticas, entre otras proteínas, proceso que depende de la actividad E3 ubiquitina ligasa del complejo promotor de la anafase o ciclosoma (APC/C). En el punto de restricción las células pueden abandonar el ciclo para entrar en G0 (fase quiescente).

2. Regulación del ciclo celular.

2.1. Checkpoints.

Los controles de comprobación del ciclo celular o *checkpoints* son vías de señalización que aseguran la estabilidad, la correcta replicación y la distribución adecuada del material genético en las células. Estos controles se ejercen principalmente en las transiciones G2/M y metafase/anafase, al prevenir la

progresión del ciclo hasta que se completen eventos críticos anteriores, como la replicación o el anclaje de todos los cinetocoros al huso mitótico, respectivamente.

Los principales checkpoints descritos en células de mamíferos son los siguientes:

- **Checkpoint de daño al DNA:** Se activa cuando se detectan roturas o alteraciones en la estructura normal de la cadena de DNA, con el fin de parar el ciclo celular y proceder a su reparación, si es posible. De este modo se evita la transmisión de mutaciones a las células hijas, contribuyendo al mantenimiento de su estabilidad genómica.

- **Checkpoint de replicación:** Regula el programa temporal de los distintos orígenes de replicación, así como la tasa de elongación de las horquillas de replicación. Se activa en respuesta a problemas que afectan a la replicación, en ausencia de daño directo al DNA, pudiendo inducir incluso su parada. [Grallert, 2008, 2315]

- **Checkpoint de antefase:** En respuesta a problemas en el ensamblaje del huso mitótico, a cambios en la topología de la cromatina, o a estrés térmico u osmótico, este *checkpoint* promueve la parada de las células en la antefase, un periodo al final de G2 inmediatamente anterior a los signos visibles de condensación cromosómica. [Mikhailov, 2005, 57].

- **Checkpoint de huso mitótico:** Es el mecanismo que asegura la correcta segregación cromosómica en mitosis, evitando así la aparición de aneuploidías. Controla los acontecimientos que tienen lugar desde la ruptura de la envuelta nuclear hasta la metafase tardía, asegurando que todos los cromosomas estén correctamente anclados al huso mitótico y alineados en la placa metafásica. La activación de este *checkpoint* provoca la parada del ciclo celular como consecuencia de la inhibición del complejo promotor de la anafase o ciclosoma (APC/C). [Musacchio, 2007, 379].

2.2. Cdks.

En las células eucariotas, las Cdks (del inglés *Cyclin-dependent kinases*, kinasas dependientes de ciclinas) están implicadas en el control de la progresión del ciclo celular, la transcripción y algunas funciones neuronales (como Cdk5). Las Cdks son serina/treonina kinasas y constituyen la subunidad catalítica de un heterodímero, formado también por una subunidad activadora, la ciclina. Según el modelo clásico del ciclo celular, varias Cdks participan en su regulación en células de mamíferos, de modo que **Cdk4** y **Cdk6** están implicadas en la regulación de G1, **Cdk2** regula principalmente la entrada y progresión por la fase S, y por último, **Cdk1** es necesaria para la entrada y la progresión por las primeras etapas de la mitosis (revisado por [Malumbres, 2005, 630]). Sin embargo, estudios recientes han puesto de manifiesto la existencia de redundancia funcional entre las distintas Cdks en células de mamíferos (en ratones), ya que sólo Cdk1 parece esencial para la regulación del ciclo celular básico [Santamaria, 2007, 811], si bien, el resto de Cdks son necesarias para la proliferación de algunos tipos celulares específicos.

Las Cdks están sometidas a una regulación muy fina que permite que, pese a mantener sus niveles proteicos constantes durante el ciclo celular, su actividad fluctúe a lo largo del mismo. Las Cdks por si solas no presenta actividad kinasa, necesitan formar un complejo con la ciclina, pero la activación de la holoenzima (complejo Cdk-ciclina) requiere, además, la fosforilación de un residuo clave en el lazo de activación (T-loop) de la Cdk (mediado por CAK, del inglés *Cdk-activating kinase*, kinasa activadora de Cdk). La actividad de los complejos Cdk-ciclina puede ser inhibida de varias formas, incluyendo la ubiquitinación y posterior degradación proteolítica de las ciclinas, la presencia de proteínas inhibidoras de tipo CKI (del inglés, *Cyclin-dependent kinase inhibitor*, inhibidores de Cdks), y procesos de fosforilación-desfosforilación de las Cdks (revisado por [Hochegger, 2008, 910]). La fosforilación inhibidora corre a cargo de las kinasas Wee1 y Myt1, quienes fosforilan los residuos adyacentes de treonina y tirosina presentes en el dominio de unión a ATP de la Cdk. La fosforilación de estos residuos puede ser revertida por las fosfatasas Cdc25,

quienes actúan como reguladores positivos de los complejos Cdk-ciclina (revisado por [Heuvel, 2005 #20]).

2.2.1. Reguladores positivos de Cdks.

Los principales reguladores positivos de las Cdks son las ciclinas, sin embargo, también se han descrito otros, como las ciclinas virales, que activan a Cdk4 y Cdk6; los activadores específicos de Cdk5, p35 y p39; y la familia de proteínas RINGO/Speedy, que activan a Cdk1 y Cdk2 [Nebreda, 2006, 192].

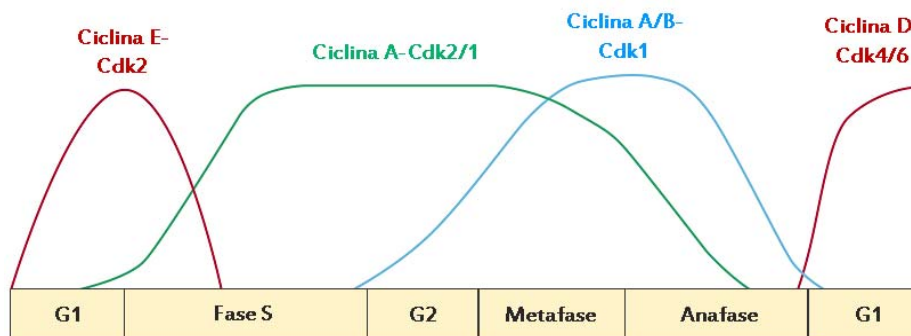
Dependiendo de la fase del ciclo en la que aparecen y la Cdk a la que se asocian, se distinguen cuatro tipos de ciclinas [Bardin, 2001, 815] (Esquema 2):

- **Ciclinas de G1:** Promueven el paso por el punto de restricción, lo que conlleva la entrada de la célula en un nuevo ciclo celular. Son las ciclinas D, que se asocian a Cdk4 y Cdk6 durante G1.

- **Ciclinas G1-S:** La ciclina E asociada a Cdk2, que es requerida para el inicio de la replicación del DNA.

- **Ciclinas de fase S:** Permiten la progresión por la fase S. Ciclina A, que se asocia a Cdk2 y Cdk1.

- **Ciclinas mitóticas:** Son responsables de la mitosis. La ciclina A y, sobre todo, las ciclinas B cuando se asocian a Cdk1.



ESQUEMA 2. **Actividad de los complejos Cdk-ciclina en las distintas fases del ciclo celular.** A lo largo del ciclo celular fluctúa la actividad de los distintos complejos Cdk-ciclina (de fase G1 en color rojo, de fase S en color verde y mitóticos en color azul). Los complejos Cdk-ciclina de G1 promueven el paso por el punto de restricción, los de fase S permiten la replicación del DNA y, por último, los mitóticos inducen la entrada y progresión por mitosis, aunque su actividad debe reducirse al final de esta fase. Adaptado de [Bardin, 2001, 815].

2.2.2. Reguladores negativos de Cdk: CKIs.

Las proteínas inhibidoras de Cdk (CKIs) participan en la parada del ciclo celular producida en respuesta a señales intrínsecas y/o extrínsecas al propio ciclo, como las relacionadas con procesos de senescencia, inhibición por contacto, activación de un *checkpoint* o control de comprobación del ciclo celular [Harper, 1997, 91] o señales antiproliferativas (como el mantenimiento en fase quiescente de los progenitores neurales) [Pechnick, 2008, 1358].

En células de mamíferos se han descrito dos familias de CKIs: CIP/KIP (del inglés *Kinase Inhibitor Protein*, proteína inhibidora de quinasa) que incluye a p21^{Cip1}, p27^{Kip1} y p57^{kip2}, y la familia INK4 (del inglés *Inhibitor of Cdk4*, inhibidor de Cdk4) que comprende a p15^{INK 4b}, p16^{INK 4a}, p18^{INK 4c} y p19^{INK 4d}. Los miembros de la familia INK4 inhiben específicamente a Cdk4 y Cdk6 cuando se encuentran en forma de monómeros, mientras que las proteínas de la familia CIP/KIP bloquean la actividad kinasa al unirse a los complejos Cdk-ciclina y presentan un espectro más amplio, ya que reconocen los complejos Cdk2-ciclina E, Cdk2-ciclina A, Cdk1-ciclina A, Cdk1-ciclina B y, posiblemente Cdk4-ciclina D y Cdk6-ciclina D. [Sherr, 1999, 1501][Malumbres, 2005, 630].

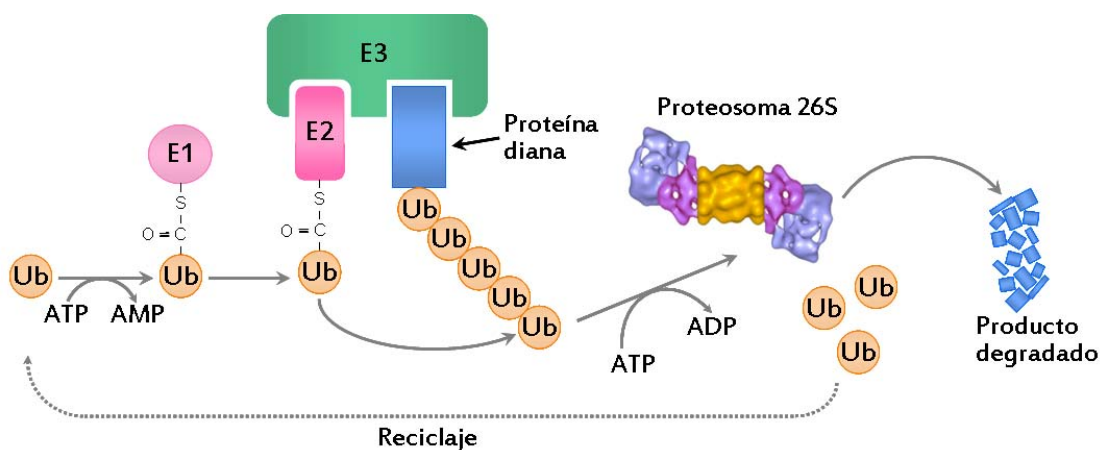
2.3. Ubiquitina ligasas.

Las oscilaciones en la actividad Cdk necesarias para la progresión del ciclo celular se deben, en gran medida, a la acción de las ubiquitina ligasas, quienes controlan la degradación de los reguladores de Cdk (ciclina y CKIs), entre otros sustratos. La proteólisis resulta útil para conducir estas oscilaciones puesto que, al tratarse de un proceso irreversible, fuerza al ciclo en una sola dirección, ya que cada ciclo requiere la síntesis *de novo* de estos reguladores.

Las ubiquitina ligasas forman parte de la **vía de la ubiquitina-proteosoma**, por la que se marca a las proteínas con una cadena de poliubiquitina, que las conduce al complejo proteosoma 26S para su proteólisis.

La ubiquitina es una proteína de 76 aminoácidos muy conservada, cuya adición a la proteína diana requiere la actividad de tres clases de enzimas: una enzima activadora de ubiquitina (E1), una ubiquitina conjugante (E2) y una ubiquitina ligasa (E3). La **E1** forma un enlace tioéster de alta energía entre un residuo de cisteína de su sitio activo y el residuo de glicina (G76) del extremo carboxilo terminal de la ubiquitina. A continuación, la ubiquitina activada se transfiere a un residuo de cisteína del sitio activo de la **E2**, formándose un nuevo enlace tioéster. Por último, la ubiquitina se acopla al grupo ϵ -amino de un residuo de lisina de la proteína a marcar, a través de un enlace isopeptídico, gracias a la actividad conjunta de la E2 y la **E3**, quien confiere especificidad de sustrato [Baker, 2007, 589]. (Esquema 3).

La elongación de las cadenas de poliubiquitina se consigue mediante el establecimiento de un enlace isopeptídico entre el residuo de glicina carboxilo terminal de la ubiquitina “n+1” con el grupo ϵ -amino de un residuo de lisina de la ubiquitina anterior (n). Dado que cada molécula de ubiquitina contiene siete residuos de lisina, se puede generar una gran variedad de cadenas de poliubiquitina desde el punto de vista morfológico, con distintas funciones celulares. La degradación por el proteosoma depende, principalmente, de cadenas unidas a través de K48 o K11 [Jin, 2008, 653].



ESQUEMA 3. Degradación de proteínas por la vía de la ubiquitina-proteosoma. La ubiquitina (Ub) se transfiere a la E1, con gasto de ATP. A continuación se conjuga a la E2 y finalmente, en colaboración con la E3, se une covalentemente a la proteína diana. Esto permite la formación de cadenas de poliubiquitina, que son reconocidas por el proteosoma 26S, el cual

hidroliza los enlaces peptídicos de la proteína diana mediante un proceso dependiente de ATP. Adaptado de [Nakayama, 2006, 369].

Para que el proteosoma pueda reconocer las cadenas de poliubiquitina, éstas deben tener una longitud mínima de cuatro moléculas, aunque algunos sustratos presentan cadenas mucho más largas [Hanna, 2007, 2854]. Esto implica que la E3 debe permanecer unida al sustrato el tiempo suficiente para procesarlo varias veces, o bien, necesita varios encuentros sucesivos con éste antes de marcarlo para su destrucción. Por ello, tanto la actividad de la E3 como su capacidad para reconocer sustratos resultan factores limitantes del proceso de poliubiquitinación, aunque no son los únicos, pues también influye la actividad de las enzimas desubiquitinantes (DUBs), las cuales revierten el efecto de las E3 [van Leuken, 2008, 49].

Las E3 se clasifican en cuatro clases principales, en función del motivo estructural que las caracteriza: tipo HECT, tipo RING-finger, tipo U-box y tipo PHD-finger. Las E3 de tipo RING-finger poseen un dominio formado por 40-100 aminoácidos con 8 residuos de cisteína e histidina muy conservados que coordinan dos átomos de Zn, formando una estructura en dedo de zinc [Yi, 2007, 2007, 14]. Estas E3 se unen simultáneamente a la E2 y al sustrato y facilitan la transferencia de la ubiquitina directamente desde la E2. Constituyen la familia más grande, que se divide en subfamilias, una de las cuales es la basada en culinas, que incluye a SKP1/CUL1/F-box (SCF) y al complejo promotor de la anafase o ciclosoma (APC/C), las principales E3 implicadas en la destrucción de componentes de la maquinaria del ciclo celular. [Nakayama, 2006, 369].

Se considera que SCF permanece activo a lo largo de todo el ciclo celular, mientras que APC/C lo está desde prometafase hasta el final de G1. [van Leuken, 2008, 49].

2.3.1. SCF

El complejo SCF está formado por tres componentes invariables: **RBX1**, (una proteína con estructura RING-finger), **CUL1** (una proteína de andamiaje), y **SKIPI1** (una proteína adaptadora), además de un componente variable, conocido como **proteína F-box**. El componente variable se une a SKIPI1 a través de su motivo F-box, y es responsable del reconocimiento de sustratos. En este sentido, cabe destacar que, en muchos casos, la interacción entre la proteína F-box y los sustratos depende del estado de fosforilación de estos últimos, de manera que, para la proteólisis mediada por SCF, resultan críticos tanto la disponibilidad de proteínas F-box, como las modificaciones de los sustratos. [Nakayama, 2006, 369].

En humanos, se han identificado aproximadamente 70 proteínas F-box, que se clasifican en tres categorías: FBXW (presentan repeticiones WD40), FBXL (presentan repeticiones ricas en leucina) y FBXO (con otros dominios estructurales diferentes). Se conocen tres proteínas F-box involucradas en el control del ciclo celular:

- **SKP2** (del inglés *S-phase kinase-associated protein 2*) (FBXL1): marca para su degradación algunos reguladores negativos del ciclo celular, como p27, p21 y p57, promoviendo así la progresión del ciclo durante las fases S y G2.

- **FBW7** (del inglés *F-box and WD-40 domain protein 7*) (FBXW7): induce la degradación de reguladores positivos del ciclo celular, como MYC, JUN, ciclina E y Notch.

- **β -TRCP** (del inglés *β -transducin repeat-containing protein*) (FBXW1/11): es una proteína F-box versátil, pues reconoce algunos reguladores del ciclo celular, como Emi1/2, Wee1A y Cdc25A/B, además de sus sustratos clásicos: β -catenina e I κ B.

3. APC/C.

3.1. Cofactores.

APC/C puede colaborar con varias E2: UbcH5, UbcH10, E2-25K y E2S [Steen, 2008, 6069]. **UbcH5** y **UbcH10** son las más conocidas, se unen a APC/C transitoriamente y, aunque cada una por separado es capaz de mantener la ubiquitinación mediada por APC/C *in vitro*, se requiere UbcH10 para que APC/C esté completamente activo. A diferencia de UbcH10, que sólo es conocido por trabajar con APC/C, UbcH5 es capaz de interaccionar con varias E3. [Peters, 2006, 644].

En humanos, APC/C y UbcH10 median la degradación de proteínas ensamblando cadenas de poliubiquitina unidas a través de la lisina 11, mayoritariamente. Y se ha descrito que si se interfiere en la formación de este tipo de cadenas, se estabilizan sustratos de APC/C como geminina o Plk1, impidiéndose la progresión del ciclo celular y el desarrollo *in vivo* [Jin, 2008, 653].

Además de las E2, la actividad de APC/C en las células depende estrictamente de uno de sus activadores, que se le unen durante periodos específicos del ciclo celular. Los más conocidos son **Cdc20** (del inglés *cell division cycle 20*) y **Cdh1**, aunque también se han identificado otros activadores específicos de meiosis. Estas proteínas se caracterizan por presentar tres elementos en su secuencia:

- El **motivo IR** (dipéptido isoleucina-arginina), en el extremo carboxilo terminal, que media la unión con APC/C.

- La **secuencia C-box** (DRF/YIPXR), situada en el extremo amino terminal. En humanos, a diferencia de levaduras, no se necesita la C-box para la asociación de los activadores con APC/C, pero se piensa que interviene en el reconocimiento de sustratos. [Schwab, 2001, 5165][Zhang, 2001, 5190].

- El **dominio WD40**, en el extremo carboxilo terminal. Compuesto por repeticiones de 40 aminoácidos que contienen residuos de triptófano y aspártico

en posiciones conservadas. Generalmente, siete repeticiones WD40 se pliegan en una estructura con forma de hélice, en la que cada repetición constituye un aspa. Se piensa que, este dominio, reconoce a los sustratos de APC/C al interactuar con unas secuencias consenso presentes en ellos, denominadas D-box y KEN-box. [Peters, 2006, 644].

Además de Cdc20 y Cdh1, dos factores de transcripción: CBP y p300, también son reguladores de APC/C en mitosis. CBP/p300 se asocia tanto a APC/C-Cdc20 como a APC/C-Cdh1, favoreciendo la actividad de ambos complejos. El silenciamiento de CBP mediante siRNA reduce la actividad E3 ligasa de APC/C y conlleva la acumulación de las proteínas ciclina B y Plk1, así como la parada de las células en mitosis. [Turnell, 2005, 690].

3.2. Composición y estructura.

APC/C es un complejo multiproteico formado por, al menos, 12 subunidades en humanos. La más grande es **APC1**, cuya expresión permanece constante a lo largo del ciclo celular y es fosforilada en mitosis. Se ha sugerido que funciona como una proteína de andamiaje o para la interacción con otras proteínas de la vía de la ubiquitina-proteosoma [Jorgensen, 2001, 51].

APC11 contiene un dominio RING-H2 finger, que se asocia al dominio culina de **APC2** [Ohta, 1999, 535] y, además, media la interacción con las E2. Se ha descrito que APC11 y UbcH5, por sí mismos, son capaces de poliubiquitinar *in vitro*, aunque con menor especificidad de sustrato, lo que indica que las demás subunidades de APC/C no son absolutamente necesarias para la actividad E3. [Tang, 2001, 3839].

APC3/Cdc27, **APC6/Cdc16**, **APC7** y **APC8/Cdc23** contienen un motivo TPR (del inglés *tetratricopeptide repeat domain*), que consiste en la repetición de una secuencia de 34 aminoácidos, que se pliega en una estructura en hélice y media interacciones entre proteínas. Se requiere la fosforilación de estas cuatro subunidades (**APC3/Cdc27**, **APC6/Cdc16**, **APC7** y **APC8/Cdc23**), para la

activación de APC/C y la progresión de la mitosis. APC3/Cdc27 y APC7 se unen al motivo IR de Cdc20 y Cdh1 y, en estado fosforilado, incrementan su afinidad por Cdc20. Revisado en [Baker, 2007, 589].

APC10/Doc1 contiene un dominio Doc, también presente en otras proteínas de la vía de la ubiquitina-proteosoma. APC10 no es imprescindible para la interacción estable con otras subunidades de APC/C, a pesar de que se une directamente a APC3/Cdc27, APC7 y APC11. Se ha observado que las mutaciones en APC10 previenen el reconocimiento de sustratos por parte de APC/C-Cdh1 [Carroll, 2005, 11]. Tanto APC10 como Cdh1 están implicadas en el reconocimiento de sustratos y la procesividad de APC/C, y su proximidad a APC2, APC11 y la E2 es importante para catalizar la reacción de ubiquitinación [Thornton, 2006, 449].

APC4 y **APC5** se unen a APC2 y APC11, y se piensa que median la interacción de estas proteínas con las subunidades que contienen el motivo TPR. [Vodermaier, 2003, 1459].

Cdc26 juega un importante papel en el mantenimiento de la estructura de APC/C. [Zachariae, 1998, 1216]. Por último, **APC13** se une a APC5 y APC8/Cdc23, y aunque no se conoce su función exacta, se piensa que es más importante en la meiosis que en la mitosis. [Yoon, 2002, 2048].

[Gieffers, 2001, 907] describieron que el complejo APC/C puede presentar dos o tres copias de cada subunidad, excepto de APC1, quien actuaría como un gran soporte de todas las demás. También encontraron dos especies con distinto coeficiente de sedimentación (25S y 36S), que representan formas de APC/C monoméricas y diméricas, respectivamente. [Passmore, 2005, 855] encontraron que la dimerización incrementa la procesividad de APC/C, ya que permite la formación de cadenas de poliubiquitina con una eficiencia 7 veces mayor. Según este modelo, en caso de dimerizar dos complejos APC/C que contengan dos subunidades catalíticas cada uno, se podría formar una cadena de tetraubiquitina sobre un sustrato en un único encuentro, lo que supone la longitud mínima para ser reconocida por el proteosoma. Sin embargo, según el modelo de [Rodrigo-

Brenni, 2007, 127], se necesita la cooperación sinérgica de dos E2 unidas a APC/C para coordinar la poliubiquitinación.

[Dube, 2005, 867] propusieron un modelo de la estructura tridimensional de APC/C, según el cual se distinguen dos grandes dominios en vertebrados, conocidos como plataforma (*platform*) y arco de lámpara (*arc lamp*), que presentan un alto grado de flexibilidad uno respecto al otro. Se ha observado que, la asociación de Cdh1, provoca un cambio en las posiciones relativas de los dominios, lo que sugiere que la unión de los activadores induce cambios conformacionales en APC/C.

Estos dos dominios constituyen una pared externa de forma triangular, la cual encierra una cavidad central con una abertura ancha hacia el exterior y algunos canales más pequeños a través de las paredes. Dube et al. sugirieron que la ubiquitinación de los sustratos tendría lugar en la superficie de la estructura, puesto que la cavidad era muy pequeña como para albergar a la E2, la ubiquitina y el sustrato. Sin embargo, existe controversia al respecto, pues un modelo más reciente muestra que la cavidad podría ser suficientemente grande como para contener a la E2 y la ubiquitina [Ohi, 2007, 871].

3.3. Reconocimiento de sustratos.

La destrucción de los sustratos de APC/C requiere el reconocimiento de determinados motivos en su secuencia. El primero que se describió fue la **D-box** (*destruction box*, caja de destrucción), compuesta por la secuencia consenso RxxL, aunque puede incluir algunos aminoácidos adicionales rodeándola (RxxLxxxN). Suele encontrarse en regiones no plegadas de la proteína [Glotzer, 1991, 132] y es reconocida tanto por APC/C-Cdc20 como por APC/C-Cdh1. Además existe otra secuencia, la **KEN-box** (KENxxxE/D/N), reconocida preferentemente por APC/C-Cdh1, aunque no exclusivamente [Pfleger, 2000, 655].

A medida que se caracterizan más sustratos de APC/C, se encuentran nuevos motivos de destrucción, normalmente localizados en los extremos amino

o carboxilo de las proteínas. Por ejemplo, la destrucción de ciclina A, un sustrato de APC/C-Cdc20, requiere un dominio situado junto al extremo carboxilo de la D-box [Geley, 2001, 137]. La destrucción de Cdc20 por parte de Cdh1, además de la KEN-box, depende de la **CRY-box** (CRYxPS) [Reis, 2006, 1040]. Aurora A posee D-box y KEN-box, y un nuevo motivo al que da nombre, la **A-box** (RxLxPSN) [Littlepage, 2002, 2274]. La degradación de XKid, proteína implicada en la segregación cromosómica en anafase, en parte depende de APC/C-Cdc20, pero necesita un motivo parecido a la KEN-box, la **GxEN-box** [Castro, 2003, 4126]. La securina posee KEN-box, D-box y, a continuación de esta última, dos **TEK-boxes**, que contribuyen a su unión con APC/C-Cdh1, así como a la nucleación de la cadena de poliubiquitina [Jin, 2008, 653].

La multi-ubiquitinación de residuos de lisina en los sustratos de APC/C sucede al azar, lo que concuerda con la idea de que la D-box actúa, fundamentalmente, como una secuencia de reconocimiento, pudiendo resultar ubiquitinado cualquier residuo de lisina que quede expuesto al sitio activo del complejo APC/C [Yamano, 1998, 5670]. Por otra parte, la flexibilidad en la región que rodea la D-box facilita la adición de largas cadenas de poliubiquitina, si bien, la poliubiquitinación, en sí misma, no es suficiente para inactivar la función de una proteína, para ello ha de ser degradada por el proteosoma.

3.4. Funciones de APC/C en el ciclo celular.

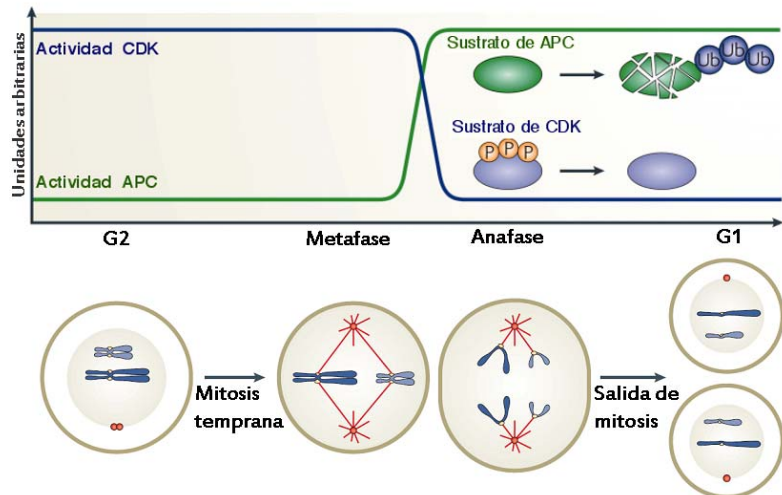
La actividad de APC/C oscila a lo largo del ciclo celular, siendo baja en las fases S y G2, y elevada durante mitosis y G1. Estas oscilaciones son responsables, en gran medida, de la progresión del ciclo celular, desempeñando un papel crucial en la transición metafase-anafase y en la subsecuente fase G1 (o G0). A continuación, se detallan los principales eventos del ciclo celular mitótico en los que interviene APC/C.

3.4.1. Progresión de la mitosis.

La actividad Cdk conduce el ciclo celular hasta metafase, pero a partir de ese punto el control lo ejerce APC/C, quien promueve la transición a anafase y la salida de mitosis.

Las principales dianas de APC/C en mitosis son las ciclinas mitóticas y la securina. La securina es un inhibidor de la proteasa separasa, de modo que la degradación de la primera por el proteosoma conlleva la activación de la última. Así, una vez activa, la **separasa** rompe la subunidad Scc1 de la cohesina (complejo que mantiene unidas a las cromátidas hermanas), permitiendo el inicio de la segregación cromosómica en anafase. Por otra parte, la degradación de las ciclinas mitóticas provoca la inactivación de las Cdks, situación que permite que las fosfatasa desfosforilen a los sustratos de Cdks, un requisito esencial para el correcto movimiento del huso mitótico y los cromosomas en anafase, así como para los eventos de la telofase posterior: desensamblaje del huso mitótico, ensamblaje de la envuelta nuclear y descondensación de la cromatina.

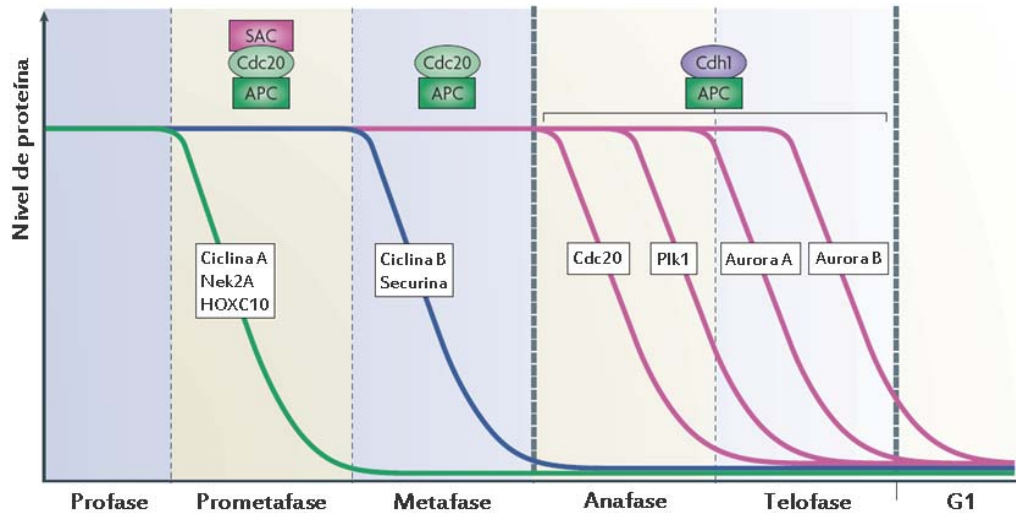
Así pues, se considera que hay dos mecanismos principales que gobiernan la progresión a través de las últimas etapas de la mitosis: la ubiquitinación de proteínas por el complejo APC/C y la desfosforilación ordenada de sustratos, fosforilados principalmente por Cdk1 (aunque también por otras quinasas mitóticas). Este último proceso también depende, aunque indirectamente, de la actividad de APC/C, ya que el orden de desfosforilación está marcado por el de la degradación de las ciclinas [Sullivan, 2007, 894]. (Esquema 4).



ESQUEMA 4. **Regulación de la salida de mitosis por APC/C.** Durante la transición metafase/anafase se produce un aumento de la actividad de APC/C (color verde), que marca para su degradación a las ciclinas mitóticas, originándose un descenso de la actividad Cdk (color azul) que permite la defosforilación de sus sustratos. De este modo, la actividad de APC/C desencadena la progresión de la mitosis a partir de metafase (representado esquemáticamente en la parte inferior). Adaptado de [Sullivan, 2007, 894].

Durante la mitosis se distinguen tres isoformas de APC/C, cada una de las cuales promueve la degradación de un grupo de sustratos determinados y, además, en un punto concreto del ciclo celular (Esquema 5). Durante prometafase, APC/C está unido al coactivador Cdc20, pero bajo la inhibición de proteínas del *checkpoint* de huso mitótico, las cuales bloquean su capacidad de reclutamiento de sustratos. Sin embargo, esta forma de APC/C-Cdc20 mantiene la capacidad de ubiquitinar algunas de sus dianas tales como ciclina A, la kinasa Nek2A o el factor de transcripción HOXC10 [Geley, 2001, 137][Hames, 2001, 7117] [Hayes, 2006, 607][Gabellini, 2003, 3715]. Cuando la última pareja de cromátidas hermanas se ancla al huso mitótico y se inactiva el *checkpoint* de huso mitótico, APC/C-Cdc20 se activa por completo, siendo capaz de ubiquitinar un nuevo grupo de proteínas en metafase, incluyendo ciclina B y securina [Hagting, 2002, 1125][Musacchio, 2007, 379]. Esta destrucción de ciclina B conlleva la inactivación progresiva de la actividad Cdk, lo que permite la defosforilación del otro coactivador de APC/C: Cdh1, el cual permanecía inactivo en su forma fosforilada. Una vez defosforilado, Cdh1 activa a APC/C, otorgándole una especificidad de sustrato más amplia que promueve la destrucción de un nuevo grupo de proteínas diana. En este nuevo grupo de sustratos se incluyen Cdc20, Plk1 y las kinasas Aurora (A y B), que se destruyen en este orden en anafase y telofase [Lindon, 2004, 233]. Posibles explicaciones para este orden concreto son diferencias en la eficiencia de poliubiquitinación de los distintos sustratos (ya sea por la afinidad relativa entre sus secuencias de destrucción y los sitios de unión de APC/C-Cdh1, o por la disponibilidad de residuos de lisina) [Rape, 2006, 89], o determinados cambios tanto en el estado

de fosforilación como en la localización subcelular de los distintos sustratos, que afectan a su reconocimiento por APC/C-Cdh1 [Huang, 1999, 2184][Mailand y Diffley, 2005, 915).



ESQUEMA 5. Ventanas de destrucción mediada por APC/C en mitosis. En los distintos estadios de la mitosis predominan tres isoformas distintas de APC/C que promueven la destrucción ordenada de tres grupos de proteínas. En prometáfase, Cdc20 activa a APC/C, permaneciendo parcialmente inhibido por componentes del checkpoint de huso mitótico (SAC). En metafase, cuando todas las parejas de cromátidas hermanas se anclan al huso mitótico, SAC deja de inhibir a APC/C-Cdc20, que marcará para su destrucción a un nuevo grupo de proteínas. Finalmente, en anafase Cdh1 sustituye a Cdc20 en la activación de APC/C y se encarga de la degradación de dianas adicionales en un orden estricto.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Cultivos celulares.

1.1. Cultivos primarios.

1.1.1 Especie ensayada y condiciones del animalario.

Para realizar los cultivos primarios de neuronas se emplearon ratas albinas de la raza Wistar, criadas y suministradas por el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca. Los animales se sometieron a ciclos de luz-oscuridad de 12 horas de duración. Las condiciones ambientales del animalario se mantuvieron con una humedad relativa entre el 45 y el 65% y una temperatura entre 20°C y 25°C. Los animales se alimentaron con una dieta sólida estándar (17% proteínas, 3% lípidos, 58,7% glúcidos, 4,3% celulosa, 5% minerales y 12% de humedad) y agua de bebida *ad libitum*.

El periodo gestacional de la rata se controló limitando la cohabitación de hembras vírgenes y machos a una noche. A la mañana siguiente, se separaron aquellas hembras que presentaban espermatozoides acompañados de células epiteliales de la vagina características del día fértil del estro en un frotis vaginal. En estas condiciones, se asume que el periodo de gestación de la rata es de 21,7 días.

1.1.2. Cultivo de neuronas.

Para la realización del cultivo primario de neuronas se utilizaron fetos de rata de 16 días de gestación (Almeida and Medina 1998). Las ratas gestantes se anestesiaron con éter etílico, se sacrificaron mediante dislocación cervical y se extrajeron los fetos rápidamente mediante histerectomía.

Los fetos se trasladaron a una cabina de flujo laminar (TC48, Gelaire Flow Laboratories, McLean, Virginia, EEUU) para garantizar las condiciones de esterilidad en el cultivo. Tras la extracción de los dos hemisferios cerebrales, se depositaron en una placa Petri de poliestireno (Nunc, Roskilde, Dinamarca) con

la solución de disgregación (NaCl 116 mM, KCl 5,40 mM, NaH₂PO₄ 1,01 mM, MgSO₄ 1,50 mM, NaHCO₃ 26 mM, glucosa 4 mM, rojo fenol 10 mg/l, albúmina 0,3% p/v y DNAsa tipo I 20 µg/ml, pH 7,2) y se disgregaron parcialmente con un bisturí. Tras 4 minutos de sedimentación en un tubo de 50 ml (BD Falcon, Bedford, MA, EEUU), se retiró el sobrenadante y el tejido se resuspendió suavemente en la solución de tripsinización (solución de disgregación suplementada con tripsina 0,025% p/v). La tripsinización del tejido se realizó a 37°C durante 15 minutos, agitando suavemente cada 3 ó 4 minutos. Transcurrido ese tiempo, la digestión se detuvo mediante la adición de suero fetal de ternera (FCS; Roche Diagnostics, Heidelberg, Alemania) a una concentración final del 10% (v/v).

Tras centrifugar a 500 x g durante 5 minutos, el sedimento se resuspendió en la solución de disgregación y se hizo pasar varias veces a través de una pipeta Pasteur siliconada. La suspensión celular se dejó reposar durante 4 minutos y el sobrenadante, que contenía las células disociadas, se recogió cuidadosamente en un tubo de 50 ml. Este proceso se repitió dos veces más para incrementar su eficiencia, combinándose los sobrenadantes obtenidos. Finalmente, la suspensión celular se centrifugó a 500 x g durante 5 minutos.

El sedimento se resuspendió en 20 ml del medio de cultivo, compuesto por DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma, Barcelona, España) suplementado con FCS a una concentración final del 10% (v/v). El número total de células vivas se determinó mediante el recuento celular en una alícuota de 10 µl de la suspensión celular, que se mezcló con 80 µl de azul de tripano (Sigma) al 0,2% (v/v), utilizándose una cámara cuenta glóbulos de Neubauer (Zeiss, Oberkochen, Alemania) y un microscopio de contraste de fases (Wilovert II pH, Helmut Hund GMBH, Wetzlar, Alemania).

Las células se sembraron a una densidad de $2,5 \cdot 10^5$ células/cm² en medio de cultivo en placas de poliestireno (Nunc, Roskilde, Dinamarca), previamente recubiertas con poli-D-Lisina 10 µg/ml (Sigma). Las placas se mantuvieron en un incubador (Thermo Forma 310, Thermo Forma, Ohio, EEUU) termostatzado a

37°C, con una atmósfera saturada de vapor de agua, compuesta por un 95% de aire y un 5% de CO₂.

A los 2 días de cultivo, el medio se cambió por DMEM suplementado con suero de caballo (HS; Sigma) al 5% (v/v), glucosa (Sigma) 20 mM y arabinósido de citosina (Sigma) 10 µM, para impedir la proliferación de células no neuronales. Las células se utilizaron a los 5-6 días de cultivo. Bajo estas condiciones, los cultivos neuronales mostraron una pureza aproximada del 95% (Fig. I), determinada mediante inmunorreacción con el marcador neuronal Map-2 (Almeida et al. 2005).

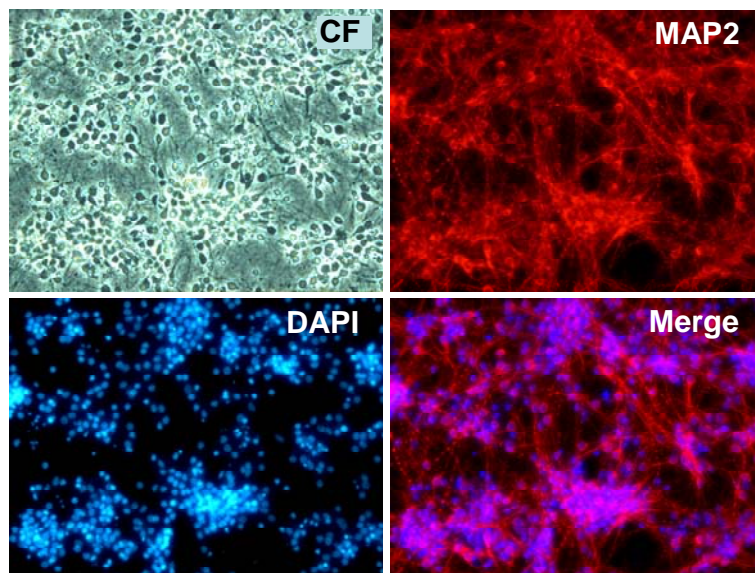


Figura I. Neuronas corticales en cultivo primario. Microfotografías de neuronas corticales de 6 días *in vitro*, donde se muestra la pureza del cultivo (95%), determinada mediante inmunorreacción con el marcador neuronal Map-2.

1.2. Línea celular HEK293T.

La línea celular procedente de riñón de embrión humano 293T (HEK293T) se mantuvo en crecimiento en DMEM suplementado con FCS al 10% (v/v). 24 horas antes de su utilización, las células se sembraron a una densidad de 10⁵ células/cm² en placas de poliestireno recubiertas con poli-D-Lisina (10 µg/ml).

2. Construcción de los plásmidos.

2.1. Silenciamiento de proteínas.

El silenciamiento de las proteínas Cdh1 y ciclina B1 se realizó mediante la expresión de los correspondientes shRNA (“small hairpin RNA”). Para ello, se utilizó el vector de expresión pSuper-neo/gfp (Oligoengine, Seattle, WA, EEUU) que, al expresar en paralelo el shRNA y la proteína verde fluorescente (GFP), permitió la identificación y el seguimiento de las neuronas transfectadas.

Para el diseño de los shRNA se seleccionaron unas secuencias específicas de los genes que codifican estas proteínas (Tabla 1), a partir de las cuales se diseñaron unos oligonucleótidos de 64 bp (Isogen Life Technologies, Maarsen, Holanda) que contienen las secuencias sentido y antisentido correspondientes separadas por 19 bp (Almeida et al. 2005) . Estos oligonucleótidos se insertaron en los sitios BglIII/HindIII del vector.

Como control de las células transfectadas, se empleó una secuencia contra el cDNA de la luciferasa de luciérnaga (5'-ctgacgcggaataacttcca-3'), no presente en el genoma de células de mamífero (Almeida et al. 2005; Diaz-Hernandez et al. 2005).

Tabla 1: Secuencias seleccionadas como siRNA				
Nombre	Número de acceso	Secuencia	Nucleótidos	Procedencia
Cdh1	NM_016263	5'-tgagaagtctcccagtcag-3'	235-253	Dra. A. Almeida
Ciclina B1	AY_338491	5'-gatggagctgatccaaacc-3'	478-496	Dra. A. Almeida

2.2. Sobreexpresión de proteínas.

Los plásmidos y construcciones empleados en este trabajo para la sobreexpresión de proteínas se detallan en las tablas 2 y 3. Para las construcciones pIRES-Cdh1 y pGEX2T-Cdh1 se utilizó el cDNA de Cdh1 (generosamente cedido por el Prof. J. Pines), que se clonó en los sitios únicos de restricción para EcoRI de los plásmidos pIRES.eGFP y pGEX.2T.

Tabla 2: Construcciones y plásmidos utilizados para la sobreexpresión de proteínas.			
Plásmido	Vector (características)	Inserto	Procedencia
pIRES2.eGFP	Expresión en mamíferos		BD Bioscience
pIRES-Ciclina B1		mCiclinaB1(wt)	(Almeida et al. 2005)
pIRES-Cdh1(wt)		hCdh1 (wt) (EcoRI)	Este trabajo
pEGFP-C2	Expresión en mamíferos		Clontech Laboratories Inc.
pCS2-hEmi1		hEmi1(wt)	Dr. Peter Jackson
pCS2-Myc5-hEmi1ΔZBR		hEmi1ΔZBR	Dr. Peter Jackson
pGEX-2T(GST)	Expresión en <i>E. coli</i>		Dra. María Sacristán
pGEX2T-Cdh1(wt)		hCdh1 (wt) (EcoR1)	Este trabajo

Tabla 3: Construcciones empleadas para sobreexpresar las formas mutadas de Cdh1.		
En células eucariotas		En <i>E. coli</i>
Mutaciones a Ala (Cdh1-A)	Fosfomiméticos (Cdh1-D)	Mutaciones a Ala (Cdh1-A)
pIRES-Cdh1(S40A)	pIRES-Cdh1(S40D)	pGEX2T-Cdh1(S40A)
pIRES-Cdh1(T121A)	pIRES-Cdh1(T121D)	pGEX2T-Cdh1(T121A)
pIRES-Cdh1(S163A)	pIRES-Cdh1(S163D)	pGEX2T-Cdh1(S163A)
pIRES-Cdh1(S40A T121A)	pIRES-Cdh1(S40D T121D)	pGEX2T-Cdh1(S40A T121A)
pIRES-Cdh1(S40A S163A)	pIRES-Cdh1(S40D S163D)	pGEX2T-Cdh1(S40A S163A)
pIRES-Cdh1(T121A S163A)	pIRES-Cdh1(T121D S163D)	pGEX2T-Cdh1(T121A S163A)
pIRES-Cdh1(S40A T121A S163A)	pIRES-Cdh1(S40D T121D S163D)	pGEX2T -Cdh1(S40A T121A S163A)

2.3. Mutagénesis dirigida.

Con objeto de identificar los residuos de Cdh1 fosforilados por Cdk5, se procedió a mutar los residuos Ser-40, Thr-121 y Ser-163 de Cdh1, para los que se encontró alta probabilidad de ser fosforilados por Cdks en <http://scansite.mit.edu> (Fig II). Estos residuos se mutaron a alanina (Cdh1-A), para bloquear su fosforilación, o a aspártico (Cdh1-D), para simular su estado fosforilado (fosfomiméticos), como mutaciones simples, dobles o triples. Para ello, se utilizó el sistema *QuickChange R XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, CA, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizaron distintas PCRs utilizando como DNA molde la construcción pIRES-Cdh1(wt) y los oligonucleótidos que contenían los codones modificados (resaltados en la Tabla 4), diseñados de acuerdo al código genético, para conseguir los cambios deseados. A continuación, el producto de la PCR se digirió con la enzima de restricción DpnI, que reconoce exclusivamente el DNA metilado, esto es, el producido *in vivo*, pero no el producto de la PCR (sin metilaciones).

Posteriormente, y con el mismo método, las construcciones con las mutaciones simples se emplearon como DNA molde en las PCRs para obtener las mutaciones dobles y, del mismo modo, se utilizó una de éstas últimas como molde para conseguir la triple mutación.

Para conseguir las mutaciones Cdh1-A en el plásmido de expresión en *E. coli*, el conjunto de cDNA mutantes obtenidos se clonaron en el sitio único de restricción para EcoRI del plásmido pGEX.2T.

Cdh1

1 MDQDYERRLL RQIVIQNENT MPRVTEMRRT LTPASSPVSS PSKHGDRFIP
 51 SRAGANWSVN FHRINENEKS PSQNRKAKDA TSDNGKDGLA YSALLKNELL
 101 GAGIEKVQDP QTEDRRLOPS TPEKKGLFTY SLSTKRSSPD DGNDVSPYSL
 151 SPVSNKSQKL LRSPRKPTRK ISKIPFKVLD APELQDDFYL NLVDWSSLNV
 201 LSVGLGTCVY LWSACTSQVT RLCDSLVEGD SVTSVGWSER GNLVAVGTHK
 251 GFVQIWDAAG GKKLSMLEGH TARVGALAWN AEQLSSGSRD RMILQRDIRT
 301 PPLQSERRLQ GHRQEVCGLK WSTDHQLLAS GGNDNKLLVW NHSSLSPVQQ
 351 YTEHLAAVKA IAWSPHQHGL LASGGGTADR CIRFWNTLTG QPLQCIDTGS
 401 QVCNLAWSKH ANELVSTHGY SQNQILVWKY PSLTQVAKLT GHSYRVLYLA
 451 MSPDGEAIVT GAGDETLRFW NVFSKTRSTK VKWESVSVLN LFTRIR

Figura II. Secuencia de aminoácidos de Cdh1. Se muestran subrayadas las secuencias consenso de Cdk5, y marcados en rojo o en azul los posibles residuos fosforilables, con mayor o menor probabilidad, respectivamente, según <http://scansite.mit.edu>.

Tabla 4: Oligonucleótidos empleados para producir las mutaciones de Cdh1.	
Mutación	Oligonucleótidos
Cdh1 S40A	Oligo Fwd 5'-ccagctcccagtgctcc <u>gcg</u> cccagcaagcacggagaccgttca-3' Oligo Rev 5'-tgaagcggctcctgctgtgctggg <u>cgcg</u> ggacactggggagctgg-3'
Cdh1 T121A	Oligo Fwd 5'-ccgcaggctgcagccctcc <u>gcg</u> cctgagaagaaggctgttcacg-3' Oligo Rev 5'-cgtgaacagacccttctctcagg <u>cgcg</u> ggaggctgcagcctgcgg-3'
Cdh1 S163A	Oligo Fwd 5'-ccagaagctgctccggg <u>gccc</u> ccccgaaaccaccgcaagatctc-3' Oligo Rev 5'-gagatcttgcgggtgggttccgggg <u>gccc</u> ccggagcagcttctgg -3'
Cdh1 S40D	Oligo Fwd 5'-tgccagctcccagtgctcc <u>gac</u> cccagcaagcacggagaccgtt-3' Oligo Rev 5'-aagcggctcctgcttctgctggg <u>gtc</u> ggacactggggagctggca-3'
Cdh1 T121D	Oligo Fwd 5'-cgcagactgaggaccgagctgcagccctcc <u>gac</u> cctgagaagaagg-3' Oligo Rev 5'-cccttctctcagg <u>gtc</u> ggaggctgcagcctgcggtctcagctgcg-3'
Cdh1 S163D	Oligo Fwd 5'-gccagaagctgctccggg <u>gac</u> ccccgaaaccaccgcaagatctc-3' Oligo Rev 5'-ggagatcttgcgggtgggttccgggg <u>gtc</u> ccggagcagcttctggc-3'

3. Transfección transitoria de células de mamífero.

En este trabajo realizamos las transfecciones por medio de lipofección, que consiste en la formación de pequeños liposomas que contienen el DNA o RNA que queremos introducir en la célula. Para ello, utilizamos el reactivo catiónico *Lipofectamine 2000* (Invitrogen, Madrid), siguiendo las instrucciones del fabricante.

En el momento de realizar las transfecciones, las células estaban en un medio carente de antibióticos.

3.1. Transfección con DNA.

Las construcciones empleadas en este trabajo expresaban la GFP, a excepción de pCS2-hEmi1 y pCS2-Myc5-hEmi1 Δ ZBR, por lo que, en estos casos, se cotransfectó con pEGFP-C2 (en proporción $\frac{1}{4}$ respecto al total de DNA transfectado).

La eficiencia de transfección se calculó mediante la cuantificación de las células fluorescentes (GFP⁺) por microscopía de fluorescencia (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Alemania), que resultó ser de aproximadamente un 9-12% en las neuronas y un 80-90% en las HEK293T. Debido a esta diferencia en la eficiencia de transfección entre ambos tipos celulares, la comprobación del correcto funcionamiento de los plásmidos utilizados posteriormente en las neuronas se realizó en HEK293T, mediante transferencia tipo Western.

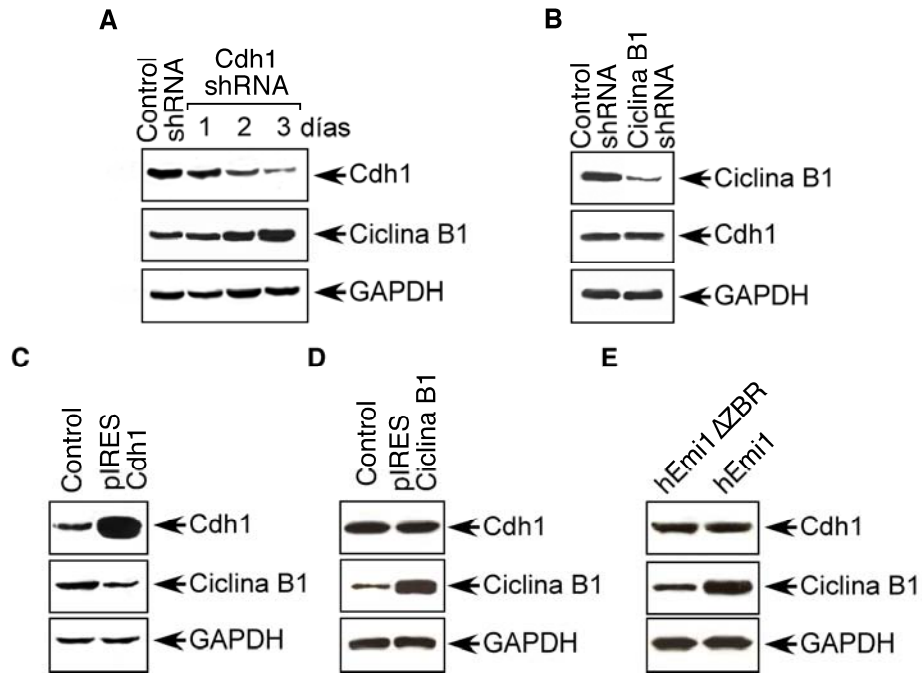


Figura III. Comprobación de la funcionalidad de las construcciones plasmídicas en células HEK293T. (A) La expresión de pSuper.neo.gfp.Cdh1 en HEK293T (Cdh1 shRNA) provocó el descenso en la expresión de Cdh1, de manera tiempo-dependiente, que se acompañó por la acumulación de la ciclina B1. (B) La expresión de pSuper.neo.gfp.Ciclina B1 (Ciclina B1 shRNA) indujo el silenciamiento de ciclina B1, sin alterar los niveles de Cdh1. (C) La sobreexpresión de Cdh1 (pIRES.Cdh1) originó la desestabilización de la proteína ciclina B1. (D) La expresión de pIRES.Ciclina B1 permitió la acumulación de la ciclina B1. (E) La sobreexpresión de hEmi1 causó la estabilización de los niveles de ciclina B1, a diferencia de hEmi1 Δ ZBR, que es inactivo al tener delecionado el dominio de unión a zinc (“Zinc-binding region”).

3.2. Transfección con los siRNAs.

Con el fin de reducir los niveles de expresión de la proteína Cdk5, las neuronas se transfectaron con los siRNAs (“short interfering RNA”) (Dharmacon Research Inc., Lafayette, CO), frente a la quinasa. Se utilizó la secuencia 5'-AAGCCGUACCCGAUGUAUC-3' (Zheng et al. 2007). Como control de transfección se utilizó un siRNA frente a Luciferasa, cuya secuencia fue 5'-CUGACGCGGAAUACUUCGAUU-3' (Cuende et al. 2008).

La eficacia del silenciamiento se comprobó mediante transferencia tipo Western. En todos los experimentos se transfectó con la misma concentración de siRNAs (100 pmol/ml), por lo que cuando fue necesario utilizar concentraciones crecientes del siRNA contra Cdk5, éstas se igualaron hasta 100 pmol/ml con siRNA control.

4. Tratamiento de las células.

4.1. Estimulación de las neuronas con glutamato o N-metil-D-aspartato.

Las neuronas se lavaron con tampón Hank's (NaCl 134,2 mM, KCl 5,26 mM, KH₂PO₄ 0,43 mM, NaHCO₃ 4,09 mM, Na₂HPO₄ 0,33 mM, D-glucosa 5,44 mM, HEPES 20 mM, CaCl₂ 4 mM; pH 7,4 esterilizado por filtración) a 37°C. A continuación, se incubaron en tampón Hank's con glicina (10 µM; Sigma) en ausencia (control) o en presencia de glutamato (100 µM; Sigma) o de N-metil-D-aspartato (NMDA, 100 µM; Sigma) en el incubador a 37°C. Tras 5 minutos de incubación, se retiró el tampón Hank's y se sustituyó por DMEM. Las neuronas se mantuvieron en el incubador a 37° hasta su recolección, según los experimentos (Delgado-Esteban et al. 2000; Almeida and Bolanos 2001).

4.1.1. Estimulación en presencia de quelantes de calcio.

Las estimulaciones con glutamato o NMDA en ausencia de calcio se realizaron en tampón Hank's sin CaCl₂ y en presencia de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, 100 µM; Sigma) o de ácido 1,2-bis(o-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético (BAPTA, 10 µM; Calbiochem) (Diaz-Hernandez et al. 2007). El EDTA es un quelante del calcio extracelular, mientras que el BAPTA, además, es un quelante del calcio intracelular, puesto que es capaz de atravesar las membranas biológicas. En ambos casos, las neuronas se

preincubaron a 37°C con Hank's (sin CaCl₂; más EDTA o BAPTA) durante 30 minutos antes de realizar la estimulación con glutamato o NMDA. Así mismo, la posterior incubación en DMEM se realizó en ausencia de calcio y en presencia de los quelantes del catión.

4.1.2. Estimulación en presencia de inhibidores farmacológicos.

En la tabla 5 se resumen los inhibidores farmacológicos y las condiciones experimentales utilizados en el presente trabajo.

Tabla 5: Inhibidores empleados en las estimulaciones neuronales.				
Inhibidor	Diana	Procedencia	Concentración final	Periodo de incubación
MK-801	NMDAR	Sigma	10 µM	5 min pre-estimulación
KN-62	CaMKII	Calbiochem	5 µM, 20 µM	Desde 30 min pre-estimulación hasta la recogida de muestras
AR-A014418	GSK-3β	Calbiochem	5 µM, 20 µM, 100 µM	
Roscovitina	Cdks	Sigma	5 µM, 20 µM, 40 µM	
MDL-28170	Calpaína	Calbiochem	10 µM, 50 µM, 100 µM	
MG-132	Proteosoma	Calbiochem	5 µM	
Lactacistina	Proteosoma	Calbiochem	4 µM	

Las neuronas se incubaron en medio Hank's que contenía los inhibidores y, transcurrido el tiempo indicado en la tabla 5, se estimularon con glutamato o con NMDA, como hemos indicado anteriormente. Tras la estimulación, se sustituyó por DMEM (en el caso del MK-801) o DMEM suplementado con el inhibidor correspondiente.

5. Determinación de la apoptosis neuronal.

5.1. Tinción con Anexina V y 7-amino-actinomicina D.

La muerte celular por apoptosis se determinó, mediante citometría de flujo, tras teñir las células con anexina V, conjugada con APC, y 7-amino-actinomicina D (7-AAD) (Becton Dickinson Biosciences). El método se basa en la detección de la fosfatidilserina, que en las células apoptóticas se transloca del interior al exterior de la membrana plasmática. La anexina V es una proteína anticoagulante vascular que posee una gran afinidad por la fosfatidilserina. Por ello, unida a un fluorocromo adecuado, permite la identificación de las células apoptóticas tras su unión a la fosfatidilserina localizada en su superficie celular. Sin embargo, la anexina V también es capaz de unirse a la fosfatidilserina en el interior de aquellas células que no tienen intacta su membrana plasmática (consideradas como necróticas). Por ello, junto con la anexina V se utilizó un colorante que se une específicamente al DNA de las células necróticas, el 7-AAD, para así poder identificar exclusivamente las células apoptóticas. Así, sólo aquellas células inmunorreactivas para la anexina V, que mostraron ser negativas para el 7-AAD, se consideraron apoptóticas.

Las neuronas se recolectaron suavemente, mediante incubación con EDTA tetrasódico 1mM en PBS, y se tiñeron con anexina V-APC y 7-AAD, siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras 15 minutos de incubación, las señales de la GFP (en el caso de células transfectadas), de la anexina V-APC y del 7-AAD se analizaron en los canales FL1, FL4 Y FL3, respectivamente, de un citómetro de flujo *FACScalibur* (BD Biosciences), equipado con un haz láser de argón de 15 mW sintonizado a 488 nm, utilizando los programas *CellQuestTM* y *Paint-A-GateTM PRO* (BD Biosciences). Se consideraron células apoptóticas aquellas anexina V-APC⁺ y 7-AAD⁻ (Fig.IV). Los resultados se expresaron como porcentaje de neuronas apoptóticas.

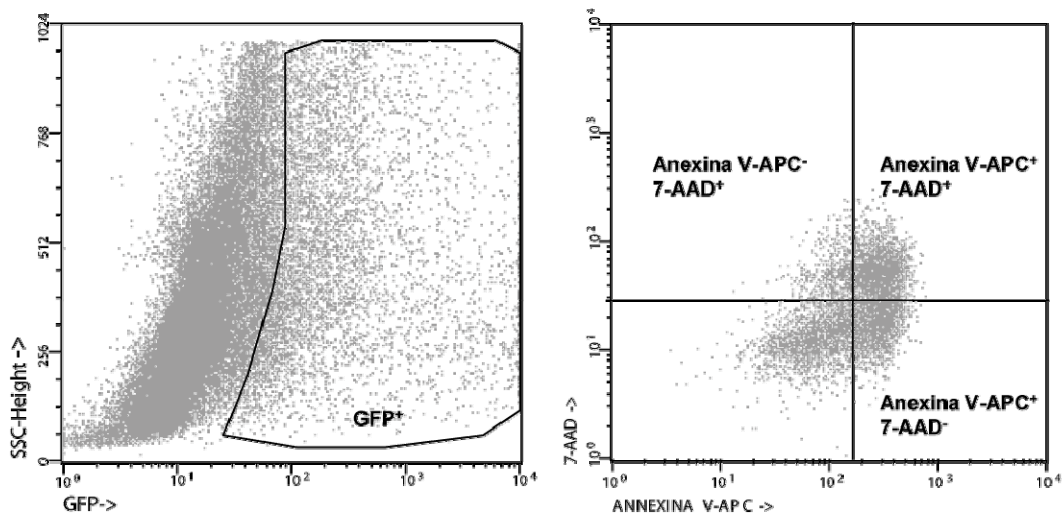


Figura IV. Determinación de la apoptosis neuronal mediante citometría de flujo. Se analizó la tinción con Anexina V-APC y 7-AAD, considerándose apoptóticas aquellas células anexina V-APC⁺ y 7-AAD⁻, en las neuronas GFP⁺.

5.2. Tinción de núcleos con 4'-6-diamidino-2-fenilindol.

Las neuronas se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% (v/v) en PBS durante 30 minutos. A continuación, se lavaron una vez con PBS y se incubaron en PBS que contenía 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Sigma) 3,5 μ M a temperatura ambiente, durante 10 minutos.

Tras lavar las células dos veces con PBS, se tomaron microfotografías con un microscopio invertido de fluorescencia (Leica IM-50), acoplado a una cámara digital (Leica DC-100), y se procedió al recuento de los núcleos apoptóticos.

6. Determinación de la incorporación de bromo-d-uridina (BrdU).

Para la determinación de la incorporación de BrdU en el DNA neuronal, se utilizó el sistema comercial APC BrdU Flow Kit (BD Bioscience). Tras la estimulación de las neuronas con glutamato o NMDA, se incubaron en DMEM que contenía bromo-d-uridina BrdU (10 μ M; Sigma). Tras 24 horas, se procedió

a la determinación de la BrdU incorporada a las células, tras el marcaje con el anticuerpo monoclonal anti-BrdU unido al fluorocromo APC. Posteriormente, se analizaron las señales de fluorescencia en los canales FL4 y FL1 del citómetro de flujo FACScalibur, con objeto de determinar la incorporación de BrdU (FL4) en la población de células GFP⁺ (FL1).

7. Detección de ciclina B1 mediante citometría de flujo.

Las neuronas se fijaron y permeabilizaron con el kit *Fix&Perm* de Caltag (Invitrogen). Tras la incubación de las células con el reactivo A del kit (reactivo de fijación), se incubaron con el reactivo B (reactivo de permeabilización) que contenía el anticuerpo anti-ciclina B1 conjugado con el fluorocromo ficoeritrina (PE; 1/100; D-11, Santa Cruz Biotechnology) a temperatura ambiente, durante 20 minutos. La fluorescencia se analizó en el canal FL3 del citómetro de flujo. Los resultados se expresaron como % de células inmunorreactivas para la ciclina B1.

8. Electroforesis y detección de mRNA (Northern Blot).

El RNA total se extrajo de las células mediante el kit *GeneluteTM Mammalian Total RNA Kit* (Sigma) y su concentración se cuantificó espectrofotométricamente a 260 nm. La integridad del RNA extraído se comprobó mediante la observación, en un gel de agarosa al 0.8% con bromuro de etidio, de las dos bandas correspondientes a los RNA ribosómicos de 28 S y 18 S. Las muestras (12 µg) de RNA total se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) con formaldehído [Sambrook, Russell, 2001]. Posteriormente, el RNA se transfirió a una membrana de nylon *Gene Screen Plus* (NEN Life Sci., Boston, MA, EEUU) y se fijó a la misma mediante radiación ultravioleta (UVC 500, Hoefer, San Francisco, CA, EEUU). Las membranas se hibridaron a 65°C durante 18 horas, en presencia de la correspondiente sonda de cDNA marcada radiactivamente mediante “random priming” con [α -³²P]-dCTP (20 µCi; Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido) y se

expusieron a una película autorradiográfica (Kodak XAR-5, Sigma). Para la detección del mRNA de Cdh1 se empleó como sonda el cDNA correspondiente a toda la ORF (*full length*) humana. Como marcador de la cantidad de RNA cargado, se utilizó el cDNA de un fragmento de ciclofilina de rata, generosamente cedido por el Dr. Dionisio Martín-Zanca (Universidad de Salamanca).

9. Análisis de los niveles de proteínas.

9.1. Obtención de las muestras.

9.1.1. Extractos proteicos totales.

Para obtener los extractos proteicos totales, las células se lavaron con PBS frío y se lisaron con tampón RIPA frío, compuesto por Na₂HPO₄ 12,5 mM, Triton X-100 al 1% (v/v), dodecil sulfato sódico (SDS) al 1% (v/v), EDTA 2 mM, NaCl 150 mM e inhibidores de proteasas y de fosfatasa: aprotinina 10 µg/ml, leupeptina 10 µg/ml, soybean 10 µg/ml, N-p-tosil-L-fenilamina clorometil cetona (TPCK) 100 µM, TLCK 100 µM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 100 µM, fenantrolina 1 mM, pepstatina A 10 µg/ml, ortovanadato sódico 1 mM y NaF 50 mM. Los extractos se incubaron 5 minutos en hielo, se hirvieron durante 5 minutos y, a continuación, se sonicaron 10 minutos en el sonicador *Cole Parmer 8891*. Seguidamente, se centrifugaron a 13.000 x g durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante.

9.1.2. Fraccionamiento nuclear y citosólico.

Para obtener extractos proteicos del citosol y del núcleo se adaptó el método de (Zancai et al. 2005). Las células se lavaron con PBS frío que contenía MgCl₂ 1 mM, se recogieron con tampón citosólico (HEPES 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 10 mM, EDTA 1 mM, NP-40 al 0,1 % v/v, sacarosa 1,5 M e

inhibidores de proteasas y de fosfatasa, pH 7,9) y se agitaron con una micropipeta para favorecer la lisis celular. A continuación, se incubaron en hielo durante 30 minutos y se agitaron en vortex durante 10 segundos. Tras comprobar al microscopio la lisis de las células, se centrifugó a 500 x g durante 5 minutos, lo que permitió separar el extracto citosólico (sobrenadante), que se hirvió durante 5 minutos. La lisis de los núcleos se realizó mediante suspensión del sedimento en el tampón nuclear (HEPES 50 mM pH 7,9, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 10 mM, NaCl 0,5 mM, EDTA 1 mM, NP-40 al 1% v/v e inhibidores de proteasas y de fosfatasa). El extracto nuclear se agitó con micropipeta, se incubó en hielo (2 horas), se agitó en vortex (10 segundos), se hirvió (5 minutos) y se sonicó (5 minutos).

9.2. Determinación de la concentración de proteínas.

La determinación de la concentración de proteínas en los distintos extractos proteicos se realizó espectrofotométricamente, utilizando el sistema colorimétrico BCA (Pierce) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Como estándar se utilizaron concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA).

9.3. Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE.

Los extractos proteicos (40-200 µg, según la proteína a analizar) se suspendieron en tampón de carga (Tris 62,5 mM, glicerol 10% v/v, SDS 2% p/v, 2-mercaptoetanol 5% v/v y azul de bromofenol 0,005% p/v, pH 6,8), se hirvieron durante 5 minutos, se centrifugaron a 13.000 x g durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante.

Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE, 8-12%), utilizando un sistema de electroforesis vertical (*Mini Protean-3*, Bio-Rad Laboratories, CA, EEUU) y un tampón compuesto por Tris 25 mM, glicina 200 mM y SDS al 0,1% (p/v), pH 8,3. Así

mismo, se utilizó un marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein Standards Dual Color*, Bio-Rad).

Una vez terminada la electroforesis, los geles se fijaron y tiñeron con azul de Coomassie, o bien se sometieron a electrotransferencia e inmunodetección (técnica de Western blot).

9.4. Inmunodetección de proteínas (Western blot).

Las proteínas separadas en geles de SDS-PAGE se transfirieron electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa (*Hybond*, Amersham Biosciences) utilizando el sistema *Mini-Transblot* (Bio-Rad). El tampón de transferencia estaba compuesto por Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20% (v/v), pH 8,3. A continuación, las membranas se bloquearon durante 1 hora con leche (Sveltesse, Nestle) al 5% (p/v) en TTBS (Tris 20 mM, NaCl 500 mM, Tween-20 al 0,1% v/v; pH 7,5).

La incubación de las membranas con el anticuerpo primario (ver tabla 6) se llevó a cabo en solución de anticuerpos (TTBS suplementado con BSA al 2% p/v) a 4°C durante toda la noche, o bien a 37°C durante 3 horas. Tras lavar las membranas 4 veces con TTBS, se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario en TTBS con leche al 2% durante 45 minutos. Tras lavar 3 veces con TTBS y una con TBS (TTBS sin Tween-20), el Western blot se reveló, según la proteína a detectar, con el reactivo de quimioluminiscencia *Super Signal West Dura* (Pierce) o con *Western Blotting Luminol Reagent* (Santa Cruz Biotechnology), siguiendo las instrucciones de los fabricantes, y se expusieron a una película *BioMax XAR film* de (Sigma).

Tabla 6: Anticuerpos utilizados en el Western blot.

Anticuerpo primario	Antígeno	Tipo/Especie	Dilución	Procedencia
Anti-GAPDH (C-6C5)	GA3PDH	Monoclonal/Ratón	1/40.000	Ambion
Anti-Cdh1 (AR38)	Cdh1	Monoclonal/Ratón	1/20	Dr. J. Gannon
Anti-Ciclina B1 (C-18)	Ciclina B1	Monoclonal/Ratón	1/200	Becton Dickinson
Anti-Topoisomerasa II (C-31)	Topoisomerasa II α	Monoclonal/Ratón	1/500	Becton Dickinson
Anti-Fosfoserina	pSer	Policlonal/Conejo	1/1000	Zymed, Invitrogen
Anti-Cdk5 (C-8)	Cdk5	Policlonal/Conejo	1/200	Santa Cruz
Anti-p35 (C-19)	p35, p25	Policlonal/Conejo	1/200	Santa Cruz
Anti-Cdc20	Cdc20	Policlonal/Conejo	1/500	Santa Cruz
Anti-Ubiquitina (P4D1)	Ubiquitina	Monoclonal/Ratón	1/1000	Cell Signaling
Anti-Cdc2 (17)	Cdk1	Monoclonal/Ratón	1/1000	Santa Cruz
Anti-Fosfotreonina	pThr	Monoclonal/Ratón	1/1000	
Anticuerpo secundario	Antígeno	Enzima asociada	Dilución	Procedencia
Anti-Ratón	IgG Ratón	HRP Peroxidasa	1/1000	Pierce
Anti-Conejo	IgG Conejo	HRP Peroxidasa	1/250	Pierce

9.5. “Stripping” de membranas de nitrocelulosa.

En ocasiones, algunas membranas de los Western blots se reutilizaron y se incubaron de nuevo con un anticuerpo primario distinto al inicial, por lo que fue necesario realizar *stripping* de las mismas. Para ello, las membranas se incubaron en un tampón compuesto por Tris-HCl 62,5 mM pH 6,7, SDS al 2% (p/v) y β -mercaptoetanol 100 mM a 50°C durante 30 minutos. Posteriormente, se lavaron 3 veces con TTBS a temperatura ambiente y se realizó el Western blot como hemos indicado anteriormente.

9.6. Tinción de geles con azul de Coomassie.

Los geles de poliacrilamida se tiñeron con solución de azul de Coomassie (azul de Coomassie al 0,1% p/v, metanol al 50% v/v y ácido acético al 10% v/v) durante 15 minutos en agitación, a temperatura ambiente. A continuación, se

destañeron en una solución que contenía metanol al 20% v/v y ácido acético al 10% v/v en agitación, cambiando periódicamente dicha solución.

10. Inmunocitoquímica.

Las neuronas se sembraron sobre cubreobjetos de cristal esterilizados al fuego y tratados con una solución de poli-L-ornitina 15 µg/ml (Sigma) y fibronectina 1 µg/ml (Sigma).

Las células se lavaron con PBS, se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS durante 30 minutos y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,3% (v/v) en PBS durante 5 minutos. A continuación, se incubaron en la solución de bloqueo (Triton X-100 al 0,1% v/v y suero de caballo al 5% v/v en PBS) a temperatura ambiente, durante 30 minutos.

Para inmunodetectar Cdh1, las células se incubaron en la solución de bloqueo que contenía el anticuerpo anti-Cdh1 (1/100, Zymed, San Francisco, CA) a 4°C, durante toda la noche. Posteriormente, se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG-Cy3 (Molecular Probes) a temperatura ambiente durante 1 hora. Para inmunodetectar la ciclina B1, las neuronas se incubaron en la solución de bloqueo que contenía el anticuerpo anti-ciclina B1-PE (1/80, D-11 Santa Cruz Biotechnology) a 4°C, durante toda la noche.

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

11. Tratamiento de los extractos neuronales con fosfatasa alcalina.

Las células se lavaron con PBS frío y se lisaron en tampón A (compuesto por Tris-HCl 50 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 1 mM, glicerol al 10% v/v, NaCl 300 mM, NP-40 al 0,1% v/v e inhibidores de proteasas, pH 7,5,) o en tampón B (tampón A suplementado con inhibidores de fosfatasa: Na₃VO₄ 1 mM y NaF 50 mM). Tras incubar los lisados en hielo durante 5 minutos, se sometieron a 3 ciclos de congelación-descongelación. A continuación, se centrifugaron durante 10 minutos a 13.000 x g y se recogió el sobrenadante. Los lisados A se incubaron en tampón (Tris-HCl 5 mM, MgCl₂ 0,5 mM, pH 8) que contenía la fosfatasa alcalina (5 U/μg proteína; Roche Diagnostics) a 30°C durante 30 minutos. Los lisados B se incubaron en el mismo tampón, pero en ausencia de la fosfatasa (Tran et al. 2008). Finalmente, se añadió tampón RIPA 2X y las muestras se hirvieron durante 5 minutos. Las muestras se analizaron mediante Western blot.

12. Inmunoprecipitaciones en condiciones desnaturalizantes.

Extractos proteicos (50 μg) obtenidos en tampón RIPA (como se indica en el apartado 9.1.1.) se incubaron, inicialmente, con 20 μl del anticuerpo anti-Cdh1 a 4°C con agitación orbital, durante toda la noche. A continuación, se añadió la proteína A-sefarosa (15 μl; GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suecia) y se incubó durante 30 minutos más a temperatura ambiente. Las bolas de sefarosa, unidas a los inmunocomplejos, se lavaron 5 veces con 1 ml de tampón RIPA, se resuspendieron en tampón de carga y se hirvieron. Finalmente, las muestras se analizaron mediante Western blot para determinar el grado de fosforilación de Cdh1, empleando para tal fin anticuerpos anti-fosfoserina o **anti-fosfotreonina** (como se indica en la tabla 6).

13. Co-inmunoprecipitaciones.

Las co-inmunoprecipitaciones se realizaron como se describe en (Wang et al. 2003). Las células se recogieron en tampón de co-inmunoprecipitación (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, NP-40 al 1% v/v e inhibidores de proteasas y fosfatasa, pH 7,6) y se incubaron con agitación orbital a 4°C, durante 30 minutos, para favorecer su lisis. A continuación, los extractos se clarificaron mediante centrifugación a 14.000 x g y 4°C, durante 10 minutos.

Alícuotas de 100 µg del extracto proteico se incubaron con 2 µg de los anticuerpos anti-Cdk5 o anti-Cdc2 a 4°C con agitación orbital, durante toda la noche. Seguidamente, se añadieron 20 µl de proteína A-sefarosa y se incubó durante una hora más, en las mismas condiciones experimentales. Finalmente, las bolas de sefarosa, unidas a los inmunocomplejos, se lavaron 5 veces con 1 ml de tampón de co-inmunoprecipitación.

14. Purificación de proteínas fusionadas a glutatión-S-transferasa (GST).

La expresión de las proteínas de fusión con la enzima GST se realizó en células de *Escherichia coli* (BL21) transformadas con plásmidos pGEX que contenían el cDNA que codifica Cdh1 silvestre o de las distintas mutaciones a alanina. Para ello, las células se cultivaron en medio LB (*Bactotryptone* 10 g/l, *Bacto Yeast Extract* 5 g/l, NaCl 10 g/l, pH 7,5) que contenía ampicilina 85 g/l. La sobreexpresión de la proteína se indujo mediante la adición de isopropil p-D-thiogluconpiranosido (IPTG, Sigma) 500 µM al medio. Tras 4 horas de incubación a 37°C, las células se recogieron por centrifugación (10.000 x g, 10 minutos) y se resuspendieron en tampón de lisis (PBS, Tritón X-100 al 1% v/v, lisozima 0,2 µg/ml, DTT 2 mM y los inhibidores de proteasas PMSF 1 mM, aprotinina 10 µg/ml y leupeptina 10 µg/ml). Tras la incubación de la suspensión celular a 4°C durante 30 minutos, ésta se sonicó (*Misonic XL2010*), y se centrifugó a 30.000 x

g a 4°C, durante 30 minutos. El sobrenadante se incubó con glutatión-sefarosa (GE Healthcare Life Sciences) a 4°C durante 2 horas, para recuperar la proteína, y se lavó 5 veces con PBS (suplementado con inhibidores de proteasas). La pureza de la proteína y el rendimiento del proceso se comprobó mediante electroforesis en SDS-PAGE y posterior tinción con azul de Coomassie.

15. Determinación de la actividad de las quinasas dependientes de ciclinas (Cdk5).

15.1. Determinación de la actividad quinásica de Cdk5 y Cdk1 neuronales.

Las quinasas Cdk5 y Cdk1 neuronales se aislaron mediante co-immunoprecipitación, como se describe en el apartado 13. Tras lavar dos veces con tampón quinasa (Hepes 50 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, ATP 20 μM e inhibidores de proteasas y de fosfatasa, pH 7,5), el inmunoprecipitado se resuspendió en tampón quinasa en presencia de 2 μCi de [γ-³²P]-ATP y de histona H1 (1 mg/ml; Calbiochem), que se utilizó como sustrato, y se incubó a 30°C durante 30 minutos en agitación (*Thermomixer*, Eppendorf). La reacción se paró añadiendo tampón de carga e hirviendo las muestras a 95°C, durante 5 minutos. Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE y, a continuación, el gel se tiñó con azul de Coomassie y se secó a 80°C durante 2 horas (*Gel Dryer* de Bio-Rad). Finalmente, la incorporación de ³²P se visualizó mediante exposición a películas de autorradiografía (*BioMax XAR film* de Kodak).

15.2. Determinación de la actividad quinásica de Cdk5 sobre Cdh1.

Las proteínas GST-Cdh1 (silvestre y mutantes a alanina), purificadas a partir de *E. coli*, se utilizaron como sustratos de la reacción catalizada por Cdk5. Así, 380 ng de las proteínas de fusión se lavaron dos veces en tampón quinasa

(Tris-HCl 20 mM, MgCl₂ 20 mM, MnCl₂ 2 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, DTT 0,1 mM e inhibidores de proteasas y de fosfatasa, pH 7,6) y se resuspendieron en tampón quinasa que contenía ATP 50 μM, 2 μCi de [γ -³²P]-ATP y Cdk5/p35 o Cdk5/p25 (Upstate, Temecula, CA, EEUU). La mezcla se incubó a 30°C, durante 30 minutos, y la reacción se paró añadiendo tampón de carga e hirviendo las muestras a 95°C durante 5 minutos. A continuación, las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE y el gel se tiñó con azul de Coomassie y se secó a 80°C durante 2 horas. Finalmente, la incorporación de ³²P se visualizó mediante exposición a películas de autorradiografía (*BioMax XAR film* de Kodak).

16. Tratamiento estadístico de los resultados.

Todos los valores se expresaron como medias \pm S.E.M. (error estándar de la media) de, al menos, tres experimentos independientes. La significatividad se determinó mediante análisis de varianza, seguido del test de la menor diferencia significativa de rango múltiple (para comparaciones múltiples) o el test de la *t* de Student (para comparaciones entre dos únicos grupos de valores). En todos los casos, un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. La acumulación nuclear de ciclina B1 media la apoptosis neuronal inducida por la estimulación del receptor NMDA en neuronas corticales.

Para investigar los posibles cambios en los niveles de expresión de la proteína ciclina B1 en condiciones excitotóxicas, neuronas corticales post-mitóticas se incubaron con glutamato (100 μ M) o NMDA (100 μ M) durante 5 minutos y se examinó la presencia de ciclina B1 20 horas después del insulto. Trabajos previos de nuestro laboratorio mostraron que bajo estas condiciones el glutamato provoca muerte neuronal dependiente del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) (Almeida, 2001). Se analizó la expresión de ciclina B1 mediante citometría de flujo, empleando un anticuerpo anti-ciclina B1 conjugado a ficoeritrina, observándose un incremento de 6.6 veces en su expresión tras el tratamiento con glutamato (Fig. 1A). Mediante análisis de western blot se confirmó que los tratamientos con glutamato o NMDA promueven la acumulación de ciclina B1 en el núcleo de las neuronas (Fig. 1B). Además, los estudios inmunocitoquímicos confirmaron que la ciclina B1 colocalizaba con los núcleos condensados o fragmentados (esto es, los núcleos de neuronas apoptóticas) en las neuronas tratadas con glutamato (Fig. 1C). Estos resultados sugieren que la ciclina B1 se acumula en el núcleo de las neuronas corticales después de un estímulo excitotóxico.

Para comprobar si esta acumulación de ciclina B1 observada era responsable de la muerte neuronal tras la estimulación del receptor NMDA, se silenció la expresión de esta proteína mediante RNA de interferencia, utilizando un vector pSuper-neo.gfp. Mediante citometría de flujo se analizó la apoptosis de las neuronas que expresaban el shRNA de ciclina B1, identificadas como células GFP+, observándose que se previno significativamente el incremento de la muerte por apoptosis causada por los tratamientos con glutamato o NMDA, considerándose apoptóticas aquellas células anexina V+/7-AAD- (Fig. 1D). Estos

resultados sugieren que la acumulación nuclear de ciclina B1 tras el tratamiento con glutamato o NMDA media la muerte por excitotoxicidad.

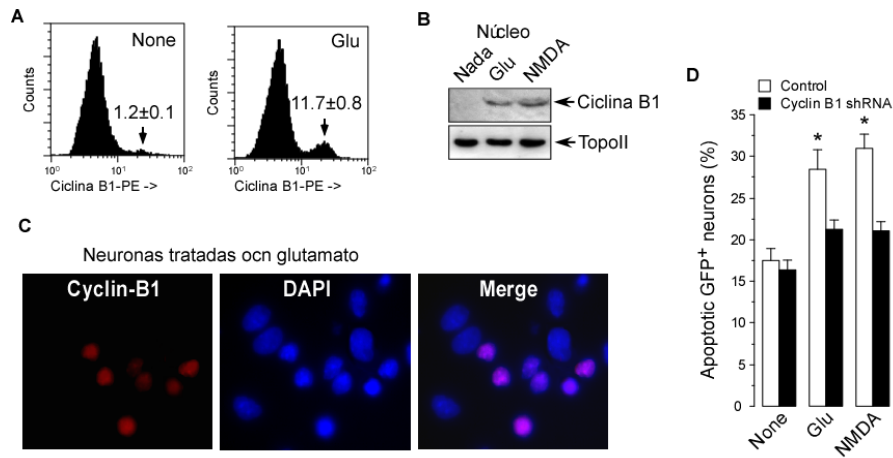


FIGURA 1. Acumulación de ciclina B1 en el núcleo de neuronas apoptóticas. **A.** El análisis de los niveles de ciclina B1 por citometría de flujo reveló que el glutamato induce un incremento de 6.6 veces en la expresión de ciclina B1. **B.** Transferencia tipo western blot que muestra que tanto el tratamiento con glutamato como con NMDA promueve la acumulación de ciclina B1 en el núcleo de las neuronas. **C.** Evidencia inmunocitoquímica de la colocalización de ciclina B1 con los núcleos tras el tratamiento con glutamato. **D.** El silenciamiento de ciclina B1 en neuronas previene la muerte por apoptosis causada por glutamato o NMDA.

2. Cdh1 modula la estabilidad de ciclina B1 tras la estimulación de NMDAR en neuronas corticales.

Con objeto de entender el mecanismo responsable de la acumulación de ciclina B1 en neuronas tratadas con glutamato o NMDA, nos centramos en Cdh1, el único activador de APC/C responsable de la degradación de ciclina B1 en neuronas postmitóticas. Para ello, se silenció Cdh1 mediante shRNA, lo que provocó la acumulación de ciclina B1 y un descenso en la expresión de la proteína Cdh1 en neuronas post-mitóticas, como se observó mediante inmunocitoquímica (Fig. 2A). Previamente, habíamos observado que el tratamiento de las células con Cdh1 shRNA induce la acumulación de ciclina B1 en los núcleos. La incubación de las neuronas con glutamato indujo un incremento de la apoptosis inducida por glutamato de manera tiempo-dependiente (Fig. 2B, panel izquierdo), un efecto que se aceleró al silenciar Cdh1 (Fig. 2B, panel derecho). Mediante microscopía de fluorescencia se confirmó una pérdida mayor de células GFP+ tras el tratamiento con glutamato en las células en que se había silenciado Cdh1. El análisis cuantitativo de las neuronas GFP+ por citometría de flujo confirmó un efecto sinérgico del glutamato y el silenciamiento de Cdh1 al provocar la pérdida de neuronas GFP+. Además, la expresión de hEmi1, un inhibidor de la actividad de APC/C-Cdh1, mimetizó el efecto observado al silenciar Cdh1. Para confirmar la implicación de Cdh1 en excitotoxicidad, también se determinó la proporción de núcleos fragmentados o condensados en neuronas tratadas con glutamato o NMDA. Estos tratamientos aumentan la proporción de núcleos condensados o fragmentados, un efecto sinérgico al del silenciamiento de Cdh1 (Figura 2C) o a la inhibición de APC/C por hEmi1. Los análisis por citometría de flujo confirmaron este incremento sinérgico de la muerte por apoptosis causada por el shRNA de Cdh1 (Figura 2D) o hEmi1 con NMDA o glutamato, siendo el efecto del glutamato prevenido por el antagonista de NMDAR, MK-801.

En conjunto, estos resultados sugieren que la inhibición por APC/C-Cdh1 sensibiliza a las neuronas ante la muerte por apoptosis causada por la estimulación de NMDAR.

A continuación, investigamos cómo la regulación de ciclina B1 por APC/C-Cdh1 era una ruta de señalización implicada en excitotoxicidad. Como muestra la figura 2E, el shRNA de ciclina B1 rescata la muerte por apoptosis provocada por glutamato o NMDA a las neuronas en las que se había silenciado Cdh1. Estos resultados sugieren que Cdh1 protege a las neuronas de la excitotoxicidad mediada por el receptor NMDA al prevenir la acumulación de la proteína ciclina B1.

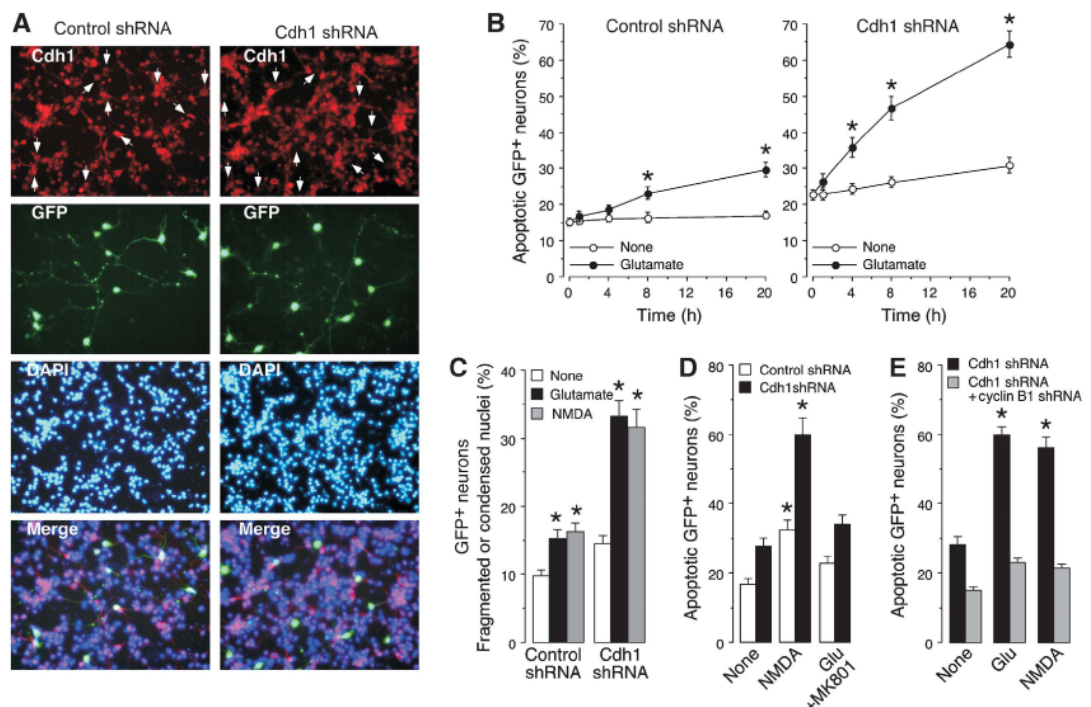


FIGURA 2. Cdh1 modula la estabilidad de ciclina B1 tras la estimulación del NMDAR en neuronas corticales. **A.** La expresión de shRNA de Cdh1 induce la depleción de Cdh1, como muestra la inmunocitoquímica **B.** El silenciamiento de Cdh1 sensibiliza a las neuronas frente al daño excitotóxico, puesto que la muerte por apoptosis se aceleró e incrementó al silenciar Cdh1 **C.** El silenciamiento de Cdh1 incrementó sinérgicamente la proporción de núcleos fragmentados o condensados a las 20 horas del tratamiento con glutamato. **D.** El silenciamiento de Cdh1 incrementa la muerte por apoptosis causada por el glutamato o el NMDA. El inhibidor del NMDAR, MK-801 previno la apoptosis inducida por glutamato. **E.** El silenciamiento de Ciclina B1 evitó el incremento de la apoptosis observada a las 20 horas del tratamiento con glutamato o NMDA en las neuronas en que se había silenciado Cdh1.

3. La estimulación del receptor NMDA produce la fosforilación en serina y la acumulación de Cdh1 en el citosol.

A continuación, nos propusimos investigar el mecanismo por el que la estimulación de NMDAR regulaba la actividad de APC/C. La abundancia del mRNA de Cdh1 permaneció inalterada por el tratamiento con glutamato, al menos hasta las 24 horas postestimulación (Fig. 3A). Además, la abundancia de la proteína Cdh1 también permaneció sin modificarse, a pesar de que se observó una migración en gel de poliacrilamida más lenta tras el tratamiento con glutamato, que resultó ser tiempo- dependiente (Fig. 3B), lo que sugería que el estímulo excitotóxico produce una modificación post-traducciona l de la proteína. Este shift de Cdh1 fue mimetizado por NMDA y evitado por el antagonista MK-801, así como por los quelantes de calcio EDTA y BAPTA, indicando que era un fenómeno mediado por NMDAR.

Previamente, se había descrito que el shift de la proteína Cdh1 se producía como consecuencia de la hiperfosforilación de Cdh1 (Kramer et al, 2000), por lo que provamos esa posibilidad. Para ello, extractos proteicos obtenidos de neuronas tratadas con glutamato o NMDA se incubaron con proteína fosfatasa. Como se observa en la figura 3D, el tratamiento con fosfatasa convirtió el shift de la banda de Cdh1 a la forma que migraba más rápido, sugiriendo que el glutamato y el NMDA inducen la fosforilación de Cdh1.

Con objeto de comprobar esta posible fosforilación, se inmunoprecipitaron extractos proteicos obtenidos a partir de neuronas incubadas con NMDA empleando un anticuerpo anti-Cdh1 y, a continuación se analizaron mediante western blot con un anticuerpo anti-fosfo serina. La figura 3E muestra que el tratamiento con NMDA produjo la fosforilación de residuos de serina de Cdh1, fenómeno dependiente del tiempo y de la presencia de calcio.

Estos resultados, junto con el aparente incremento de masa molecular de Cdh1 y experimentos previos de otros laboratorios (Kramer et al, 2000), sugieren que Cdh1 podría ser fosforilada, al menos, en residuos de serina. Es más, se ha descrito que la hiperfosforilación de Cdh1 secuestra a la proteína en el citosol, de

manera que se inhibe la actividad de APC/C-Cdh1. Por ello, investigamos esta posibilidad y, como muestra la figura 3F, el NMDA promovió la acumulación en el citosol de Cdh1 y su depleción en el núcleo, de manera dependiente del tiempo, así como de la presencia de calcio. Así, la estimulación del receptor NMDA promueve la hiperfosforilación de Cdh1 y su acumulación en el citosol, causando la inactivación de APC/C-Cdh1.

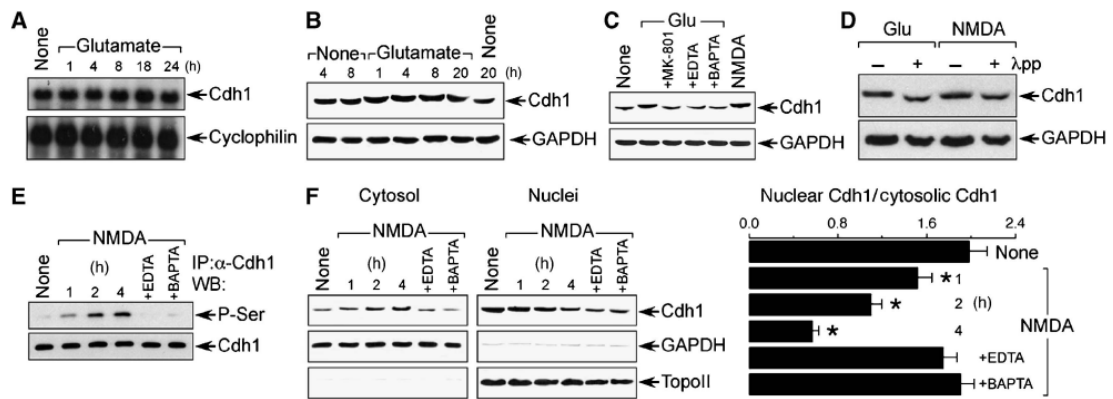


FIGURA 3. La estimulación del NMDAR produce la fosforilación en serina de Cdh1 y su acumulación en el citosol. **A.** La expresión del mRNA de Cdh1 no se altera por la estimulación con NMDA. **B.** El glutamato no altera la expresión de la proteína Cdh1, aunque induce un shift en la banda. **C.** El shift de Cdh1 se previene con el inhibidor MK801 y con quelantes de calcio. **D.** El tratamiento de las muestras con fosfatasa previene el shift de Cdh1. **E.** El NMDA provoca la fosforilación en serina de Cdh1. **F.** El NMDA induce la acumulación de Cdh1 en el citosol y su salida del núcleo.

4. La estimulación de NMDAR activa Cdk5-p25, quien interacciona con Cdh1 y la fosforila, provocando la acumulación de ciclina B1 y la muerte neuronal por apoptosis.

Para comprender el mecanismo por el que la estimulación del receptor NMDA promueve la acumulación de ciclón B1, investigamos la posible implicación de la kinasa dependiente de calcio/calmodulina (CaMKII). Las neuronas se estimularon con NMDA en presencia o en ausencia de un inhibidor de la CaMKII, KN-62. Cdh1 se inmunoprecipitó y se analizó por western blot el marcaje de fosfoserina. Pero este tratamiento no previno la fosforilación de Cdh1.

Como GSK3B es una kinasa que se había relacionado con excitotoxicidad, provamos la posibilidad de que fosforilase a Cdh1. Para ello, las neuronas se estimularon con glutamato en presencia del inhibidor de esta kinasa, AR-A014418. Pero este tratamiento tampoco previno la fosforilación de Cdh1.

Estos resultados indican que ni CaMKII ni GSK3B fosforilan a Cdh1. Por lo que buscamos en la secuencia de Cdh1 posibles secuencias consenso de fosforilación, en la página web scansite (<http://scansite.mit.edu>). Encontramos tres posibles sitios de fosforilación por kinasas dependientes de ciclina (Cdks), altamente conservados en mamíferos: serina 40, treonina 121 y serina 163. Inhibimos la actividad de Cdks empleando roscovitina, y este tratamiento previno la fosforilación de Cdh1 causada por NMDA.

Estos resultados sugieren que Cdh1 es fosforilado por una Cdk. Y esta observación, junto con la evidencia de que Cdk5 es activada por calpaína, de manera dependiente de calcio, tras la estimulación neuronal con glutatamato, nos hizo centrarnos en Cdk5 como la posible kinasa responsable de la fosforilación de Cdh1. Para comprobar esta hipótesis, investigamos el papel sobre la fosforilación in vitro de Cdh1 por Cdk5. Cdk5 puede unirse tanto a p35 como al producto de su proteolisis, p25, lo que mantiene a Cdk5 en una forma

persistentemente activada, y se ha comprobado su acumulación en pacientes que sufren enfermedad de Alzheimer.

El ensayo *in vitro* de la actividad kinasa de Cdk5 mostró que ambas formas de Cdk5 fosforilan a Cdh1, aunque Cdk5-p25 lo hacía con una eficiencia más de tres órdenes de magnitud superior que Cdk5-p35 (Fig. 4A). A continuación, probamos si Cdk5 era activado en las neuronas tras el tratamiento con NMDA. Para ello, primero investigamos posibles cambios en los niveles proteicos de p35 y p25 bajo estas condiciones. Como se observa en la figura 4B, la estimulación del receptor NMDA produce el descenso en la abundancia proteica de p35, al mismo tiempo que se acumula p25, sugiriendo la conversión proteolítica de p35 en p25 en neuronas bajo condiciones de stress. Para confirmar que esto se acompañaba por la activación de Cdk5, determinamos su capacidad para fosforilar histona H1, que fue incrementada en aquellos extractos de neuronas tratadas con NMDA (Fig 4C). Estos resultados confirman que la estimulación de NMDAR promueve la activación de Cdk5 en nuestro modelo experimental. Para investigar si Cdk5 interaccionaba con Cdk1 en neuronas, se inmunoprecipitaron extractos de neuronas tratadas con NMDA con un anticuerpo anti-Cdk5, siguiendo con un western blot con anti-Cdh1. Estos resultados (Fig 4D) muestran un incremento en la intensidad de la banda en la co-inmunoprecipitación de muestras tratadas con glutamato o NMDA, lo que sugiere que la estimulación de NMDAR promueve la interacción entre Cdk5 y Cdh1.

Para confirmar que Cdk5 era responsable de fosforilar Cdh1 en neuronas, se silenció Cdk5 con siRNA, un tratamiento que fue efectivo tras 3 días, de forma dosis dependiente. Las neuronas en que se silenció Cdk5 se incubaron con NMDA, y se analizó el shift de la banda de Cdh1. Como se muestra en la figura 4E, el silenciamiento de cdk5 previno el shift de Cdh1 causado por NMDA. Dicho shift no se produjo, migrando las bandas del mismo modo que cuando se incubaban con fosfatasa (Fig 4F).

Para comprobar el papel de Cdk5 sobre la fosforilación de Cdh1, los extractos obtenidos de neuronas que tenían Cdk5 silenciado y se estimularon con

NMDA se inmunoprecipitaron con anti-Cdh1, y se hizo un western blot con anti-fosfoserina. Como ilustra la figura 4G, el silenciamiento de Cdk5 inhibe de forma dosis dependiente la fosforilación en serina de Cdh1. En conjunto, estos resultados sugieren que Cdh1 es fosforilada en serina(s) por Cdk5, tras la estimulación del receptor NMDA.

Seguidamente, investigamos la implicación de la interacción de Cdk5-Cdh1 sobre la acumulación de ciclina B1 y la apoptosis tras la estimulación de NMDAR. Para ello, se analizó la ciclina B1 en neuronas en que se había silenciado Cdk5, observándose que dicho silenciamiento previene la acumulación de ciclina B1 inducida por el tratamiento con NMDA (fig4H). Además, encontramos que el silenciamiento de Cdk5 previene la apoptosis por glutamato o NMDA de forma dosis dependiente. Por otra parte, el descenso en la apoptosis por NMDA promovida por el silenciamiento de Cdk5 se impidió tanto por la inhibición de cdh1 (por hEmi1) como por la sobreexpresión de ciclina B1 (Fig. 4 J). Estos resultados confirman que la estimulación del receptor NMDA produce la acumulación de ciclina B1 en la excitotoxicidad a través de Cdk5.

En vista de que dos formas de Cdk5 pueden fosforilar a Cdh1 *in vitro* (Cdk5-p35 y Cdk5-p25) (fig 4A), nos propusimos dilucidar cuál era la responsable de la acumulación de ciclina B1 en nuestras condiciones experimentales. Para ello, las neuronas se estimularon con NMDA en presencia de MDL, un inhibidor específico de calpaína, que es la enzima responsable de la conversión de p35 en p25. Como muestra la figura 4K, el corte de p35 en p25 se inhibió por MDL, de manera dosis dependiente. Además, el MDL previno la fosforilación de histona H1 inducida por NMDA (fig 4L), así como el shift de la banda de Cdh1 (fig 4M) y la acumulación de ciclina B1 (fig 4N).

En conjunto, estos resultados confirman que la estimulación del NMDAR en neuronas corticales provoca la proteólisis de p35 en p25, por acción de la calpaína, lo que conlleva la activación de Cdk5. El complejo Cdk5-p25 fosforila a Cdh1, que permanece secuestrada e inhibida en el citosol (fig 3F) y así, se inactiva APC/C-Cdh1. Como consecuencia, se acumula su sustrato ciclina B1,

que induce la muerte por apoptosis (Fig 4 J), posiblemente porque cataliza la fosforilación de BAD.

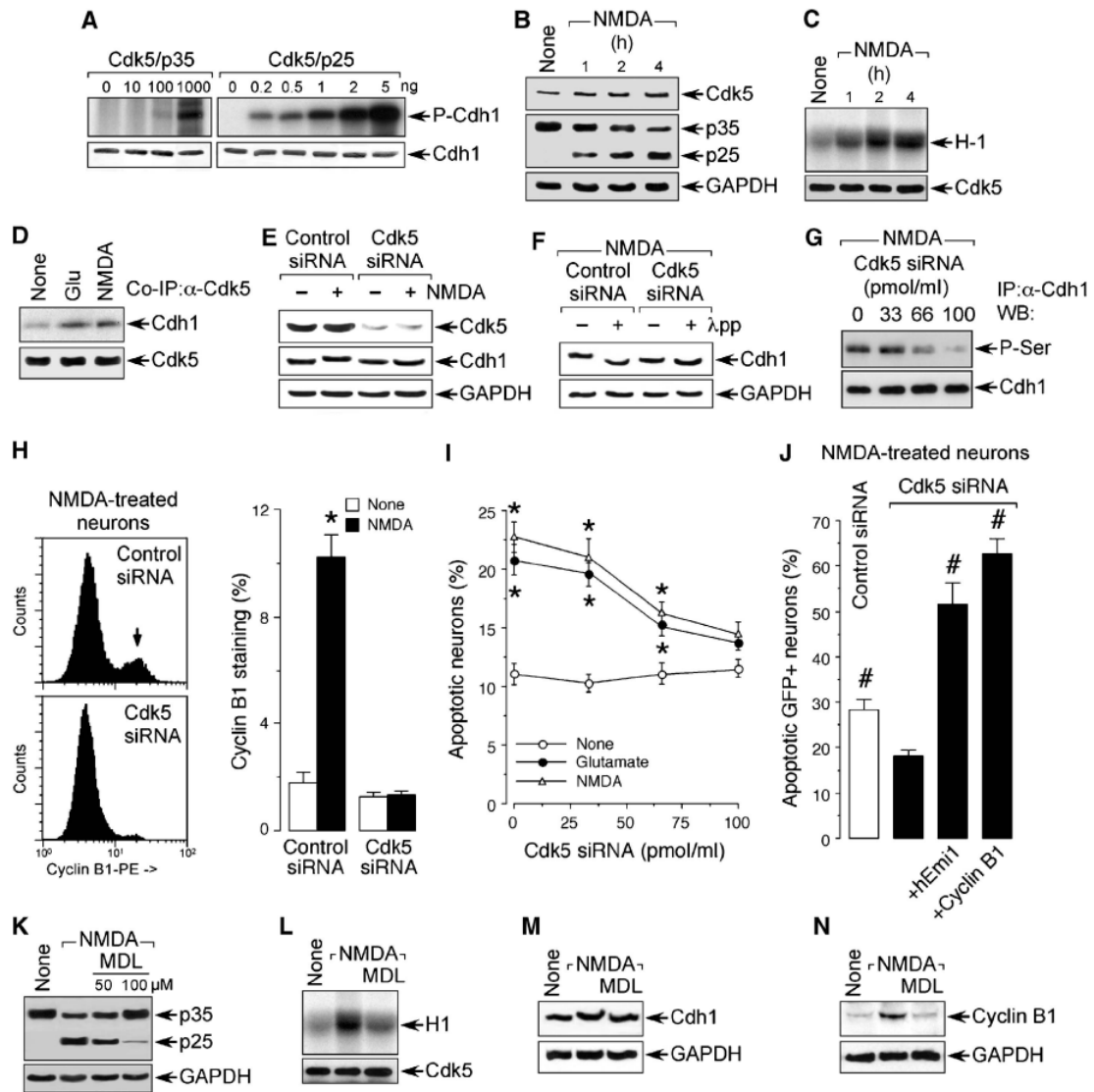


FIGURA 4. La estimulación del NMDAR activa Cdk5-p25, que interacciona con Cdh1 y la fosforila, causando la acumulación de ciclina B1 y la muerte por apoptosis.

5. La triple fosforilación de Cdh1 sobre los residuos serina 40, treonina 121 y serina 163 por Cdk5 es necesaria y suficiente para causar la acumulación de ciclina B1 y la excitotoxicidad.

Finalmente, nos propusimos identificar los residuos de Cdh1 fosforilados por Cdk5 que eran responsables de la acumulación de ciclina B1 y la muerte por apoptosis. Para ello, se realizaron mutagénesis dirigidas de los residuos anteriores. Estos residuos se mutaron a alanina como mutaciones simples, dobles o triples, y las formas mutantes resultantes se expresaron, purificaron y sometieron a fosforilación por Cdk5-p35 y Cdk5-p25 in vitro. Como se observa en la figura 5A, las mutaciones triples impidieron la fosforilación de Cdh1 por ambos complejos de Cdk5. Esto sugiere que los dos complejos fosforilan estos residuos de Cdh1 in vitro.

Quisimos comprobar si estos residuos también se fosforilaban en excitotoxicidad y eran responsables de la acumulación de ciclina B1. Como muestra la figura 5B, la expresión de Cdh1 previno la muerte mediada por NMDA de forma dosis dependiente. Por ello, para los siguientes experimentos empleamos la mínima cantidad de cDNA que no alteraba la apoptosis (Fig 5B y C). La expresión en neuronas de Cdh1 con mutaciones triples previene completamente la apoptosis (Fig 5C) y la acumulación de ciclina B1.

Estos resultados sugieren que la triple fosforilación de Cdh1 en ser40, thr121 y ser163 es necesaria para la acumulación de ciclina B1 inducida por la excitotoxicidad.

Los residuos anteriores también se mutaron a aspártico, para mimetizar el estado fosforilado de la proteína. Y su sobreexpresión en neuronas causó la acumulación de ciclina B1 y la apoptosis neuronal.

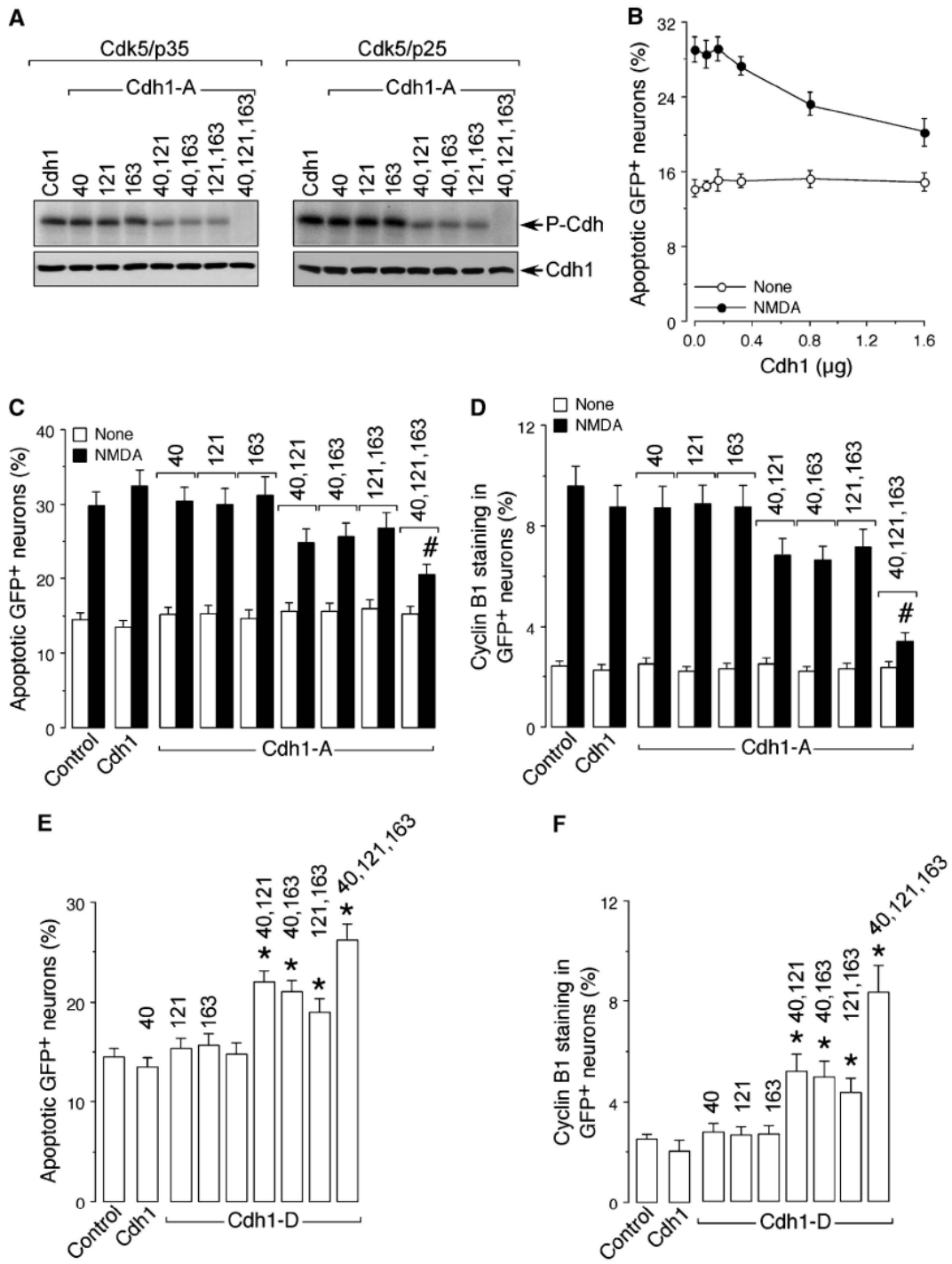


FIGURA 5. La triple fosforilación de Cdh1 en ser 40, thr 121 y ser163 por Cdk5 es necesaria y suficiente para que se acumule ciclina B1 y se produzca excitotoxicida.

CONCLUSIONES

NMDAR activa a Cdk5, lo que promueve la fosforilación de Cdh1 y su acumulación en el citoso, inactivándose APC/C. La inactivación de APC/C conlleva la acumulación de ciclina B1 en el núcleo de las neuronas, lo que provoca su muerte por apoptosis.

BIBLIOGRAFÍA

- Almeida A. and Medina J. M.** (1998) A rapid method for the isolation of metabolically active mitochondria from rat neurons and astrocytes in primary culture. *Brain research* 2, 209-214.
- Almeida A. and Bolanos J. P.** (2001) A transient inhibition of mitochondrial ATP synthesis by nitric oxide synthase activation triggered apoptosis in primary cortical neurons. *Journal of neurochemistry* 77, 676-690.
- Almeida A., Bolanos J. P. and Moreno S.** (2005) Cdh1/Hct1-APC is essential for the survival of postmitotic neurons. *J Neurosci* 25, 8115-8121.
- Cuende J., Moreno S., Bolanos J. P. and Almeida A.** (2008) Retinoic acid downregulates Rae1 leading to APC(Cdh1) activation and neuroblastoma SH-SY5Y differentiation. *Oncogene* 27, 3339-3344.
- Delgado-Esteban M., Almeida A. and Bolanos J. P.** (2000) D-Glucose prevents glutathione oxidation and mitochondrial damage after glutamate receptor stimulation in rat cortical primary neurons. *Journal of neurochemistry* 75, 1618-1624.
- Diaz-Hernandez J. I., Moncada S., Bolanos J. P. and Almeida A.** (2007) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 protects neurons against apoptosis induced by oxidative stress. *Cell death and differentiation* 14, 1211-1221.
- Diaz-Hernandez J. I., Almeida A., Delgado-Esteban M., Fernandez E. and Bolanos J. P.** (2005) Knockdown of glutamate-cysteine ligase by small hairpin RNA reveals that both catalytic and modulatory subunits are essential for the survival of primary neurons. *The Journal of biological chemistry* 280, 38992-39001.
- Tran K., Mahr J. A., Choi J., Teodoro J. G., Green M. R. and Spector D. H.** (2008) Accumulation of substrates of the anaphase-promoting complex (APC) during human cytomegalovirus infection is associated with the phosphorylation of Cdh1 and the dissociation and relocalization of APC subunits. *Journal of virology* 82, 529-537.
- Wang J., Liu S., Fu Y., Wang J. H. and Lu Y.** (2003) Cdk5 activation induces hippocampal CA1 cell death by directly phosphorylating NMDA receptors. *Nature neuroscience* 6, 1039-1047.
- Zancai P., Dal Col J., Piccinin S., Guidoboni M., Cariati R., Rizzo S., Boiocchi M., Maestro R. and Dolcetti R.** (2005) Retinoic acid stabilizes p27Kip1 in EBV-immortalized lymphoblastoid B cell lines through enhanced proteasome-dependent degradation of the p45Skp2 and Cks1 proteins. *Oncogene* 24, 2483-2494.
- Zheng Y. L., Li B. S., Kanungo J., Kesavapany S., Amin N., Grant P. and Pant H. C.** (2007) Cdk5 Modulation of mitogen-activated protein kinase signaling regulates neuronal survival. *Molecular biology of the cell* 18, 404-413.