



Participación de JNK3 en los mecanismos de muerte neuronal e inflamación en procesos neurodegenerativos

Maria Luisa de Lemos Machado



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 3.0. Spain License.**



FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y QUÍMICA TERAPÉUTICA

Participación de JNK3 en los mecanismos de muerte neuronal e inflamación en procesos neurodegenerativos

Maria Luisa de Lemos Machado

2014



FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y QUÍMICA TERAPÉUTICA

PROGRAMA DE DOCOTORADO: INVESTIGACIÓN, DESARROLLO Y CONTROL DE
MEDICAMENTOS

Participación de JNK3 en los mecanismos de muerte neuronal e inflamación en procesos neurodegenerativos

Memoria presentada por Maria Luisa de Lemos Machado para optar al título de doctor por la Universidad de Barcelona

Directores

Dr. Fèlix Junyent Herena

Dra. Carme Auladell Costa

Tutor

La doctoranda

Dr. Antoni Camins Espuny

Maria Luisa de Lemos Machado

Este trabajo ha sido realizado gracias a una beca predoctoral de la Fundação Ciência e Tecnologia de Portugal.

Este trabajo ha sido financiado por los siguientes proyectos:

Generalitat de Catalunya

(proyecto 2009/SGR00853)

Ministerio de Economía y competitividad

(proyectos SAF2009-13093 y BFU2010-19119/BFI)

Instituto de Salud Carlos III

(proyectos PI080400 y PS09/01789)

Fundació la Mataró TV3

(proyecto 063230)

Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo (CYTED)

(proyecto 610RT0405)

Imagen de portada: Fotografía de microscopia de fluorescencia de una sección cerebral de hipocampo de ratón.

AGRADECIMIENTOS

Resulta complicado recoger en unas pocas líneas todo el apoyo, tanto a nivel científico como personal, que he recibido de grandes personas que me han rodeado a lo largo de todos estos años de tesis doctoral. Sin ellos, todo habría sido más difícil y sin duda pueden sentir también esta tesis como suya.

En primer lugar me gustaría dar las gracias a mis directores de tesis. Al Dr. Fèlix Junyent, por haberme introducido en el mundo de la investigación, por su confianza en mi capacidad para hacer este trabajo, por haberme guiado durante estos años y porque cada día he aprendido un poco más que en el anterior. Por todas sus sugerencias, comentarios y correcciones que fueron fundamentales para mi formación. A la Dra. Carme Auladell, por sus consejos, por su confianza y comprensión en los momentos de desánimo. Por su dedicación y asesoramiento para que llegara a la finalización de esta tesis.

Al Dr. Antoni Camins, le agradezco por aceptarme en su grupo de investigación y poner a mi disposición sus recursos. Por su confianza y acogida como un miembro más del grupo. También quiero agradecer a todo el profesorado y personal de la Unidad, por hacer que los proyectos se desarrollen y que en la medida de lo posible tengamos todo lo necesario para trabajar.

De igual manera me gustaría agradecer al Dr. Rafael Romero, por sus consejos y enseñanzas, aportando su tiempo y experiencia. Y a la Dra. Ester Verdaguer, porque siempre tiene una palabra de ánimo y una sonrisa, aunque los resultados no sean los esperados.

Me gustaría mencionar también a mis compañeros de laboratorio, los que ya se han ido, los que estamos a punto de hacerlo y los que todavía siguen. Porque no podría haber disfrutado tanto de trabajar en un sitio con tan buen ambiente y por hacerme sentir como en casa desde el primer día. Gracias por todas las cenas, risas y grandes momentos. En especial, agradezco a todos los que también fuera del laboratorio me han brindado con su amistad, inmenso ánimo y cariño y que han contribuido en la elaboración de esta tesis con sus consejos, sugerencias y clases de castellano. Sin vosotros hubiera sido mucho más difícil llevar a cabo esta tesis.

Gracias también al Farmaco Team. El *running* empezó al inicio de esta tesis y se tornó en una forma de desconectar y de recorrer Barcelona de otra forma, disfrutando del deporte en la mejor compañía. Espero un día compartir una maratón a vuestro lado.

Gracias a todos los integrantes del Laboratorio de Biología Celular, de la Facultad de Biología, por su apoyo, ánimo e interés.

AGRADECIMIENTOS

En general quisiera agradecer a todos mis amigos, tanto los que viven en Barcelona y que me han acompañado estos años más de cerca, como los amigos que desde Portugal siempre me han brindado con sus visitas y ánimo. Me habéis hecho sentir más cerca de casa.

A Paulo, gracias por su apoyo y cariño constante durante todos estos años, tanto en los altos como en los bajos momentos. *Porque sempre estiveste presente apesar da distancia e sem ti este caminho teria sido mais difícil.*

A mi prima Inês, gracias por la amistad incondicional y constante, por la paciencia y confianza. Por compartir todos estos años desde el primer momento en que llegué a Barcelona y seres un apoyo en mi vida. *Obrigado por aturares-me todos os dias.*

Muy especialmente, agradezco a toda mi familia. A mis abuelos porque siempre fueron una referencia de fuerza, dedicación al trabajo y a los demás. A mis padres por apoyarme incondicionalmente y proporcionarme todo y más. Por enseñarme el valor del esfuerzo, la humildad y el respeto a lo largo de mi vida. Porque sin ellos todo esto no sería posible. A mis hermanos, que siempre me han apoyado y animado, y a mis sobrinos que se han acostumbrado muchas veces a mi ausencia, pero siempre me han recibido con una sonrisa y un abrazo cariñoso. *Obrigado meus queridos Pais e irmãos por toda a compreensão, carinho e palavras encorajadoras, muitas vezes por mail, que sempre me incentivaram a ir mais além.*

En definitiva, porque todos de una u otra manera habéis contribuido para hacer realidad este proyecto personal y profesional. Muchas gracias. *Muito obrigado.*

“Challenges are what make life interesting, overcoming them is what makes life meaningful.”

Joshua J. Marine

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ABREVIATURAS	VII
I. INTRODUCCIÓN	3
1. MUERTE CELULAR	4
1.1 Apoptosis	5
1.1.1 Proteínas implicadas en la regulación de la apoptosis	6
1.1.1.1 Caspasas	6
1.1.1.2 Proteínas de la familia Bcl-2	9
1.1.1.3 Calpaínas	11
1.1.2 Vías de señalización de la apoptosis	13
1.1.2.1 Vía extrínseca	13
1.1.2.1.1 Receptores de muerte	13
1.1.2.2 Vía intrínseca	16
1.2 Necrosis	18
1.3 Necroptosis o necrosis programada	19
1.4 Autofagia	19
1.5 Muerte celular programada similar a apoptosis	20
2. INFLAMACIÓN EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	21
2.1 Microglia	21
2.2 Astrocitos	22
2.3 Activación glial	22
3. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE PI3K/AKT	23
3.1 La familia de PI3K	24
3.2 AKT	25
4. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE MAPK	27
4.1 Vía de señalización de ERK1/2	29
4.2 Vía de señalización de p38	29
4.3 Vía de señalización de ERK5	30
4.4 Vía de señalización de JNK	31
4.4.1 Sustratos de JNK	34
4.4.2 Interacciones funcionales con las proteínas JIP	35
4.4.3 Regulación de la apoptosis mediada por la activación de JNK	37
4.4.4 Inhibición de la vía de JNK	38
4.4.5 Implicación de JNK en mecanismos neurodegenerativos	40
4.4.6 Modelos genéticamente modificados de la vía de JNK	41

4.4.6.1 JNK3 como posible diana terapéutica en la neurodegeneración	42
5. MODELOS EXPERIMENTALES	43
5.1 Modelo experimental del ácido 3-nitropropiónico (3NP)	43
5.1.1 El ácido 3-nitropropiónico	43
5.1.2 Mecanismos de neurodegeneración inducidos por 3NP	45
5.1.2.1 Bloqueo del ciclo de Krebs	45
5.1.2.2 Reducción del ATP y homeostasis del calcio	45
5.1.2.3 Reducción del potencial de membrana	45
5.1.2.4 Estrés oxidativo	46
5.1.2.5 Activación de cinasas y proteasas	46
5.2 Modelo experimental del ácido kaínico (KA)	46
5.2.1 El ácido kaínico	46
5.2.2 El hipocampo	48
5.2.3 Mecanismos de neurodegeneración inducidos por KA	51
5.2.3.1 Vulnerabilidad selectiva de las neuronas hipocámpales	51
5.2.3.2 Estrés oxidativo	52
5.2.3.3 Inducción de muerte neuronal	52
5.2.3.4 Activación glial	53
5.2.3.5 Expresión de genes de respuesta inmediata	53
II. OBJETIVOS	57
III. MÉTODOS	61
1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	61
2. MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN <i>IN VIVO</i>	61
2.1 Modelo experimental de la enfermedad de Huntington basado en la administración de 3NP	61
2.2 Modelo experimental de epilepsia basado en la administración de KA	63
3. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	66
3.1 Fijación tisular por perfusión cardíaca	66
3.2 Obtención de tejido para extracción de proteína y RNA	67
3.2.1 Obtención de extractos totales de proteína	67
3.2.2 Obtención de extractos de RNA	68
4. TÉCNICAS EXPERIMENTALES	69
4.1 Técnicas inmunológicas	69
4.1.1 Inmunohistoquímica de fluorescencia	69
4.1.2 Doble inmunohistoquímica de fluorescencia	70
4.1.3 <i>Western Blot</i>	70

4.2 Tinciones histoquímicas	74
4.2.1 Tinción de Hoescht 33342	74
4.2.2 Tinción de Fluoro-Jade B	74
4.3 Técnicas de biología molecular	75
4.3.1 Caracterización genética	75
4.3.2 Análisis de la expresión génica mediante PCR en tiempo real	77
4.3.2.1 PCR en tiempo real	78
4.3.2.2 <i>Array</i> de PCR en tiempo real	81
4.3.3 Estudio de <i>microarrays</i>	82
4.4 Otras técnicas experimentales	83
4.4.1 Ensayo actividad calpaína	83
4.4.2 Ensayo actividad succinato deshidrogenasa	83
4.4.3 Ensayo actividad PI3K	84
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	84
IV. RESULTADOS	87
1. RELACIÓN ENTRE LA ISOFORMA JNK3 Y LA NEURODEGENERACIÓN	87
1.1 Respuesta al KA en ratones deficientes para JNK3	87
1.1.1 Presencia de neurodegeneración en hipocampo	87
1.1.2 Inducción de astrogliosis en hipocampo	88
1.1.3 Inmunoreactividad de la proteína c-Fos	89
1.1.4 Análisis de cambios en la fosforilación de MAPKs	90
1.1.5 Inducción de la fosforilación de c-Jun	92
1.2 Respuesta al 3NP en ratones deficientes para JNK3	93
1.2.1 Actividad de la succinato deshidrogenasa en estriado	93
1.2.2 Presencia de neurodegeneración en el estriado	94
1.2.3 Inducción de astrogliosis en el estriado	95
1.2.4 Análisis de cambios en la fosforilación de MAPKs	95
1.2.5 Inducción de la fosforilación de c-Jun	97
1.2.6 Activación de la vía de las calpaínas	97
1.2.7 Análisis de la vía de señalización de AKT	99
2. RELACIÓN ENTRE LA ISOFORMA JNK3 Y LA VÍA DE SUPERVIVENCIA DE PI3K/AKT	101
2.1 Análisis de los niveles de expresión génica en hipocampo	102
2.1.1 Validación de genes implicados en neurodegeneración	103
2.1.2 Detección de la subunidad p110 β y análisis de la actividad de PI3K	104
2.2 Detección de la vía de señalización de AKT	104

3. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS MECANISMOS APOPTOTICOS Y NEUROINFLAMATORIOS REGULADOS POR JNK3 Y JNK1 EN EL MODELO DEL KA	107
3.1 Análisis de la neurodegeneración en ratones <i>Jnk3^{-/-}</i> y <i>Jnk1^{-/-}</i>	107
3.2 Activación glial en ratones <i>Jnk3^{-/-}</i> y <i>Jnk1^{-/-}</i>	108
3.3 Expresión de genes implicados en inflamación en ratones <i>Jnk3^{-/-}</i> y <i>Jnk1^{-/-}</i>	109
3.4 Inmunoreactividad de c-Fos en ratones <i>Jnk3^{-/-}</i> y <i>Jnk1^{-/-}</i>	110
3.5 Inducción de la fosforilación de JNK y c-Jun en ratones <i>Jnk3^{-/-}</i> y <i>Jnk1^{-/-}</i>	111
3.6 Análisis de la expresión de genes implicados en la apoptosis	114
3.6.1 Análisis de genes apoptóticos entre ratones <i>Jnk3^{-/-}</i> y <i>Jnk1^{-/-}</i>	115
V.DISCUSIÓN	123
VI. CONCLUSIONES	143
VII. BIBLIOGRAFÍA	147
VIII. ANEXO: PUBLICACIONES	199

ABREVIATURAS

3NP <i>Ácido 3-nitropropiónico</i>	CA <i>Cornu Ammonis</i>
A1 <i>Bcl-2 related protein 1</i>	CARD <i>Caspase-Recruitment Domain</i>
AIF <i>Apoptosis-Inducing Factor</i>	Caspasas <i>Cysteine Aspartyl-Specific Proteases</i>
AKT <i>Protein kinase B</i>	ced <i>C. elegans death genes</i>
AMPA <i>Aminomethylphosphoric Acid Receptor</i>	cFLIP <i>cellular FLICE-like inhibitory protein</i>
ANT <i>Adenine Nucleotide Translocater</i>	c-Fos <i>Proto-oncogene c-Fos</i>
AP-1 <i>Activator Protein 1</i>	ciAP1 <i>cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1</i>
Apaf-1 <i>Apoptotic protease activating factor-1</i>	ciAP2 <i>cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 2</i>
Apo3L <i>TNF ligand member 12</i>	c-Jun <i>Proto-oncogene Jun</i>
APP <i>Amyloid Precursor Protein</i>	CREB <i>c-AMP responsive element binding protein</i>
ASK <i>Apoptosis Signal-regulating Kinase</i>	CypD <i>Cyclophilin D</i>
ASK1 <i>Apoptosis Signal-regulating Kinase 1</i>	DD <i>Death Domain</i>
Asp <i>Ácido aspártico</i>	DED <i>Death Effector Domain</i>
ATF2 <i>Activating transcription factor</i>	DISC <i>Death Inducing Signaling Complex</i>
ATP <i>Adenosine Triphosphate</i>	DNA <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
Aβ <i>Beta-amiloide</i>	DR3 <i>Death receptor 3</i>
Bad <i>Bcl-2 associated death promoter</i>	ERK1/2 <i>Extracellular signal regulated kinase 1/2</i>
Bak <i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>	ERK5 <i>Extracellular signal regulated kinase 5</i>
bax <i>Bcl-2 associated X protein</i>	FADD <i>Fas-Associated Death Domain</i>
Bcl-2 <i>B-cell lymphoma 2</i>	FADD <i>Fas-Associated Death Domain</i>
Bcl-w <i>Bcl-2 like protein 2</i>	FasL <i>Fas ligand</i>
Bcl-X_L <i>B-cell lymphoma-extra large</i>	FOXO <i>Forkhead box transcription factor, class O</i>
BDNF <i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>	GFAP <i>Glial Fibrillary Acid Protein</i>
BH <i>Bcl-2 Homology</i>	Glu <i>Ácido glutámico</i>
Bid <i>BH3 interacting domain death agonist</i>	GPCR <i>G protein-coupled receptor</i>
Bim <i>Bcl-2 like protein 11</i>	
BIR <i>Baculoviral IAP Repeat</i>	
Bok <i>Bcl-2-related ovarian killer</i>	

ABREVIATURAS

GSK3β <i>Glycogen Synthase Kinase 3β</i>	MLK3 <i>MAPK kinase kinase 11/Mixed lineage kinase 3</i>
Hrk <i>Bcl-2 interacting protein</i>	MOMP <i>Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization</i>
htt <i>huntingtin</i>	MPP⁺ <i>1-methyl-4-phenylpyridinium</i>
IAPs <i>Inhibitor of Apoptosis Protein</i>	MPTP <i>1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine</i>
ICE <i>Interleukin-1β-Converting Enzyme</i>	mPTP <i>mitochondrial Permeability Transition Pore</i>
IFNγ <i>Interferon gamma</i>	mRNA <i>messenger Ribonucleic Acid</i>
iGluR <i>Ionotropic Glutamate Receptor</i>	mTOR <i>mammalian Target of Rapamycin</i>
IL-1β <i>Interleukin 1 beta</i>	NADH <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>
iNOS <i>inducible Nitric Oxide Synthase</i>	NAIP <i>Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein</i>
IRS1/2 <i>Insulin Receptor Substrate 1/2</i>	NCCD <i>Nomenclature Committee on Cell Death</i>
JIP <i>JNK-Interacting Protein</i>	NF-κB <i>Nuclear Factor Kappa of activated B cells</i>
JNK <i>c-Jun N-terminal kinase</i>	NGF <i>Neurotrophic Growth Factor</i>
KA <i>Ácido kaínico</i>	NK <i>Natural killer</i>
KAR <i>Kainate receptor</i>	NMDA <i>N-Methyl-D-Aspartate</i>
KO <i>Knock-out</i>	NMDAR <i>N-Methyl-D-Aspartate Receptor</i>
MAP1B <i>Microtubule-associated protein 1B</i>	NO <i>Nitric Oxide</i>
MAP2 <i>Microtubule-associated protein 2</i>	Noxa <i>phorbol-12-myristate-13 acetate-induced protein</i>
MAPK <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>	NPY <i>Neuropeptide Y</i>
MAPKK/MAP2K <i>MAP Kinase Kinase</i>	Omi/HtrA2 <i>High temperature requirement serine protease</i>
MAPKKK/MAP3K <i>MAP Kinase Kinase Kinase</i>	PARP <i>Poly ADP Ribose Polymerase</i>
Mcl-1 <i>Myeloid cell leukemia 1</i>	PARP-1 <i>Poly-ADP-ribose polymerase-1</i>
Mef2c <i>Myocyte enhancer factor-2</i>	PCR <i>Polymerase chain reaction</i>
MEK1/2 <i>Dual specificity Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1/2</i>	PDK1 <i>Phosphoinositide-dependent kinase 1</i>
MEKs <i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinases</i>	PI3K <i>Phosphoinositide 3-Kinase</i>
mGluR <i>Metabotropic Glutamate Receptor</i>	
MK2 <i>MAPK-activated protein kinase 2</i>	
MLK <i>Mixed Lineage Kinase</i>	

PIP2 *Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate*

PIP3 *Phosphatidylinositol 3, 4, 5-biphosphate*

PKC *Protein Kinase C*

Pro *Prolina*

PRR *Pathogen Recognition Receptor*

Puma *Bcl-2 binding component 3*

Raf *Rapidly accelerated fibrosarcoma*

RIP *Receptor Interacting Protein*

ROS *Reactive Oxygen Species*

RTK *Receptor Tyrosine Kinase*

SAPK *Stress-Activated Protein Kinase*

SDH *Succinate dehydrogenase*

Ser *Serina*

SH2 *Src Homology*

sl stratum lucidum

slm stratum lacunosum-moleculare

Smac/DIABLO *Second mitochondrial-derived activator caspases/Direct IAP Binding protein*

SNC *sistema nervioso central*

SOM *Somatostatin*

sr stratum radiatum

Src *proto-oncogene c-Src*

TAK1 *TGF- β activated kinase 1*

Tau *microtubule-associated protein Tau*

Thr *Treonina*

TNF *Tumor Necrosis Factor*

TNF α *Tumor Necrosis Factor alpha*

TRADD *Tnfr1-Associated death domain protein*

TRAF2 *TNF receptor-associated factor2*

TRAIL *TNF-related apoptosis-inducing ligand*

Trk *Tropomyosin-receptor kinase*

Tyr *Tirosina*

VDAC *Voltaje-Dependent Anion Channel*

WT *Wild-type*

XIAP *x-Linked mammalian IAP*

I. INTRODUCCIÓN

1. MUERTE CELULAR

La muerte celular es un proceso que está estrechamente relacionado con el desarrollo fisiológico normal y con el mantenimiento de la homeostasis de los diferentes tejidos. Su regulación es esencial durante toda la vida del individuo y en este sentido, un mal funcionamiento de este proceso provoca la aparición de diferentes enfermedades, incluyendo las enfermedades neurodegenerativas y el cáncer (Cory and Adams 2002). En concreto, la muerte celular en el sistema nervioso central (SNC) es un fenómeno central que ocurre durante el envejecimiento y de manera prematura en el curso de numerosas patologías agudas y crónicas que afectan al cerebro. Entre ellas las más frecuentes, serían la isquemia cerebral, la epilepsia y las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica (Martin 2001). Hasta el momento se desconocen las causas y los mecanismos de muerte neuronal en estas enfermedades. Sin embargo, la sobreactivación de los receptores al glutamato (excitotoxicidad), el incremento de la concentración de calcio (Ca^{2+}) citoplasmático y la generación de ROS (*Reactive Oxygen Species*), son tres factores relacionados entre sí que parecen jugar un papel relevante en la inducción de la neurodegeneración en estas patologías (Coyle and Puttfarcken 1993; Tapia et al. 1999).

Los mecanismos intracelulares de muerte celular se han clasificado en función de distintos parámetros bioquímicos, inmunológicos y funcionales (Galluzzi et al. 2012; Kroemer et al. 2009). Esto ha dado lugar a múltiples tipos y definiciones de muerte celular como la apoptosis, la necrosis y la autofagia, que se han estudiado por separado y se han considerado mutuamente excluyentes. No obstante, los conocimientos adquiridos durante la última década sugieren que estos procesos de muerte celular están regulados por vías similares que involucran distintas proteínas, como caspasas, calpaínas, catepsinas y endonucleasas, y que pueden ser dirigidos desde diferentes orgánulos. Además, dependiendo del contexto y del estímulo, los diferentes procesos de muerte pueden actuar de manera independiente o colaborar entre ellos para facilitar la muerte celular (Broker et al. 2005; Nikolettou et al. 2013). Considerando los diferentes parámetros anteriormente mencionados, se ha descrito la apoptosis, la necrosis y la autofagia como los tres principales mecanismos de muerte celular (Figura I.1). Sin embargo, recientemente se han descrito otros mecanismos menos conocidos, como la necroptosis y la muerte celular programada (MCP) similar a la apoptosis (Boujrad et al. 2007; Galluzzi et al. 2012; Nikolettou et al. 2013).

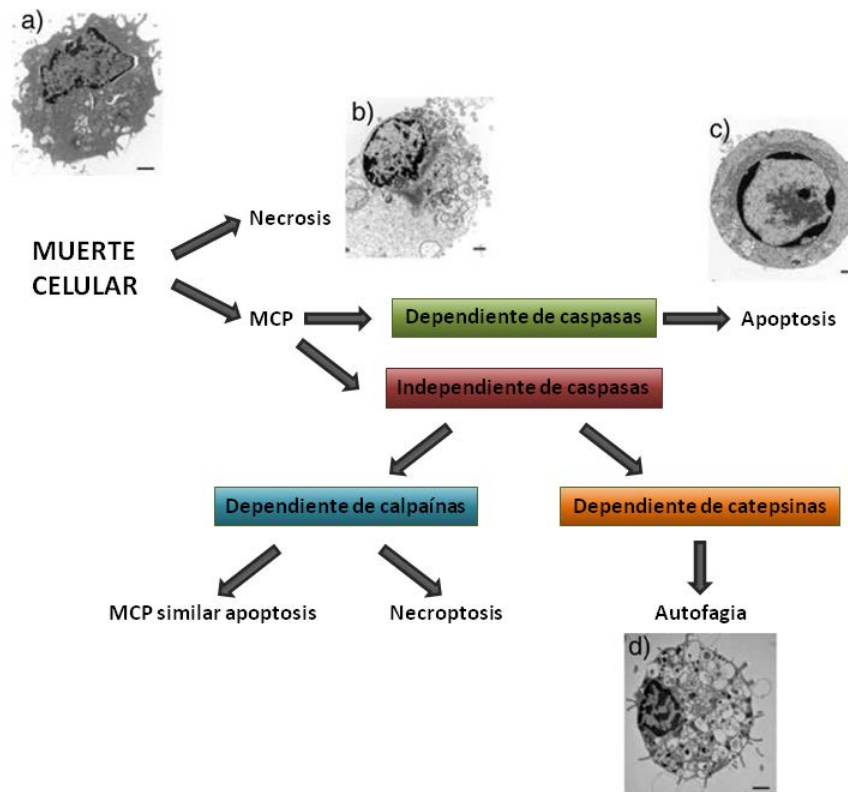


Figura I.1: Clasificación de diferentes tipos de muerte celular, dependiendo de la activación de diferentes proteínas y de las distintas características morfológicas de cada proceso. Diferentes características morfológicas de a) célula normal, b) célula necrótica, c) célula apoptótica y d) célula autofágica (adaptado de Nikolettou et al. 2013).

1.1 APOPTOSIS

El término apoptosis fue introducido por primera vez por Kerr y colaboradores (1972). Éste es un proceso resultante de la activación de diversos mecanismos codificados en el genoma y que presenta características morfológicas muy bien definidas, como la pérdida del volumen general de la célula, la condensación de la cromatina, la fragmentación del núcleo, la ruptura del DNA (*Deoxyribonucleic Acid*) en las zonas internucleosomales, el plegamiento de la membrana y la disgregación de la misma en pequeños glóbulos que pueden ser fagocitados, evitando provocar daño a las células vecinas (Kerr et al. 1972; Yuan et al. 2003).

La apoptosis es un proceso común y necesario en todos los organismos pluricelulares para su correcto funcionamiento fisiológico. Durante el desarrollo embrionario, la muerte celular es imprescindible en la formación de diferentes partes del organismo y en la eliminación de estructuras vestigiales. En organismos adultos, la apoptosis está relacionada con el

mantenimiento de la homeostasis de los tejidos, ya que interviene en procesos como la división celular y la eliminación de células dañadas, ya sea por defectos genéticos, por el envejecimiento, por acción de diferentes enfermedades o por la exposición a agentes nocivos (Reed 1999; Wyllie 1997).

Una excesiva o insuficiente apoptosis en la época adulta, contribuye a la patogénesis de una extensa variedad de enfermedades relacionadas con la isquemia, la neurodegeneración, el sistema inmune, las infecciones virales y el crecimiento o regresión de tumores (Ellis et al. 1986; Ferlini et al. 1999).

La apoptosis neuronal tiene un papel significativo en la patología de enfermedades neurodegenerativas del sistema nervioso central (SNC), como la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de Alzheimer, entre otras. La activación del mecanismo apoptótico, no es el único mediador de la muerte neuronal en enfermedades neurodegenerativas, pero sigue siendo un componente clave responsable del proceso neurodegenerativo (Vila and Przedborski 2003). Sin embargo, la descripción clásica del fenotipo apoptótico no es necesariamente aplicado a todas las circunstancias donde el proceso apoptótico prevalece. En situaciones de estrés celular inducidas por agentes físicos, toxinas o isquemia, las células pueden morir tanto por apoptosis como por otro mecanismo alternativo de muerte celular. La forma de muerte celular ya sea apoptótica, necrótica o de otro tipo, puede depender de la intensidad y durabilidad del estímulo dañino. Así, las células dañadas por un estímulo de estrés celular pueden activar el mecanismo apoptótico y secundariamente pueden terminar en procesos necróticos cuando los niveles de energía en las células son insuficientes para proseguir con la apoptosis (Saikumar et al. 1998; Wyllie 1997).

Los mecanismos moleculares involucrados en la apoptosis empezaron a ser caracterizados con estudios genéticos en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) (Ellis et al. 1986). En este organismo, las diferentes fases de la apoptosis están controladas por los genes *ced* (*C. elegans death genes*), altamente conservados en la evolución (Yuan 1996). Los productos proteicos de los genes *ced-3*, *ced-4* y *ced-9* (CED-3, CED-4, CED-9 respectivamente) forman un complejo y ante la presencia de un estímulo apoptótico, se provoca la disociación de CED-9 permitiendo que CED-4 active a CED-3 desencadenando la muerte celular (Spector et al. 1997; Seshagiri and Miller 1997). En mamíferos se han descrito moléculas mediadoras y reguladoras de la apoptosis homologas a CED-3, CED-4 y CED-9 (Chaudhary et al. 1998).

La apoptosis en mamíferos puede ser activada principalmente por dos vías centrales: la vía intrínseca o mitocondrial en la que diferentes señales de estrés extracelular o intracelular activan una vía celular que involucra la mitocondria y/o el retículo endoplasmático (Green and Reed 1998; Movassagh and Foo 2008); y la vía extrínseca, que implica la activación de receptores en la superficie celular por unión específica de ligandos de muerte extracelulares (Ashkenazi and Dixit 1998; Movassagh and Foo 2008).

1.1.1. PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA REGULACIÓN DE LA APOPTOSIS

1.1.1.1 CASPASAS

Las caspasas (*Cysteine Aspartyl-Specific Proteases*) son una familia de cisteína-proteasas que se encuentran como moléculas precursoras inactivas (procaspasas), y que al recibir la señal apoptogénica son proteolizadas, dando lugar a dos subunidades que constituyen la enzima activa o caspasa. Las proteínas de la familia de las caspasas son homólogas de CED-3 en *C. elegans* (Cerretti et al. 1992; Kid 1998; Zimmermann et al. 2001).

Las procaspasas constan de un prodominio N-terminal y dos subunidades, una de 20 kDa (p20) y otra de 10 kDa (p10). La activación proteolítica ocurre secuencialmente en sitios específicos de corte detrás de un residuo de ácido aspártico (Asp). En primer lugar, las procaspasas sufren una proteólisis entre las dos subunidades, y posteriormente el prodominio es eliminado de la subunidad de 20 kDa (Wolf and Green 1999). Estudios de cristalografía han revelado que tras la proteólisis de la procaspasa, ésta obtiene su forma funcional mediante la asociación de dos subunidades de 20 kDa y dos subunidades de 10 kDa, formando un tetrámero con dos sitios catalíticos activos (Walker et al. 1994; Wilson et al. 1994; Rotonda et al. 1996).

Hasta el momento, se conocen 14 miembros de esta familia de proteínas (Stegh and Peter 2002). La primera caspasa descrita en mamíferos se denominó ICE (*Interleukin-1 β -Converting Enzyme*) o caspasa 1. Ésta es precisamente uno de los miembros de la familia al que no se le ha relacionado con apoptosis sino con la inflamación, ya que es responsable de la proteólisis y activación de la citocina proinflamatoria IL-1 β (*Interleukin 1, beta*) (Earnshaw et al. 1999; Cerretti et al. 1992). La familia de las caspasas incluye a las caspasas procesadoras de citocinas e involucradas en inflamación, y a las caspasas involucradas en apoptosis (Alnemri et al. 1996).

Basándose en el análisis funcional dentro de la cascada apoptótica, las caspasas se pueden subdividir en caspasas iniciadoras o activadoras (caspasas -2, -8, -9, -10), y en caspasas efectoras o ejecutoras (caspasas -3, -6 y -7) (Figura I.2) (Alnemri et al. 1996; Vilita et al. 1997).

Las caspasas iniciadoras son las primeras que se activan tras un estímulo apoptótico. Poseen prodominios N-terminal largos que contienen unos motivos de interacción proteína-proteína característicos: los dominios DED (*Death Effector Domain*) en el caso de la caspasa-8 y -10, y el dominio CARD (*Caspase-Recruitment Domain*) en las caspasas-9 y -2. Por medio de ellos, éstas pueden interactuar con proteínas adaptadoras que presentan dominios homólogos. El mecanismo de activación de estas caspasas no es totalmente conocido. Se ha postulado que las caspasas iniciadoras se activaban mediante autoproteólisis al inducirse su agregación; lo que podría explicar por ejemplo, el reclutamiento tanto de caspasa-8 o -10 en el DISC (*Death Inducing Signaling Complex*) como el de caspasa-9 en el apoptosoma (Salvesen and Dixit 1999). Sin embargo, se ha propuesto otro mecanismo, en el cual la homodimerización de las caspasas es necesaria y suficiente para la activación de las caspasas iniciadoras (Boatright et al. 2003; Riedl and Shi 2004). Esto comporta que sean necesarios más estudios para dilucidar los mecanismos involucrados en el proceso de activación de las caspasas.

Las caspasas efectoras (-3, -6 y -7) son las encargadas de cortar múltiples sustratos celulares necesarios para la supervivencia celular como proteínas del citoesqueleto, proteínas reguladoras de la reparación del DNA o proteínas implicadas en el ciclo celular (Enari et al. 1998; Lee et al. 1997; Martin et al. 1995).

A diferencia de las caspasas iniciadoras, las caspasas efectoras poseen un prodominio N-terminal corto y no contienen dominios DED o CARD. Normalmente son procesadas y activadas por las caspasas iniciadoras. Aunque no se conoce totalmente el mecanismo de activación de las caspasas efectoras, se sabe que el corte proteolítico en los residuos específicos de Asp que separan las subunidades p20 y p10 es absolutamente necesario. Tras su proteólisis, su actividad catalítica aumenta varios órdenes de magnitud conduciendo a la muerte celular (Riedl and Shi 2004).

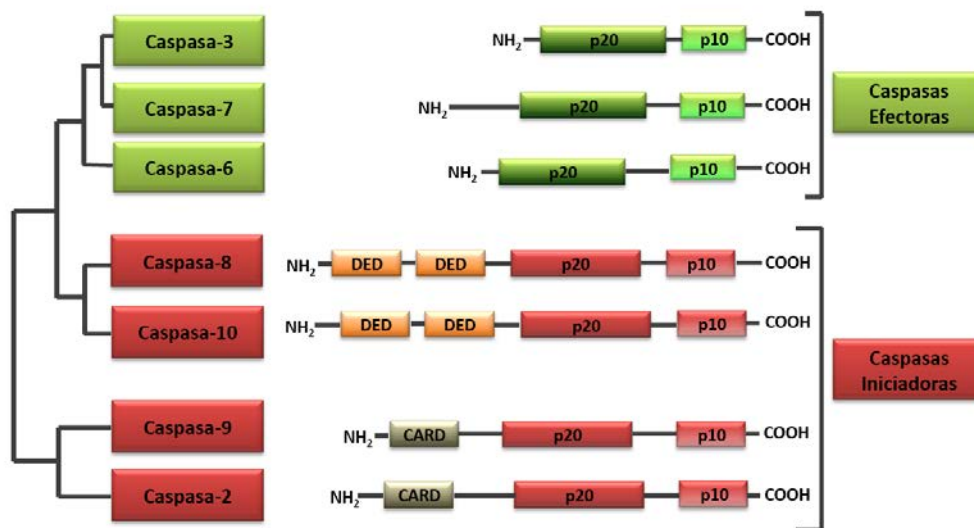


Figura I.2: Caspasas apoptóticas en mamíferos. Las caspasas efectoras e iniciadoras se presentan en verde y rojo, respectivamente. Ambas poseen dos subunidades catalíticas, una de 20kDa (p20) y otra 10kDa (p10). Los prodominios de las caspasas iniciadoras contienen los motivos de interacción CARD y DED (adaptado de Riedl and Shi 2004; Rupinder et al. 2007).

Debido al papel importante que juegan las caspasas en la actividad celular, existen diferentes mecanismos reguladores de su actividad, como las proteínas IAPs (*Inhibitor of Apoptosis Protein*) y las proteínas cFLIP (*cellular FLICE-like inhibitory protein*) (Crook et al. 1993).

Las proteínas IAPs fueron identificada por primera vez en baculovirus, por su habilidad para impedir la apoptosis en la célula infectada mediante la inactivación de la actividad caspasa (Deveraux et al. 1999). Hasta la fecha, se han identificado 8 proteínas IAP en mamíferos, entre las que se encuentran NAIP (*Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein*), XIAP (*x-Linked mammalian IAP*), cIAP1 (*cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1*), cIAP2 (*cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 2*) y survivina. (Roy et al. 1997). Las IAPs son inhibidores directos de las caspasas, y son las únicas proteínas endógenas conocidas capaces de regular la actividad tanto de las caspasas iniciadoras como de las efectoras. Todas ellas se caracterizan por la presencia del dominio formado por 70-80 aminoácidos llamado BIR (*Baculoviral IAP Repeat*), de forma que todos los miembros de esta familia contienen de una a tres copias de este dominio (Deveraux et al. 1999). En particular, XIAP, cIAP1, cIAP2 están descritas como inhibidoras de la caspasa-3, -6, y -7 y como bloqueadoras de la activación de la procaspasa-9, inducida por la liberación del citocromo c de la mitocondria (Deveraux et al. 1999; Roy et al. 1997).

Otras proteínas como las cFLIP, presentan homología con caspasa-8 y son capaces de inhibir la activación de la caspasa-8 o -10, mediante su capacidad para competir por los dominios de

muerte, DED, de la proteína FADD (*Fas-Associated Death Domain*). Esta proteína es responsable de reclutar caspasa-8 junto con el receptor de muerte de la vía extrínseca de la apoptosis (Scaffidi et al. 1999; Thome et al. 1997). Además, cFLIP posee dos copias del dominio DED en su extremo N-terminal que son esenciales para su mecanismo de acción. A pesar de que existen varias formas de cFLIP a nivel de mRNA (*messenger Ribonucleic Acid*), sólo 3 isoformas se han detectado a nivel de proteína: cFLIP_L, cFLIP_S, cFLIP_R (Golks et al. 2005).

1.1.1.2 PROTEÍNAS DE LA FAMILIA Bcl-2

Esta familia de proteínas desempeña un papel clave en el control de la vía intrínseca de la apoptosis. Los miembros de la familia Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) se caracterizan por poseer de uno a cuatro dominios, conocidos como BH (*Bcl-2 Homology*), que les confiere la capacidad de interactuar entre ellos para formar homodímeros y heterodímeros, regulando así su función (Figura 1.3). Las proteínas Bcl-2 son afines de CED-9 en *C. elegans* (Cory and Adams 2002). La familia Bcl-2 se puede clasificar en tres diferentes subfamilias, una subfamilia de miembros antiapoptóticos y dos subfamilias de miembros proapoptóticos (Cory et al. 2003; Gross et al. 1999).

- Clase 1: Proteínas antiapoptóticas multidominio

Las proteínas antiapoptóticas multidominio generalmente se encuentran insertadas en la membrana externa mitocondrial, aunque también se pueden detectar en el citosol o unidas a la membrana del retículo endoplasmático. Incluyen a las proteínas Bcl-2, Bcl-X_L (*B-cell lymphoma-extra large*), Bcl-w (*Bcl-2 like protein 2*), Mcl-1 (*Myeloid cell leukemia 1*) y A1 (*Bcl-2 related protein 1*), con cuatro dominios BH (Certo et al. 2006; Cory and Adams 2002). Los dominios BH1, BH2 y BH3 forman una cavidad hidrofóbica que permite la interacción con las proteínas proapoptóticas *BH3-only* (Cheng et al. 2001; Kelekar et al. 1997). Además, estas proteínas pueden prevenir la muerte celular por inhibición de la oligomerización entre las proteínas proapoptóticas Bax (*Bcl-2-associated X protein*) y Bad (*Bcl-2-associated death promoter*), ya que secuestran el dominio activador BH3 de las proteínas proapoptóticas (Cheng et al. 1996; 2001; Kuwana et al. 2005).

- Clase 2: Proteínas proapoptóticas multidominio tipo Bax

Las proteínas proapoptóticas multidominio contienen los dominios BH1, BH2 y BH3. Son exclusivamente proapoptóticas e incluyen a las proteínas Bax, Bak (*Bcl-2 homologous antagonist/killer*) y Bok (*Bcl-2-related ovarian killer*), esenciales para la apoptosis en muchos tipos celulares (Cory and Adams 2002; Krajewski et al. 1993). En condiciones normales, estas proteínas se encuentran en forma de monómeros inactivos. Bax se localiza principalmente en el citosol (Wolter et al 1997), mientras que Bak es constitutivamente mitocondrial (Griffiths et al 1999). En respuesta a estímulos dañinos, Bax y/o Bak son activadas, sufriendo un cambio conformacional que provoca la exposición del dominio BH3, a través del cual dimerizan para formar el poro mitocondrial, provocando la permeabilización de la membrana mitocondrial (Cartron 2004; Wei et al. 2000; Marani et al. 2002). Se ha observado que Bax y Bak controlan la homeostasis del calcio (Ca^{2+}) en el retículo endoplasmático, y que en respuesta a agentes que liberan Ca^{2+} del retículo endoplasmático inducen la apoptosis. Por otro lado, también se ha observado cómo estas proteínas están implicadas en la apoptosis mediada por receptores de muerte (Kandasamy et al. 2003).

- Clase 3: Proteínas proapoptóticas BH3-only

Las proteínas proapoptóticas BH3-only juegan un papel crucial como sensores del estrés celular, y como su nombre indica, solamente presentan el dominio BH3. Éstas son las encargadas de, ante estímulos durante el desarrollo o daño intracelular, activar las proteínas proapoptóticas multidominio para una inducción efectiva de la muerte celular (Huang and Strasser 2000). Miembros de esta subfamilia son las proteínas Bid (*BH3 interacting domain death agonist*), Bad, Bim (*Bcl-2 like protein 11*), Hrk (*Bcl-2 interacting protein*), Noxa (*phorbol-12-myristate-13 acetate-induced protein*), Puma (*Bcl-2 binding component 3*), entre otras. A su vez, esta subfamilia se puede subdividir en función de su capacidad para interactuar con las proteínas antiapoptóticas o con las proteínas proapoptóticas multidominio (Zimmerman et al. 2001). Aquellas que interactúan sólo con las proteínas antiapoptóticas se denominan “sensibilizadoras”, sin embargo, las que pueden interactuar tanto con las proteínas antiapoptóticas como con las proapoptóticas se denominan “activadores directos”. Es el caso de Bid, Bim y posiblemente Puma. Las proteínas BH3-only están altamente reguladas, tanto a nivel transcripcional, como es el caso de Puma, Noxa y Hrk, como a nivel post-transcripcional, como Bad y Bim (Fu et al. 2009; Xiao et al. 2008). Algunas proteínas BH3-only pueden ser activadas por cortes proteolíticos, como la proteína Bid que es proteolizada por la caspasa-8,

generando su forma activa tBid, que expone el dominio BH3. Además, cada una de estas proteínas tiene un perfil único y característico de unión a las proteínas antiapoptóticas, lo que posiblemente permite un control más específico en cada tejido y para cada estímulo (Chipuk et al. 2010).

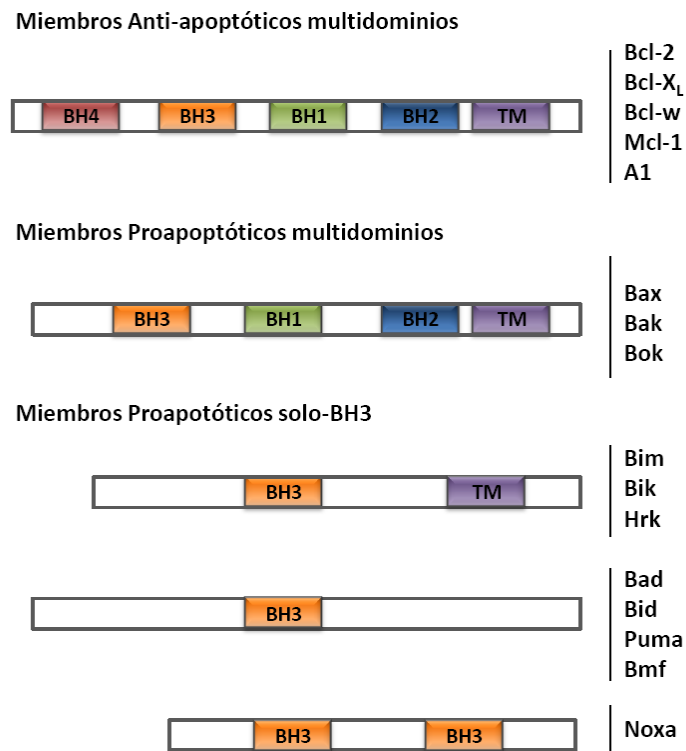


Figura I.3: Proteínas de la familia Bcl-2. Se subdivide en tres diferentes subfamilias: antiapoptóticas que promueven la supervivencia, proapoptóticas multidominio y BH3-only que facilitan la apoptosis. Los dominios BH están presentes en todas ellas, mientras que el dominio transmembrana TM sólo se encuentra en algunas de las proteínas Bcl-2 (adaptado de Strasser 2005; Zimmerman et al. 2001).

1.1.1.3 CALPAÍNAS

Las calpaínas son endoproteasas de cisteína no lisosomales activadas por Ca²⁺ intracelular, relacionadas con los procesos apoptóticos y muy conservadas en la evolución (Goll et al. 2003; Momeni 2011).

En mamíferos, las calpaínas se pueden clasificar en dos grandes grupos, según su distribución en los tejidos: i) calpaínas que son específicas de tejido, como la calpaína-3 (músculo esquelético) y la calpaína-9 (estomago); y ii) calpaínas que se expresan de forma ubicua en los tejidos, como la μ -calpaína (calpaína I) y la m-calpaína (calpaína II). La calpaína I y la calpaína II

se distinguen *in vitro* por los diferentes niveles de Ca^{2+} requeridos para su activación: de 2-80 μM para la calpaína I y 0.2-0.8 mM para la calpaína II (Ray et al. 2003; Momeni 2011). Ambas proteínas son heterodímeros compuestos por una subunidad catalítica de 80 kDa y una subunidad reguladora de 30 kDa, que se encuentran en forma de proenzimas en el citosol (Ray et al. 2003). La subunidad catalítica contiene el dominio de actividad proteasa y de unión al Ca^{2+} , mientras que la subunidad reguladora presenta una región rica en glicinas que permite interactuar con la membrana (Aoki et al. 1986). Estos proenzimas están inactivos en el citosol, a una concentración basal intracelular de Ca^{2+} libre de 50-100 nM (Pietrobon et al. 1990). En condiciones patológicas, asociadas a un incremento de Ca^{2+} libre intracelular, los proenzimas se activan, probablemente por una desregulación del inhibidor endógeno calpastatína (Wingrave et al. 2003; Neumar et al. 2001).

La activación de las calpaínas está implicada en la muerte neuronal, como la que ocurre en lesiones de la medula espinal, esclerosis múltiple, isquemia neuronal (Wingrave et al. 2003; Goll et al. 2003) y también en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica (Tsuji et al. 1998; Mouatt-prigent et al. 1996; Ueyama et al. 1998). Además, se ha descrito que las calpaínas son responsables de la apoptosis en células gliales (Ray et al. 1999; Ray et al. 2002).

La implicación de las calpaínas activadas en la apoptosis neuronal se sugiere porque median la degradación de diferentes proteínas del citoesqueleto, de la membrana y de la matriz extracelular, como las lamininas (Santella and Carafoli 1997). La intervención de las calpaínas en la apoptosis se estudió inicialmente a partir de la expresión de la proteína α -espectrina, que es una proteína reguladora del citoesqueleto. Esta proteína es un sustrato tanto de las caspasas, como de las calpaínas, lo que sugiere que los dos tipos de proteasas pueden activarse en simultáneo durante la apoptosis (Wang 2000). Además de la α -espectrina, estas proteasas comparten otros sustratos como: la proteína Tau (*microtubule-associated protein Tau*), que es una proteína asociada a los microtúbulos; la PARP (*Poly ADP Ribose Polymerase*), que interviene en la reparación del DNA; y las cinasas dependientes de calmodulina, Bax, Bcl-2 o p35 entre otras (Wood et al 1998; Siman et al 1990; Shah et al 1996). Los sustratos de las calpaínas están implicados en el mantenimiento de la integridad de las estructuras neuronales, esenciales para una función celular normal y de supervivencia, y por tanto su degradación conduce a la apoptosis (Springer et al. 1997).

1.1.2 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LA APOPTOSIS

1.1.2.1 VÍA EXTRÍNSECA

La vía extrínseca o de receptores de muerte ha sido ampliamente estudiada para definir la muerte celular inducida por señales de estrés extracelular, como citocinas proapoptóticas y proinflamatorias, detectadas por receptores de membrana específicos. Esta vía se inicia en la membrana celular tras la unión de distintos ligandos, como FasL (*Fas ligand*), TNF α (*Tumor Necrosis Factor alpha*) y TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) a sus respectivos receptores Fas, TNFR1 (*TNF-Receptor member 1*) y TRAILR1/R2 (*TRAIL receptor1/2*) (Figura I.4) (Ashkenazi and Dixit 1998). La unión del ligando induce la homotrimerización del receptor y, de este modo, el receptor de muerte recluta proteínas adaptadoras como FADD (*Fas-Associated Death Domain*), que posee los dominios de muerte, DED, capaces de interactuar con la procaspasa-8 o -10, formando el complejo intracelular multiproteico denominado DISC (Kischkel et al. 1995). La proteína caspasa-8 activa es suficiente para activar a caspasas efectoras que ejecutan la apoptosis. Igualmente, la caspasa-8 media la activación de miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2, como la proteína Bid, responsable de la liberación del citocromo *c* de la mitocondria, desencadenando la activación de la vía intrínseca de la apoptosis (Luo et al. 1998; Li et al. 1998). Por otra parte, a través de la vía de señalización de los receptores de muerte, la activación de caspasas puede ser regulada por cFLIP, la cual bloquea la interacción de caspasa-8 con los complejos receptor-proteína adaptadora (Figura I.5).

1.1.2.1.1 RECEPTORES DE MUERTE

Los receptores de muerte pertenecen a la superfamilia de receptores de TNF (*Tumor Necrosis Factor*), que estructuralmente conservan una región rica en cisteínas en sus dominios extracelulares y que comparten un dominio intracelular homólogo, denominado DD (*Death Domain*). Dicho dominio es fundamental para la transmisión de la señal apoptótica, ya que permite reclutar proteínas señalizadoras que también poseen un dominio DD (Ashkenazi and Dixit 1998; Smith et al. 1994; Tartaglia et al. 1993). Los receptores más ampliamente estudiados incluyen a Fas (o CD95), a TNFR1, a DR3 (*Death receptor 3*), y a los receptores TRAIL (DR4 y DR5) (Smith et al. 1994; Pan et al. 1997). Los principales ligandos específicos son TNF α que se une a TNFR1, FasL que se une al receptor de Fas, Apo3L (*TNF ligand member 12*) que se une a DR3, y TRAIL/Apo2L que se une a DR4 o DR5 (Figura I.4) (Chiceportiche et al. 1997; Pan et al. 1997; Wiley et al. 1995).

La activación de los receptores de muerte no siempre transduce señales de muerte celular por la cascada de caspasas, ya que también transduce señales intracelulares relacionadas con proliferación, supervivencia o regulación de expresión génica a partir de la vía de NF- κ B (*Nuclear Factor-kappa of activated B cells*) o AP-1 (*Activator Protein 1*) (Ashkenazi and 1999; Schutze et al. 2008).

- Señalización por Fas/FasL

El receptor de Fas se encuentra en diferentes tipos celulares, como linfocitos T y B activados, macrófagos, células hepáticas, células neurales, células intestinales y células cardíacas. Su expresión puede aumentarse por la acción de citocinas como IFN- γ (*Interferon gamma*) y TNF α . Asimismo, FasL es una citocina presente en linfocitos T y B activados, en macrófagos, en células NK (*Natural killer*), en neuronas y en astrocitos (Nagata and Golstein 1995; Suda et al. 1993; Watanabe-Fukunaga et al. 1992).

La unión de FasL a su receptor específico (Fas), provoca el reclutamiento y unión de otras moléculas adaptadoras como FADD (Schmitz et al. 2000; Vincenz 2001), que contiene dos dominios importantes: el DD que interacciona con Fas, y el DED que transmite la señal apoptótica a proteínas iniciadoras como la caspasa-8, ya que ésta tiene también un dominio DED y puede activar a caspasas efectoras de la apoptosis, como la caspasa-3 (Figura I.4) (Ashkenazi and Dixit 1998; Yeh et al. 1998; Zhang et al. 1998).

La apoptosis inducida por Fas puede inhibirse por acción de moléculas intracelulares como cFLIP, que tiene un dominio DED con el que puede unirse a FADD, evitando así su interacción con caspasa-8 y bloqueando la apoptosis mediada por Fas (Irmeler et al. 1997). Por otra parte, FasL no sólo está relacionado con muerte celular, sino también con la respuesta inmune, ya que se ha descrito su implicación en la proliferación y activación de linfocitos T (Nagata 1997).

- Señalización por TNFR1/TNF α

TNF α es una citocina proinflamatoria principalmente secretada por células T y macrófagos activados en respuesta a infecciones (Tartaglia and Goeddel 1992). Su función está implicada en la regulación de un amplio espectro de procesos biológicos, incluyendo proliferación celular, diferenciación y apoptosis (Wajant et al. 2003). Cuando TNF α se une a TNFR1 induce la asociación de diferentes moléculas adaptadoras, como TRADD (*Tnfr1-Associated death domain protein*), RIP (*Receptor Interacting Protein*) y TRAF2 (*TNF receptor-associated factor2*). De este

modo, se forma el complejo I de membrana que inducirá la vía de NF- κ B, debido a que TRAF2 es capaz de reclutar a cIAP1 y cIAP2. Por otra parte, TRADD puede disociarse de TNFR1 y asociarse a FADD, que presenta un dominio DED, permitiendo así su unión a procaspasa-8, formando el complejo II citoplasmático (Figura I.4) (Micheu and Tschopp 2003; Wang et al. 1998).

Dependiendo de los diferentes contextos celulares, se formará el complejo I o II tras la activación de TNFR1, pudiéndose generar señales tan distintas como apoptosis o supervivencia celular (Hughes et al. 2009; Oberst et al. 2010).

- Señalización por DR3/Apo3L

El receptor DR3 presenta una estrecha similitud con TNFR1, y está implicado tanto en la apoptosis, como en la activación de la vía NF- κ B (Chinnaiyan et al. 1996; Kitson et al. 1996). Tras la activación de DR3 por su ligando Apo3L se puede inducir la apoptosis, o bien activar la vía de NF- κ B mediante los mismos mecanismos descritos para TNFR1 (Masters et al. 1998).

- Señalización por DR4 y DR5/TRAIL

Los receptores DR4 y DR5 son codificados por genes que se encuentran en el mismo cromosoma y comparten el mismo ligando, TRAIL, también llamado Apo2L, un miembro de la familia TNF que presenta similitud con FasL (Pitti et al. 1996; Wiley et al. 1995). TRAIL desencadena, de una forma parecida a FasL, un mecanismo rápido de apoptosis en muchas líneas celulares tumorales (Mariani et al. 1997; Marsters et al. 1996). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con FasL, que presenta una expresión muy restringida, el mRNA de TRAIL se expresa constitutivamente en la mayoría de los tejidos (Wiley et al. 1995). Además puede unirse a cinco receptores diferentes, siendo TRAIL-R1 (DR4) y TRAIL-R2 (DR5) los únicos que presentan un dominio DD y que son capaces de inducir la apoptosis (Ashkenazi and Dixit 1998).

Diferentes estudios evidencian que la vía activada por TRAIL induce a la apoptosis y a la consecuente activación de caspasas. Sin embargo, es independiente de la vía de señalización de Fas (Pan et al. 1998; Schneider et al. 1997). Cuando TRAIL se une a sus receptores proapoptóticos, éstos se agregan formando homo o heterodímeros (Kischkel et al. 2000; Sprick et al. 2000), y esta conformación permite el reclutamiento de proteínas citoplasmáticas específicas, como FADD y caspasa-8 o -10. De este modo, se forma el DISC que puede activar a

las caspasas efectoras (caspasa-3 y -7) o cortar la proteína Bid accionando la ruta mitocondrial de apoptosis (Sprick et al. 2000).

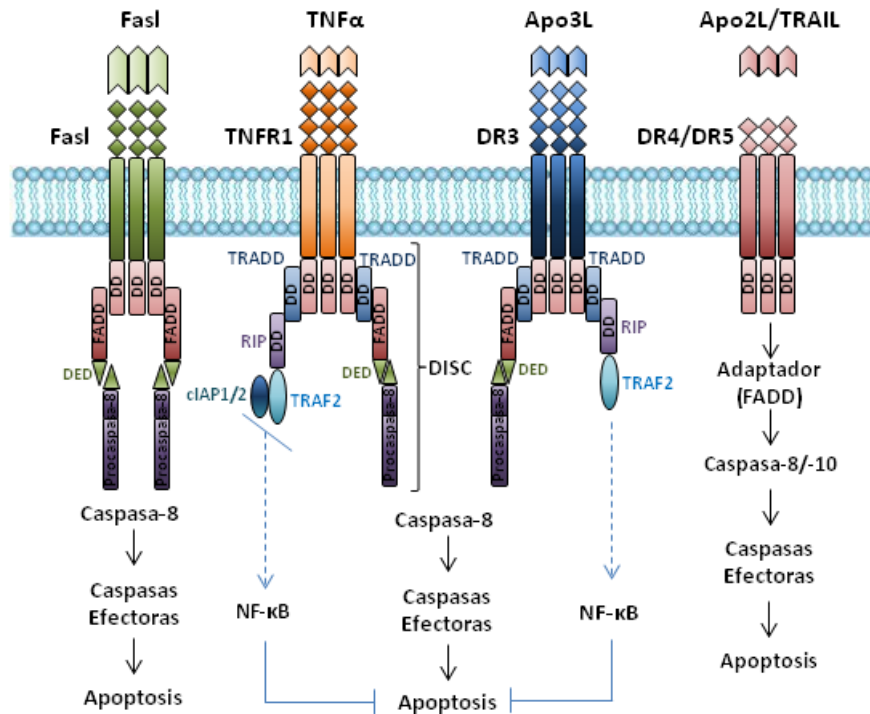


Figura I.4: Ligandos y receptores de muerte celular de la familia TNF. Señalización apoptótica de Fas; señalización proapoptótica y antiapoptótica de TNFR1 y DR3; señalización de receptores DR4 y DR5 (adaptado de Ashkenazi and Dixit 1998).

1.1.2.2 VÍA INTRÍNSECA

La vía intrínseca o mitocondrial se induce a partir de estímulos extracelulares e intracelulares como toxinas, radiación, hipoxia, estrés oxidativo, daño al DNA, isquemia o privación de factores tróficos (Foo et al. 2005). Actualmente, la señalización inducida por los diferentes estímulos no está totalmente descrita, pero todos ellos parecen convergir en el mismo orgánulo mediador central de la vía intrínseca, la mitocondria.

La permeabilización de la membrana mitocondrial, o MOMP (*Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*), se manifiesta normalmente por una disipación del potencial de membrana ($\Delta\psi_m$), que es el evento responsable de la liberación irreversible de factores proapoptóticos o apoptogénicos del espacio intermembrana al citosol (Goldstein et al. 2000; Green and Kroemer 2004). El mecanismo a través del cual se produce la MOMP durante la apoptosis todavía es un

tema controvertido. Se han propuesto dos posibles mecanismos: i) basado en la apertura de un “mega” canal denominado mPTP (*mitochondrial Permeability Transition Pore*) formado por tres proteínas principales, VDAC (*Voltaje-Dependent Anion Channel*) presente en la membrana externa; ANT (*Adenine Nucleotide Translocater*) ubicado en la membrana interna y CypD (*Cyclophilin D*) en la matriz mitocondrial (Sullivan et al. 2005; Tsujimoto and Shimizu 2007); y ii) estrechamente regulado por un grupo de proteínas pertenecientes a la familia Bcl-2 y que actúan directamente en la membrana mitocondrial externa. Es el caso de las proteínas Bax y Bak, que una vez activadas, pueden interaccionar entre ellas y dimerizar, formando poros que permeabilizan la membrana mitocondrial (Krajewski et al 1993; Monaghan et al 1992).

Ya sea a través de uno u otro mecanismo, la inducción de la MOMP precipita la célula a la muerte por liberación de diferentes proteínas como el citocromo *c*, la proteína Smac/DIABLO (*Second mitochondrial-derived activator caspases/Direct IAP Binding protein*), la proteasa Omi/HtrA2 (*High temperature requirement serine protease*), el AIF (*Apoptosis-Inducing Factor*) y la EndoG (*Endonuclease G*) (Green and Kroemer 2004). En concreto, la liberación del citocromo *c* es un fenómeno crítico, ya que éste interacciona con la proteína citosólica APAF-1 (*Apoptotic protease activating factor-1*) y en presencia de dATP (*Deoxyadenosine triphosphate*) recluta la procaspasa-9. De esta manera, se forma un complejo heptamérico conocido como apoptosoma que ejecuta el programa apoptótico (Li et al. 1997). La formación de este complejo induce a un cambio conformacional y la activación proteolítica de la procaspasa-9, que a su vez activa a la caspasa-3 o -7 (Figura I.5) (Konopleva et al. 1999).

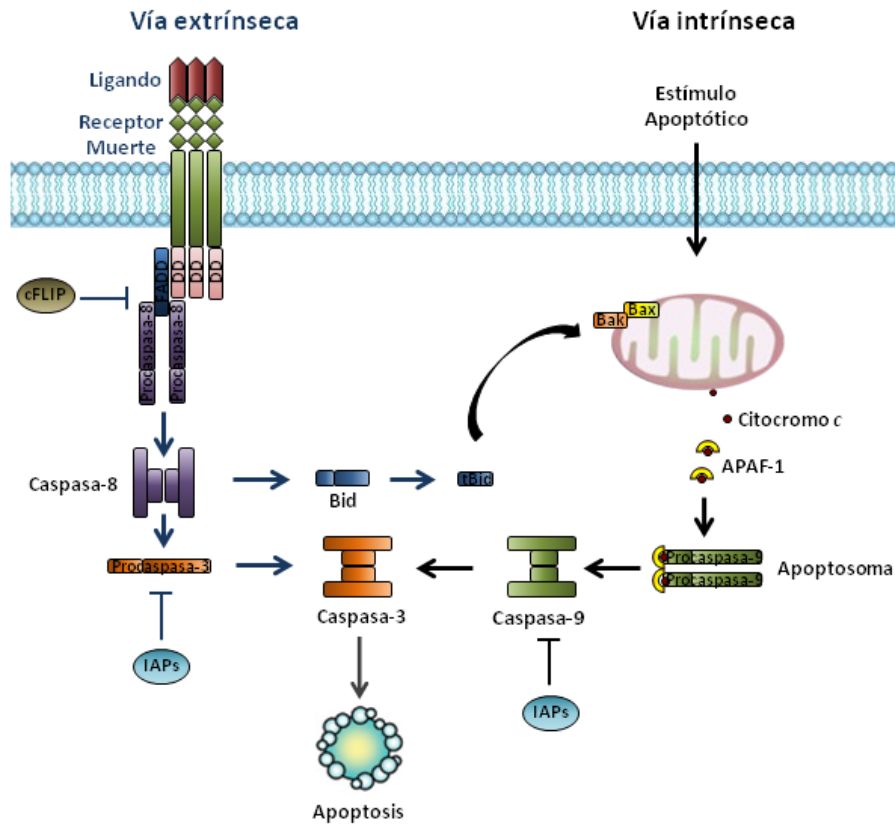


Figura I.5: Vías extrínseca e intrínseca de apoptosis. La vía extrínseca o de receptores de muerte, es mediada por caspasa-8, mientras que la vía intrínseca o mitocondrial es mediada por caspasa-9. Las dos vías están interconectadas por tBid, la forma proteólizada de la proteína Bid por caspasa-8 activa (adaptado de Franklin 2011; Hotchkiss and Nicholson 2006).

Además de la apoptosis, existen otros mecanismos de muerte celular que pueden ocurrir de manera dependiente o independiente a la activación de caspasas. Los más bien caracterizados son la necrosis, necroptosis o necrosis programada, autofagia y muerte celular programada similar a apoptosis.

1.2 NECROSIS

La muerte por necrosis transcurre en situaciones de ataque drástico a la membrana citoplasmática, y no está asociada a la activación de caspasas (Yuan et al. 2003). Las células necróticas se caracterizan morfológicamente por una extensa vacuolización del citoplasma, dilatación de orgánulos citoplasmáticos, y un aumento del volumen celular que conlleva a la ruptura de la membrana plasmática (Figura I.1b) (Festjens et al. 2006; Golstein and Kroemer 2007). En la necrosis, el núcleo se mantiene relativamente intacto, por lo que es de las últimas

estructuras en perder su integridad. Las células son lisadas sin formarse vesículas y en consecuencia, el contenido celular que contiene sustancias reactivas y enzimas, es liberado al espacio extracelular, afectando las células adyacentes y derivando en una respuesta inflamatoria (Mozoluk et al. 2002; Nikolettou et al. 2013).

1.3 NECROPTOSIS O NECROSIS PROGRAMADA

Estudios recientes muestran la existencia de un mecanismo de muerte celular por necrosis que ocurre bajo condiciones estrictamente reguladas, y que desempeña un importante papel en muchas condiciones fisiológicas y patológicas, como por ejemplo, en la neurodegeneración, en la muerte por isquemia, o en un proceso de infección (Nikolettou et al. 2013).

Los distintos receptores de muerte como TNFR1, Fas, TRAIL-R1 o TRAIL-R2, que normalmente inducen la apoptosis mediante la vía extrínseca, se han relacionado también con la necroptosis. Este proceso sucede cuando la apoptosis se encuentra bloqueada por inhibidores de caspasas y por bajos niveles de ATP (Scheller et al. 2006; Skulachev 2006). La necroptosis también puede ser inducida por miembros de la familia PRR (*Pathogen Recognition Receptor*) presentes en células del sistema inmune innato (Vandenabeele et al. 2010). Sin embargo, los mecanismos moleculares concretos después de la activación de los receptores de muerte son actualmente desconocidos.

La vía de inducción de la necroptosis más ampliamente caracterizada es la iniciada por los ligandos de muerte, específicamente a través de TNFR1 (He et al. 2009; Zhang et al. 2009). La unión de TNF α a TNFR1 permite la internalización y formación del complejo citoplasmático, DISC. Pero en caso de una inhibición de las caspasas iniciadoras, ya sea farmacológica o genética, no se podrá iniciar la apoptosis, induciéndose así la necrosis programada o necroptosis (Vandenabeele et al. 2010; Lin et al. 1999).

1.4 AUTOFAGIA

La autofagia es un mecanismo muy conservado evolutivamente y ocurre en todas las células eucariotas, desde las levaduras hasta los mamíferos (Levine and Klionsky 2004). Se define morfológicamente por estructuras de doble membrana que rodean orgánulos intracelulares y

material citoplasmático, formándose vesículas denominadas autofagosomas (Figura I.1d). Estas vesículas se fusionan con lisosomas que contienen enzimas hidrolíticos, formándose un autolisosoma (Levine and Kroemer 2008). Este proceso sucede de forma habitual en las células, pudiendo ser inhibido o inducido según condiciones celulares y señales fisiológicas como hormonas, factores de crecimiento o infecciones por patógenos (Yang and Klionsky 2010). En muchas condiciones, se ha observado que la autofagia constituye un mecanismo citoprotector, activado en respuesta a diversos tipos de estrés y su inhibición acelera, más que prevenir, la muerte celular (Galluzzi et al. 2007).

El papel citoprotector de la autofagia puede prevenir la apoptosis o la necrosis. Sin embargo, este proceso celular podrá ser también considerado como un mecanismo de muerte celular. La activación de la autofagia más allá de cierto umbral puede promover la muerte celular directa, y provocar el colapso de funciones celulares dando como resultado la atrofia celular. Por otra parte, la autofagia puede conducir a la ejecución de la apoptosis presumiblemente a través de la familia de proteínas reguladoras de Bcl-2 (He and Klionsky 2009; Kroemer et al. 2010; Mizushima et al. 2008).

La interrelación entre la autofagia y la muerte celular apoptótica o necrótica es compleja, y no completamente entendida. Tanto la autofagia como la apoptosis, son procesos biológicos controlados que presentan un papel importante en el desarrollo, en la homeostasis y en diferentes enfermedades (Liang et al. 2007). La mayoría de los estudios demuestran que la autofagia es activada por un estrés metabólico, pudiendo ser una respuesta adaptativa al estrés del retículo endoplasmático (Ding et al. 2007).

1.5 MUERTE CELULAR PROGRAMADA SIMILAR A APOPTOSIS

El término de muerte celular programada similar a apoptosis, fue introducido para describir casos donde la muerte celular presenta características morfológicas apoptóticas como la condensación nuclear de la cromatina, entre otras, y que sucede de forma independiente de caspasas. Este proceso necesita la activación de la proteína AIF y de la proteína PARP-1 (*Poly-ADP-ribose polymerase-1*) (Boujrad et al. 2007; Jaattela and Tschopp 2003). AIF es una flavoproteína, ubicada en el espacio intermembrana de la mitocondria y está implicada en la regulación de la cadena respiratoria mitocondrial en el complejo I (Delettre et al 2006). Este mecanismo está asociado con la proteólisis de AIF en su forma soluble (tAIF) mediada por

calpaínas y catepsinas, permitiendo su liberación de la mitocondria y translocación al núcleo. Esta liberación normalmente se desarrolla bajo el incremento de los niveles de Ca^{2+} intracelular y el daño al DNA. Elevados niveles de calcio participan en la despolarización de la membrana mitocondrial, que conduce a la pérdida del potencial de membrana y a la generación de ROS (Capon et al. 2012; Moubarak et al. 2007).

2. INFLAMACIÓN EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC)

La inflamación en el SNC, específicamente en el cerebro, se caracteriza por una respuesta de las células gliales, principalmente de la microglía y de los astrocitos, a un daño cerebral, un trauma o una infección. La respuesta inflamatoria que se presenta en muchas enfermedades neurodegenerativas, se denomina comúnmente neuroinflamación (Shastri et al. 2013). En este proceso intervienen diferentes componentes moleculares y celulares del sistema inmune, como citocinas, quimiocinas y factores del complemento; que conducen a la activación de las células gliales, como la microglía y la astrogliá. Una vez este proceso se ha llevado a cabo, la inflamación desaparece y empieza el proceso curativo de la lesión. Sin embargo, si el estímulo patológico se mantiene, la reacción inmunológica adquiere un carácter crónico, y la activación glial persistente puede ser destructiva, inadecuada y demasiado prolongada, tal y como ocurre en las enfermedades neurodegenerativas (Marchetti 2005; Orr et al. 2002).

2.1 MICROGLÍA

Las células microgliales se caracterizan por su pequeño tamaño, con un denso núcleo y prolongaciones cortas. La microglía representa a las principales células efectoras de la respuesta inflamatoria en el SNC. Estas células ejercen una función fagocítica, e interactúan con otras células gliales y neuronas (Mack et al. 2003). Fisiológicamente, la microglía está en parte vinculada con la neuroprotección, sin embargo, en condiciones fisiopatológicas, la microglía activa secreta una gran cantidad de sustancias: citocinas proinflamatorias, prostaglandinas, factores neurotróficos, ROS y NOS (*Nitric Oxide Synthase*), contribuyendo al proceso neurodegenerativo (Kata and Walz 2000). Si este proceso se mantiene durante un tiempo prolongado puede ser perjudicial para la neurona, estableciendo una situación de

destrucción celular a causa de la activación de la microglía y de la inflamación, que puede tener como resultado final, la muerte neuronal (Orr et al. 2002).

2.2 ASTROCITOS

Los astrocitos representan a las principales y más numerosas células gliales. Se caracterizan por tener una gran cantidad de prolongaciones que irradian del soma hacia las células vecinas. Durante décadas, la astrogliá fue considerada como un componente pasivo de las neuronas, considerándose células de soporte de la neuroglia, sin embargo, recientemente se ha descrito una intercomunicación entre células gliales y neuronas, donde los astrocitos presentan un papel importante en la modulación de la actividad sináptica neuronal (Gill et al. 2008; Matyash and Kettenmann 2009). Los astrocitos, a la vez que pueden prevenir la muerte celular y promover la proliferación y diferenciación por producción de factores de crecimiento (Braun et al. 2009) en condiciones fisiopatológicas, también pueden contribuir al daño cerebral, liberando ROS y factores proinflamatorios (Heneka et al. 2010).

2.3 ACTIVACIÓN GLIAL

Ante un daño neuronal, la microglía es la primera en activarse, y su morfología cambia a una apariencia ameboidea con retracción de las ramificaciones (Kettenmann 2011; Olson and Miller 2004). La activación de la microglía tiene lugar a través de los receptores TLR (*Toll-like Receptors*) y NLR (*NOD-like Receptors*), y también como una respuesta del sistema inmune innato, produciendo citocinas proinflamatorias como TNF α , las interleucinas IL-1 β y IL-6 y quimiocinas (Olson and Miller 2004). La estimulación de TNF α incrementa la actividad fagocítica de la microglía, y se han encontrado unos niveles elevados de esta citocina en diferentes enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson (Combs et al. 2001; Zahn et al. 1997). La IL-1 β induce la expresión de TNF α e IL-6 y está implicada en el proceso inflamatorio, tanto en daño traumático cerebral, como en enfermedades neurodegenerativas (Shaftel et al. 2008). Con el fin de regular la respuesta inmune, la microglía también produce citocinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF β (*Transforming Growth Factor β*).

La liberación de citocinas y otros factores por parte de la microglía, regula la respuesta de los astrocitos, evidenciándose una sincronización entre la microglía y astroglía. Los astrocitos, al activarse, cambian su estructura y morfología, presentando una hipertrofia acompañada de un aumento de la expresión de GFAP (*Glial Fibrillary Acid Protein*). Además, estas células liberan citocinas como $\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-1 β , INF γ y quimiocinas (Lieberman et al. 1989; Neerven et al. 2010). La activación astrogliosa (o astrogliosis), al igual que la activación microglial, está asociada a diversas enfermedades neurodegenerativas (Garwood et al. 2011; Johnstone et al. 1999). Todos estos eventos preceden o causan la muerte neuronal, generando interacciones entre células gliales y neuronas, que se asocian a un daño celular o a una enfermedad neurodegenerativa (Figura I.6) (Morales et al. 2014).

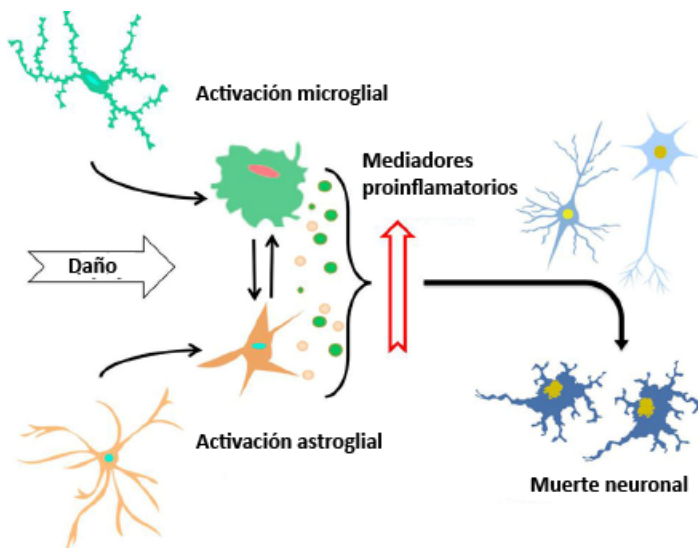


Figura I.6: El daño o estímulo citotóxico activan la microglía y la astroglía. Estas células sufren cambios morfológicos y secretan factores proinflamatorios. Estos eventos, cuando tienen un carácter crónico, preceden y causan la muerte neuronal (adaptado Morales et al. 2014).

3. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE PI3K/AKT

La vía de PI3K/AKT es la vía de señalización de supervivencia más caracterizada. Puede ser activada por diferentes estímulos, como factores de crecimiento, citocinas y hormonas, que se unen a la familia de receptores RTK (*Receptor Tyrosine Kinase*) o receptores GPCR (*G protein-coupled receptor*) (Vanhaesebroeck and Waterfield 1999). Tanto en el SNC como en el sistema nervioso periférico, los factores neurotróficos, como el NGF (*Neurotrophic Growth Factor*) y el BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*) son los estímulos más bien estudiados, y éstos se unen específicamente a los receptores RTK de clase VII, los Trk (*Tropomyosin-receptor kinase*) (Brunet et al. 2001).

I. INTRODUCCIÓN

La activación de los receptores Trk lleva al reclutamiento de la cinasa PI3K (*Phosphoinositide 3-Kinase*) (Kaplan and Miller 2000), a través de sus dominios SH2 (*Src Homology*), que se unen a residuos citoplasmáticos de tirosina fosforilados de estos receptores. El reclutamiento ocurre normalmente de un modo indirecto, por medio de proteínas adaptadoras como Src (protooncogene c-Src) o IRS1/2 (*Insulin Receptor Substrate 1/2*) (Holgado-Madruga M et al. 1997; Korhonen et al. 1999; Yamada et al. 1997). La PI3K fosforila a PIP2 (*Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) convirtiéndolo en el segundo mensajero PIP3 (*Phosphatidylinositol 3, 4, 5-bisphosphate*) el cual conduce a la activación de la proteína AKT (*Protein kinase B*) (Figura I.7) (Fruman et al. 1998).

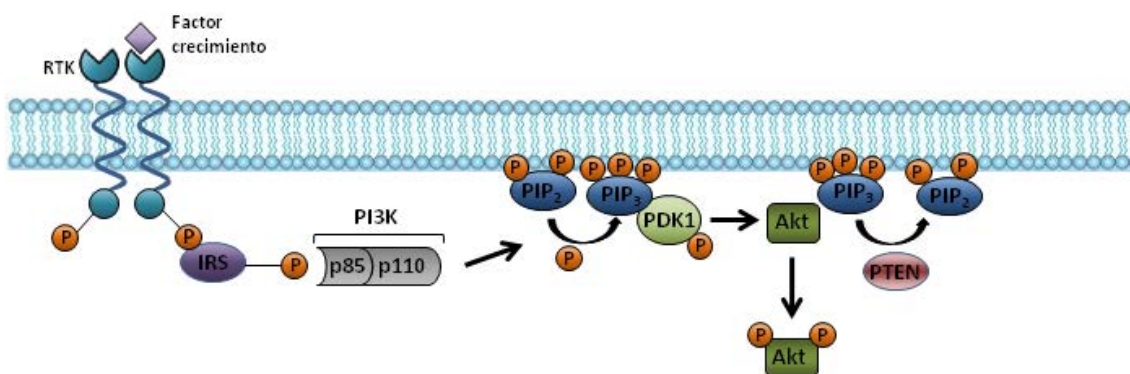


Figura I.7: Representación esquemática de la activación de la proteína AKT por la vía de señalización de PI3K. La subunidad catalítica (p110) de PI3K fosforila PIP2 a PIP3. El segundo mensajero PIP3 recluta una serie de proteínas en la membrana como PDK1 y AKT. PDK1 fosforila y activa a AKT. La fosfatasa PTEN regula negativamente la vía de PI3K (adaptado de Henessy et al. 2005).

3.1 LA FAMILIA DE PI3K

La familia PI3K está formada por cinasas lipídicas serina/treonina que desempeñan un papel crucial en la regulación del ciclo celular, apoptosis, reparación del DNA, senescencia, angiogénesis, metabolismo y motilidad celular (Cantley 2002). Estas cinasas transmiten señales desde la superficie celular al citoplasma, mediante la generación de segundos mensajeros, que a su vez activan múltiples vías efectoras de cinasas incluyendo, AKT, PKC (*Protein Kinase C*), NF- κ B o JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*), con el objetivo de promover la supervivencia y el crecimiento de las células (Cantley 2002; Hu et al. 2012; Osaki et al. 2004).

En mamíferos se conocen múltiples isoformas de PI3K, subdivididas en cuatro clases (I_A, I_B, II y III), según sus características estructurales y la especificidad del sustrato. La subclase más

estudiada y más numerosa es la I_A, relacionada con los estímulos extracelulares de proliferación y supervivencia celular (Cantrell 2001; Fruman et al. 98; Foukas et al. 2010; Vanhaesebroeck and Waterfield 1999). Esta subclase está formada por proteínas heterodiméricas compuestas por una subunidad reguladora (p85) y otra subunidad catalítica (p110). De p85 se conocen 3 isoformas: p85 α , p85 β y p55 γ , codificadas por los genes *pik3r1*, *pik3r2* y *pik3r3*, respectivamente (Vanhaesebroeck et al. 2001); mientras que de p110 se han identificado las isoformas α , β , δ , que están codificadas por los genes *pik3ca*, *pik3cb* y *pik3cd*, respectivamente. Las subunidades catalíticas p110 α y p110 β , si bien presentan similitud en su secuencia y en los patrones de expresión, tienen funciones distintas en los procesos de proliferación celular, progresión del ciclo celular y desarrollo (Bi et al. 1999; Bi et al. 2002; Jia et al. 2008). Diferentes estudios han demostrado que las funciones específicas de cada subunidad están relacionadas con su localización subcelular (Marqués et al. 2008, 2009). Así, la subunidad p110 α se localiza en el citoplasma y tiene un papel clave en la acción de la insulina y en la entrada del ciclo celular (Foukas et al. 2006, 2010); mientras que la subunidad p110 β , una vez activada y asociada con la subunidad reguladora p85, se transloca al núcleo, donde controla mecanismos de viabilidad celular, como la progresión de la fase S y la reparación y replicación del DNA (Kumar et al. 2010; Marqués et al. 2008, 2009; Martelli et al. 2006).

3.2 AKT

AKT es una cinasa serina/treonina mediadora de la supervivencia celular en respuesta a la unión de factores de crecimiento a los receptores específicos (Datta et al. 1999; Lawlor and Alessi 2001). Tras la activación de PI3K, AKT se asocia a la membrana plasmática y su fosforilación depende de PDK1 (*Phosphoinositide-dependent kinase 1*) (Hresko et al. 2003; Toker and Newton 2000). De este modo, AKT activa puede regular la expresión de diferentes factores de transcripción implicados en la muerte celular y supervivencia (Figuras I.7 y I.8) (Brunet et al. 2001).

Por un lado, AKT inhibe por fosforilación distintos substratos proapoptóticos, como los miembros de la familia FOXO (*Forkhead box transcription factor, class O*) y Bad (Kops et al. 1999; Biggs 1999; Datta et al. 1997). Por otro lado, AKT fosforila substratos prosupervivencia como CREB (*c-AMP responsive element binding protein*) y NF- κ B, los cuales activados inducen la expresión de genes antiapoptóticos (Du et al. 1998; Ozes et al. 1999; Romashkova and Makarov 1999). También se ha demostrado que AKT regula el metabolismo mediante

I. INTRODUCCIÓN

fosforilación de GSK3 β (*Glycogen Synthase Kinase 3*) en el residuo de serina 9, inactivándola (Hetman et al. 2000) y que estimula la activación de mTOR (mammalian Target of Rapamycin), implicada en la regulación del crecimiento, proliferación y supervivencia celular (Hennessy et al. 2005).

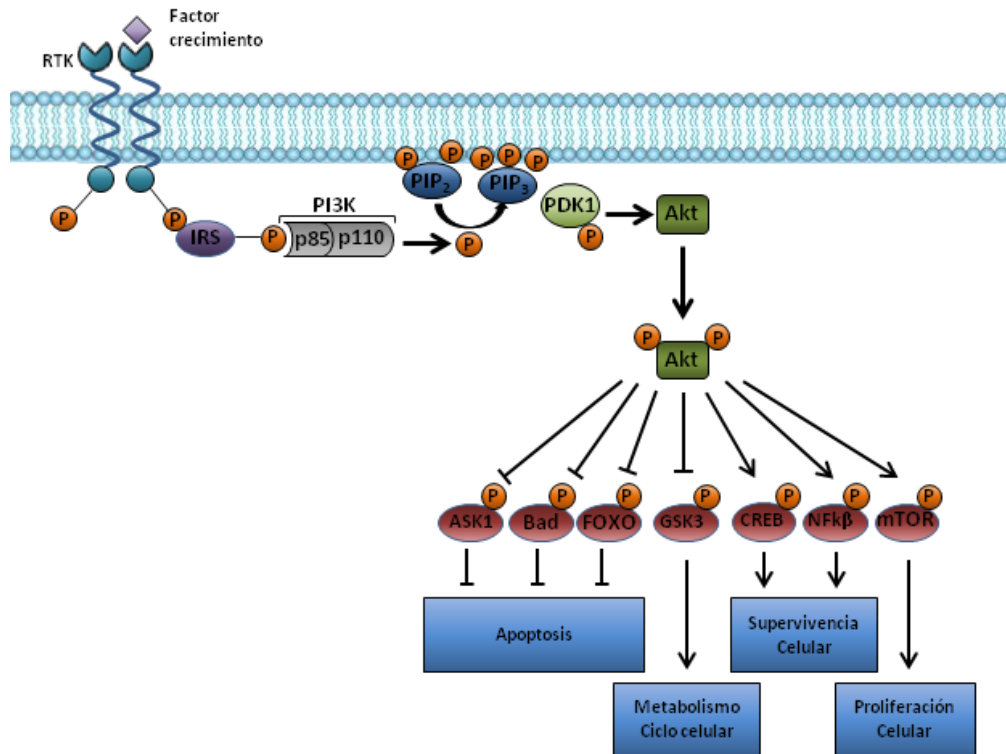


Figura I.8: Vía de señalización de PI3K/AKT. AKT una vez activa, media la activación o la inhibición de diferentes sustratos, induciendo mecanismos de supervivencia, crecimiento y proliferación (adaptado de Hennessy et al. 2005).

Entre las diferentes funciones de AKT también se encuentra su implicación en la regulación de la vía de las MAPKs (*Mitogen Activated Protein Kinases*). En concreto, inhibe por fosforilación las proteínas MLK3 (*Mixed lineage kinase 3*) y ASK1 (*Apoptosis Signal-regulating Kinase 1*), ambas activadoras de JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*) y de su principal sustrato c-Jun (*Proto-oncogene Jun*) (Bathwal et al. 2003; Kim et al. 2001). Además, AKT promueve el silenciamiento de la vía JNK, uniéndose a la proteína JIP (*JNK-Interacting Protein*), y por tanto evitando que ésta promueva la activación de la cascada de muerte por la vía de señalización de JNK (Kim et al. 2003; Pan et al. 2006).

4. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LAS MAPK

MAPKs (*Mitogen Activated Protein Kinases*) es una familia de proteínas cinasas citosólicas que responden a distintas señales extracelulares, tales como, hormonas, factores de crecimiento, citocinas o diferentes tipos de estrés, que regulan procesos celulares como la proliferación, la diferenciación y la apoptosis (Aouadi et al. 2006; Chang and Karin 2001; Fang and Richardson 2005).

Existe una alta especificidad entre el tipo de estímulo que activa la vía de las MAPKs y la función específica que éstas desarrollan. La vía de las MAPKs está regulada a través de una fosforilación secuencial de tres cinasas. De esta forma, la fosforilación se inicia en los receptores de membrana, asociados a la proteína G o a otras cinasas adaptadoras, que inducen la activación de las MAPKKK o MAP3K (*MAP Kinase Kinase Kinase*). Éstas a su vez, fosforilan a las MAPKK o MAP2K (*MAP Kinase Kinase*), que finalmente activan a la MAPK que genera la respuesta fisiológica (Kyriakis and Avruch 2001; Keshet and Seger 2010) (Figura I.9). Se han descrito cuatro grupos de MAPKs: ERK1/2 (*Extracellular signal regulated kinase 1/2*) (Boulton et al. 1991), JNK1-3 (*c-Jun N-terminal kinase 1-3*) (Kyriakis et al. 1994), p38MAPK α , β , γ , δ (Freshney et al. 1994; Rouse et al. 1994; Cuenda et al. 2007) y ERK5 (*MAPK7*) (Zhou et al. 1995) (Figuras I.9 y I.10).

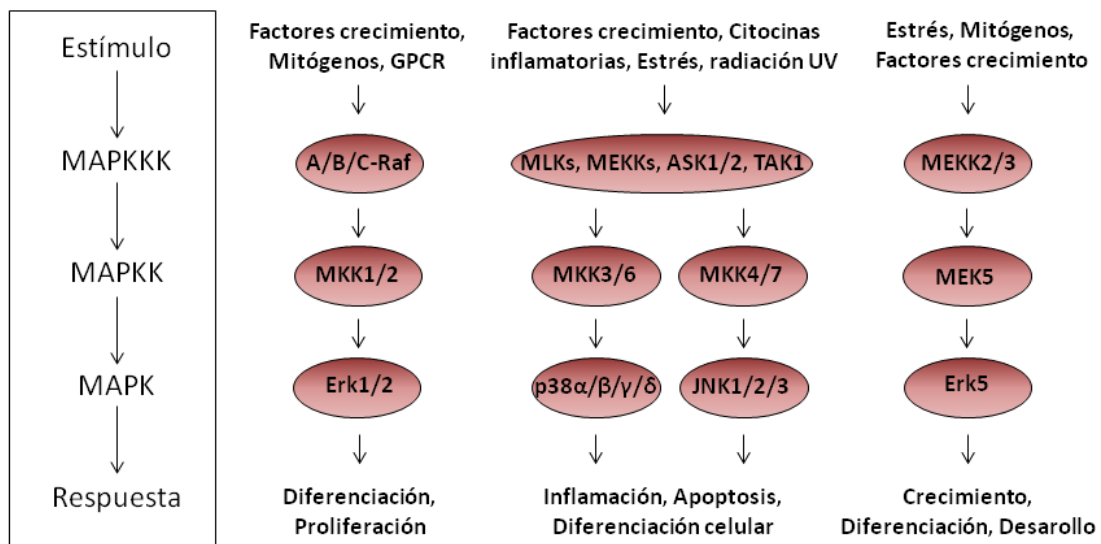


Figura I.9: Las cuatro vías principales de MAPKs mejor caracterizadas en mamíferos (adaptado Roberts and Der 2007).

I. INTRODUCCIÓN

Cada una de las diferentes vías de MAPKs, presenta sus MAP3Ks y MAP2Ks específicas y regulan diferentes procesos celulares: ERK1/2 tiene un papel importante en la proliferación y diferenciación; JNK y p38, también llamadas SAPKs (*Stress-Activated Protein Kinases*), son activadas por estrés celular; y ERK5 se activa ante estrés y señales mitogénicas (Keshet and Seger 2010) (Figura I.9).

Las cinasas MAPK son activadas por una doble fosforilación de los residuos Treonina (Thr) y Tirosina (Tyr) que se presentan en motivos conservados Thr-X-Tyr localizados en el subdominio cinasa VIII de las cuatro MAPKs (Figura I.10) (Robbins et al. 1993).

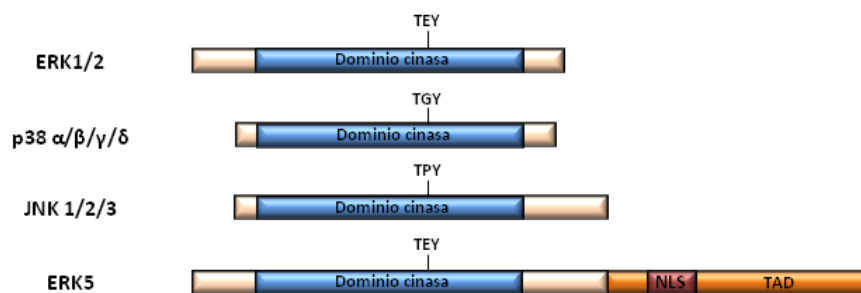


Figura I.10: Representación esquemática de las cuatro MAPKs convencionales. Todas las MAPKs contienen un dominio cinasa y extremos C- y N-terminal con diferente longitud. En los dominios cinasas se representan los motivos de doble fosforilación denominados TEY (Thr-Glu-Tyr), TGY (Thr-Gly-Tyr) y TPY (Thr-Pro-Tyr). ERK5 presenta dominios adicionales en su estructura. TAD: dominio de transactivación y NLS: secuencia de localización nuclear (adaptado de Cargnello and Roux 2011).

Los sustratos específicos de cada MAPK se fosforilan en motivos Serina/Prolina (Ser/Pro) o Treonina/Prolina (Thr/Pro), dependiendo de si están localizados en el citosol o en el núcleo (Fang and Richardson 2005). Este sistema de activación se encuentra muy conservado en eucariotas (Chang and Karin 2001; Fang and Richardson 2005). Además de este proceso fosforilativo, la activación de las vías de MAPK está regulada por el acoplamiento e interacción con moléculas reguladoras, denominadas de proteínas de anclaje (*Scaffold Proteins*) (Biondi et al. 2003; Morrison and Davis 2003; Tanoue et al. 2000).

4.1 VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE ERK1/2

La vía de ERK, relacionada con proliferación y diferenciación, se activa principalmente por una variedad de agentes extracelulares como factores de crecimiento, hormonas y estrés celular (Avruch 2007; Torii et al. 2004), que actúan a través de receptores RTK, GPCR y/o canales de iones (Marmor et al. 2004; Naor et al. 2000; Rane 1999) (Figura I.9). En muchos casos, la transmisión de señal en la cascada de ERK involucra el reclutamiento de proteínas adaptadoras, como Src o Grb, que activan receptores y/o proteínas efectoras. Esto permite la transmisión de la señal a componentes MAP3K de la cascada de ERK, principalmente las Raf kinases (*Rapidly accelerated fibrosarcoma*), A-Raf, B-Raf y C-Raf (Kyriakis et al. 1992).

Esta vía está constituida por dos principales cinasas, la ERK1 y la ERK2, también conocidas como p44 (MAPK3) y p42 (MAPK1) (Boulton and Cobb 1991), que se activan por acción de las MAP2Ks, MEK1/2 (*Dual specificity Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1/2*) (Seger et al. 1992), mediante una doble fosforilación en los residuos de Thr83 y Tyr185 del motivo conservado Thr-Glu-Tyr (TEY) (Chong et al. 2003). Tras su activación, ERK1 y ERK2 fosforilan numerosos sustratos de membrana (CD120a, SyK y calnexina), nucleares (NF-AT, Elk-1, MEF2, c-Fos, c-Myc y STAT3) y del citoesqueleto (paxilina) (Chen et al. 2001; Frodin and Gammeltoft 1999). Ambas isoformas se expresan de manera ubicua y parecen tener papeles muy similares, ya que estudios *in vitro* muestran que los inhibidores específicos de la vía ERK, U0126 y PD98059, no discriminan entre ambas isoformas (Aouadi et al. 2006).

Diversos estudios demuestran que ERK1/2 se activa en respuesta a neurotrofinas y puede regular la transcripción de genes implicados en la supervivencia y proliferación neuronal. Además, ERK1/2 se activa frente a otros estímulos, como el daño neuronal inducido por isquemia o en enfermedades neurodegenerativas (Chu et al. 2004; Hetman and Gosdz 2004).

4.2 VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE p38

La cinasa p38 está involucrada en la respuesta inflamatoria, en la apoptosis y en el ciclo celular (Aouadi et al. 2006; Zarubin and Han 2005). La actividad de esta vía es inducida por diferentes factores de estrés como temperatura, radiación UV, choque osmótico, citocinas y por ligandos que se unen a receptores GPCR y RTK (Cohen 2005). Estos procesos inducen la activación de diferentes MAP3K de la vía de p38, como MLK3 (MAP3K11), MEKK4 (MAP3K4), TAK1 (*TGF- β*

activated kinase 1) y ASK1, muchas de ellas similares o compartidas con las de la vía de JNK (Uhlik et al. 2004). Un extenso número de MAP3K transmiten la señal a dos principales MAP2K, la MKK3 (MAP2K3) y la MKK6 (MAP2K6), que posteriormente activan a p38 (Figura I.9). Sin embargo, diferentes estudios han relacionado también las MAP2Ks, MKK4 (MAP2K4) y MKK7 (MAP2K7), con la activación de p38 (Dashti et al. 2001; Uhlik et al. 2004).

Se han identificado cuatro isoformas de p38: p38 α (SAPK2a), p38 β (SAPK2b), p38 γ (SAPK3) y p38 δ (SAPK4) (Jiang et al. 1996; Jiang 1997; Lechner et al. 1996; Li et al. 1996). Mientras que p38 α y p38 β se expresan de forma ubicua, p38 γ y p38 δ se expresan diferencialmente dependiendo del tipo de tejido (Aouadi et al. 2006). Su activación ocurre por fosforilación en los residuos Thr180 y Tyr182 del motivo tri-péptido Thr-Gly-Tyr (TGY) (Hanks and Hunter 1995). La proteína p38, una vez activa, puede fosforilar diferentes sustratos, incluyendo proteínas cinasas citoplasmáticas como MK2 (*MAPK-activated protein kinase 2*) o factores de transcripción como CMOP, Elk-1, ATF2 (Activating transcription factor) y Mef2c (*Myocyte enhancer factor-2*) (Zarubin and Han 2005; Roux and Blenis 2004). Al contrario que ERK1/2, p38 puede localizarse tanto en el núcleo como en el citosol (Ben-Levy et al. 1998).

Además de su papel en la regulación de la muerte y supervivencia neuronal como cinasa activada por estrés celular, la proteína p38 se ha relacionado con la diferenciación neuronal en respuesta a factores de crecimiento neurales (Takeda and Ichijo, 2002).

4.3 VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE ERK5

La cinasa, ERK5 o BMK1, es la MAPK más recientemente caracterizada. Diferentes estudios han demostrado que la vía de ERK5 puede ser activada tanto por estímulos de estrés, como por mitógenos e hiperosmolaridad (Kato et al. 1997, 1998, 2000).

Se ha descrito una relación directa entre la MAP3K, MEKK3 (MAP3K3) y la activación de ERK5 a través de la MAP2K, MEK5 (MAP2K5) (Figura I.9), sugiriendo así una cascada lineal (MEKK3-MEK5-ERK5) en la activación de ERK5 (Chao et al. 1999). ERK5 se expresa en una amplia variedad de tejidos y puede localizarse en el citoplasma o ser translocada al núcleo después su activación (Kondoh et al. 2006). Posteriormente a la activación de ERK5, ésta fosforila diferentes factores, como miembros de la familia Mef2c, c-Fos y posiblemente SAP1 α (Yang et al. 1998; Kato et al, 1997; Kamakura et al. 1999).

A nivel del sistema nervioso, en concreto en el cerebro, se detectan niveles elevados de ERK5, sin embargo su función no está claramente definida (Shalizi et al. 2003). Estudios *in vitro* describen la implicación de ERK5 tanto en la diferenciación de células musculares como en la supervivencia neuronal (Cohen 2009). Mediante modelos *in vivo* y estudios tras una lesión cerebral, se ha demostrado la activación de ERK5 en respuesta a factores de supervivencia neuronal y estrés oxidativo (Erazo et al. 2013). En adulto, esta proteína se expresa principalmente en regiones de neurogénesis, como la zona subventricular o la zona subgranular del giro dentado. Se ha observado cómo su delección genética altera el proceso de proliferación y migración en estas áreas (Wang et al. 2013). Además, ERK5 juega un papel activo en la señalización de la insulina en neuronas hipocámpales y puede presentarse como una diana terapéutica en las enfermedades neurodegenerativas (Goalstone 2011). Sin embargo el papel preciso que desempeña en esta vía no es totalmente conocido, debido principalmente al hecho de que pocos sustratos se han identificado hasta al momento (Erazo et al. 2013).

4.4 VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE JNK

La proteína JNK (*c-jun N-terminal Kinase*) fue inicialmente identificada y purificada por Kyriakis y colaboradores (1994) como una proteína que se activa en el hígado de roedores expuestos a la cicloheximida. Estudios posteriores, centrados en la clonación molecular de JNK, demostraron que ésta era un miembro de un grupo de proteínas de señalización de MAPK (Derijard et al. 1994; Kyriakis et al. 1994; Davis RJ 2000).

La vía de JNK es activada por diversos tipos de estímulos externos como las citocinas inflamatorias TNF α y IL-1 β , la radiación ultravioleta, la privación de factores de crecimiento y un choque térmico (Kyriakis and Avruch 2001). Junto con p38, las proteínas JNK son sensibles a receptores relacionados con estrés y apoptosis, y son activadas por ligandos específicos de receptores GPCR y RTKs (Keshet and Seger 2010). Éstos activan las MAP3K como las MLKs (*Mixed Lineage Protein group*), MEKKs y ASKs entre otras, que activan las dos MAP2K, MKK4 y MKK7 que son cinasas específicas de treonina y tirosina. Concretamente, MEKK1-4 y ASK1-2 activan a MKK4, mientras que MKK7 es fosforilada por MLK1/2/3 (Figura I.9). Tanto MKK4 como MKK7 activan las JNK por doble fosforilación en el motivo TPY (Thr-Pro-Tyr) (Coffey et al. 2000).

I. INTRODUCCIÓN

Diversos estudios han demostrado que MKK4 se activa preferentemente por estrés ambiental, y que fosforila preferentemente el residuo Tyr185 del motivo TPY de JNK, mientras que MKK7 se activa por citocinas, TNF α e IL-1 β , y fosforila el residuo Thr183 (Kishimoto et al. 2003). Sin embargo, para la completa activación de JNK es necesaria la cooperación de estas dos cinasas (Tournier et al. 1999; Lawler et al. 1998; Gallo and Johnson 2002).

La proteína JNK activada fosforila diferentes sustratos, tanto de membrana, como de citoplasma y núcleo, involucrados en procesos fisiológicos como la respuesta inflamatoria, la apoptosis y la diferenciación y proliferación celular (Kyriakis and Avruch 2001; Davis 2000).

Existen diferentes isoformas de JNK, codificadas por 3 genes diferentes, *Jnk1*, *Jnk2* y *Jnk3*. En concreto, a partir del procesamiento alternativo de los productos genéticos, se han identificado diez isoformas de JNK que presentan una homología de un 85%: JNK1 α 1, JNK1 α 2, JNK1 α 2, JNK2 α 1, JNK2 α 1, JNK2 α 2, JNK2 α 2, JNK3 α 1 y JNK3 α 2 (Gupta et al. 1996; Dreskin et al. 2001) (Figura I.11).

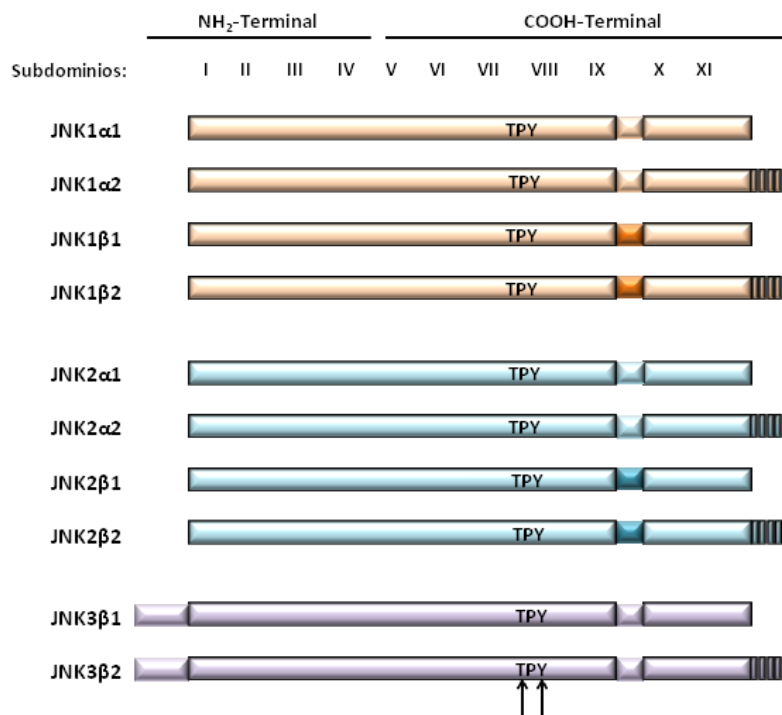


Figura I.11: Características estructurales de las isoformas de JNK. Todas las isoformas presentan 11 subdominios cinasa (I-XI). Los residuos Thr y Tyr (TPY) están presentes entre los subdominios VII-VIII. Las diferencias entre la especificidad de las isoformas se representan por las áreas sombreadas (IX-X), y las regiones rayadas en el extremo C-terminal (COOH-Terminal), donde resultan proteínas que difieren en la longitud de 42-43 aminoácidos (adaptado de Manning and Davis 2003).

En mamíferos, las proteínas JNK1 (MAPK8) y JNK2 (MAPK9) se expresan de forma ubicua, mientras que JNK3 (MAPK10) se expresa preferentemente en cerebro y en menor medida en corazón y testículos (Chand and Marin 2001; Davis 2000). Las isoformas de JNK tienen un peso de entre 46 y 54 kDa. En muchos casos, el gen *Jnk1* genera un producto proteico de 46 kDa (Gupta et al. 1996), mientras que el gen *Jnk2* genera una proteína de 54 kDa (Gupta et al. 1996; Sabapathy et al. 1999), y el gen *Jnk3* produce una variante de 46 y 54 kDa (Gupta et al. 1996).

En varios estudios con roedores se ha descrito la presencia de elevados niveles de mRNA de *Jnk1*, *Jnk2* y *Jnk3* en la neocorteza, hipocampo, tálamo y mesencéfalo (Carboni et al. 1998; Lein et al. 2007). La expresión de *Jnk1* comparativamente con *Jnk2* y *jnk3*, es elevada durante el desarrollo cerebral en roedores, sin embargo ésta disminuye en estadios postnatales, manteniéndose elevada en bulbo olfatorio en adulto. Mediante estudios de hibridación *in situ* en roedores, se sugirió que *Jnk3* se expresaba ampliamente en cerebro, seguido de *Jnk2* y *Jnk1* (Carboni et al. 1998; Lein et al. 2007). La distribución subcelular de JNK1 y JNK3 difiere en corteza, hipocampo y cerebelo. En corteza e hipocampo, JNK1 se localiza en gran parte en el citosol, mientras que JNK3 se encuentra en núcleo. Respecto a JNK2, esta isoforma se distribuye tanto en el citosol como en el núcleo (Figura I.12). Concretamente, los niveles de JNK3 se encuentran ampliamente dispersos en la gran mayoría de áreas del hipocampo, mientras que los niveles de JNK1 se encuentran exclusivamente en las áreas CA3, CA4 y en giro dentado (Lee et al. 1999). Diferentes estudios apoyan un papel de JNK1 activo en corteza y cerebelo, mientras que JNK3 es la responsable de la actividad de JNK en hipocampo y estriado (Brecht et al. 2005; Taratuk et al. 2006).

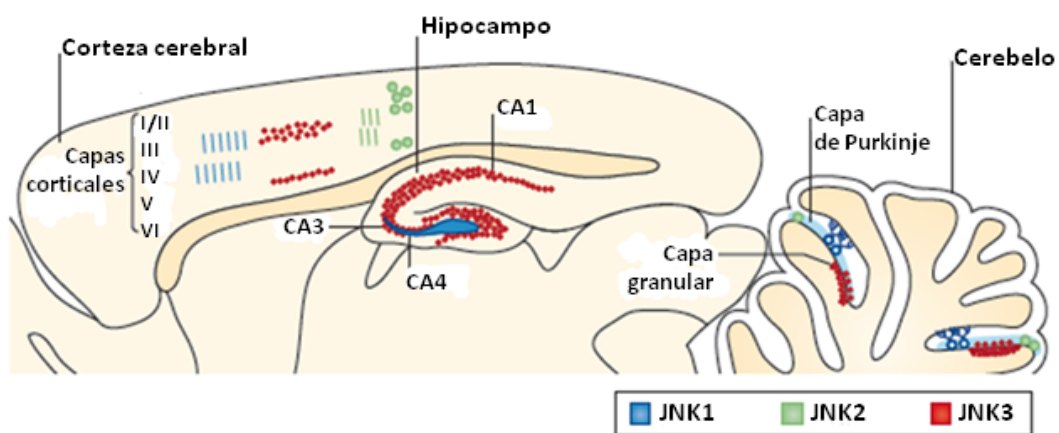


Figura I.12: Representación esquemática de los niveles de las isoformas de JNK en cerebro de ratón adulto. (adaptado de Coffey 2014).

4.4.1 SUSTRATOS DE JNK

JNK fosforilada activa a una gran variedad de factores nucleares: factores AP-1 de la familia Jun (c-Jun, junB, JunD), ATF2, Elk1, p53, NFAT4, c-Myc, sustratos citoplasmáticos como Bcl-2 y Bcl-x_L, receptores glucocorticoides y proteínas de membrana como APP (*Amyloid Precursor Protein*) (Figura I.13) (Borsello and Forloni 2007; Coffey et al. 2000). El primer sustrato de JNK descrito y mejor identificado es c-Jun (Dunn et al. 2002), que al ser fosforilado en los residuos de Ser63 y Ser73 aumenta su estabilidad y su actividad transcripcional (Hibi et al. 1993; Pulverer et al. 1991).

La proteína c-Jun puede formar homodímeros o heterodímeros con otras proteínas, como el factor de transcripción ATF2, o componentes de la familia c-Fos. Cuando esta última heterodimerización se lleva a cabo, se forma el complejo AP-1, que activa la transcripción de diversos genes implicados en procesos relacionados con la proliferación, la diferenciación, la apoptosis o la respuesta inmune (Ubeda et al. 1999). Una expresión alta del gen *c-Jun* y niveles elevados de la proteína preceden o coinciden con periodos de muerte celular, como el que se da durante el desarrollo embrionario (Sun et al. 2005), en situaciones de trauma, en isquemia cerebral y tras convulsiones (Gall et al. 1990; Herdegen et al. 1997; Wessel et al. 1991). Una inducción similar de este gen se detecta en enfermedades neurodegenerativas como en la enfermedad de Alzheimer, en la Esclerosis Lateral Amiotrofica y la enfermedad de Parkinson (Migheli et al. 1997; Oo et al. 1999; Pearson et al. 2006).

También hay diferencias entre las isoformas en lo que se refiere a la activación de factores de transcripción. Así, algunos trabajos apuntan a una capacidad mayor de JNK2 con respecto a JNK1 para fosforilar el sustrato nuclear c-Jun (Gupta et al.; 1996; Waetzig and Herdegen, 2005), ya que la isoforma JNK1 está más implicada en la fosforilación de sustratos citosólicos, como la MAP2 (*Microtubule-associated protein 2*) y la MAP1B (*Microtubule-associated protein 1B*), destacando así la importancia de JNK1 en el control de la actividad de los microtúbulos y de la elongación axonal (Feltrin et al. 2012). Sin embargo, en otras funciones, como es el caso del control de la plasticidad sináptica, JNK1 podría intervenir a través de los factores de transcripción ATF-2 y c-Jun (Li et al. 2007).

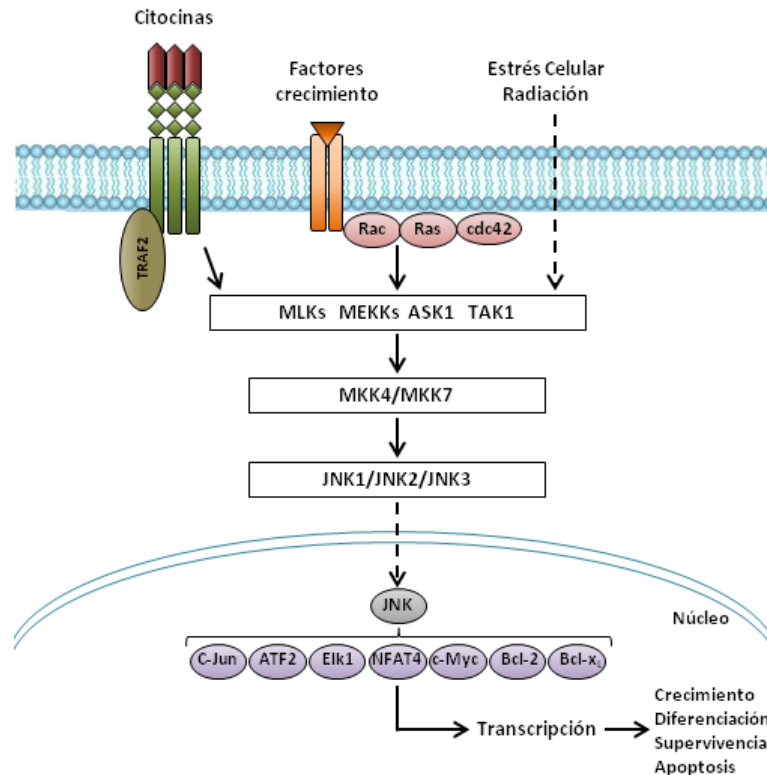


Figura I.13: Representación esquemática de los principales sustratos de la vía de señalización de JNK. JNK activada se transloca al núcleo fosforilando diferentes sustratos, en su mayoría factores de transcripción (adaptado de Harper and Wilkie 2003).

4.4.2 INTERACCIONES FUNCIONALES CON LAS PROTEINAS JIP

Las células aseguran la especificidad y eficiencia de una cascada de señalización mediante la interacción de una variedad de proteínas de anclaje que, a pesar de carecer de actividad enzimática, se agregan a distintos componentes de una misma vía de señalización de forma simultánea, formando módulos funcionales (Good et al. 2011).

La vía de señalización de JNK interacciona con proteínas de anclaje específicas, las JIPs (*JNK interacting proteins*), formando un módulo señalización de JNK funcional. Las proteínas JIPs facilitan la activación de JNK, agregándose a diferentes componentes de la cascada de la MAPK, como JNK, MKK7 y algunas MAP3K, como MLK3 o DLK, formando un complejo multienzimático (Yasuda et al. 1999).

La familia de JIP consta de varios miembros, entre los cuales JIP1, JIP2, JIP3 y JIP4 son los más caracterizados (Dhanasekaran et al. 2007). JIP1 fue la primera proteína de anclaje descrita y

I. INTRODUCCIÓN

caracterizada como un mediador de las funciones neuronales de JNK. El gen que codifica para esta proteína, *jip1*, se expresa de forma ubicua (Dickens et al. 1997; Whitmarsh et al. 2001). JIP1 puede interactuar con varias proteínas MAP3K (MEKK3, MLK3 y DLK), pero únicamente con una MAP2K (MKK7). Además, JIP1 interactúa con las isoformas de JNK, presentando una mayor afinidad para la isoforma JNK1 (Whitmarsh et al. 1998; Yasuda et al. 1999). Se ha descrito que otras cinasas pueden fosforilar a JIP1 y cambiar su afinidad por las MAPKs (Nihalani et al. 2003). En concreto, JIP1 se puede unir a AKT promoviendo su activación, y reprimiendo la señalización de JNK en neuronas debido a la inhibición de la interacción entre JIP1 y JNK. Sin embargo, la exposición de estas células a estrés excitotóxico promueve la liberación de AKT de JIP1, aumentando así la interacción entre JIP1 y JNK, desencadenando la activación de JNK a través del módulo JIP1-JNK (Figura I.14) (Kim et al. 2002; Whitmarsh 2006).

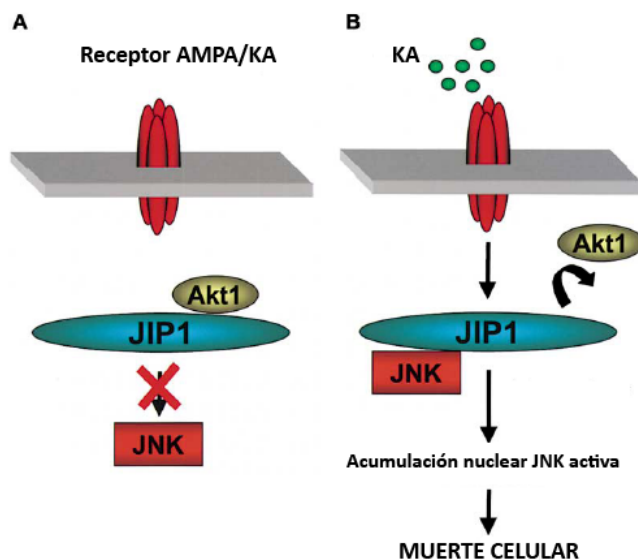


Figura I.13: Representación del módulo de interacción formado por AKT-JIP1-JNK. A) En el estado basal, AKT se encuentra unida a JIP1, previniendo la formación del complejo proapoptótico de JIP1-JNK. B) Bajo un estímulo excitotóxico, como el ácido kaínico (KA), AKT se disocia de JIP1, permitiendo la asociación de JIP1 con la vía de JNK. De esta manera, se activa JNK provocando la muerte celular. Receptor AMPA/KA (*α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxezolepropionic acid/Kainate*) (adaptado de Kim et al. 2002).

La proteína JIP2 se expresa casi exclusivamente en neuronas y células neuroendocrinas (Yasuda et al. 1999). Ésta interactúa con JNK y p38 y además, se puede asociar a MLKs. Tal y como sucede con JIP1, JIP2 interactúa específicamente con MKK7 (Yasuda et al. 1999; Negri et al. 2000; Schoorlemmer and Goldfarb 2002).

La proteína JIP3 se expresa, al igual que JIP2, en neuronas y células neuroendocrinas (Ito et al. 2000). Ésta interactúa con MEKK1, MLK3 y ASK1, y también con ambas MAP2Ks: MKK4 y MKK7. Sin embargo, se ha demostrado que JIP3 posee mayor afinidad por la isoforma JNK3, que por JNK1 o JNK2 (Ito et al. 1999, 2000; Kelkar et al. 2000).

La proteína JIP4 es el miembro de la familia JIP más recientemente identificado (Lee et al. 2002). Se detecta principalmente en cerebro, riñón, hígado y testículos, y en menor medida en

corazón (Kelkar et al. 2005). Se han descrito componentes específicos de las vías de JNK y de p38 que interaccionan con JIP4. Se ha identificado que JIP4 interacciona con MEKK3, MKK4 y con las MAPKs, JNK y p38 α (Lee et al. 2002; Nguyen et al. 2005; Dhanasekaran et al. 2007).

4.4.3 REGULACIÓN DE LA APOPTOSIS MEDIADA POR LA ACTIVACIÓN DE JNK

La proteína JNK está involucrada en la regulación de la proliferación y diferenciación celular, y también en la de la apoptosis, dependiendo del estímulo que active la vía y del tipo celular donde suceda (Lin and Dibling 2002; Liu and Lin 2005). Tal y como se mencionó anteriormente, las dos principales vías que inician la apoptosis se clasifican en vía extrínseca activada por receptores de muerte, y en vía intrínseca iniciada por eventos mitocondriales. JNK parece tener un papel central en ambas vías, ya que por un lado activa la señalización apoptótica a través de la regulación positiva de genes proapoptóticos, mientras que por otro lado es capaz de modular directamente la actividad mitocondrial, gracias a la fosforilación de proteínas anti- y proapoptóticas (Elmore, 2007; Dhanasekaran and Reddy 2008).

La activación de JNK y su translocación al núcleo induce la fosforilación de c-Jun, la cual permite la formación del complejo AP-1 que induce la transcripción de factores proapoptóticos. Diferentes hallazgos indican que la vía JNK-AP1 potencia el incremento de la expresión de genes proapoptóticos como *Tnfa*, *Fasl* y *Bak* (Dhanasekaran and Johnson 2007; and Chambers 2001).

JNK también modula proteínas pro- y antiapoptóticas localizadas en la mitocondria. Distintos autores apoyan que tras la activación de JNK, ésta se transloca a la mitocondria pudiendo inducir la liberación del citocromo *c* desde el espacio intermembrana, que en combinación con Apaf-1 activa a la caspasa-9 (Tournier et al. 2000; Kharbanda et al. 2000; Chauhan et al. 2003; Hill et al. 2004). Sin embargo, el mecanismo específico por el cual JNK media la liberación del citocromo *c* no está claramente establecido. Se ha evidenciado también que JNK induce la rotura de Bid (Madash et al. 2002), o la fosforilación de Bax y Bad (Donovan et al. 2002).

Además de los mecanismos descritos anteriormente, JNK también es responsable de la fosforilación de la proteína Tau (Ploia et al. 2011) y puede regular la estabilidad y actividad transcripcional de p53, proteína que media la regulación de genes proapoptóticos en la

apoptosis inducida por el daño al DNA y el estrés oxidativo (Fuchs et al. 1998; Oleinik et al. 2007).

Esto indica que JNK puede producir una respuesta tanto proapoptótica como antiapoptótica, incluso en el mismo tipo celular. Esto dependerá de la activación de las diferentes isoformas de esta cinasa y el estado de activación de otras vías de señalización. Por otra parte, se ha propuesto que el tiempo de activación de JNK puede determinar el tipo de respuesta. Así, una activación sostenida de JNK está relacionada con la apoptosis, mientras una activación transitoria se relaciona con la supervivencia y la proliferación (Chen and Tan 2000; Sanchez-Perez et al. 1998).

4.4.4 INHIBICIÓN DE LA VÍA DE JNK

La inhibición farmacológica de JNK es una estrategia para la protección de la muerte neuronal. En este sentido, se han identificado moléculas específicas que silencian esta vía: CEP-1347, un inhibidor específico de la familia MLK; SP600125 y AS601245, ambos inhibidores selectivos de la actividad de JNK (Figura I.15); y D-JNKI, un péptido permeable que previene la fosforilación de c-Jun (Bennett et al. 2001; Carboni et al. 2005; Recipi and Borsello 2006; Saporito et al. 2002). El inhibidor CEP-1347 actúa sobre las cinasas MLKs, que activan a la vía de JNK, compitiendo por el sitio de unión al ATP. Este compuesto, a pesar de presentar una baja selectividad para JNK, demostró efectos neuroprotectores en modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson, frente a la exposición de MPP⁺ (*1-methyl-4-phenylpyridinium*) en neuronas nigroestriatales, y ante la toxicidad del β -amiloide (β A) en neuronas (Bozyczko-Coyne et al. 2001; Kuan et al. 2005; Troy et al. 2001). Aunque CEP-1347 se trata de un inhibidor seguro y bien tolerado en estudios en pacientes de la enfermedad Parkinson, no es efectivo en el tratamiento, siendo necesario más estudios para elucidar su mecanismo de acción (Kuan et al. 2005; Silva et al. 2005).

SP600125 es un inhibidor reversible que compete por el lugar de unión al ATP, con elevada selectividad para las tres isoformas de JNK. El efecto neuroprotector de SP600125 se ha demostrado en modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson (Wang et al. 2004), en procesos isquémicos (Guan et al. 2005; Bennett et al. 2001) y en mecanismos neurotóxicos de la enfermedad de Alzheimer (Kuan et al. 2005). No obstante, altas dosis de este fármaco

pueden inhibir de manera inespecífica otras cinasas como MKK3, MKK4, MKK6 y MKK7 (Borsello and Forloni 2007).

Con un mecanismo similar de acción, se ha desarrollado el inhibidor AS601245, que presenta una mayor afinidad hacia la isoforma JNK3 que hacia JNK1 y JNK2. Se ha demostrado que AS601245 previene la muerte neuronal en modelos de isquemia cerebral (Carboni et al. 2005), y tiene una capacidad anti-inflamatoria en modelos de artritis reumatoide (Gaillard et al. 2005). Sin embargo, este fármaco no ofrece suficiente eficiencia para desarrollar ensayos clínicos destinados a su uso en enfermedades neurodegenerativas.

Por otra parte, una estrategia distinta para inhibir la vía de JNK, es el uso de péptidos que reconozcan el dominio de unión al sustrato o a proteínas reguladoras del mismo, como las JIPs (Recipi and Borsello 2006). En esta línea, se ha desarrollado el péptido D-JNKI que no inhibe la actividad enzimática de JNK, pero bloquea la unión a sus sustratos (Bonny et al. 2001). Este péptido previene la fosforilación de c-Jun, ejerciendo un efecto neuroprotector en diferentes modelos de excitotoxicidad *in vitro*; y además, protegiendo de la muerte celular por apoptosis en modelos experimentales de isquemia (Borsello et al. 2003). Sin embargo, son necesarios más estudios *in vivo* para mejorar tanto, la capacidad que tiene este inhibidor de atravesar la barrera hematoencefálica, como para analizar exhaustivamente su farmacocinética, con el objetivo de una posible aplicación clínica (Bidwell and Raucher 2009).

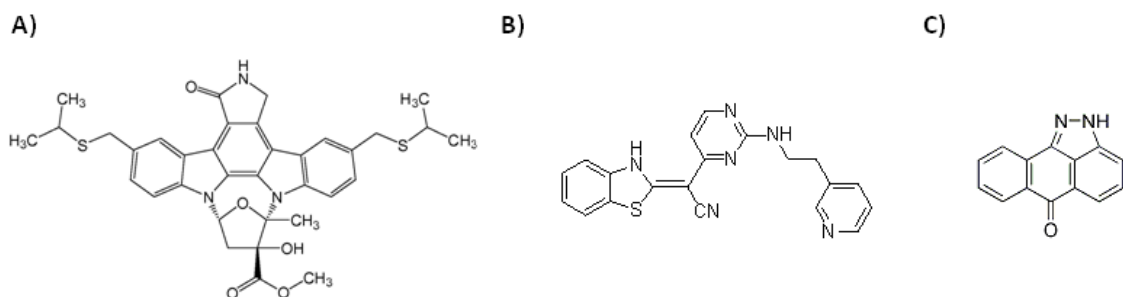


Figura I.15: Estructura molecular de los inhibidores de la vía de JNK. A) CEP-1347; B) AS601245; C) SP600125.

4.4.5 IMPLICACIÓN DE JNK EN MECANISMOS NEURODEGENERATIVOS

En el sistema nervioso, la activación de la vía JNK se ha relacionado tanto, con los procesos de muerte neuronal que ocurren naturalmente durante el desarrollo embrionario, como en la muerte patológica inducida por distintos estímulos en el cerebro adulto (Recipi and Borsello 2006). En particular, las cinasas JNK juegan un papel importante en la excitotoxicidad inducida en isquemia cerebral, epilepsia y también en enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington (Kim et al. 2000; Schauwecker 2000; Zipfel et al. 2000; Zhu et al. 2001).

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza principalmente por la formación de ovillos neurofibrilares constituidos por hiperfosforilación de la proteína Tau y por la presencia de placas de β -amiloide formadas a partir de la proteólisis anómala del péptido APP (Harper and Wilkie 2003). Estudios recientes sugieren que la vía de JNK puede tener un papel importante en la muerte neuronal y en la pérdida sináptica asociada a la enfermedad de Alzheimer (Sclip et al. 2014; Seo et al. 2012). Además, se ha descrito *in vitro* que la actividad de JNK se incrementa ante la neurotoxicidad inducida por $A\beta$, conllevando a la muerte neuronal (Bozyczko et al. 2001). La estimulación con $A\beta$ y la proteólisis de APP requieren una posterior activación de c-Jun, de la caspasa-8 y de la expresión de Fasl (Sclip et al. 2011; Harper and Wilkie 2003). De la misma manera, se ha demostrado que la fosforilación de JNK está relacionada con la hiperfosforilación de Tau en la neurodegeneración observada en este tipo de patología (Ploia et al. 2011; Yoshida et al. 2004).

Se ha evidenciado que la vía de señalización de JNK juega un papel crucial en la enfermedad de Parkinson. La principal causa de esta enfermedad neurodegenerativa se caracteriza por el aumento del estrés oxidativo, que provoca la muerte selectiva de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra (Harper and Wilkie 2003). La degeneración de la vía nigroestriada produce alteraciones como acinesia, temblor, rigidez o trastornos posturales. Diferentes estudios demostraron que JNK se activa tanto en cultivos de neuronas dopaminérgicas sujetas a la neurotoxicidad del MPP^+ (Dickens et al. 1997; Gearan et al. 2001) como tras la administración de MPTP (*1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine*) a nivel nigroestriatal (Xia et al. 2001; Saporito et al. 2000).

Además, se ha demostrado una activación de JNK en modelos experimentales de la enfermedad de Huntington. Esta patología se caracteriza por la pérdida selectiva de neuronas estriatales, causada principalmente por una mutación en el gen *htt* (*huntingtin*) (Harper and

Wilkie 2003). Estudios *in vitro* realizados tanto en neuronas hipocampales, como en neuronas estriatales, tratadas con ácido 3-nitropropiónico (3NP), evidencian que la activación de JNK y de c-Jun está asociada a la degeneración neuronal (Garcia et al. 2002; Liu 1998). Sin embargo, actualmente no existen estudios que describan el efecto inhibitorio de la vía de JNK en los modelos animales de esta enfermedad.

El papel diferencial de las isoformas de JNK en la neurodegeneración y los mecanismos específicos que regula cada isoforma es poco conocido. El análisis con animales modificados genéticamente, como el caso de los ratones KO (*Knock-out*) para isoformas concretas, proporciona la primera evidencia para entender la función de cada isoforma.

4.4.6. MODELOS GENETICAMENTE MODIFICADOS DE LA VÍA DE JNK

En la última década, la utilización de modelos genéticos murinos ha proporcionado un gran avance en el estudio de las funciones diferenciales *in vivo* de las distintas isoformas de JNK (Aouadi et al. 2006). Las deleciones por separado de los genes *Jnk1*, *Jnk2* y *Jnk3* producen animales viables con un desarrollo normal (Dong et al. 1998; Sabapathy et al. 1999; Yang et al. 1997).

Diferentes estudios basados en ratones *Jnk1^{-/-}* y *Jnk2^{-/-}*, describen un papel central de JNK1 en la obesidad y en la resistencia a la insulina (Hirosumi et al. 2002), mientras que JNK2 podría estar implicado en la diabetes y en la resistencia a la neurotoxina MPTP (Hunot et al. 2004; Jaeschke et al. 2005). Además, ambas isoformas están implicadas en la regulación del desarrollo cerebral (Kuan et al. 1999).

Los ratones deficientes para el gen *Jnk3*, son menos sensibles a estímulos excitotóxicos, ya que presentan una reducción de la muerte neuronal en áreas específicas del hipocampo tras una administración de la toxina ácido kaínico (KA), un inductor de convulsiones. En estos ratones se detectó una reducción significativa de la fosforilación de c-Jun y de la actividad de AP-1 (Yang et al. 1997). Asimismo, los ratones *Jnk3^{-/-}* presentan una reducción de la muerte neuronal frente a la toxina MPTP, en procesos isquémicos y ante la 6-hidroxidopamina (Pirianov et al. 2007; Breth et al. 2005; Hunot et al. 2004).

Se ha establecido un modelo murino KO para *c-Jun*, en el cual este gen es reemplazado por el gen mutante *JunAA*, que difiere del salvaje en las posiciones serina 63 y 73, que son sustituidas

por alanina. Este modelo animal es viable y muestra neuroprotección en diferentes áreas del hipocampo tras inyecciones con KA. Esto sugiere que la proteína c-Jun pueda ser el sustrato clave para JNK3 en el modelo del KA (Beherens et al. 1999).

El doble ratón KO de *Jnk1/Jnk2* es letal, ya que el tubo neural no se cierra correctamente debido a una deficiencia en la apoptosis crucial en este proceso. Sin embargo, los dobles KO *Jnk1/Jnk3* y *Jnk2/Jnk3* son viables, demostrándose así que ambas isoformas, JNK1 y JNK2, son esenciales en la regulación de la apoptosis durante el desarrollo embrionario del cerebro (Kuan et al. 1999).

Algunos autores han descrito incrementos compensatorios de la expresión de las isoformas de JNK en modelos de ratón deficientes para alguna de estas isoformas (*Jnk^{-/-}*). De este modo, se ha detallado cómo en cerebro de ratones *Jnk2^{-/-}*, los niveles de JNK1 se encuentran aumentados (Chen et al. 2001) mientras que en ratones *Jnk3^{-/-}*, es la proteína JNK2 la que presenta niveles elevados (Brecht et al. 2005).

Gracias a la delección de los activadores de JNK, MKK4 y MKK7, se obtuvo un conocimiento más detallado de las funciones fisiológicas de JNK. De esta manera, se permitió la comparación entre la falta de expresión y la falta de activación de JNK, clarificando la posible redundancia de las isoformas de JNK. Tanto los ratones deficientes para *Mkk4* o *Mkk7*, como el doble KO *Mkk4/Mkk7*, son letales debido a defectos en la proliferación de hepatocitos (Nishina et al. 1999; Watanabe et al. 2002; Wada et al. 2004). Para superar esta limitación, se han desarrollado KO condicionales mediante el sistema Cre-LoxP, pudiéndose estudiar la implicación de MKK4 y MKK7, principalmente a nivel del desarrollo cerebral y cáncer (Finegan and Tournier 2010; Yamasaki et al. 2012).

4.4.6.1. JNK3 COMO POSIBLE DIANA TERAPÉUTICA EN LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

La expresión específica de JNK3 en cerebro contribuye a que esta isoforma se presente como una posible diana terapéutica en enfermedades neurodegenerativas. Tal y como se describió anteriormente, el ratón *Jnk3^{-/-}* es viable y demuestra protección ante diversos estímulos apoptóticos. Diversos trabajos *in vitro* demuestran que neuronas corticales e hipocampales deficientes en JNK3 son resistentes a la toxicidad del β -amiloide (Morishima et al. 2001) y a la

privación de oxígeno y glucosa (Brunckner et al. 2001). Además, estudios *in vivo* demuestran que ratones deficientes en JNK3 presentan neuroprotección y reducción de las crisis epilépticas ante el ácido kaínico (Yang et al. 1997; Brecht et al. 2005) y resistencia a la apoptosis inducida en hipoxia-isquemia (Kuan 2001). Estos datos demuestran el importante papel que JNK3 desempeña en la muerte neuronal. No obstante, la elevada homología entre las isoformas de JNK dificulta el desarrollo de anticuerpos e inhibidores selectivos para cada isoforma. De este modo, no está dilucidado si JNK3 juega un papel más fuerte que las otras dos isoformas que también se expresan en cerebro y si el efecto neuroprotector es debido únicamente a la inhibición de una isoforma, o de las tres (Harper and Wilkie 2003).

5. MODELOS EXPERIMENTALES

5.1 MODELO EXPERIMENTAL DEL ÁCIDO 3-NITROPROPIÓNICO

5.1.1 EL ÁCIDO NITROPROPIÓNICO (3NP)

El ácido 3-nitropropiónico (3NP) es una toxina natural (Figura I.16) descrita tanto en plantas del género *Astragalus*, como en el género de hongos, *Arthrimum* (Candlish et al. 1969; Hu et al. 1986; Liu et al. 1992). Esta toxina es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y causar daño en el SNC, al ser administrada de forma sistémica ya sea por vía subcutánea o por vía intraperitoneal (Hamilton and Gould 1987).

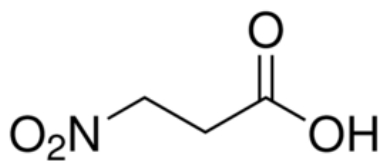


Figura I.16: Estructura molecular del 3NP.

Uno de los principales mecanismos de acción del 3NP, es la inhibición selectiva del complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial, la SDH (*Succinate dehydrogenase*). Al interrumpir el metabolismo energético, se produce ROS y NOS, además de una disminución severa de las concentraciones de ATP, conduciendo a la muerte celular (Browne et al. 1997; Schulz et al. 1995).

La analogía estructural del 3NP con el succinato (sustrato de la SDH) y los estudios farmacológicos llevados a cabo en la mitocondria, han permitido definir el 3NP como un inhibidor irreversible de la SDH, ya que se une covalentemente a este enzima (Coles et al.

I. INTRODUCCIÓN

1979) (Figura I.17). La inhibición de SDH por el 3NP se produce en todas las regiones del cerebro. Sin embargo, el estriado, constituido por un 95% de neuronas GABAérgicas, es el área más susceptible a sufrir el proceso de neurodegeneración. La neurodegeneración estriatal ocurre cuando la inhibición de la SDH alcanza el 50%-60%. No obstante, una inhibición inferior puede producir alteraciones celulares, sin dar lugar a un proceso neurodegenerativo (Alexi et al. 1998; Brouillet et al. 1998; Blum et al. 2002; Bizat et al. 2003). En humanos, la ingesta accidental de 3NP produce una degeneración preferentemente en el putamen y núcleo caudado, que se asocia a síntomas neurológicos severos, como la distonía y la discinesia (Ludolph et al. 1991).

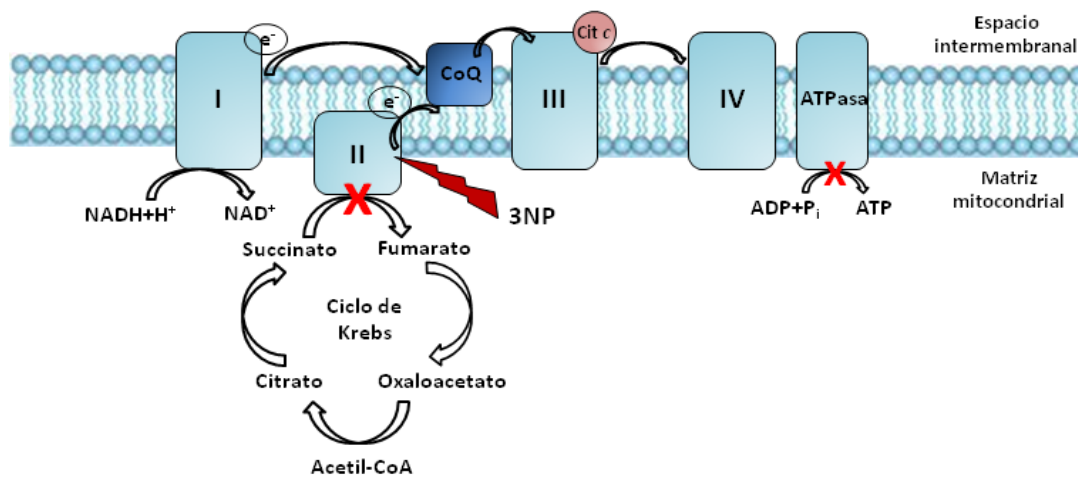


Figura I.17: Inhibición irreversible del complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial, por acción del 3NP. Inducción a una desaceleración del ciclo de Krebs y a una reducción de la síntesis del ATP. Complejo I- NADH deshidrogenasa; complejo II- succinato deshidrogenasa; complejo III- Citocromo c reductasa; Complejo IV- Citocromo c oxidasa; ATPasa- ATP sintasa (adaptado Túnez et al. 2010).

Por tanto, el uso de 3NP constituye un modelo adecuado para el estudio de enfermedades donde la disfunción mitocondrial y la alteración del metabolismo energético juegan un papel evidente en la patogénesis (Wallace 1999; Beal 1995). En concreto, la administración sistémica o aguda de 3NP en roedores, está aceptada como modelo experimental para el estudio de la enfermedad de Huntington (EH) (Beal et al. 1993), ya que esta toxina replica características fenotípicas e histológicas presentes en pacientes con EH, tales como, deficiencias neuroconductoras, alteración de la actividad locomotora y un deterioro cognitivo asociado a una degeneración estriatal con astrogliosis (Johri et al. 2013).

5.1.2 MECANISMOS DE NEURODEGENERACIÓN INDUCIDOS POR 3NP

La neurotoxicidad del 3NP está relacionada con un déficit energético y una disfunción mitocondrial, consecuencia de la inhibición irreversible del complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial (Figura I.17). Sin embargo, hay afectación en otros procesos metabólicos como la inhibición del ciclo de Krebs, la disminución de los niveles de ATP, la reducción del potencial de membrana mitocondrial, alteraciones en la homeostasis del Ca^{2+} , producción de radicales libres y activación de vías de muerte celular (Bizat et al. 2003; Mirandola et al. 2010; Rosenstock et al. 2004).

5.1.2.1 Bloqueo del ciclo de Krebs

La enzima SDH, además de ser el principal constituyente del complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial, también es responsable de la oxidación del succinato a fumarato en el ciclo de Krebs. Dado que el 3NP posee una estructura química similar al succinato, es capaz de bloquear el ciclo de Krebs, disminuyendo la producción de NADH (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide*) disponible para el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (Figura I.17) (Henry et al. 2002; Turan et al. 2006).

5.1.2.2 Reducción del ATP y homeostasis del calcio

La inhibición de la cadena respiratoria conduce a una reducción de la tasa de ATP intracelular. Debido a este déficit en el metabolismo energético, la actividad de las bombas de transporte iónico (Na^+/K^+ -ATPasa) disminuye, conduciendo a una despolarización de la membrana plasmática. La despolarización irreversible de la membrana permite el desbloqueo de los receptores de NMDA (*N-Methyl-D-Aspartate*) por el Mg^{2+} , y una consecuente entrada de iones de Ca^{2+} y Na^{2+} . Esta es la hipótesis más comúnmente postulada para explicar una excitotoxicidad indirecta inducida por 3NP (Beal et al. 1993; Novelli et al. 1988; Perez de la Cruz and Santamaria, 2007).

5.1.2.3 Reducción del potencial de membrana

La pérdida del potencial de membrana conlleva a una translocación del citocromo *c*, ya que se desencadena la formación del poro mitocondrial mPTP (Bizat et al. 2003). La apertura de este poro debida a la traslocación de miembros de la familia Bcl-2 hacia la mitocondria, como Bax y Bak, no sólo produce la translocación del citocromo *c*, sino que también libera otros factores apoptóticos como SMAC/Diablo (Galas et al. 2004).

5.1.2.4 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo proviene del incremento de la producción de radicales libres. El tratamiento con 3NP induce una producción anormal de ROS (*Reactive Oxygen Species*), debido a la activación de receptores NMDA (Liot et al. 2009) y a un aumento en la liberación de especies altamente reactivas derivadas de la formación de NO (*Nitric Oxide*), que amplifican el bloqueo del complejo II (Túnez et al. 2010; Liot et al. 2009).

5.1.2.5 Activación de cinasas y proteasas

El bloqueo específico del complejo II mitocondrial por el 3NP, y el incremento de Ca^{2+} intracelular, son factores clave para conducir a la activación de dos vías apoptóticas paralelas: la vía mitocondrial que involucra la caspasa-9, y la vía de la calpaína. La caspasa-9, una vez activada, proteoliza a la caspasa-3 activándola e induciendo la muerte por apoptosis. En paralelo, el incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular activa a la μ -calpaína y posiblemente a la m-calpaína. Sin embargo, se ha descrito la activación de las caspasas como un mecanismo transitorio, en el cual el incremento de la actividad de calpaína media la inactivación de caspasa-9 y regula negativamente la caspasa-3, degradándola (Bizat et al. 2003). Aunque en la neurodegeneración inducida por 3NP hay activación de la calpaína, es probable que otros mecanismos celulares también contribuyan en esta toxicidad. En este sentido, estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que en neuronas estriatales de rata tratadas con 3NP hay activación de la vía de JNK, sugiriendo que ésta puede desencadenar la activación de factores de transcripción que promuevan la muerte celular (García et al. 2002).

5.2 MODELO EXPERIMENTAL DEL ÁCIDO KAÍNICO

5.2.1 EL ÁCIDO KAÍNICO

El ácido kaínico (*2-carboxy-4-isopropenylpyrrolidin-3-ylacetic acid*, KA) (Figura I.18) fue aislado por primera vez en la alga roja, *Digenea simplex*, encontrada en aguas tropicales y subtropicales (Murakami et al. 1953). El KA es un análogo no degradable del glutamato, y una potente neurotoxina que actúa a través de los receptores de glutamato, presentando afinidad por los receptores ionotrópicos no-NMDA, en concreto a los receptores kainato (KAR).

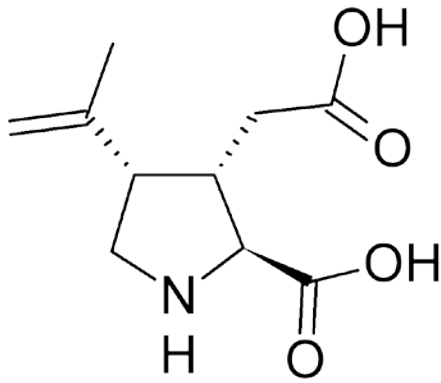


Figura I.18: Estructura molecular del KA.

Existen dos grandes grupos de receptores de glutamato: los receptores ionotrópicos (iGluR) y los metabotrópicos (mGluR). Los primeros regulan el paso de iones a través de la membrana plasmática, y su permeabilidad a éstos se modifica cuando el glutamato se une al receptor. Los receptores metabotrópicos, en cambio, tras la unión del glutamato, modifican su interacción con otras proteínas citosólicas y dan lugar a la activación de determinadas cascadas de señalización intracelular. La estimulación excesiva de los receptores de glutamato induce excitotoxicidad, principal inductor de los procesos de muerte celular que ocurren en enfermedades del sistema nervioso central (Kew and Kemp 2005).

Cuando el glutamato se une a los iGluRs, produce cambios conformacionales en el receptor, dando lugar a la apertura del canal y permitiendo el flujo de iones de Ca^{2+} y/o Na^{+} hacia el citosol, y de K^{+} hacia el medio extracelular. Los iGluRs incluyen a tres tipos principales de receptores: los NMDAR (*N-Methyl-D-Aspartate Receptor*), los AMPAR (*AminoMethylphosphoric Acid Receptor*) y los KAR (*Kainate Receptors*) (Kew and Kemp 2005; Levesque and Avoli 2013).

Los receptores de NMDA se caracterizan por poseer una alta permeabilidad al Ca^{2+} y una activación de activación lenta. Cuando se da la unión de glutamato o NMDA al receptor, se estimula la apertura del canal, liberando el catión Mg^{2+} y permitiendo la entrada de Ca^{2+} , que actuará como segundo mensajero activando diversas cascadas de señalización (Mori et al. 1992). Por otro lado, los receptores AMPA/Kainato también se denominan receptores no-NMDA, al no ser sensibles a los antagonistas selectivos de los receptores NMDA. Éstos presentan menor afinidad por el glutamato pero tienen una cinética de activación mucho más rápida que los receptores NMDA (Kew and Kemp 2005).

El KA ejerce sus propiedades epileptogénicas y neuroexcitotóxicas actuando como agonista específico de los receptores kainato (KAR) (Vincent and Mulle, 2009; Bloss and Hunter 2010). La familia de KARs se divide en dos subfamilias, los GluR5-7 y los KAR1-2. Estos receptores se expresan en la amígdala (Rogawski et al. 2003), corteza entorrinal (Patel et al. 1986), ganglios

basales (Jin and Smith 2011), cerebelo (Wisden and Seeburg 1993) e hipocampo, donde se han detectado elevados niveles de KAR1 y KAR2 (Bloss and Hunter 2011). Se ha demostrado que KAR1 se expresa mayoritariamente en neuronas piramidales de CA3, mientras que KAR2 se expresa en las neuronas piramidales de CA1 y CA3, tanto a nivel presináptico, como postsináptico (Werner et al. 1991; Wisden and Seeburg 1993; Bahn et al. 1994). La afinidad del KA para KAR1 y KAR2, junto a los altos niveles de estos receptores en hipocampo, hace que esta región sea la más susceptible a la excitotoxicidad del KA y el área dónde empiezan y se desarrollan las crisis en este modelo experimental (Ben-Ari and Cossart 2000; Levesque et al. 2009). También los receptores GluR5, que se expresan en las interneuronas GABAérgicas de las regiones CA1, y los receptores GluR6 que mayoritariamente se expresa en CA3, intervienen en la acción excitatoria del KA (Bahn et al. 1994; Bloss and Hunter 2010).

En roedores, la administración local o sistémica de KA desencadena un patrón de convulsiones repetitivas durante varias horas, seguido de un período de latencia, y una posterior aparición espontánea de convulsiones (Ben-Ari 1985; Ben-Ari and Cossart 2000; Nadler 1981). Estas convulsiones causan daño cerebral, a menudo asociado a la formación aberrante de nuevas sinapsis, en simultáneo con un aumento de la densidad de receptores kainato, una activación glial, una desregulación de la homeostasis celular y una consecuente pérdida de neuronas hipocampales (Blumcke et al. 2000; Cavazos et al. 2004; Dudek et al. 2002; Kondratyev and Gale 2004; Lee et al. 2002; Niquet et al. 1994; Pitkanen and Sutula 2002). Estas alteraciones son similares a las que se desarrollan en la epilepsia más frecuente en humanos adultos, la epilepsia del lóbulo temporal (TLE) (Engel et al. 1989). De este modo, el modelo experimental del KA además de reproducir la TLE, permite la comprensión de mecanismos de muerte neuronal presentes en enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson o la Esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (Pitt et al. 2000; Hynf et al. 2004; Meredith et al. 2009).

5.2.2 EL HIPOCAMPO

El hipocampo es una estructura que forma parte de un sistema de integración sensorial multimodal dentro del SNC (Sweatt 2004), participando en procesos tales como la memoria y el aprendizaje (Cooper and Lowenstein, 2002). También participa en la detección de estímulos novedosos; y por lo tanto, es clave tanto en los procesos de habituación, como en los de

sensibilización y en los de condicionamiento clásico. También se ha descrito su participación en la conducta de búsqueda y en la respuesta al estrés (Fernandez-Espejo 1996).

El hipocampo, junto con la amígdala, el tálamo, el hipotálamo, el área septal, la corteza olfatoria, entre otras estructuras del SNC, forma parte del sistema límbico. En roedores, es una estructura allocortical compleja de forma cilíndrica y organizada en capas. El extremo anterior del hipocampo, denominado polo septal, se localiza dorsalmente en el cerebro y es contiguo a su homólogo contralateral (Cassel et al. 1997).

A nivel celular, en el hipocampo se pueden distinguir diferentes regiones. El extremo subicular está formado por células piramidales de pequeño tamaño y que corresponde a la región CA1 de Lorente de Nó (1934). La zona proximal hacia el giro dentado se caracteriza por células piramidales de mayor tamaño, que corresponden a la región CA3, la única región que recibe contactos sinápticos desde las fibras musgosas que provienen del giro dentado. Otra de las regiones presentes en el hipocampo, la región CA2, se sitúa entre las dos anteriores (Kosaka et al. 1988; Ribak et al. 1985).

Las neuronas piramidales de las regiones CA (*Cornu Ammonis*) son en su mayoría glutamatérgicas y constituyen aproximadamente el 90% de todas las neuronas de las regiones CA del hipocampo (Swett, 2004). La disposición de los somas celulares y proyecciones dendríticas y axonales en el hipocampo se observa claramente en secciones transversales del órgano, formando capas que se curvan y pliegan unas sobre otras (Amaral and Witter 1989). Sobre el *stratum pyramidale* (sp), formado por los somas de las células piramidales, se dispone el *stratum oriens* (so), que contiene las dendritas basales de las células piramidales, y sobre éste, el *alveus*, que corresponde a la sustancia blanca del resto de la corteza. Por debajo de la capa de células piramidales, se encuentra el *stratum radiatum* (sr) formado por las dendritas apicales de las células piramidales y el *stratum lacunosum-moleculare* (slm), el más profundo. En CA3 se encuentra el *stratum lucidum* (sl), entre el *stratum pyramidale* y el *radiatum*, una capa inervada por las fibras musgosas de la células granulares del giro dentado (Figura I.19) (Stanfield and Cowan 1998; Cooper and Lowenstein 2002).

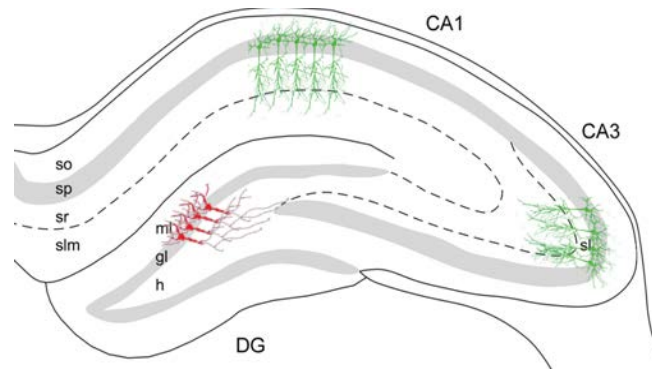


Figura I.19: Organización de los estratos celulares de las principales regiones del hipocampo, CA1, CA3 y giro dentado (GD). Las células en verde en CA1 y CA3 representan las células piramidales, mientras que en rojo se representan las células granulares del giro dentado. Los diferentes estratos moleculares están identificadas como: *so-stratum oriens*, *sp-stratum pyramidale*, *sr-stratum radiatum*, *slm-stratum lacunosum-moleculare*, *sl-stratum lucidum*. El giro dentado está formado por tres capas diferentes: ml-capla molecular, gl-capla granular o *stratum granulare*, h-hilus o capa de las células polimórficas (adaptado de Jinno 2009).

La organización funcional básica en el hipocampo se denomina circuito trisináptico, ya que existen tres vías sinápticas excitadoras que actúan en serie. La primera, constituida por las fibras perforantes, derivadas de la corteza entorrinal, contactan sobre las células granulares del giro dentado. La segunda, formada por los axones de las células granulares, las fibras musgosas, forman sinapsis con las células piramidales de CA3. La tercera, los axones de CA3 de la vía colateral de Schaffer contactan sinápticamente con las células de CA1 que, a su vez, proyectan sobre la corteza entorrinal, tanto directa como indirectamente a través del *subiculum*, cerrando de esta forma el circuito (Amaral and Witter 1989; Cooper and Lowenstein, 2002) (Figura I.20).

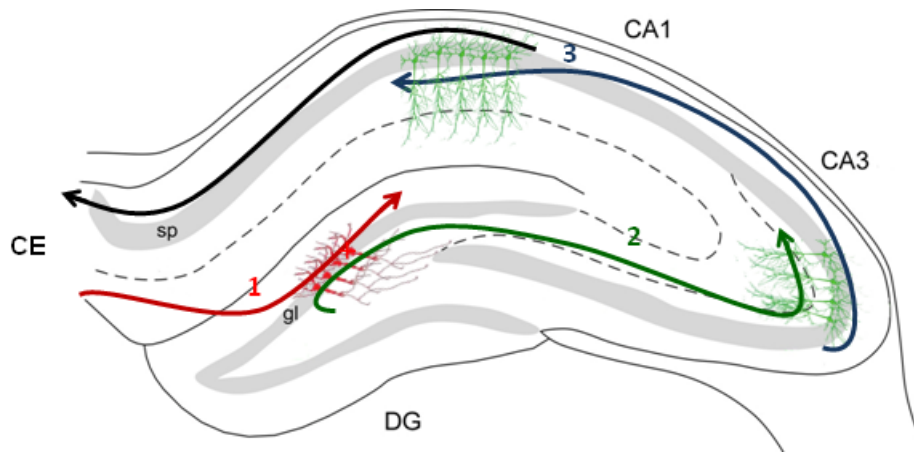


Figura I.20: Circuito trisináptico del hipocampo. 1) La vía perforante procedente de la corteza entorrinal (CE) contacta con las células granulares del giro dentado (DG). 2) Las fibras musgosas del giro dentado forman sinapsis con las células piramidales de CA3. 3) La vía colateral de Schaffer contacta con las células piramidales de CA1. Las células de CA1 proyectan hacia la corteza entorrinal cerrando el circuito (adaptado de Jinno 2009; Neves et al. 2008).

5.2.3. MECANISMOS DE NEURODEGENERACIÓN INDUCIDOS POR KA

La excitación producida tras la unión del KA a los receptores ionotrópicos de glutamato induce a numerosos eventos celulares, incluyendo un incremento de calcio intracelular, producción de ROS, disfunción mitocondrial y muerte neuronal en determinadas zonas del cerebro, particularmente en las subregiones del hipocampo CA1, CA3 y en el hilus del giro dentado. Esta unión del KA con los receptores provoca una activación glial y una respuesta inflamatoria característica (Wang et al. 2005).

5.2.3.1 Vulnerabilidad selectiva de las neuronas hipocampales

La vulnerabilidad selectiva de las neuronas hipocampales está relacionada con la distribución de los KARs en el hipocampo, ya que éstos se presentan como los principales moduladores de la transmisión sináptica inducida por KA (Bloss and Hunter 2010). Diversos estudios sugieren que el efecto epileptogénico del KA sobre las neuronas piramidales de CA3 está causado por la activación de KARs expresados preferentemente en la región sináptica de las fibras musgosas, que promueven la liberación de glutamato en el espacio sináptico (Ben-Ari and Cossart, 2000). La región sináptica de las fibras musgosas (*stratum lucidum*) está enriquecida en KARs de elevada afinidad, que pueden ser activados incluso por bajas concentraciones de KA que atraviesa la barrera hematoencefálica induciendo crisis epilépticas (Berger et al. 1986). La

despolarización inducida en las neuronas piramidales de CA3 genera la sincronización de circuitos glutamatérgicos, que propagan la hiperexcitabilidad a CA1 y a otras regiones del sistema límbico (Ben-Ari and Gho, 1988; Robinson and Deadwyler 1981).

5.2.3.2 Estrés oxidativo

Los KARs tienen acciones tanto como moduladores presinápticos, como excitadores postsinápticos (Campbell et al. 2007; Youn and Randic 2004). La administración de KA conduce a la despolarización de la membrana celular y a la entrada masiva de Ca^{2+} (Brorson et al. 1994). Estas condiciones favorecen la producción de ROS, que induce cambios estructurales y funcionales en las proteínas y daño en el DNA. Asimismo, el KA produce la liberación de NOS que modula la transmisión glutamatérgica y puede inducir cambios a nivel de la función mitocondrial (Nakaki et al. 2000; Prast et al. 2001). La generación de otros radicales libres también contribuye al daño neuronal y consecuentemente, a la muerte celular en el hipocampo (Ueda et al. 2002).

5.2.3.3 Inducción de muerte neuronal

En general, el daño neuronal excitotóxico es mediado por la entrada masiva de Ca^{2+} en las células durante las crisis epilépticas (Lado et al. 2002). Los niveles elevados de Ca^{2+} activan el metabolismo oxidativo generando radicales libres y dañando la membrana celular. Además, se activan mecanismos de muerte celular, ya sea por apoptosis o por necrosis.

Se han descrito mecanismos necróticos inducidos por la administración intracerebral de KA (Ben-Ari 1985) sin embargo, en áreas distales al lugar de aplicación, y cuando el KA es administrado intraperitonealmente, se han observado cambios morfológicos que indican una neurodegeneración apoptótica (Nishiyama et al. 1996). Así, si bien durante las crisis epilépticas se ha observado que hay una activación de la vía extrínseca de la apoptosis, relacionada con la activación de los receptores de muerte TNFR1 y Fas, el mecanismo de activación de esta vía no está totalmente descrito (Shinoda et al. 2003, 2004; Henshall et al. 2001; Murphy et al. 2004). También, la funcionalidad mitocondrial se ve afectada por la entrada de calcio en la mitocondria, desencadenando mecanismos de muerte por la vía intrínseca (Griffiths et al. 1984). Se ha detectado, bajo crisis epilépticas, la movilidad de Bax a la membrana externa mitocondrial, la liberación del citocromo c y la consecuente activación de caspasa-9 (Henshall et al. 2000; 2001; Li et al. 2004).

5.2.3.4 Activación glial

En la neurotoxicidad inducida por KA, la microglia se activa y libera ROS, NOS (Stuehr et al. 1991; Amor et al. 2010) y diferentes citocinas, tales como IL-1 β , IL-6, IL-12, I-L18 y TNF α , proteasas y aminoácidos excitatorios que contribuyen a la muerte neuronal (Mack et al. 2003; Kato and Walz 2000; Penkowa et al. 2001). Además, se ha demostrado que la administración de KA intrahipocampal o intraperitoneal, provoca una importante reacción astrogliar determinada por la presencia de glía reactiva (Bendotti et al. 2000; Ding et al. 2000).

Se han descrito que los niveles de IL-6 incrementan después de crisis límbicas inducidas por KA (Ravizza et al. 2005). Esta citocina es secretada por macrófagos y células dendríticas, y parece ser un factor crítico en las fases tempranas de los insultos al SNC, generalmente con una función de reparación (Amor et al. 2010). La IL-12, otra citocina proinflamatoria y estrechamente relacionada con la muerte neuronal por excitotoxicidad, es producida principalmente por la microglía activada y requiere la inducción de IFN γ (Mizuno et al. 2008; Chen et al. 2005). Estudios *in vivo* e *in vitro* demostraron que la microglía se activa significativamente por el KA, induciendo niveles elevados de IL-1 β (Zheng et al. 2010). TNF α es una citocina principalmente producida por la microglía y astrocitos en el SNC. La administración de KA induce la expresión de elevados niveles de mRNA de TNF α y de su proteína. Esta citocina puede tener propiedades neuroprotectoras en contraste con el papel de otras citocinas proinflamatorias (Lu et al. 2008).

5.2.3.5 Expresión de genes de respuesta inmediata

Uno de los primeros cambios que ocurren en condiciones de hiperexcitabilidad neuronal inducida por KA, es la sobreexpresión de genes de respuesta inmediata. Se ha descrito, bajo estas condiciones, la expresión de mRNA que codifica para proteínas de choque térmico como *Hsp27*, *Hsp70* y *Hsp72*. Estudios *in vivo* han demostrado que la sobreexpresión de *Hsp27* y *Hsp70* tienen una función protectora ante el daño excitotóxico, aunque no consiguen rescatar las células de la muerte excitotóxica, mientras que la expresión elevada de *Hsp72* puede ser nociva para las células (Planas et al. 1995; Yenari et al. 1998). La sobreexpresión de los genes *fos*, *jun* y *Erg1* también se detecta en regiones vulnerables del hipocampo tras la administración de KA (Pozas et al. 1997). Así, la inmunoreactividad de c-Fos se mantiene elevada en el hipocampo, sugiriendo que los niveles altos de c-Fos se pueden asociar a la muerte celular. Sin embargo, este incremento prolongado de c-Fos no tiene un carácter predictivo, y no es preciso para que ocurra daño neuronal excitotóxico, por lo que c-Fos se

I. INTRODUCCIÓN

presenta como un marcador de la sensibilidad de las células a la excitotoxicidad del KA (Gass and Herdegen 1995; Kasof et al. 1995). Los genes *jun* y *fos*, codifican para proteínas que forman el complejo AP-1, regulando la expresión de otros genes (Chiu et al. 1989).

Se han detectado diferentes niveles de mRNA e inmunoreactividad de algunos neuropéptidos, como SOM (*Somatostatin*), NPY (*Neuropeptide Y*) entre otros, durante las crisis epilépticas (Sloviter 1991).

II. OBJETIVOS

Uno de los principales efectos de las enfermedades neurodegenerativas es la inducción de muerte celular asociada a procesos inflamatorios, en los que la activación de la vía de JNK tiene un papel clave y en concreto la isoforma JNK3.

Objetivo general:

Caracterizar los mecanismos moleculares y celulares responsables de la neuroprotección observada en ausencia de la isoforma JNK3, mediante la utilización de ratones deficientes para JNK3 (*Jnk3^{-/-}*) y bajo la acción de estímulos neurotóxicos.

Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar el efecto neuroprotector en ausencia de JNK3 en modelos neurotóxicos representativos del proceso de neurodegeneración.

1.1 Estudiar la neurodegeneración en ratones *Jnk3^{-/-}* tratados con ácido kaínico (KA) como modelo experimental de epilepsia del lóbulo temporal (TLE).

1.2 Estudiar la neurodegeneración en ratones *Jnk3^{-/-}* tratados con ácido 3-nitropropiónico (3NP) como modelo experimental de la enfermedad de Huntington.

2. Estudiar la modulación de la actividad transcripcional inducida por la ausencia de JNK3.

2.1 Analizar el efecto específico de la delección de JNK3, comparativamente con la ausencia de la isoforma JNK1, mediante la utilización de ratones *Jnk1^{-/-}*.

3. Analizar funcionalmente los mecanismos apoptóticos y neuroinflamatorios regulados por las isoformas JNK3 y JNK1 en el modelo del ácido kaínico.

3.1 Estudiar la activación glial y regulación de mediadores proinflamatorios en ratones *Jnk3^{-/-}* y *Jnk1^{-/-}*.

3.2 Estudiar la regulación de la expresión de genes apoptóticos en ratones *Jnk3^{-/-}* y *Jnk1^{-/-}*.

III. MÉTODOS

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para la realización de este trabajo se utilizaron ratones macho de la cepa C57BL/6 (Harlan Lab.) con un peso comprendido entre los 25-35 gramos, y con una edad de 2 meses. Los genotipos con los que se trabajó fueron los siguientes:

- Cepa salvaje (*Wild Type*, WT): C57BL/6.
- Knock-out para *Jnk3* (KO JNK3): *Jnk3*^{-/-} (con fondo genético C57BL/6)
- Knock-out para *Jnk1* (KO JNK1): *Jnk1*^{-/-} (con fondo genético C57BL/6)

La generación y caracterización inicial de los ratones *Jnk1*^{-/-} fue descrita por Dong y colaboradores (1998), mientras que los ratones *Jnk3*^{-/-} fueron descritos por Yang y colaboradores (1997). Ambos ratones *Jnk3*^{-/-} y *Jnk1*^{-/-} fueron cedidos por la Dra. Carme Caelles del Departamento de Bioquímica y Biología celular de la Universidad de Barcelona y mantenidos en un fondo genético C57BL/6.

Los ratones se mantuvieron estabulados en condiciones de temperatura y humedad constante, siguiendo un ciclo de luz/oscuridad de 12 h y con acceso libre a la comida y al agua.

Los animales fueron manipulados según la Directiva de la Comunidad Europea (86/609EEC) y cumpliendo el procedimiento descrito por el Departament d'Agricultura, Ramaderia y Pesca de la Generalitat de Catalunya.

2. MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN *IN VIVO*

2.1 Modelo experimental de la enfermedad de Huntington basado en la administración de ácido 3-nitropropiónico (3NP)

El modelo experimental de la enfermedad de Huntington basado en la administración de ácido 3-nitropropiónico (3NP) en ratas y ratones está ampliamente descrito (Gould and Gustine 1982; Hamilton and Gould 1987; Beal et al. 1986) y ha sido utilizado en las últimas décadas como modelo para estudiar mecanismos de toxicidad en el núcleo estriado. La administración de dosis neurotóxicas de 3NP en estos animales provoca la aparición de un comportamiento indicativo de daño en esta zona del cerebro. Así, los animales presentan un periodo de contracciones sostenidas que se traducen en movimientos repetitivos e involuntarios hasta un estadio de parálisis de los miembros posteriores (Hamilton and Gould 1987; Beal et al. 1993).

III. MÉTODOS

En este estudio, se evaluaron los efectos de la administración intraperitoneal de 3NP (Sigma-Aldrich) a una dosis de 70 mg/Kg (Blum et al. 2003). Para ello, se utilizaron ratones de la cepa salvaje (WT) y ratones *Jnk3^{-/-}*, y se realizaron dos tipos de tratamiento:

Tratamiento 3NP I: 10 ratones WT y 10 ratones *Jnk3^{-/-}* fueron utilizados para este grupo de tratamiento. 5 ratones de cada genotipo fueron tratados con una única dosis diaria de 3NP, durante 3 días y los 5 restantes fueron tratados del mismo modo con solución salina (0.9 % NaCl) y utilizados como grupo control. Los animales fueron sacrificados a las 24h tras la última administración. Un hemisferio del cerebro fue procesado, para la realización de técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas, y se procedió al aislamiento del núcleo estriado del hemisferio restante para el estudio de los niveles proteicos mediante *Western blot* y análisis de la actividad calpaína (Figura III.1).

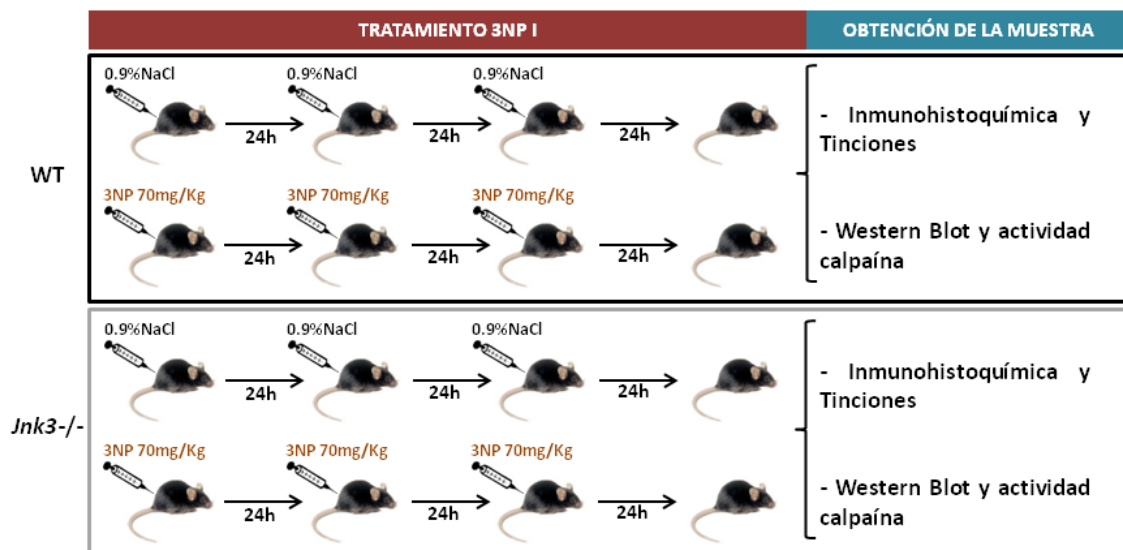


Figura III.1: Esquema representativo del diseño experimental basado en el tratamiento de 3 días con 3NP en ratones WT y *Jnk3^{-/-}*.

Tratamiento 3NP II: Para este tratamiento se usaron ratones WT y *Jnk3^{-/-}*. Para cada genotipo 3 ratones fueron tratados con una única dosis de 3NP y 3 ratones con solución salina para formar el grupo control. Los animales fueron sacrificados a las 3 h tras la administración y se obtuvieron los cerebros para el aislamiento del núcleo estriado, con el fin de realizar el análisis de la actividad del enzima succinato deshidrogenasa (Figura III.2).

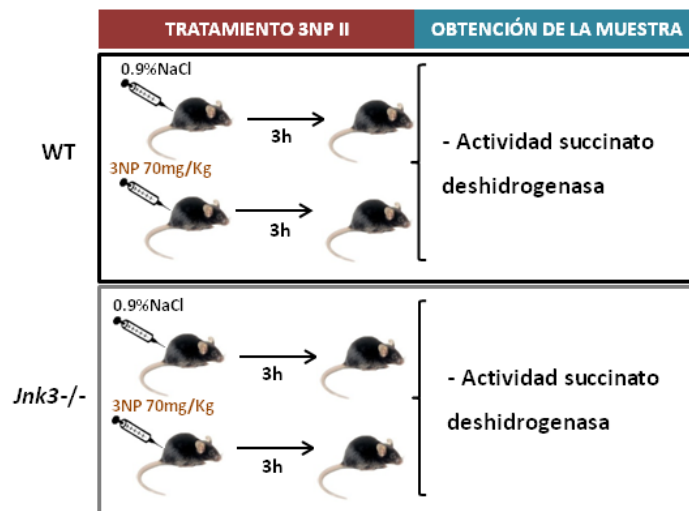


Figura III.2: Esquema representativo del diseño experimental basado en el tratamiento de 3 h con 3NP en ratones WT y *Jnk3^{-/-}*.

2.2 Modelo experimental de epilepsia basado en la administración de ácido kaínico (KA)

Este modelo experimental de epilepsia fue establecido en ratas y ratones por diferentes autores (Ben-Ari and Crossart, 2000; Leite et al. 2002), basado en la administración sistémica de ácido kaínico (KA), un análogo del glutamato (Olney et al. 1974, 1979), que provoca un síndrome de crisis epilépticas repetitivas. Este modelo experimental es el que reproduce más fielmente la epilepsia del lóbulo temporal (TLE) en humanos, siendo ésta la epilepsia más común en adultos (Engel et al. 1989). En la primera hora tras la administración de KA, los animales empiezan a presentar convulsiones recurrentes a nivel motor. Estas convulsiones se desarrollan en un *status epilepticus* con una durabilidad aproximada de 2 horas (Ben-Ari 1985; Chuang et al. 2004).

En este estudio se inyectó KA (Sigma-Aldrich) intraperitonealmente a una única dosis de 30 mg/Kg. Esta dosis produce la aparición de crisis epilépticas a partir de los 30 minutos de la administración y éstas persisten hasta las 2 h (Schauwecker 2000). Para llevar a cabo este

III. MÉTODOS

estudio, se trabajó con ratones WT, *Jnk3*^{-/-} y *Jnk1*^{-/-}, y se realizaron diferentes grupos de tratamiento en función de los tiempos de obtención de la muestra después de la administración de KA y de las técnicas de estudio aplicadas posteriormente:

Tratamiento KA I: Los ratones fueron tratados con KA a una única dosis de 30 mg/Kg, o solución salina en el grupo control. Para el estudio comparativo entre WT y *Jnk3*^{-/-}, 3 ratones por genotipo y tiempo fueron utilizados. Los ratones se sacrificaron tras 1, 3, 6 y 12 h de la administración de KA. Para el grupo control, 3 ratones por genotipo fueron inyectados con solución salina y sacrificados a las 12 h. Para el estudio comparativo entre WT, *Jnk3*^{-/-} y *Jnk1*^{-/-}, 3 ratones por genotipo fueron sacrificados tras 3 y 6 h de la administración de KA. Como controles, 3 ratones de cada genotipo fueron inyectados con solución salina y sacrificados a las 6 h. De estos ratones se extrajeron los hipocampos para el posterior análisis de los niveles proteicos mediante la técnica de *Western blot* (Figura III.3).

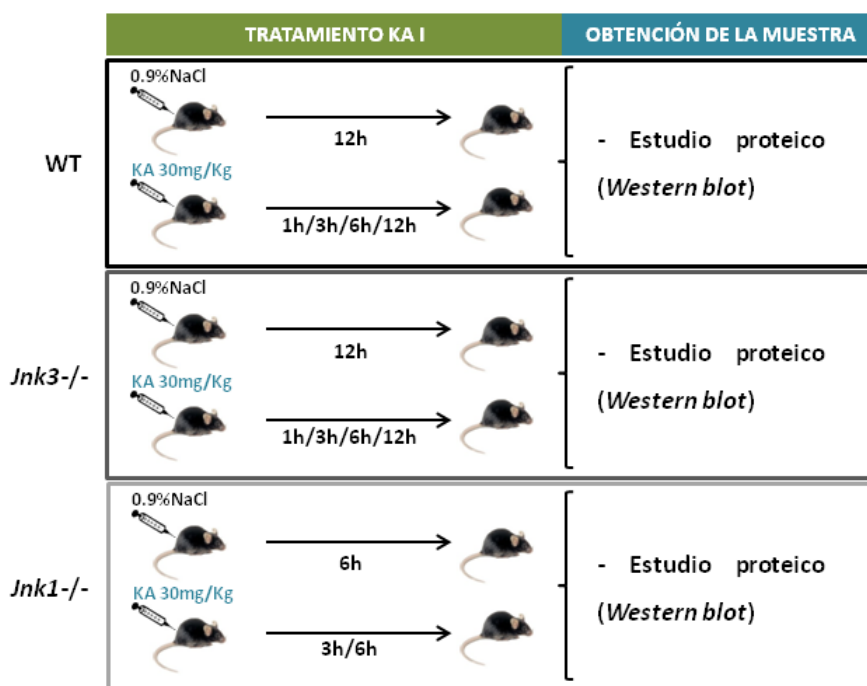


Figura II.3: Esquema representativo de los tratamientos con KA de ratones WT, *Jnk3*^{-/-}, *Jnk1*^{-/-}, para la obtención de muestras y el análisis de niveles proteicos en hipocampo.

Tratamiento KA II: Los ratones fueron tratados con KA a una única dosis de 30 mg/Kg o solución salina en el grupo control. Para el estudio comparativo entre WT y *Jnk3*^{-/-}, 5 ratones por genotipo y tiempo fueron utilizados. Los ratones se sacrificaron tras 3, 6, 12, 24 h o 3 días de la administración de KA. Para el grupo control, 5 ratones por genotipo fueron inyectados con solución salina y sacrificados a las 24 h y 3 días. Para el estudio comparativo entre WT, *Jnk3*^{-/-} y *Jnk1*^{-/-}, 5 ratones por genotipo fueron sacrificados tras 3, 6, 12, 24 h o 3 días de la administración de KA. Como controles, 5 ratones de cada genotipo fueron inyectados con solución salina y sacrificados a las 24h y 3 días. Los cerebros fueron procesados para la realización de técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas (Figura III.4).

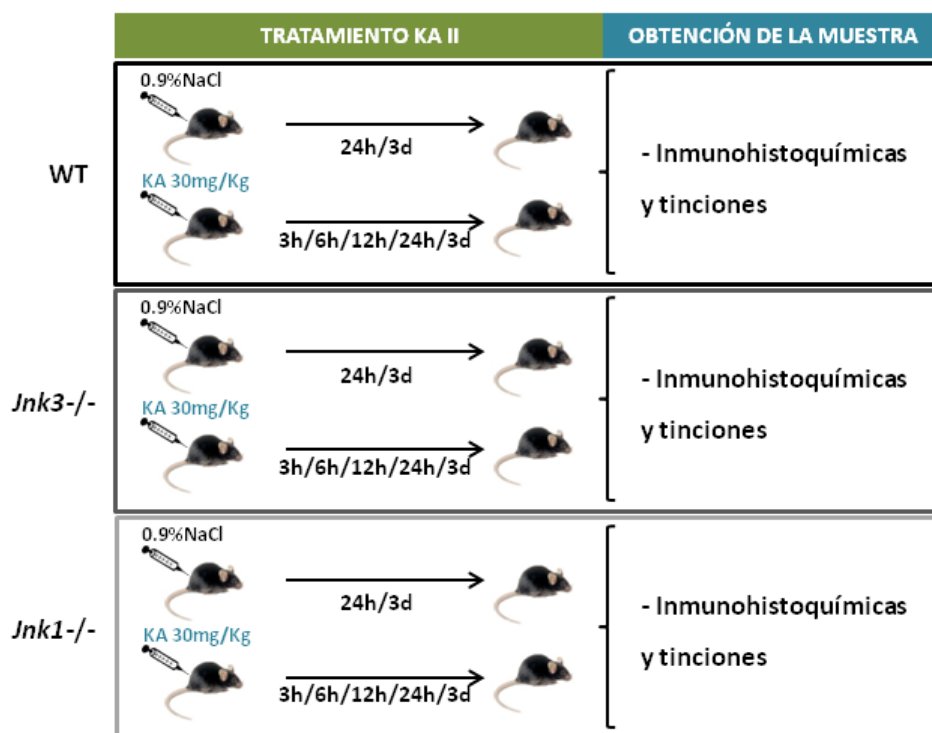


Figura III.4: Esquema representativo de los tratamientos con KA de ratones WT, *Jnk1*^{-/-} y *Jnk3*^{-/-}, para la obtención de muestras y la realización de tinciones y técnicas de inmunohistoquímica.

III. MÉTODOS

Tratamiento KA III: Para el estudio de la expresión génica entre ratones WT, *Jnk3*^{-/-} y *Jnk1*^{-/-}, 4 ratones de cada genotipo fueron tratados con KA a una única dosis de 30 mg/Kg y 4 ratones tratados con solución salina como grupo control. Los animales fueron sacrificados tras las 12 h de la administración de KA o solución salina y se aislaron los hipocampos, para el posterior análisis de la expresión génica (Figura III.5).

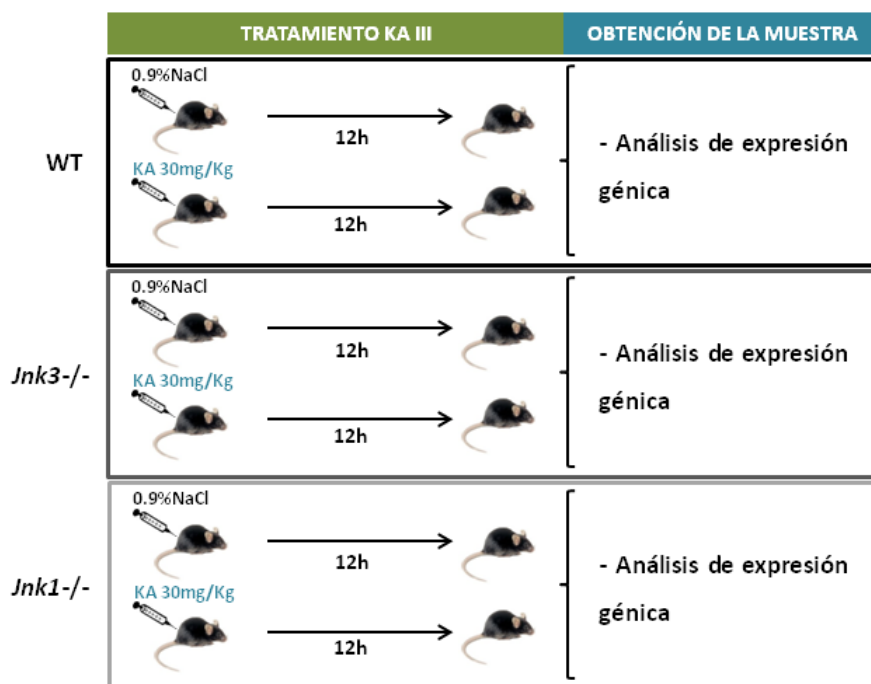


Figura III.5: Esquema representativo de los tratamientos con KA de ratones WT, *Jnk1*^{-/-} y *Jnk3*^{-/-}, para la obtención del hipocampo y el análisis de la expresión génica.

3. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

3.1 Fijación tisular por perfusión cardiaca

Preservar las propiedades físico-químicas de la muestra biológica a estudiar es el principio básico de las técnicas experimentales de inmunodetección histoquímica. Por este motivo, es imprescindible la fijación de las proteínas y moléculas del tejido de interés, proceso que se lleva a cabo mediante una solución fijadora.

Antes de proceder a la fijación del tejido, los ratones fueron anestesiados mediante la administración intraperitoneal de una mezcla de ketamina (Ketolar, Pfizer) a una dosis de 100 mg/Kg y xilacina (Rompun, Bayer) a 10 mg/Kg. Posteriormente, se procedió a la fijación de los

componentes del sistema nervioso mediante perfusión intracardiaca con una solución de paraformaldehído al 4 % (PFA) (Panreac) en tampón fosfato (PB) 0.1 M (K_2HPO_4 14 g/L, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 26.5 g/L).

Una vez finalizada la fijación intracardiaca, se extrajeron los cerebros siendo éstos postfijados en la misma solución de perfusión durante 24 h a 4 °C. A continuación, se llevó a cabo un proceso de crioprotección de 48-72 h en PFA 4 % y sacarosa 30 % en PB 0.1 M. Finalmente los cerebros se congelaron en hielo seco y se guardaron a -80 °C para la posterior realización de secciones coronales de 20 μ m de grosor a una temperatura de -20 °C. Dichos cortes se realizaron con el criostato (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) y se guardaron en solución crioprotectora (glicerol 30 %, etilenoglicol 30 % en PB 0.1 M) a -20 °C hasta el momento de su utilización.

3.2 Obtención de tejido para la extracción de proteína y RNA

Los ratones cuyos cerebros iban a ser destinados a los estudios de niveles proteicos, a la valoración de actividades enzimáticas, o al estudio de la expresión génica, fueron anestesiados tal y como se menciona anteriormente, para después ser decapitados. Posteriormente, se realizó la extracción y disección del cerebro, conservándose rápidamente en hielo seco las estructuras de interés.

3.2.1 Obtención de extractos totales de proteína

El tejido obtenido por decapitación de los animales y destinado para la valoración proteica, fue homogenizado con 500 μ l de tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Triton X-100 1 % y cocktail de inhibidores de proteasas (Complete, Roche Diagnostics)) mediante el politrón (PT10-35, Metrohm). Posteriormente, los extractos homogenizados se centrifugaron a 13000 g durante 15 min a 4 °C y el sobrenadante se guardó a -80 °C para su posterior utilización. La concentración proteica del extracto se determinó siguiendo el ensayo del ácido bicinónico (BCA).

- **Determinación de la concentración proteica: método del BCA**

La determinación de la concentración proteica se realizó mediante el método del ácido bicinónico (BCA) (Pierce Company). Para ello, se añadieron 48 μ l H_2O a 2 μ l de extracto proteico y a continuación se añadió 1 ml de reactivo de BCA (reactivo A + reactivo B, en

proporción 50:1). Posteriormente, se incubó la mezcla durante 30 min a 65 °C y finalmente, tras dejarla enfriar 5 min, se procedió a la lectura de la absorbancia a 562 nm en un espectrofotómetro de microplaca (BioRad, Benchmarck Plus). La concentración de proteína se determinó por interpolación de las lecturas de absorbancia obtenidas en una recta de calibrado preparada con concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA, 2 mg/ml, Pierce Company).

3.2.2 Obtención de extractos de RNA

La extracción de RNA se realizó a partir de la región del hipocampo, que se obtuvo tras la decapitación del animal y la disección del cerebro.

Para la extracción de RNA, los dos hipocampos de cada cerebro de cada animal fueron homogenizados con 500 µl de TRIzol® (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA). Posteriormente, se añadió 200 µl de cloroformo y, tras agitación, se dejó reposar la mezcla 5 min en hielo. A continuación, se centrifugó dicha mezcla a 13000 g durante 15 min a 4 °C y se recuperó la fase acuosa superior. Con el fin de obtener un RNA más limpio, se repitió este proceso de extracción clorofórmica una vez más. Una vez obtenida la fase acuosa definitiva, se le añadió 200 µl de isopropanol. Tras una mezcla por inversión y una etapa de reposo de 10 min en hielo, se centrifugó a 13000 g durante 15 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 1 ml de etanol al 70 %. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 7500 g, durante 5 min a 4 °C. Se repitió el lavado con etanol al 70 % una segunda vez y tras la segunda centrifugación, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet mediante evaporación del etanol. Finalmente, se resuspendió el pellet con 30 µl de H₂O mQ autoclavada.

- **Cuantificación del RNA**

Una vez extraído el RNA, se procedió a la determinación de la concentración de RNA de las muestras obtenidas, así como del análisis de la pureza de éstas. Para ello, se utilizó el NanoDrop (ND-1000), mediante el cual se obtuvieron las lecturas de las absorbancias a 230, 260 y 280 nm. A partir de la lectura de 260 nm se obtuvo la concentración de RNA de la muestra, mientras que mediante las relaciones 260/280 nm y 260/230 nm se determinó la pureza de las mismas. Las muestras se consideraron puras cuando la primera relación era próxima a 2 y cuando la segunda era superior a 1.70. Tras la cuantificación de la concentración de RNA y de la pureza de las muestras, éstas fueron guardadas a -80 °C hasta su uso posterior.

4. TÉCNICAS EXPERIMENTALES

4.1 TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS

4.1.1 Inmunohistoquímica de fluorescencia

La inmunohistoquímica fue utilizada para la detección de proteínas específicas en secciones coronales de cerebro. Siguiendo el método de “free-floating”, diseñado para optimizar la penetración del anticuerpo en el tejido, ya que durante todo el proceso el tejido se mantiene en flotación, usando el agitador orbital Titramax 100 (Heidolph-Elektro GmbH&Co KG).

El primer paso en esta técnica consistió en lavar el tejido con PB 0.1M pH 7.2, con el objetivo de eliminar del mismo la solución crioprotectora. Posteriormente, se realizaron tres lavados durante 5 min con PBS 1X-Tritón® X 100 0.1% (PBS-T: K_2HPO_4 1.4 g/L, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 0.265 g/L, NaCl 8.1 g/L y Tritón® X 100 1 ml/L), para facilitar la entrada de los anticuerpos al tejido. A continuación, el tejido se incubó durante 2 h a temperatura ambiente con solución de bloqueo (FBS (*Fetal Bovine Serum*) 10 %, Tritón® X 100 0.1 % en PBS-gelatina 0.2 %). Tras tres lavados de 5 min con PBS-T 1X, el tejido se incubó con el anticuerpo primario durante una noche a 4 °C, usando como solución de incubación del anticuerpo primario: FBS 5 %, Tritón® X 100 0.1 % en PBS-gelatina 0.2 % y el anticuerpo primario a la concentración correspondiente indicada en la Tabla III.1. A continuación, se repitieron tres lavados durante 5 min con PBS-T 1X, y se procedió a incubar durante 2 h a temperatura ambiente y en oscuridad, el anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo. De nuevo, como solución de incubación se utilizó FBS 5 %, Tritón® X 100 0.1 % en PBS-gelatina 0.2 % y el anticuerpo secundario a la concentración correspondiente indicada en la Tabla III.1. Posteriormente, se realizaron tres lavados de 5 min con PBS-T 1X y a continuación, otros tres lavados con PBS 1X (K_2HPO_4 1.4 g/L, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 0.265 g/L, NaCl 8.1 g/L). Antes de montar las secciones sobre portaobjetos gelatinizados (Gelatina oro al 4%, Cromo III Potasio Sulfato 0.2%), se procedió a una contratinción con Hoescht (apartado 4.2.1). Finalmente, se montó la preparación con Fluoromount G™ (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA) y se observó el marcaje en el microscopio óptico de epifluorescencia (Olympus BX61).

4.1.2 Doble inmunohistoquímica de fluorescencia

El procedimiento para la realización de la técnica de doble inmunohistoquímica de fluorescencia fue el mismo que el anteriormente detallado, pero aplicando dos anticuerpos primarios y dos secundarios en las mismas muestras, para la detección de dos proteínas específicas diferentes. En este caso, es muy importante comprobar que los anticuerpos primarios no hayan sido producidos en la misma especie animal, con el fin de evitar la misma señal para las dos proteínas de interés.

ANTICUERPO PRIMARIO	CASA COMERCIAL	REFERENCIA	ORIGEN	DILUCIÓN
c-Fos	Santa Cruz	H-125	Rabbit	1:700
GFAP	DAKO	Z0334	Rabbit	1:2000
GFAP	Lab. vision	MS1376P	Mouse	1:1000
Iba-1	WAKO	019-19741	Rabbit	1:1000
ANTICUERPO SECUNDARIO	CASA COMERCIAL	REFERENCIA	ORIGEN	DILUCIÓN
Rabbit IgG Alexa Fluor 594	Invitrogen	A11037	Goat	1:500
Mouse IgG Alexa Fluor 488	Invitrogen	A11029	Goat	1:200

Tabla III.1: Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la detección inmunohistoquímica.

4.1.3 Western blot

La técnica de *Western blot* permite observar los niveles de una proteína específica y combina un proceso de migración electroforética con una inmunodetección. La electroforesis permite la separación de las proteínas en un gel de acrilamida en función de su masa molecular. Posteriormente, se lleva a cabo una transferencia de las proteínas a una membrana sintética, que actuará como soporte para llevar a cabo la detección de los niveles de una determinada proteína mediante el uso de anticuerpos específicos.

- **Preparación de las muestras**

Para la preparación de las muestras, se tomaron volúmenes de proteína total equivalentes a 10 µg de proteína y se les añadió tampón de carga 2X (β -mercaptoetanol 100mM, Tris-HCl 50mM pH 6.8, Glicerol 10%, SDS (Dodecilsulfato sódico) 2% y azul de bromofenol 0.05%) a una proporción 1:1 con el volumen proteico. A continuación las muestras fueron colocadas en un baño seco (Techne DRI-BLOCK DB-2A) a 95 °C, durante 5 min, con la finalidad de desnaturalizar las proteínas.

- **Electroforesis**

Las muestras fueron cargadas en un gel de electroforesis, que consta de dos fases: el gel concentrador, que permite concentrar las proteínas cargadas en el gel, y el gel separador, en el cual se separan las proteínas en función de su masa molecular.

Los reactivos y las proporciones necesarias para la elaboración de 2 geles de poliacrilamida-SDS se muestran en la Tabla III.2.

COMPONENTE	SEPARADOR 7.5 %	CONCENTRADOR 4 %
Acrilamida-bisacrilamida	5.26 ml	760 µl
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	5.25 ml	-----
Tris-HCl 1 M pH 6.8	-----	1.46 ml
SDS 10 %	420 µl	120 µl
H ₂ O destilada	9.85 ml	3.6 ml
APS 10 %	300 µl	60 µl
TEMED	50 µl	10 µl

Tabla III.2: Componentes y proporciones necesarias para la elaboración de dos geles de poliacrilamida-SDS en el sistema MiniProtean III (Bio-Rad).

Una vez polimerizados los geles, éstos se colocaron dentro de una cubeta de electroforesis Miniprotean III (BioRad) con suficiente tampón de migración (Tris 125 mM, Glicina 1,25 M, SDS 0.5 %) para que ambos extremos del gel queden en contacto con el tampón y permitir de esta manera cerrar el circuito. Finalmente, se cargaron las muestras en el gel, junto con un marcador estándar de peso molecular (Precision Plus Protein™ Dual Color Standarts, 161-0374; BioRad). La electroforesis se llevó a cabo a 90V-100 V el tiempo necesario para que la proteína se separe según su masa molecular.

- **Transferencia de las proteínas a la membrana**

Acabada la electroforesis, se llevó a cabo la transferencia proteica del gel a una membrana de polivinilideno (PVDF, 162-0177; BioRad), utilizando el sistema Mini Trans-Blot® (Bio-Rad). Este proceso permite la transferencia de las proteínas a la membrana, donde se realizará posteriormente la inmunodetección de las proteínas de interés. La transferencia se realizó a una intensidad de corriente eléctrica constante de 200 mA en tampón de transferencia (Tris 25mM, Glicina 190mM, Metanol 20%) y manteniendo la cubeta de transferencia a 4 °C durante todo el proceso.

- **Inmunodetección**

Para llevar a cabo la inmunodetección, se extrajeron las membranas de la cubeta de transferencia y se lavaron con TBS 1X-Tween® 0.1 % pH 7.4 (TBS-T: Tris 24,25g/L, NaCl 80g/L y Tween 20 1ml/L) durante 5 min. Posteriormente, se incubaron las membranas durante toda la noche a 4 °C en una solución bloqueadora (5% BSA en TBS-T) que contenía el anticuerpo primario de interés a la concentración correspondiente indicada en la Tabla III.3. Tras tres lavados de 5 min con TBS-T, se procedió a la incubación de las membranas con el anticuerpo secundario conjugado a un enzima peroxidasa, en TBS-T (Tabla III.4) a temperatura ambiente durante 1 h. Como paso final de la inmunodetección, se lavaron las membranas con TBS-T para eliminar el exceso de anticuerpo secundario y se procedió a la detección de la proteína de interés mediante una reacción de quimioluminiscencia. Para ello, se procedió al contacto de la membrana con la solución de detección (Immobilon Western HRP substrate Peroxide Solution®, Millipore) durante 1 min. El revelado de la señal quimioluminiscente se llevó a cabo mediante el aparato Chemidoc XRS Bio-Rad® y su cuantificación, mediante el empleo de un software específico para capturar imágenes digitales (ImageLab, Bio-Rad). Para normalizar los resultados se utilizó la proteína β -actina, inmunodetectada en la misma membrana que la proteína de interés.

ANTICUERPO PRIMARIO	CASA COMERCIAL	REFERENCIA	ORIGEN	DILUCIÓN
AKT	Cell Signaling	4691	Rabbit	1:2000
pAKT (Ser473)	Cell Signaling	3787	Rabbit	1:1000
Cdk5	Sta Cruz	sc-173	Rabbit	1:500
c-Jun	Cell Signaling	9165	Rabbit	1:1000
p-c-Jun(Ser73)	Cell Signaling	9164	Rabbit	1:1000
ERK1/2	Cell Signaling	9102	Rabbit	1:1000
ERK1/2 (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling	9101	Rabbit	1:1000
GSK3 β	Cell Signaling	9332	Rabbit	1:2000
GSK3 β Ser9	Cell Signaling	9336	Rabbit	1:2000
JNK	Cell Signaling	9252	Rabbit	1:1000
p-JNK (Thr183/Tyr185)	Cell Signaling	9251	Rabbit	1:1000
JNK1	Cell Signaling	3708	Mouse	1:1000
JNK3	Cell Signaling	2305	Rabbit	1:1000
p35/p25	Cell Signaling	2680	Rabbit	1:1000
p38	Cell Signaling	9212	Rabbit	1:1000
p-p38 (Thr180/Tyr182)	Cell Signaling	9211	Rabbit	1:1000
Tau	Biosource-Life	GTX100866	Rabbit	1:4000
pTau Ser 199	Biosource-Life	GTX24749	Rabbit	1:4000
pTau Ser202	Biosource-Life	GTX62062	Rabbit	1:4000
pTau Ser396	Biosource-Life	GTX78930	Rabbit	1:4000
P110 β	Cell Signaling	3011	Rabbit	1:1000
β -Actina	Sigma-Aldrich	A5441	Mice	1:20000
α -Espectrina	Millipore	MAB1622	Mice	1:5000

Tabla III.3: Anticuerpos primarios utilizados para la inmunodetección de proteínas por *Western blot*.

ANTICUERPO SECUNDARIO	CASA COMERCIAL	REFERENCIA	ORIGEN	DILUCIÓN
Mouse IgG- HRP	Bio-Rad	170-5047	Rabbit	1:2000
Rabbit IgG- HRP	Bio-Rad	170-5046	Goat	1:2000

Tabla III.4: Anticuerpos secundarios utilizados para la inmunodetección de proteínas por *Western blot*.

4.2 TINCIONES HISTOQUÍMICAS

4.2.1 Tinción de Hoescht 33342

El Hoescht 33342, también denominado de bisbenzimidide H33342 (Sigma-Aldrich), es un colorante específico para regiones del DNA que son ricas en adenina y timina. Se puede utilizar tanto para la detección de DNA en muestras tisulares, como en células en cultivo. Es un fluorocromo permeable a la membrana plasmática que se excita a una longitud de onda de 343 nm (luz ultravioleta) y que emite fluorescencia azul correspondiente a una longitud de onda de 455 nm (Holmquist 1975; Shapiro 1981).

Para la realización de la tinción de Hoescht, se montaron las secciones coronales de los cerebros en portaobjetos gelatinizados y se dejaron secar. Tras tres lavados de 5 min con PBS 1X, estas secciones se incubaron con la solución de Hoescht a una concentración de 5 µM en PBS 1X durante 20 min en oscuridad. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS 1X y se realizó la tinción de Fluoro-Jade-B.

4.2.2 Tinción de Fluoro-Jade B

El Fluoro-Jade B (Histo-Chem Inc.) es un colorante fluorescente que permite el marcaje específico de células que se encuentran en proceso de neurodegeneración (Schmued et al. 1997).

Para la realización de la tinción de Fluoro-Jade B, se utilizaron las secciones coronales en donde anteriormente se había realizado la tinción de Hoescht. Tras un primer lavado con PBS 1X y otro con H₂O destilada, las secciones fueron incubadas durante 15 min con una solución de permanganato de potasio (KMnO₄) 0.06 %, en condiciones de oscuridad. Posteriormente, se realizaron dos lavados rápidos con H₂O destilada y se incubaron las secciones con la solución de Fluoro-Jade B 0.0004% y ácido acético 0.01% en H₂O destilada durante 30 min en oscuridad. A continuación, se realizaron tres lavados con H₂O destilada, y se dejaron secar los cortes protegiéndolos de la luz. Finalmente, se sumergieron los cortes en xilol y tras el montaje con DPX (Sigma-Aldrich) se observó el marcaje al microscopio óptico de epifluorescencia (Olympus BX61). Se llevó a cabo el conteo de las neuronas positivas para el marcaje de Fluoro-Jade B con el fin de obtener un dato cuantitativo de la muerte neuronal.

4.3 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

4.3.1 Caracterización genética

Los animales se genotiparon a partir de DNA genómico extraído de la cola del ratón. La extracción del DNA a partir del tejido se realizó con DirectPCR lysis reagent (VIAGEN) y siguiendo el protocolo descrito por VIAGEN.

- **Extracción de DNA**

El primer paso en la extracción de DNA consistió en la obtención de tejido, a partir de un corte de 0,5-1cm de la cola del ratón. Posteriormente, este tejido se incubó con 100 µl de DirectPCR lysis reagent (Viagen) y 0.2 mg/ml de proteinasa K (Roche) a 55 °C durante toda la noche. A continuación el tejido se calentó a 85 °C durante 45 min y se centrifugo 3 min a 13000 g. Finalmente, se recuperó el sobrenadante y se guardó a -20 °C hasta su uso posterior.

- **Amplificación del DNA genómico mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la amplificación de fragmentos de DNA hasta niveles que puedan ser fácilmente detectables. Para ello, se necesita el enzima DNA polimerasa y dos oligonucleótidos específicos (o cebadores) complementarios a secuencias presentes en una de las cadenas de DNA, y que limitan el fragmento de DNA a amplificar. LA PCR consiste en la desnaturalización del DNA molde, seguida por la hibridación de los oligonucleótidos específicos a sus secuencias específicas y de la posterior extensión de la cadena de DNA por acción de la polimerasa. Las cadenas resultantes sirven de molde en los siguientes ciclos, obteniéndose después de n ciclos, 2ⁿ moléculas de la secuencia de DNA deseada.

La mezcla de reacción para la técnica de PCR se preparó siguiendo las instrucciones del kit *Go Taq® Green Master Mix* (Promega), para un volumen final de 20 µl de reacción (Tabla III.5).

III. MÉTODOS

COMPONENTE	VOLUMEN/REACCIÓN (μl)
5X Reaction Buffer	5
dNTPs mix 10mM	0.5
MgCl ₂ 25mM	2
Cebador I	1
Cebador II	1
DNA polimerase	0.05
H ₂ O mQ	9.45
cDNA	1
Volumen Total	20

Tabla III.5: Reactivos y volúmenes utilizados para llevar a cabo la reacción de PCR siguiendo el Kit Go Taq® Green Master Mix.

Para la detección del genotipo al cual pertenecía el ratón se combinaron los cebadores tal y como se indica en la Tabla III.6. De este modo, se detectó la presencia tanto del alelo normal como del alelo mutado para los diferentes genotipos. En la Tabla III.7 se indican la secuencia de cada cebador.

GENOTIPO	COMBINACION DE CEBADORES (Cebador I / Cebador II)	TAMAÑO AMPLICÓN (bp)
<i>Jnk1</i> ^{-/-}	PGKT1 / MJ1F8	390
<i>Jnk1</i> ^{+/+}	MJ1B8 / MJ1F8	460
<i>Jnk3</i> ^{-/-}	MJ3B3 / MJ3F3	430
<i>Jnk3</i> ^{+/+}	PGKP1 / MJ3F3	250

Tabla III.6: Combinación de cebadores utilizados para genotipar los ratones *Jnk1*^{-/-} y *Jnk3*^{-/-}.

CEBADORES	SECUENCIA
PGKP1	5'-CTCCAGACTGCCTTGGGAAAA-3'
MJ3B3	5'-CCTGCTTGTCAGAAACACCTTC-3'
MJ3F3	5'-CGTAATCTTGTCACAGAAATCCCATAC-3'
PGKT1	5'-CCAGCTCATTCTCCACTCATG-3'
MJ1B8	5'-CGCCAGTCCAAAATCAAGAATC-3'
MJ1F8	5'-GCCATTCTGGTAGAGGAAGTTTCTC-3'

Tabla III.7: Secuencia de los cebadores utilizados para genotipar los ratones *Jnk1*^{-/-} y *Jnk3*^{-/-}.

La amplificación de la PCR se llevó a cabo en el termociclador Veriti 96 *Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems), siguiendo las siguientes etapas:

TIEMPO	TEMPERATURA
5 min	95 °C
30 seg	94 °C } 50 °C } 72 °C } X30
45 seg	
1 min	
7 min	72 °C
∞	6 °C

Tabla III.8: Etapas del programa usado para la amplificación de la PCR en el termociclador Veriti 96 *Well Thermal Cycler*.

A continuación, se realizó el análisis de los fragmentos amplificados en un gel de agarosa al 2 % en tampón TBE 1X (Tris 10.8 g/L, Ácido Bórico 5.5 g/L y 4 ml EDTA 0.5 M pH 8.0), que contenía *RedSafe DNA Stain* (ChemBio) a una dilución de 1:20000. Para ello, se cargó un volumen de 18 µl de muestra en cada pozo y se inició la separación de las muestras a 90 V, durante 30 min. Una vez acabada esta migración, se observó el gel mediante un transiluminador de luz ultravioleta (MiniBis Pro, Dnr), permitiendo visualizar las bandas de DNA resultado de la amplificación por PCR.

4.3.2 Análisis de la expresión génica mediante PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real (qPCR) o PCR cuantitativa es una variante de la PCR en la cual, el proceso de amplificación y de detección se producen simultáneamente. Para ello, se realiza una reacción de PCR convencional, pero en la que a cada ciclo de reacción, le acompaña una lectura de fluorescencia, mediante el uso de fluoróforos. La fluorescencia liberada en cada ciclo es proporcional a la cantidad de DNA generado. La medición de esta emisión de fluorescencia y su representación gráfica se realiza en un detector, permitiendo así, la cuantificación de la expresión del gen de interés.

- **Síntesis de cDNA: reacción de retrotranscripción**

La reacción de retrotranscripción (RT), o transcriptasa inversa, permite sintetizar una cadena complementaria de DNA (cDNA) a partir de una molécula de mRNA, y es llevada a cabo por el enzima retrotranscriptasa inversa, un DNAPolimerasa dependiente de RNA.

III. MÉTODOS

La síntesis de cDNA se realizó a partir de 1 µg de RNA que se llevó a un volumen de 10 µl, a estos 10 µl, se les añadió 10 µl más de una mezcla de reacción, siguiendo el protocolo descrito por el Kit de *Retrotranscription High Capacity cDNA reverse transcription* (Applied Biosystems) (Tabla III.9).

COMPONENTE	VOLUMEN/REACCIÓN (µl)
10X RT buffer	2
25X dNTPs mix (100mM)	0.8
10X Random primers	2
Multiscribe reverse transcriptase	1
H ₂ O mQ autoclavada	4.2
RNA (1µg)	10
Volumen Total	20

Tabla III.9: Reactivos y volúmenes utilizados para llevar a cabo la reacción de retrotranscripción siguiendo el Kit de *Retrotranscription High Capacity cDNA reverse transcription* de Applied Biosystems.

El proceso de retrotranscripción se llevó a cabo en el termociclador Veriti 96 *Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems), siguiendo las siguientes etapas:

TIEMPO	TEMPERATURA
10min	25°C
2h	37°C
5min	85°C
∞	4°C

Tabla III.9: Etapas del programa usado para la realización de retrotranscripción en el termociclador Veriti 96 *Well Thermal Cycler* de Applied Biosystems.

Una vez obtenido el cDNA, las muestras se diluyeron H₂O mQ (1:10) y se congelaron a -20 °C hasta su uso posterior.

4.3.2.1 PCR en tiempo real

Para la amplificación por la técnica de PCR en tiempo real, se llevaron a cabo dos métodos de detección diferentes. El SYBR Green® dye y Taqman® probe FAM dye.

Detección mediante SYBR Green® dye (Applied Biosystems): Para este tipo de detección, se partió de 25 ng de cDNA obtenidos tras la retrotranscripción, y se llevaron hasta un volumen

de reacción de 20 μ l, en el que también estaban presentes, a una concentración de 1 μ M, los cebadores *forward* y *reverse* de cada gen a amplificar, y 10 μ l de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Los cebadores para PCR a tiempo real, se diseñaron con el software *Primer Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast> del NCBI). Dentro de los parámetros deseados para el diseño de estos cebadores se seleccionó, siempre que fuera posible, un amplicón de un tamaño de entre 70 y 150 bp y que la temperatura de melting fuera entre 59 y 61 °C. Además se procuró que dichos cebadores fueran multi-exonales. Los cebadores (o *primers*) utilizados en este trabajo se detallan en la Tabla III.10.

III. MÉTODOS

GEN	SECUENCIA	
	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
<i>B-Actina</i>	5'-CAACGAGCGGTTCCGAT-3'	5'-GCCACAGGATTCCATACCCA-3'
<i>Atf5</i>	5'-GGGTCATTTTAGCTCTGTGAGAGAA-3'	5'-ATTGTGCCATAAACCCCTAGA-3'
<i>Bag3</i>	5'-ACAGGCCTCAGCCCATGACCC-3'	5'-GGAGGGAGGTCTGGTCCGGCT-3'
<i>Bcl10</i>	5'-GGCCTGGACACCCTGGTGGAA-3'	5'-GCTGCTGCACTTCAGGCCTTTGA-3'
<i>Card6</i>	5'-CAGTCCAGCGCCATCAACCC-3'	5'-GGAGGGCCGGGAGTGAGACG-3'
<i>Casp3</i>	5'-TCAGAGGCGACTACTGCCGGA-3'	5'-GTACCCCGGCAGGCCTGAAT-3'
<i>Casp4</i>	5'-ACGCAGTGACAAGCGTTGGGTTT-3'	5'-TGGCTGCCTGGGTCCACACTG-3'
<i>Casp8</i>	5'-GGCACCAGGATGCCACCTCT-3'	5'-CTGTTCCACGCCGGCTCACA-3'
<i>Ccl2</i>	5'-CCCACTCACCTGCTGCTACT-3'	5'-TCTGGACCCATTCTTCTTG-3'
<i>Cidea</i>	5'-GGACTACGCGGGAGCCCTCA-3'	5'-ATCACCCACGCCGGCTACT-3'
<i>Cflar</i>	5'-ACCCAGTCCAGCCAAGGAGCA-3'	5'-ACACTGGCTCCAGACTCACCT-3'
<i>Cox2</i>	5'-TGACCCCAAGGCTCAAATA-3'	5'-CCCAGGTCCTCGTTATGATC-3'
<i>Fas</i>	5'-GTACACCAACCTGCGCCCA-3'	5'-CACACGAGGCGCAGCGAACA-3'
<i>Fasl</i>	5'-TGGTGGCTCTGGTTGGAATGGGA-3'	5'-AGGCTTTGGTTGGTGAACCTCACGG-3'
<i>Hells</i>	5'-TGGCCGAACAAACGGAGCCTG-3'	5'-AGCCTCGAGCTGTTCTCTCC-3'
<i>Ifny</i>	5'-CGGCACAGTCATTGAAAGCC-3'	5'-TGTACCATCTTTTGCCAGT-3'
<i>IL18-F</i>	5'-ACAGAATATCAACCAACAAGTGATATTCTC-3'	5'-GATTCTTTCCTTTGAGGCCCA-3'
<i>Ltbr</i>	5'-ATGCAGCCGAGCCAAGACA-3'	5'-ACAGCGGCACTCGGCTTCC-3'
<i>Mcl1</i>	5'-CGAGACGGCCTTCCAGGGCAT-3'	5'-TCCTGCCCCAGTTTGTTACGCC-3'
<i>Nme5</i>	5'-AGCCAAGGAGACACACCCGGA-3'	5'-TCGCTCTGAGGCAGCGAAGTC-3'
<i>Nol3</i>	5'-CGGACCACAAGCCGACTCC-3'	5'-ATGGGCGCTCCTGCACGTTG-3'
<i>Pak7</i>	5'-ACCCAGAGGCCCCACAAA-3'	5'-AGGGTACTGGTGGCTGCCTGA-3'
<i>Pim2</i>	5'-TTTGGCACCGTCTTCGCGGG-3'	5'-AGCGCAACCTCAAGTGGGCA-3'
<i>Tnfα</i>	5'-TCGGGGTGATCGGTCCCAA-3'	5'-TGGTTTGCTACGACGTGGGCT-3'
<i>Tnfr1</i>	5'-GTGCGTCCCTTGACGCACT-3'	5'-GCAACAGCACCGCAGTACCTGA-3'
<i>Traf2</i>	5'-GCCTGACCAGCATCTCAGCTCT-3'	5'-ACCTCTGCGGGCAGCGTTA-3'
<i>Trp53bp2</i>	5'-ACGACAACCAGTCGGCCGTG-3'	5'-AGCCGGTCCCTCAGCTCACT-3'

Tabla III.10: Cebadores utilizados para la reacción de PCR a tiempo real mediante la detección por SYBR Green® dye.

Detección mediante Taqman® probe FAM dye (Applied Biosystems): Para este tipo de detección se partió de 25 ng de cDNA obtenidos tras la retrotranscripción, y se llevaron hasta un volumen final de reacción de 20 μ l, al que también se le añadió 1 μ l de *Taqman Gene Expression assay* y 9 μ l de *Taqman Gene expression Master Mix* (Applied Biosystems). Las sondas Taqman utilizadas se detallan en la Tabla III.11.

TAQMAN GENE EXPRESSION ASSAY	REFERENCIA
<i>Banp</i>	Mm00479456
<i>Dysf</i>	Mm00458042
<i>En1</i>	Mm00438709
<i>Gapdh</i>	Mm99999915
<i>Pik3cb</i>	Mm00659576

Tabla III.11: Sondas Taqman utilizadas para la reacción de PCR a tiempo real mediante la detección por Taqman® probe FAM dye.

Para los dos tipos de detección utilizados, la reacción se llevó a cabo mediante el termociclador *StepOne plus™ Real Time PCR system* (Applied Biosystems) seleccionando el protocolo específico dentro del software *StepOne software v2.2.2* (Applied Biosystems).

Para el análisis de los datos, se realizó una cuantificación relativa mediante el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Utilizando este método se determinó el cambio en la expresión del gen de interés en relación a la expresión de un gen constitutivo, cuya expresión no varía en las condiciones del experimento (control endógeno). En este caso, como gen constitutivo (también llamado de *housekeeping gene*) se utilizó β -Actina o *Gapdh*.

4.3.2.2 Array de PCR en tiempo real

Se realizó un *array* de PCR en tiempo real para la determinación de la expresión de 84 genes relacionados con el proceso de apoptosis (*Mouse Apoptosis RT² profiler PCR Array*, ref:PAMM-012A, SABiosciences™, Qiagen). Este tipo de *array* permite el análisis simultáneo de la expresión de diversos genes involucrados en muerte celular programada, de una forma cuantitativa, mediante la técnica de PCR en tiempo real que se basa en el uso de una sonda SYBR Green que emite fluorescencia cuando se intercala en las moléculas de DNA.

Para este procedimiento, se utilizó 1 μ g de RNA que fue sometido a una reacción de retrotranscripción utilizando el Kit *RT² first strand* (SABiosciences, Qiagen) y siguiendo las

III. MÉTODOS

instrucciones del fabricante. Una vez obtenido el cDNA, se procedió a la preparación de la mezcla de reacción de PCR según el protocolo de la casa comercial. La reacción de PCR se realizó en el aparato Light Cycler 480 (Roche Applied Science) y el programa utilizado constó de diferentes etapas:

TIEMPO	TEMPERATURA
10min	95 °C
15seg	95 °C
1min	60 °C } X40
∞	4 °C

Tabla III.12: Etapas del programa usado para el análisis de array de PCR en tiempo real.

La expresión de cada gen fue normalizada teniendo en cuenta la media de las Cts de los siguientes genes de control endógeno (*housekeeping genes*): β -Glucuronidase (GUS), Hypoxanthine phosphoribosyltransferase (Hpvt), Heat shock protein 90 α (Hsp70s), Glyceraldehyde-3-phosphate (GAPDH) y β -Actin (ACTB). La expresión relativa (*fold change*) de cada gen fue calculada mediante el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Los cálculos estadísticos fueron realizados según el programa *RT² ProfilerTM PCR Array Data Analysis* y los cambios diferenciales en la expresión génica fueron considerados significativos asumiendo un *fold change* ≥ 1.5 y *p*-valor < 0.05 .

4.3.3 Estudio de *microarrays*

El análisis por *microarrays* permite analizar la expresión diferencial de genes y se basa en medir el nivel de hibridación entre la sonda específica y la molécula diana.

Se realizó la síntesis de cDNA a partir de 10 μ g de RNA, con la incorporación de los nucleótidos modificados dUTP-Cy3 o dUTP-Cy5 mediante el kit *CyScribe First-Strand cDNA labeling Kit* (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). La incorporación del fluorocromo fue analizada mediante la medición de la absorbancia a 555 nm para Cy3 y 655 nm para Cy5. Cantidades iguales de cDNA fueron hibridadas durante 14 h a 42 °C con una librería de 22000 *oligo mouse arrays (65-mer library, Sigma-Genosys)* en solución de hibridación *UniHyb* (TeleChem International, Inc).

Las imágenes obtenidas fueron cuantificadas utilizando el aparato ScanArray 4000 (Packard Bioscience, Perkin-Elmer Minnesota). El análisis de los datos de los experimentos de

microarrays fue llevado a cabo por el Dr. Jorge Ramírez y el Dr. José Luis Santillán de la Unidad de Microarreglos de DNA del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

4.4 OTRAS TÉCNICAS EXPERIMENTALES

4.4.1 Ensayo de actividad calpaína

La actividad calpaína fue analizada mediante un Kit comercial (MBL, Co., Ltd.) utilizando Ac-LLY-AFC como sustrato de la calpaína. Este sustrato es proteolizado por la calpaína, liberándose como producto el AFC, con propiedad de emitir señal fluorescente. Para cada muestra analizada, se incubaron 15 μ g de proteína total con 200 μ mol/L del sustrato en tampón de reacción (HEPES 50 mM, NaCl 100 mM, CHAPS 0.1 %, dithiothreitol 10 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4) en placas de 96 pozos durante 24 h a 37 °C. Como control negativo del ensayo se utilizó el inhibidor de la calpaína Z-LLY-FMK. La intensidad de fluorescencia debida a la liberación de AFC fue analizada con un espectrofluorímetro (Victor3 , PerkinElmer), usando una longitud de onda de excitación de 400 nm y una longitud de onda de emisión de 505 nm. La actividad de calpaína fue expresada en porcentaje respecto al grupo WT CT, tomando como referencia las unidades relativas de fluorescencia (RFU) por mg de proteína.

4.4.2 Ensayo de actividad succinato deshidrogenasa

Para realizar el ensayo de la actividad succinato deshidrogenasa, previamente se procedió a la obtención de la fracción mitocondrial. Para ello, se homogenizó el tejido estriado de los cerebros obtenidos por decapitación con 1.2 ml de tampón de homogenización (225 mM manitol, 75 mM sucrosa, 5 mM HEPES, 1 mM EGTA y 1 mg/ml BSA, pH 7.4). Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 2000 g durante 3 min a 4 °C, y se descartó el precipitado. El sobrenadante resultante, se centrifugó a 12000 g durante 10 min a 4 °C. Como resultado de esta centrifugación, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado con 400 μ l de tampón de homogenización conteniendo 0.02 % de digitonina. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 12000 g durante 10 min a 4 °C, para descartar el sobrenadante y lavar el precipitado con 500 μ l de tampón de homogenización sin EGTA, BSA y digitonina. Finalmente, se resuspende el precipitado mitocondrial con 200 μ l del anterior tampón de homogenización (sin EGTA, BSA y digitonina).

Una vez obtenida la fracción mitocondrial, se procedió a la medición enzimática de la succinato deshidrogenasa. Este método involucra la oxidación del succinato por un aceptador de electrones artificial, el ferricianuro de potasio $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, al añadir el extracto mitocondrial (King 1967). Se utilizó una solución de reacción conteniendo PB 0.2 M pH 7.8, BSA 1 %, ácido succínico 0.6 M y $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 0.03 M y se inició la reacción, añadiendo 50 μg del extracto mitocondrial a la solución de reacción. Como control negativo del ensayo se utilizó una solución de reacción sin $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Tras la mezcla de los mismos se procedió a lectura de la absorbancia a 420 nm durante 2 h. Los datos obtenidos se analizaron mediante la disminución de la absorbancia por unidad de tiempo, y normalizados por la cantidad de proteína en cada fracción.

4.4.3 Ensayo de actividad PI3K

Para la determinación de la actividad de la cinasa PI3K, se utilizó el Kit comercial *PI3-Kinase* HTRF™ Assay (Millipore Corporation), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit se basa en la detección por espectrofluorimetría de la acción de PI3K sobre su sustrato específico PIP2 (fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato). Para ello, se incubó una cantidad de 20 μg de proteína total con 0.5 μl de dimetilsulfóxido y 14.5 μl de tampón reacción PIP2 1X durante 10 min. Posteriormente, se añadieron 5 μl de solución de ATP a cada muestra y se incubaron durante 30 min a 22 °C. A continuación, se añadieron 5 μl de solución stop, y 5 μl de solución de detección y se incubó durante 18 h en oscuridad a 22°C. Como control negativo del ensayo se utilizó un tampón de reacción control sin PIP2. Finalmente, se analizó la fluorescencia emitida a una longitud de onda de excitación de 335 nm y una longitud de onda de emisión de 620 y 655 nm con el espectrofluorímetro (Victor3, PerkinElmer).

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos corresponden a la media \pm desviación estándar de un mínimo de tres experimentos. Las diferencias estadísticamente significativas se calcularon mediante el test de *t-Student* para las comparaciones de dos condiciones, o bien, mediante un ANOVA de una vía con contraste a posteriori con el test de comparación múltiple de Bonferroni, para la comparación de tres o más condiciones. El nivel de significación estadística se estableció en $p < 0.05$.

IV. RESULTADOS

1. RELACIÓN ENTRE LA ISOFORMA JNK3 Y LA NEURODEGENERACIÓN

La activación de JNK se ha relacionado con la muerte celular y los procesos inflamatorios desencadenantes de mecanismos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson (Antoniou et al. 2010; Bozyczko-Coyne et al. 2002; Resnick and Fennell 2004), enfermedad de Huntington (Garcia et al. 2002; Hisieh et al. 2003) y en isquemia (Borsello et al. 2003).

A partir de modelos experimentales de neurodegeneración *in vivo* e *in vitro*, inducidos por la acción del glutamato, ácido kaínico (KA), MPTP y privación neurotrófica, se ha evidenciado que la isoforma JNK3 tiene un papel clave en los procesos de neurotoxicidad (Behrens et al. 1999; Eilers et al. 2001; Pan et al. 2009, Yang et al. 1997). Sin embargo, no se conocen sus mecanismos de acción. Con el fin de conocer las funciones de JNK3 relacionadas con la muerte celular y los procesos inflamatorios, en este primer apartado se estudió el efecto de la ausencia de JNK3 en dos modelos experimentales de neurotoxicidad en ratón: el modelo de epilepsia inducido por KA, y el modelo experimental de la enfermedad de Huntington inducido con ácido 3-nitropropiónico (3NP).

1.1 RESPUESTA AL KA EN RATONES DEFICIENTES PARA JNK3

La primera evidencia de la implicación de JNK3 en procesos neurodegenerativos, deriva de la reducción de la actividad convulsiva y de la muerte celular observada en ratones *Jnk3^{-/-}* (KO JNK3) tratados con KA (Yang et al. 1997) u otros aminoácidos excitadores (Brech et al. 2005; Kuan et al. 2003). Partiendo de estos resultados, se planteó estudiar alguno de los mecanismos celulares responsables del efecto neuroprotector en ausencia de JNK3. Para ello se analizaron muestras hipocampales de ratones *Jnk3^{-/-}* tratados con KA, respecto a ratones de cepa salvaje (WT).

1.1.1 Presencia de neurodegeneración en hipocampo

Mediante la tinción de Fluoro-Jade B se evaluó la neurodegeneración en hipocampo de ratones *Jnk3^{-/-}* comparativamente con ratones WT después de 24 h de tratamiento con KA. Los resultados permitieron observar que en ratones *Jnk3^{-/-}* se producía una reducción significativa

de células en neurodegeneración, respecto a los WT en diferentes áreas como CA1, CA3 e hilus (Figura IV-1B, D vs IV-1A, C).

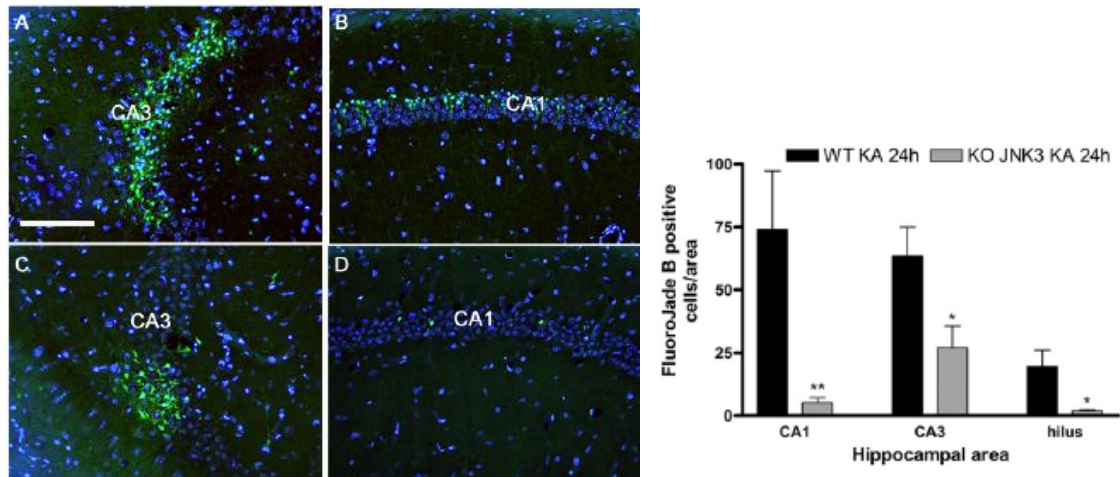


Figura IV-1: Neurodegeneración observada con la tinción de Fluo-Jade B (verde) y contratinción nuclear con Hoechst 33342 (azul) en los áreas CA3 y CA1 de hipocampo de ratones WT (A, B) y *Jnk3*^{-/-} (C, D) después de 24 horas de tratamiento con KA. Gráficamente, se representa la cuantificación de las células neuronales positivas al marcaje de Fluo-Jade B en diferentes áreas hipocámpales de WT y *Jnk3*^{-/-}. Los resultados corresponden a la media con su desviación estándar de cinco experimentos independientes (**p*<0.05; ***p*<0.01; con respecto a WT KA 24h). Barra de escala: 100 μm.

1.1.2 Inducción de astrogliosis en hipocampo

Un importante marcador de daño excitotóxico es la inducción de astrogliosis (Steward et al. 1991; Norton et al. 1992; Torre et al. 1993) que implica un incremento de la GFAP y una retracción de las prolongaciones celulares en astrocitos (Hatten et al. 1991). La astrogliosis se evaluó mediante inmunohistoquímica contra GFAP, en hipocampos de ratones *Jnk3*^{-/-} y WT, a los 3 días después del tratamiento con KA (Figura IV-2). Tanto en ratones WT, como *Jnk3*^{-/-} controles (inyectados con solución salina) no se observó inducción de astrogliosis (Figura IV-2 A-a', C-c'). Sin embargo, a cabo de 3 días tras el tratamiento con KA se detectó astrogliosis en diferentes áreas hipocámpales de ratones WT (Figura IV-2B-b'), que se vio claramente reducida en ratones *Jnk3*^{-/-} (Figura IV-2D-d').

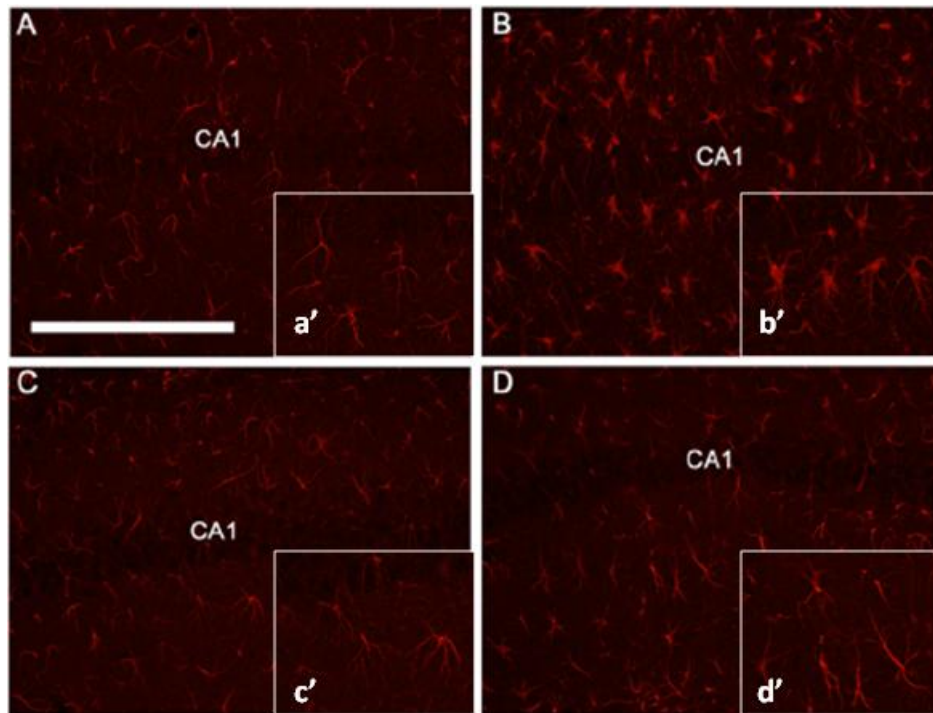


Figura IV-2: Inmunohistoquímica contra GFAP en el área CA1 del hipocampo en WT CT (A-a'), WT KA 3d (B-b'), *Jnk3*^{-/-} CT (C-c'), *Jnk3*^{-/-} KA 3d (D-d'). Barra de escala: 100 μ m.

1.1.3 Inmunoreactividad de la proteína c-Fos

Se analizó el patrón de activación de la proteína c-Fos, un factor de transcripción inducible que pertenece a la familia de genes de respuesta inmediata y se expresa en el hipocampo tras el tratamiento con KA, considerándose de este modo un marcador de la actividad neuronal tras convulsiones (Andrioli et al. 2009; Lopez-Martin et al. 2009). Se detectó un incremento de la inmunoreactividad para c-Fos en diferentes áreas del hipocampo de animales WT y *Jnk3*^{-/-} después de 6 h de tratamiento con KA (Figura IV-3 C, D, respectivamente), observándose una reducción significativa después de 12 h de tratamiento en los ratones *Jnk3*^{-/-} respecto a los WT (Figura IV-3 F, E, respectivamente).

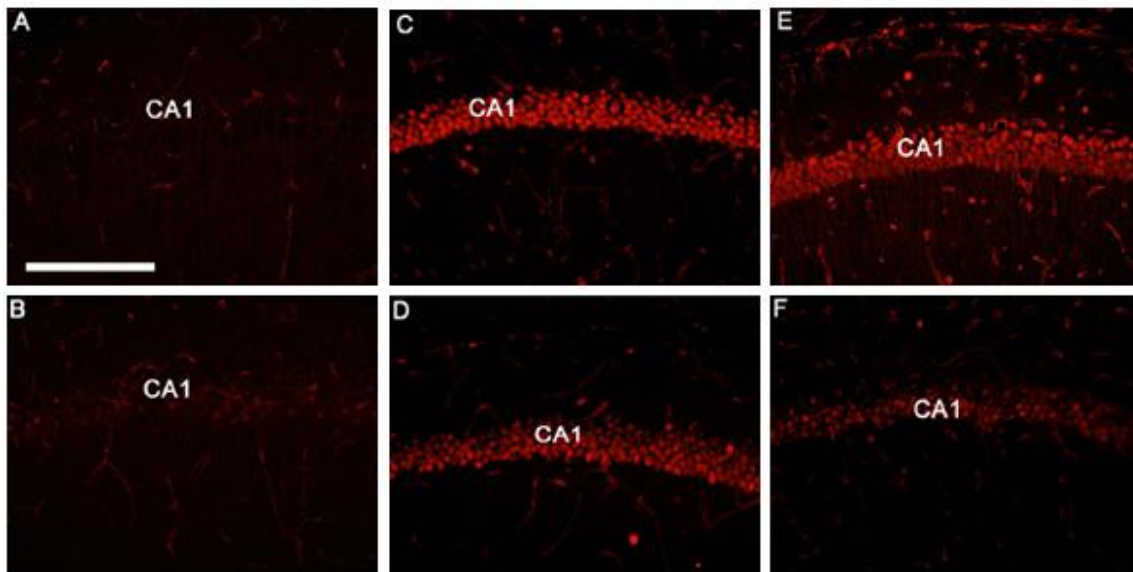


Figura IV-3: Inmunohistoquímica contra c-Fos en el área CA1 de hipocampo de ratones WT (A, C, E) y de ratones *Jnk3*^{-/-} (B, D, F) tratados con KA, a 6 h y 12 h. A y B son controles, C y D KA 6h, E y F KA 12h. Barra de escala: 100 μ m.

1.1.4 Análisis de los cambios en la fosforilación de MAPKs

Se estudió por *Western blot* la activación de las diferentes MAPKs (JNK, p38 y ERK1/2) ya que todas ellas están relacionadas con la señalización de la muerte celular (Kim and Choi 2010; Subramaniam and Unsicker 2006). Para ello, se analizaron los niveles de cada MAPK en hipocampo tras 1h, 3h, 6h y 12h posteriores al tratamiento con KA.

- **Efecto del KA en la fosforilación de JNK**

En primer lugar, se analizó la proteína JNK3, a fin de comprobar su ausencia en las muestras hipocampales de los ratones *Jnk3*^{-/-} (Figura IV-4).

Respecto a JNK, tanto en los animales WT como en *Jnk3*^{-/-}, se observó un incremento de la fosforilación de JNK en los residuos Thr183/Tyr185 (p-JNK) a 1h y 3h después del tratamiento. Si bien, este incremento fue significativamente más bajo en *Jnk3*^{-/-} respecto a WT, a 6h y 12h de tratamiento se detectó una reducción de los niveles de p-JNK en los dos genotipos, siendo más acentuado, en los ratones *Jnk3*^{-/-}, ya que en estos no se detectaron diferencias significativas respecto al control. Sin embargo, entre ambos genotipos, las diferencias de p-JNK resultaron significativas (Figura IV-4).

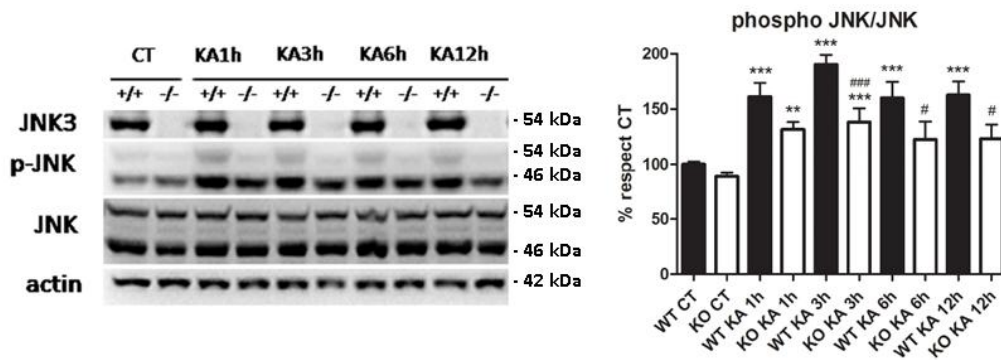


Figura IV-4: Detección de JNK3, p-JNK y JNK total en hipocampos obtenidos a partir de animales WT y *Jnk3*^{-/-} control y a diferentes tiempos del tratamiento con KA. La grafica muestra la cuantificación de las bandas y los resultados corresponden a la media con su desviación estándar de tres experimentos independientes. (**p<0.01;***p<0.001 respecto a los controles salinos; #p<0.05; ##p<0.01 respecto al WT KA).

- Efecto del KA en la fosforilación de p38

La activación de la MAPK p38, se ha relacionado con la respuesta a citocinas proinflamatorias y con diversos estímulos de estrés celular como la radiación UV, la temperatura y el choque osmótico (Zarubin and Han 2005). Así, a las 3h de tratamiento con KA, se detectó un incremento significativo de la fosforilación de p38 (p-p38) en los residuos Thr180/Tyr182 en animales WT y *Jnk3*^{-/-}, sin embargo, en los ratones *Jnk3*^{-/-} los niveles fueron significativamente más bajos que en los WT. A las 6h y 12h, los niveles de p-p38 disminuyeron en ambos genotipos, aunque las diferencias entre *Jnk3*^{-/-} y WT continuaron siendo significativas (Figura IV-5).

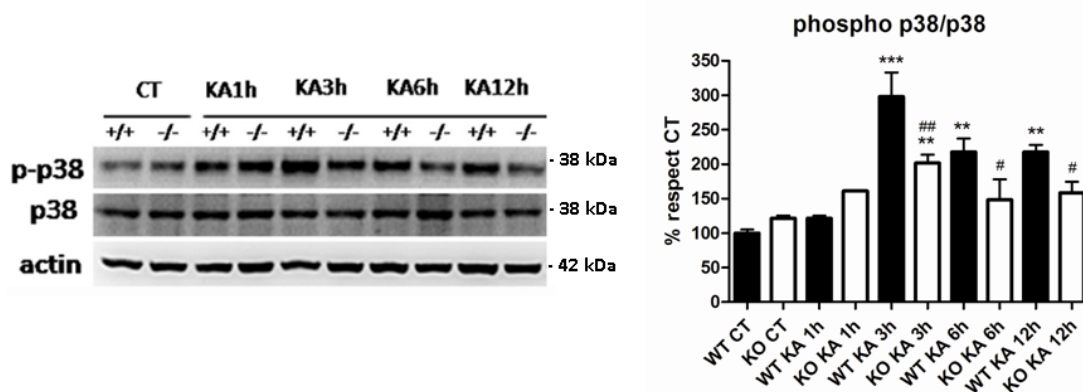


Figura IV-5: Detección de p-p38 y p38 total en hipocampos obtenidos a partir de animales WT y *Jnk3*^{-/-} a diferentes tiempos del tratamiento con KA. La grafica muestra la cuantificación de las bandas. Los resultados corresponden a la media con su desviación estándar de tres experimentos independientes. (**p<0.01;***p<0.001 respecto a los controles salinos; #p<0.05; ##p<0.01 respecto al WT KA).

• Efecto del KA en la fosforilación de ERK1/2

LA MAPK ERK1/2 se activa ante señales extracelulares, como mitógenos y factores de crecimiento (Roskoski 2012). Respecto a ERK1/2, se observó un incremento significativo de la fosforilación en los residuos Thr202/Tyr204 (p-ERK1/2) en ambos genotipos (WT y *Jnk3*^{-/-}) a 1h de tratamiento con KA. Si bien, en WT los niveles de p-ERK1/2 se mantuvieron significativamente altos hasta las 6h de tratamiento, en los *Jnk3*^{-/-} se recuperaron los niveles basales de p-pERK1/2 a partir de las 3h (Figura IV-6).

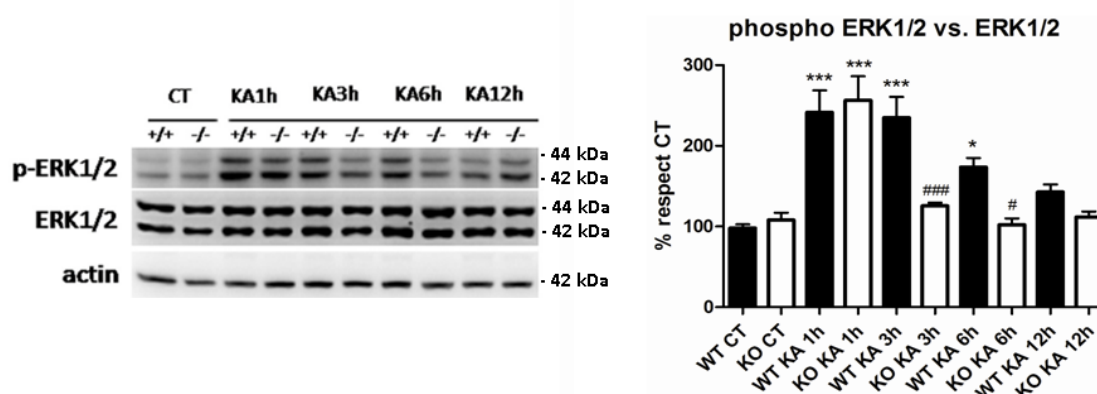


Figura IV-6: Detección de p-ERK1/2 y ERK1/2 total en hipocampos obtenidos a partir de animales WT y *Jnk3*^{-/-} a diferentes tiempos del tratamiento con KA. La grafica muestra la cuantificación de las bandas. Los resultados corresponden a la media con su desviación estándar de tres experimentos independientes. (**p*<0.05;****p*<0.001 respecto a los controles salinos; #*p*<0.05; ###*p*<0.001 respecto al WT KA).

1.1.5 Inducción de la fosforilación de c-Jun

c-Jun es un factor de transcripción y el principal sustrato de JNK. Su activación se ha relacionado con procesos neurodegenerativos y con la apoptosis (Garcia et al. 2002). Se evaluaron los niveles de c-Jun y su forma fosforilada (p-c-Jun) en el residuo Ser73 en ambos genotipos a diferentes tiempos de tratamiento con KA (Figura IV-7). Se detectó un incremento de los niveles de p-c-Jun en WT a 3h que se mantuvieron elevados hasta las 12h posteriores al tratamiento con KA. Sin embargo, en ratones *Jnk3*^{-/-} se detectó un incremento significativo sólo a 3h y en menor magnitud respecto a los WT. También, se analizaron los niveles totales de c-Jun que se incrementaron en ambos genotipos, a 3h y 6h del tratamiento con KA. Sin embargo, a las 6h los niveles de c-Jun fueron significativamente inferiores en *Jnk3*^{-/-} respecto a WT (Figura IV-7).

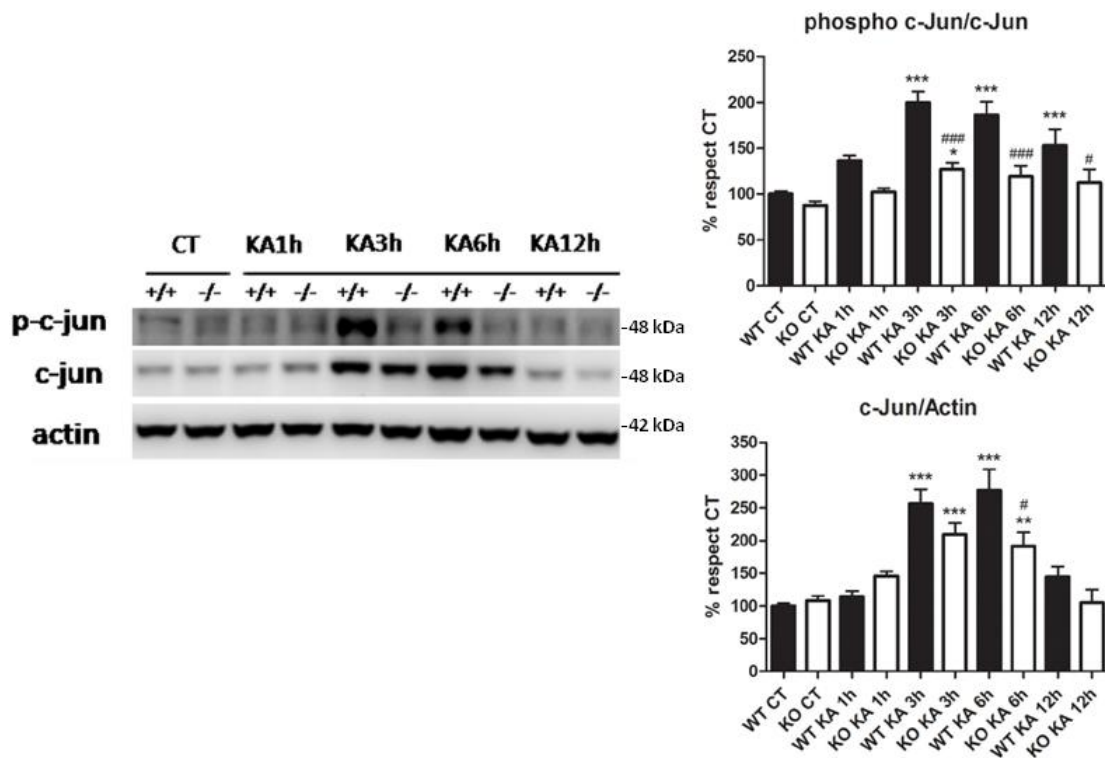


Figura IV-7: Detección de p-c-Jun y c-Jun en WT y *Jnk3*^{-/-} a diferentes tiempos de KA. La grafica muestra la cuantificación de las bandas. Los resultados corresponden a la media con su desviación estándar de tres experimentos independientes. (**p*<0.05; ***p*<0.01; ****p*<0.001 respecto a los controles salinos; #*p*<0.05; ###*p*<0.001 respecto al WT KA).

1.2 RESPUESTA AL 3NP EN RATONES DEFICIENTES PARA JNK3

La administración crónica de 3NP en roedores induce lesión a nivel del estriado. Además de esta característica histológica, este modelo también mimetiza aspectos bioquímicos y comportamentales de la enfermedad de Huntington en humanos (Bogdanov et al. 1998; Túnez et al. 2010). Se utilizó este modelo para estudiar la implicación de la vía de JNK y concretamente el papel de la isoforma JNK3 en la neurotoxicidad inducida por 3NP.

1.2.1 Actividad de la succinato deshidrogenasa (SDH) en estriado

Se realizó un ensayo de la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH) en el estriado para analizar el efecto de 3NP en la cadena respiratoria mitocondrial. Los resultados mostraron que había una reducción de un 50% en la actividad de este enzima en ratones WT y *Jnk3*^{-/-} tratados con 3NP, respecto a sus controles (Figura IV-8).

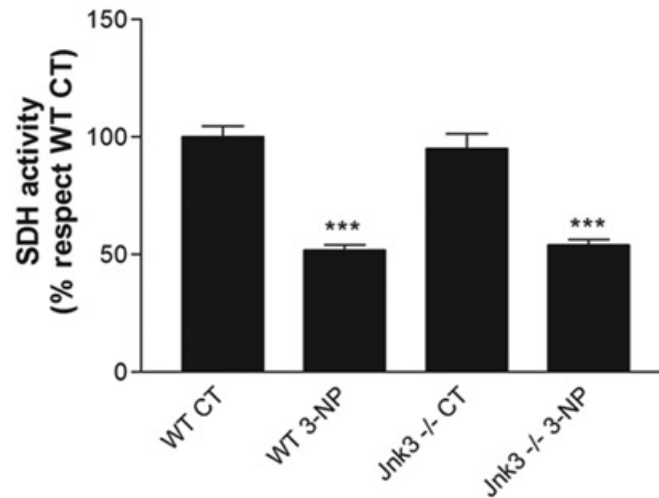


Figura IV-8: Actividad de la SDH tras el tratamiento 3h con 3NP en ratones WT y *Jnk3*^{-/-} respecto a sus controles. Se observa una disminución de la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa en ambos genotipos después del tratamiento con 3NP. Los resultados corresponden a la media con su desviación estándar de tres experimentos independientes, determinados por cinco replicas por experimento (***) $P < 0.001$, respecto al CT salino).

1.2.2. Presencia de neurodegeneración en el estriado

Mediante la tinción de Fluoro-Jade B se detectó la presencia de neurodegeneración en el estriado de ratones WT y *Jnk3*^{-/-} tratados con 3NP (Figura IV-9), observándose un incremento estadísticamente significativo del área lesionada en *Jnk3*^{-/-} (Figura IV-9B) respecto al WT (Figura IV-9A).

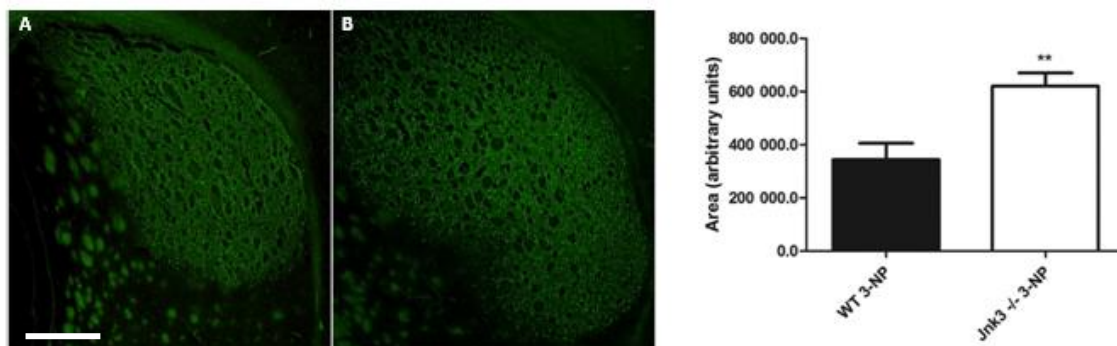


Figura IV-9: Neurodegeneración observada con la tinción de Fluoro-Jade B (verde) en estriado de ratones WT (A) y *Jnk3*^{-/-} (B) tratados tres días con 3NP. Gráficamente se representa el área de la lesión en ratones WT y *Jnk3*^{-/-} tratados con 3NP. Los resultados corresponden a la media con su desviación estándar de cinco experimentos independientes (**) $p < 0.01$, respecto al WT 3NP). Barra de escala: 40 μ m.

1.2.3 Inducción de astrogliosis en el estriado

Mediante la técnica inmunohistoquímica contra GFAP, se analizó la inducción de astrogliosis en el estriado de ratones WT y *Jnk3*^{-/-} tratados con 3NP. Los resultados evidenciaron la presencia de astrocitos reactivos en ambos genotipos, WT (Figura IV-10B) y *Jnk3*^{-/-} (Figura IV-10D) después de ser tratados con 3NP, respecto a sus respectivos controles (Figura IV-10A y C).

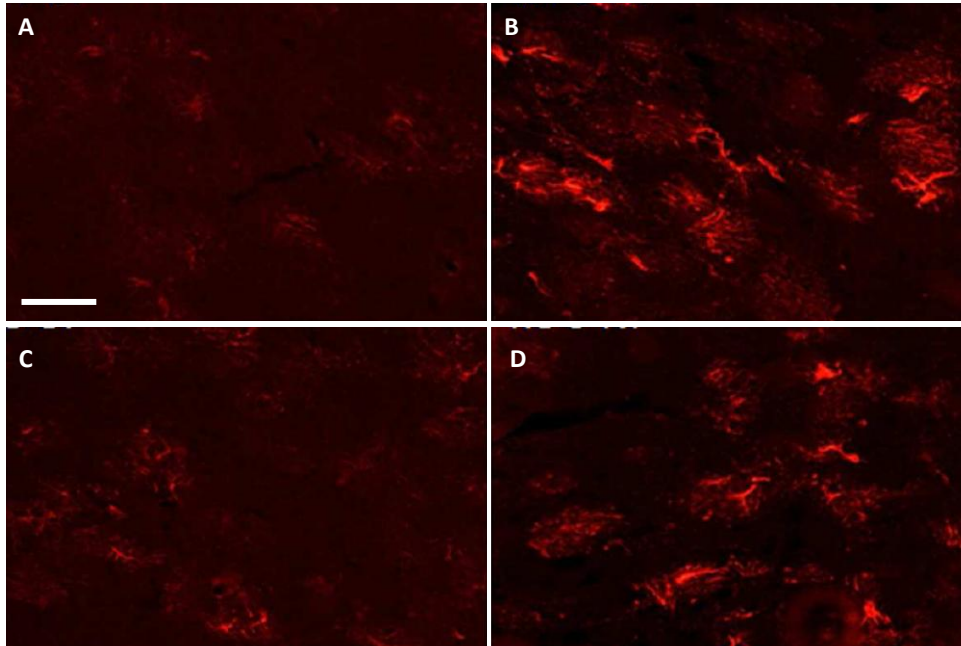


Figura IV-10: Inmunohistoquímica contra GFAP en secciones de estriado. Se observa un incremento de inmunoreactividad en el estriado de ambos genotipos WT (B) y *Jnk3*^{-/-} (D) tratados a 3 días con 3NP respecto a los controles, WT (A) y *Jnk3*^{-/-} (C) no tratados. Barra de escala: 200 μ m.

1.2.4 Análisis de los cambios en la fosforilación de MAPKs

A fin de determinar la implicación de las diferentes MAPKs en la muerte celular inducida por 3NP, se analizó su fosforilación mediante *Western blot* en WT y *Jnk3*^{-/-}.

En primer lugar se analizó la ausencia de JNK3 en el estriado de ratones *Jnk3*^{-/-}. Se valoraron los niveles de JNK y p-JNK tras el tratamiento con 3NP y se observó un incremento de la fosforilación de JNK en ratones WT, pero no en ratones *Jnk3*^{-/-} (Figura IV-11).

IV. RESULTADOS

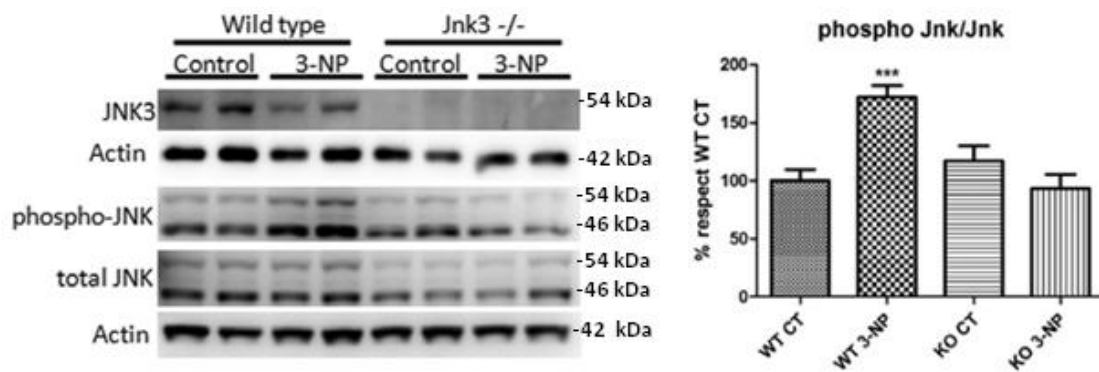


Figura IV-11: Detección de JNK3, p-JNK y JNK tras el tratamiento con 3NP. La grafica muestra la cuantificación de las bandas. Los resultados corresponden a la media con su desviación estándar de tres experimentos independientes (** $p < 0.001$ respecto al WT CT).

Respecto al patrón de fosforilación de la cinasa p38 no se detectaron cambios significativos inducidos por 3NP (Figura IV-12).

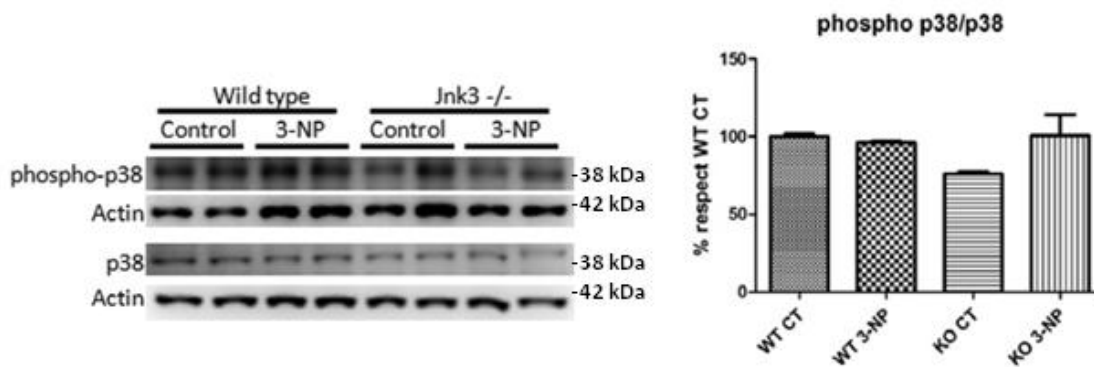


Figura IV-12: Detección de p-p38 y p38 tras el tratamiento con 3NP. La grafica muestra la cuantificación de las bandas. No se observan cambios significativos en ninguno de los genotipos tras el tratamiento con 3NP. Los resultados corresponden a la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

En cuanto a la MAPK, ERK1/2, su fosforilación incrementó significativamente en ambos ratones tras el tratamiento con 3NP, sin embargo no se detectaron diferencias significativas cuando se compararon dichos incrementos (Figura IV-13).

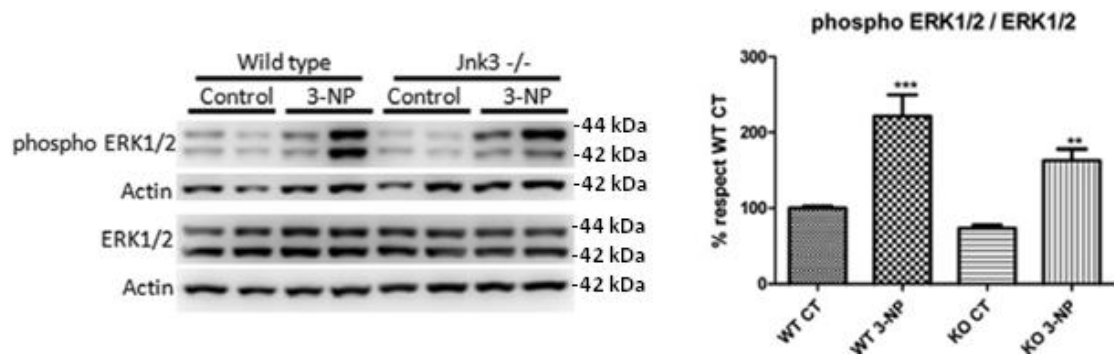


Figura IV-13: Detección de p-ERK1/2 y ERK1/2 total tras el tratamiento con 3NP. La grafica muestra la cuantificación de las bandas. Los resultados corresponden a la media con su desviación estándar de tres experimentos independientes (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, respecto al CT salino).

1.2.5 Inducción de la fosforilación de c-Jun

Al evaluar la fosforilación de c-Jun, se detectó un incremento de los niveles de p-c-Jun en los WT tratados con 3NP, superior al reflejado por los ratones *Jnk3*^{-/-} (Figura IV-14). Además, en situación basal se observó que los niveles de p-c-Jun también resultaban inferiores en *Jnk3*^{-/-} respecto al WT control (WT CT).

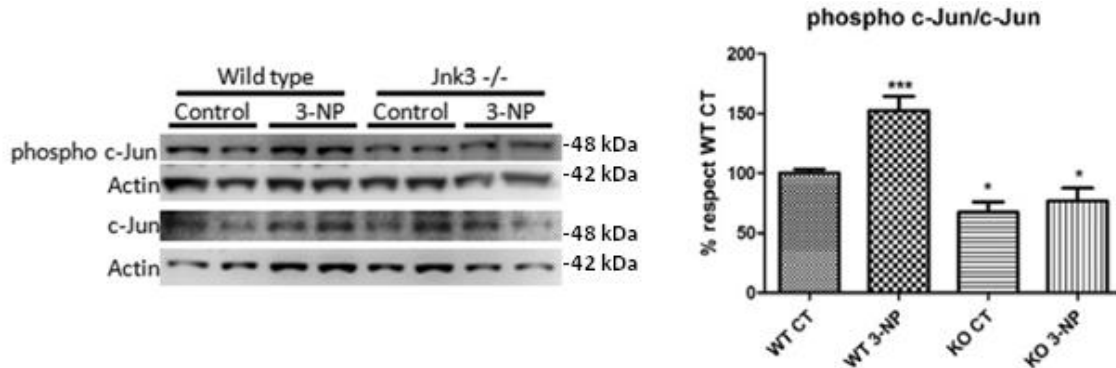


Figura IV-14: Detección de p-c-Jun y c-Jun total en WT y *Jnk3*^{-/-} tras el tratamiento con 3NP. La grafica muestra la cuantificación de las bandas. Los resultados corresponden a la media con su desviación estándar de tres experimentos independientes. (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$, respecto a al CT salino).

1.2.6 Activación de la vía de las calpaínas

Una vez analizado el perfil de fosforilación de cada MAPK ante el 3NP y observar que tanto c-Jun como JNK no parecen ser proteínas claves en la neurodegeneración inducida por 3NP, se estudió la implicación de la vía de las calpaínas, dado que su activación se ha descrito como

IV. RESULTADOS

fundamental en el mecanismo de muerte celular inducido por 3NP (Raynaud and Marcilhac et al. 2006; Crespo Biel et al. 2007; 2009).

En un inicio, se examinó mediante la técnica de *Western blot* la fragmentación de α -espectrina, un indicador de la activación de calpaína. En ambos ratones WT y *Jnk3*^{-/-} tratados con 3NP, se observó un incremento del fragmento de 145kDa, resultado de la proteólisis de la α -espectrina realizada por la calpaína (Figura IV-15A). Este resultado fue confirmado por el ensayo de actividad calpaína (Figura IV-15B).

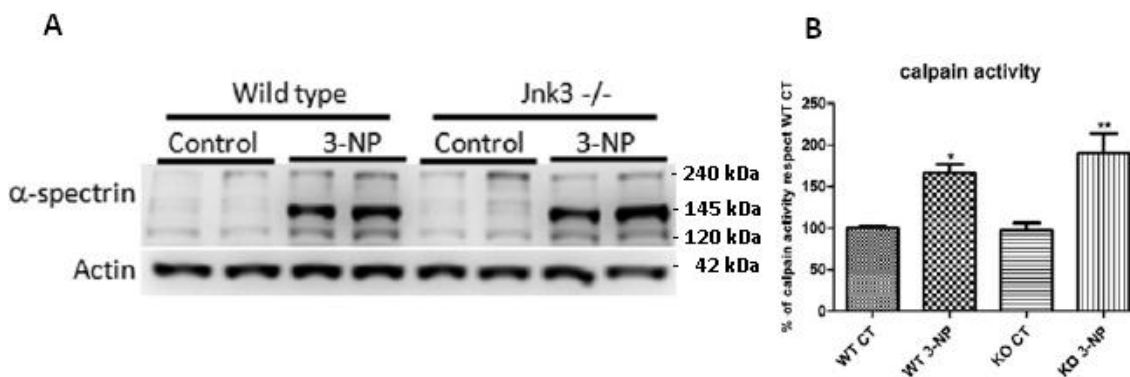


Figura IV-15: Evaluación de la activación de calpaína tras el tratamiento con 3NP, mediante la detección de α -espectrina (A) y un ensayo de actividad calpaína (B). Se observa un incremento de la actividad calpaína tras el tratamiento con 3NP en ambos genotipos. Los resultados corresponden a la media con su desviación estándar de 3 experimentos independientes (* p <0.05; ** p <0.01, respecto al CT salino).

A continuación, se analizaron los niveles de la proteína p35 y CDK5. La proteína p35 se encuentra en la membrana celular unida a CDK5, la cual es degradada a p25, y libera a CDK5. Los resultados mostraron una reducción significativa de p35 en ambos genotipos (WT y *Jnk3*^{-/-}) tratados con 3NP, respecto a los no tratados (Figura IV-16).

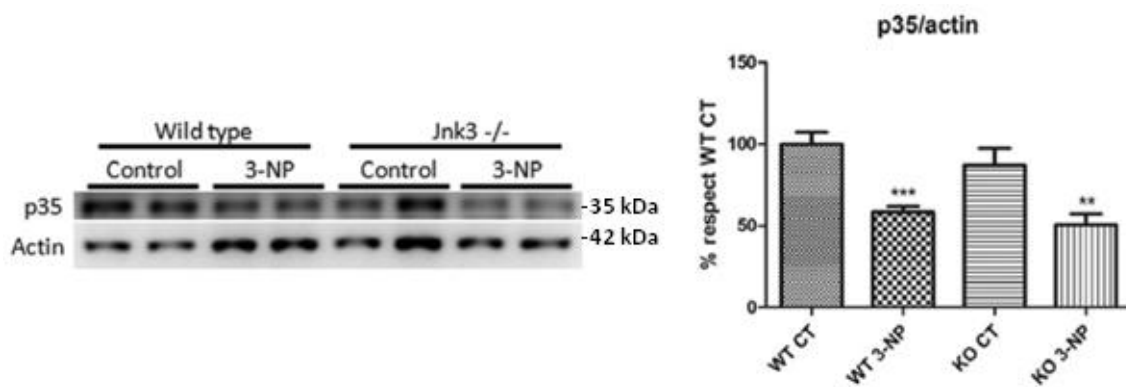


Figura IV-16: Detección de p35 en WT y $Jnk3^{-/-}$ tras el tratamiento con 3NP. La grafica muestra la cuantificación de las bandas. Los resultados corresponden a la media con su desviación estándar de tres experimentos independientes (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, respecto al WTCT).

Respecto a la ciclina CDK5, no se detectaron cambios tras el tratamiento con 3NP en ambos genotipos WT y $Jnk3^{-/-}$ (Figura IV-17).

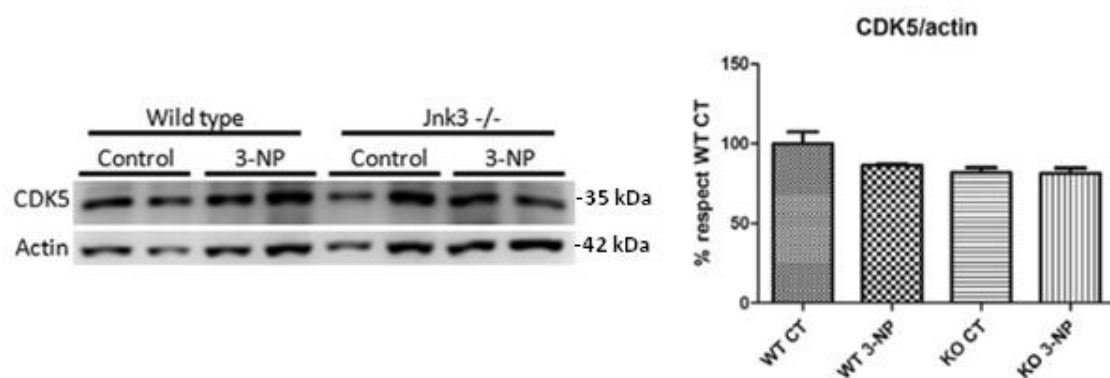


Figura IV-17: Detección de CDK5 en WT y $Jnk3^{-/-}$ tras el tratamiento con 3NP. La grafica muestra la cuantificación de las bandas. Los resultados corresponden a la media con su desviación estándar de tres experimentos independientes.

1.2.7 Análisis de la vía de señalización de AKT

La relación directa entre la vía de activación de AKT con la supervivencia neuronal está ampliamente descrita en diferentes modelos de neurodegeneración (Ávila et al. 2004; Junyent et al. 2011; Song et al. 2005). Para comprobar si en el modelo experimental del 3NP también se daba esta relación, se analizaron mediante *Western blot*, los niveles de AKT, de su principal sustrato la GSK3 β y de la proteína asociada a los microtúbulos Tau. En ambos genotipos se detectó un incremento de pAKT tras el tratamiento con 3NP, sin embargo estos fueron

IV. RESULTADOS

significativamente más altos en ratones *Jnk3*^{-/-} que en los WT, tanto en los animales no tratados como tratados con 3NP (Figura IV-18).

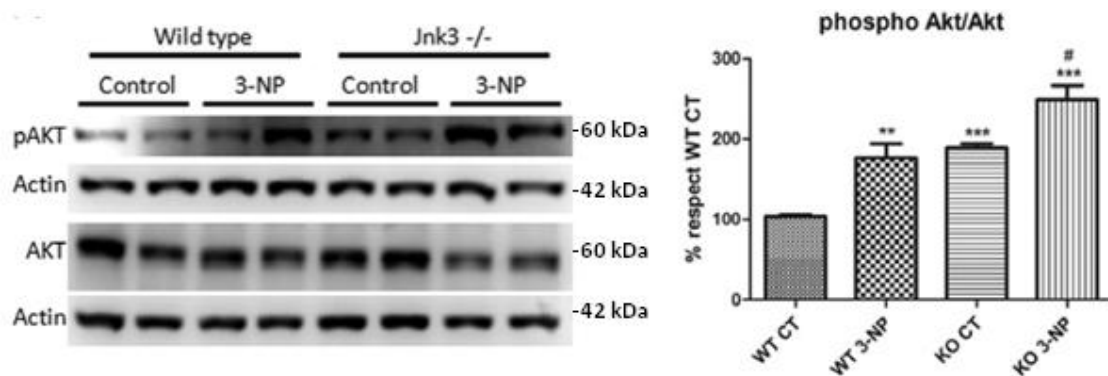


Figura IV-18: Detección de pAKT y AKT en WT y *Jnk3*^{-/-} tras el tratamiento con 3NP. La grafica muestra la cuantificación de las bandas. Los resultados corresponden a la media con su desviación estándar de tres experimentos independientes. (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, respecto al CT salino; # $p < 0.05$, respecto al WT 3NP).

Los niveles de fosforilación de GSK3 β en Ser9 (pGSK3 β), revelaron un incremento en WT y *Jnk3*^{-/-} tras el tratamiento con 3NP, sin embargo se detectaron niveles significativamente más elevados en *Jnk3*^{-/-}, tanto en ratones tratados como no tratados, respecto a WT (Figura IV-19).

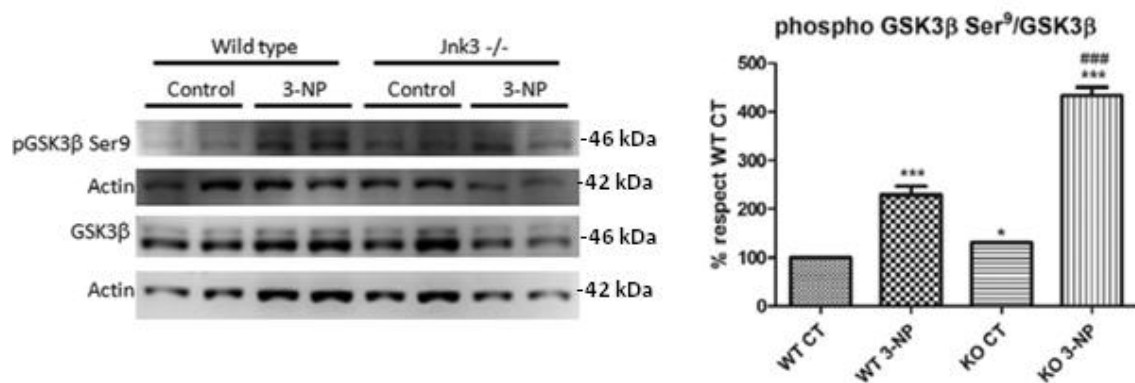


Figura IV-19: Detección de GSK3 β Ser9 y GSK3 β en WT y *Jnk3*^{-/-} tras el tratamiento con 3NP. La grafica muestra la cuantificación de las bandas. Los resultados corresponden a la media con su desviación estándar de tres experimentos independientes (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ respecto al CT salino; ### $p < 0.001$, respecto al WT 3NP).

Al analizar la fosforilación de la proteína Tau en dos residuos, Ser202 y Ser199 (pTau Ser202 y pTau Ser199), tras el tratamiento con 3NP, se observó un incremento de la fosforilación de Tau en Ser202 en WT pero no en *Jnk3*^{-/-}, sin embargo, la fosforilación de Tau en Ser199 se detectó elevada en ambos genotipos (Figura IV-20).

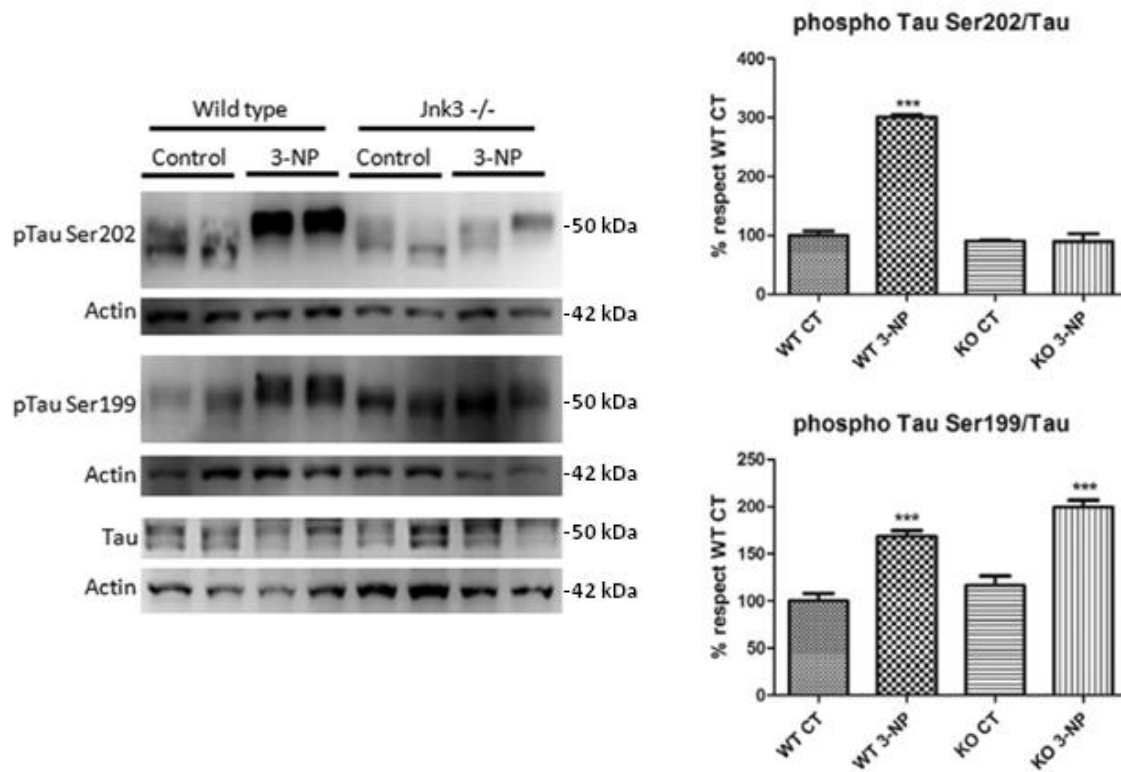


Figura IV-20: Detección de la fosforilación de Tau Ser202, Tau Ser199 y Tau en WT y *Jnk3*^{-/-} tras el tratamiento con 3NP. Las graficas muestran la cuantificación de las bandas. Los resultados corresponden a la media con su desviación estándar de tres experimentos independientes (***) $p < 0.001$, respecto al CT salino).

2. RELACIÓN DE LA ISOFORMA JNK3 Y LA VÍA DE SUPERVIVENCIA PI3K/AKT

Estudios previos han evidenciado que la falta de JNK3, pero no de JNK1 y JNK2, confiere neuroprotección ante diferentes insultos, principalmente en procesos excitotóxicos (Yang et al. 1997; Brecht et al. 2005). En el apartado 1, se corroboró la neuroprotección de los ratones *Jnk3*^{-/-} ante la acción del KA; sin embargo, ésta no se observó ante la acción del 3NP. Estos resultados indican que el papel específico que juega JNK3 en el mecanismo de muerte neuronal y su interacción con otras vías celulares, ya sean de supervivencia o de muerte neuronal, queda por esclarecer. Por este motivo, en el presente trabajo se analizó mediante la técnica de *microarrays* de alta densidad un perfil de expresión génica de muestras hipocámpales en situación control de ratones *Jnk3*^{-/-}, comparados con WT; con el fin de determinar cambios transcripcionales relacionados con procesos de muerte y supervivencia celular en ausencia de JNK3.

IV. RESULTADOS

2.1 Análisis de los niveles de expresión génica en hipocampo de ratones *Jnk3*^{-/-}

Se realizó un análisis comparativo entre ratones *Jnk3*^{-/-} y WT para conocer la expresión de genes en hipocampo, mediante la técnica de *microarrays*. Se consideraron genes de interés aquellos que se expresaban diferencialmente en dos *arrays* independientes con un valor de variable estandarizada, z-score>2 (Tabla IV-1). Este análisis permitió identificar 22 genes diferencialmente expresados entre el genotipo *Jnk3*^{-/-} y el WT. De éstos, 5 son transcritos RIKEN cDNA y 17 son transcritos que codifican para proteínas de función identificada, de los cuales, 10 están regulados a la alza y 7 a la baja.

GENBANK NUMBER	GENE SYMBOL	GENE NAME	Z-SCORE	SD
AK02938	<i>Tmem107</i>	Transmembrane protein 107	2,79	0,08
AK013609	<i>Zdhhc4</i>	Zinc finger, DHHC domain containing 4	2,61	0,06
AK003230	<i>Pik3cb</i>	Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, beta polypeptide	2,55	0,61
NM_016812	<i>Banp</i>	BTG3 associated nuclear protein	2,4	0,36
NM_011543	<i>Skp1a</i>	S-phase kinase-associated protein 1A	2,31	0,28
NM_008980	<i>Ptpa</i>	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, A	2,29	0,2
NM_019473	<i>Olf155</i>	Olfactory receptor 155	2,22	0,15
AF374267	<i>Srebf2</i>	Sterol regulatory element binding factor 2	2,1	0,1
NM_007674	<i>Cdx4</i>	Caudal type homeobox 4	2,09	0,12
AK007679	<i>18100033B17Rik</i>	RIKEN cDNA 1810033B17	2,09	0,05
NM_011268	<i>Rgs9</i>	Regulator of G-protein signalling 9	2,04	0,02
AK019660	<i>4930488B04Rik</i>	RIKEN cDNA 4930488B04	-2,05	0,06
AF282276	<i>Olf1893</i>	Olfactory receptor 893	-2,1	0,04
AF188290	<i>Dysf</i>	Dysferlin	-2,12	0,08
AK005708	<i>Cox8c</i>	Cytochrome c oxidase, subunit VIIIc	-2,12	0,06
AK005166	<i>Ip6k2</i>	Inositol hexaphosphate kinase 2	-2,16	0,08
AK013367	<i>2810459M11Rik</i>	RIKEN cDNA 2810459M11	-2,17	0,03
NM_010133	<i>En1</i>	Engrailed 1	-2,23	0,14
AK006550	<i>1700030I03Rik</i>	RIKEN cDNA 1700030I03	-2,31	0,33
AK020104	<i>Rnf170</i>	Ring finger protein 170	-2,44	0,53
AK018452	<i>Rbm22</i>	RNA binding motif protein 22	-2,51	0,19
AK015928	<i>4930528J11Rik</i>	RIKEN cDNA 4930528J11	-2,68	0,67

Tabla IV-1: Genes que se expresan diferencialmente en hipocampo de ratones *Jnk3*^{-/-} vs WT con un z-score>2.

Desviación estándar (SD) representada por la media de los valores de z-score de dos *arrays* independientes.

2.1.1 Validación de genes implicados en neurodegeneración

Con el fin de validar los resultados encontrados con la técnica de *microarrays*, se cuantificó la expresión de cuatro genes que potencialmente están involucrados en desórdenes neurodegenerativos, como son *Banp*, *Pik3cb*, *Dysf* y *En1* por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a tiempo real (Figura IV-21). Los datos obtenidos fueron consistentes con el análisis realizado por *microarrays*, confirmando su validez: los niveles de mRNA de los genes *Pik3cb* y *Banp* se encontraban aumentados significativamente, mientras que los de *Dysf* y *En1* se encontraban disminuidos significativamente en hipocampo de ratones *Jnk3*^{-/-} con respecto a los WT.

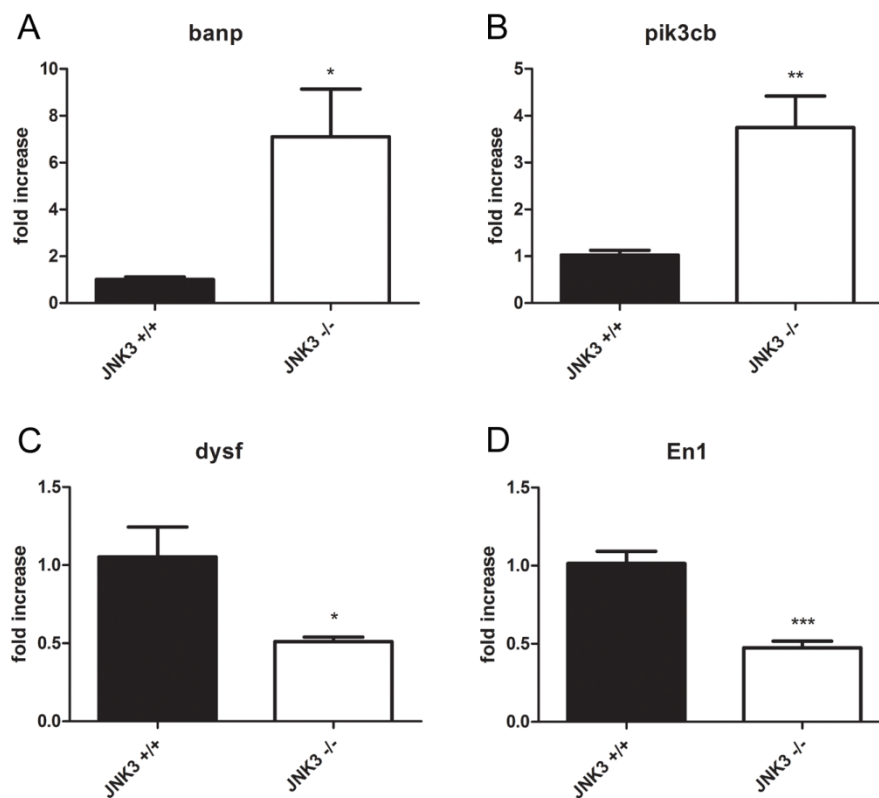


Figura IV-21: Detección de cambios en los niveles de expresión (fold increase) de RNAm para los genes *Banp* (A), *Pik3cb* (B), *Dysf* (C) y *En1* (D) en ratones WT (*JNK3*^{+/+}) y *Jnk3*^{-/-}, mediante qPCR. Los resultados corresponden a la media con su desviación estándar de tres experimentos independientes (tres replicas por experimento), (**p*<0.05; ***p*<0.01; ****p*<0.001, respecto al WT).

2.1.2 Detección de la subunidad p110β de PI3K y análisis de la actividad de PI3K

De los 22 genes encontrados, nos centramos en el gen *Pik3cb*, que codifica para la subunidad catalítica p110β de PI3K. Esta cinasa está implicada tanto en mecanismos de supervivencia celular, como en la replicación del DNA y en la regulación del ciclo celular en enfermedades neurodegenerativas (Kumar et al. 2010; Marqués et al. 2008, 2009). Mediante *Western blot* se valoraron los niveles de p110β en hipocampo procedentes de animales WT, *Jnk3*^{-/-} y *Jnk1*^{-/-} para detectar la interacción entre la vía PI3K y la vía JNK (Figura IV-22). Se observó un incremento significativo de p110β en *Jnk3*^{-/-} con respecto a WT, pero no así en *Jnk1*^{-/-} (Figura IV-22a). Al analizar la actividad de la cinasa PI3K en los mismos genotipos (WT, *Jnk3*^{-/-} y *Jnk1*^{-/-}), se observó un incremento significativo en ratones *Jnk3*^{-/-}, pero no en *Jnk1*^{-/-}, respecto a WT (Figura IV-22b). Estos datos sugirieron que la activación de PI3K podría atribuirse a la ausencia de JNK3 (Figura IV-22a).

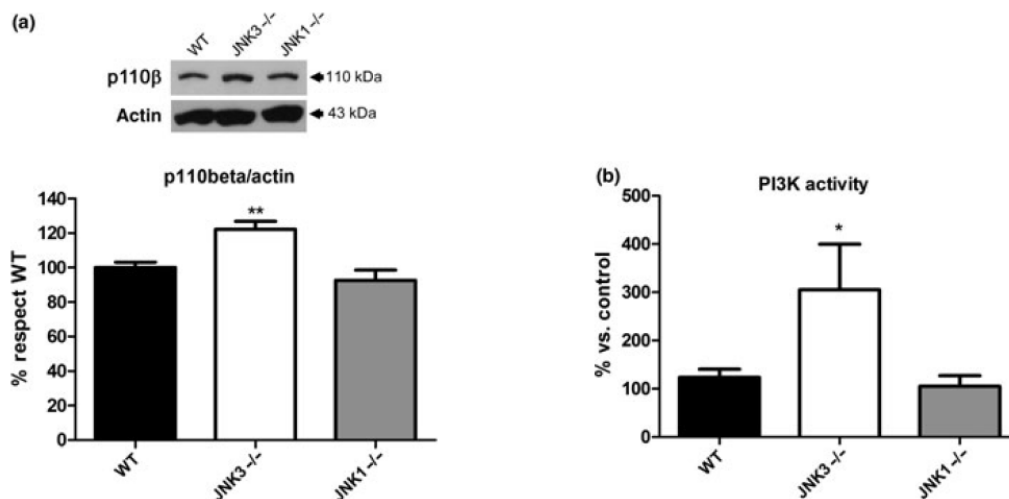


Figura IV-22: Detección de la proteína p110β en WT, *Jnk3*^{-/-} y *Jnk1*^{-/-} mediante *Western blot* (a); y determinación de la actividad de PI3K en WT, *Jnk3*^{-/-} y *Jnk1*^{-/-} (b). Los resultados de ambas graficas corresponden a la media con su desviación estándar de tres experimentos independientes por grupo (**p*<0.05, ***p*<0.01, respecto al WT).

2.2. Detección de la vía de señalización de AKT

Tras la detección de un incremento en los niveles de la proteína p110β y en la actividad de PI3K en ratones *Jnk3*^{-/-}, se estudió mediante *Western blot* la vía de señalización AKT en animales *Jnk3*^{-/-} y *Jnk1*^{-/-}. Se utilizaron ratones *Jnk1*^{-/-}, con el fin de comprobar la especificidad del efecto de JNK3. Previamente, se analizaron los niveles de JNK y de c-Jun en ambos ratones *Jnk3*^{-/-} y *Jnk1*^{-/-}.

Los resultados indicaron una reducción de los niveles tanto de fosforilación como totales de la proteína JNK en ratones *Jnk3^{-/-}* y *Jnk1^{-/-}*. Esta disminución se vio acompañada de una reducción de la fosforilación de c-Jun en ambos ratones KO respecto al WT (Figuras IV-23 y IV-24). En relación a la vía de AKT, se observó un incremento de los niveles de fosforilación de AKT en *Jnk3^{-/-}* respecto al WT (Figura IV-25). Además, se detectó un aumento en los niveles de fosforilación de GSK3 β en Ser9, junto con una disminución de la fosforilación de Tau en Ser396 en ratones *Jnk3^{-/-}*, respecto al WT (Figura IV-25). Por el contrario, no se detectaron diferencias en los niveles de fosforilación de las proteínas AKT, GSK3 β y Tau en animales *Jnk1^{-/-}* (Figura IV-26). Estos datos apoyan a una posible interacción entre la vía de PI3K/AKT y la vía de JNK, inducida por la falta de la isoforma JNK3.

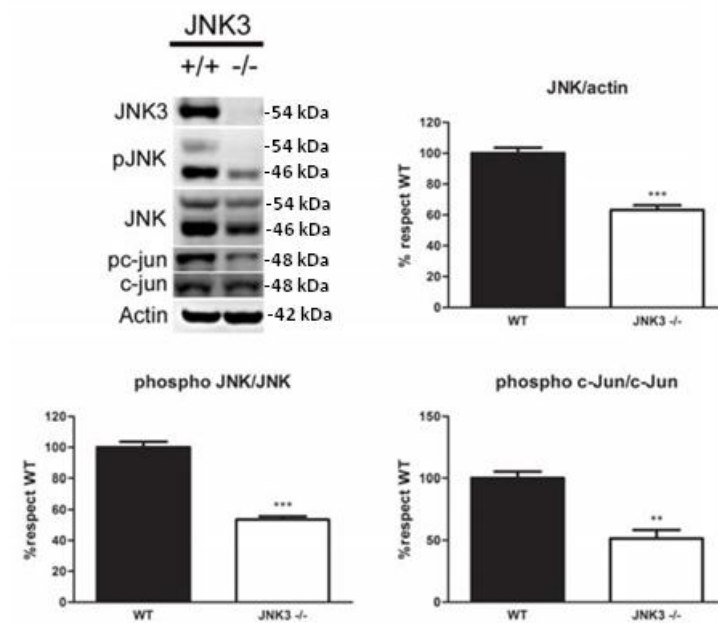


Figura IV-23: Detección de las proteínas JNK3, pJNK, JNK, pc-Jun y c-Jun a partir de muestras de hipocampo, obtenidas de animales WT y de *Jnk3^{-/-}*. Las gráficas muestran la cuantificación de las bandas de JNK vs actina, pJNK vs JNK y pc-Jun vs c-Jun y los resultados corresponden a la media con su desviación estándar de tres experimentos independientes (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ respecto al WT).

IV. RESULTADOS

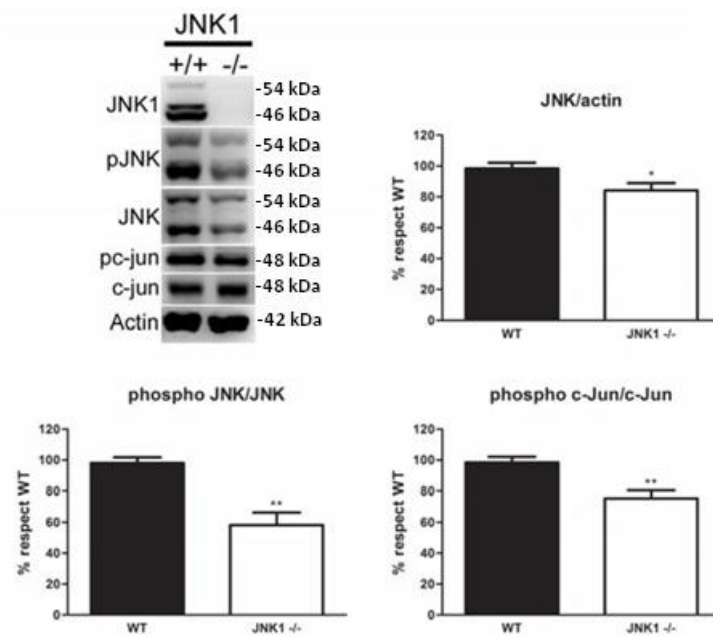


Figura IV-24: Detección de JNK1, pJNK, JNK, pc-Jun y c-Jun en ratones WT y en *Jnk1*^{-/-}. Las graficas muestran la cuantificación de las bandas de JNK vs actina, pJNK vs JNK y pc-Jun vs c-Jun. Los resultados corresponden a la media y desviación estándar de tres experimentos independientes (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ respecto al WT).

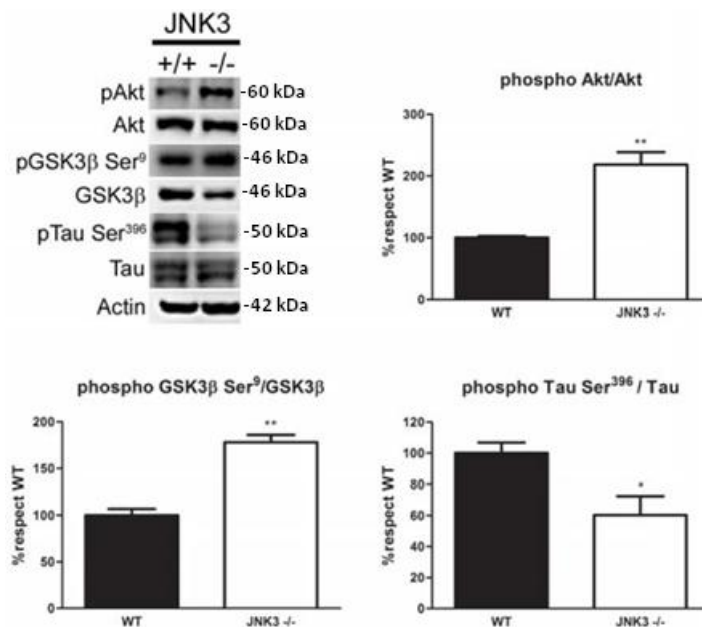


Figura IV-25: Detección de pAKT, AKT, pGSK3β (Ser9), GSK3β, pTau (Ser396) y Tau en ratones WT y en *Jnk3*^{-/-}. Las graficas muestran la cuantificación de las bandas de pAKT vs AKT, pGSK3β vs GSK3β y pTau vs Tau. Los resultados corresponden a la media con su desviación estándar de tres experimentos independientes (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

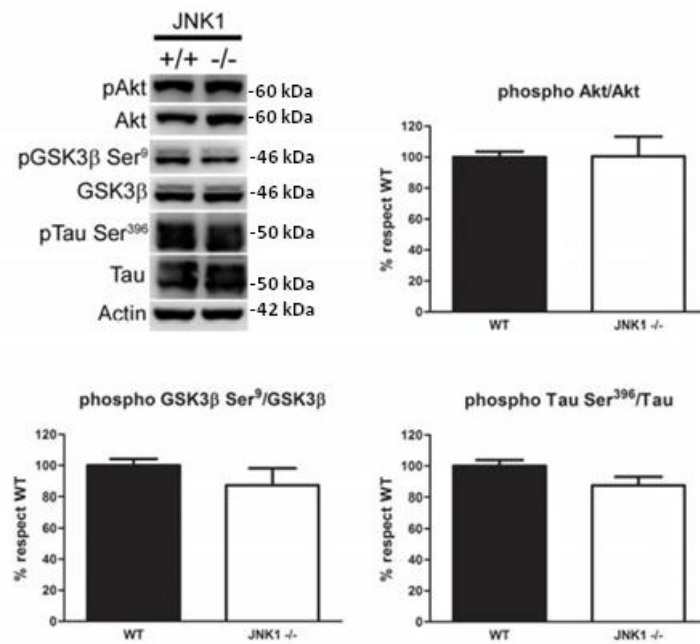


Figura IV-26: Detección de pAKT, AKT, pGSK3β (Ser9), GSK3β, pTau (Ser396) y Tau en ratones WT y en *Jnk1*^{-/-}. Las graficas muestran la cuantificación de las bandas de pAKT vs AKT, pGSK3β vs GSK3β y pTau vs Tau. Los resultados corresponden a la media de tres experimentos independientes.

3. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS MECANISMOS APOPTÓTICOS Y NEUROINFLAMATORIOS REGULADOS POR JNK3 Y JNK1 EN EL MODELO DEL KA

Los resultados obtenidos en el primer apartado permitieron corroborar que la ausencia de JNK3 induce neuroprotección ante la excitabilidad causada por la acción del KA. Además, el análisis comparativo entre ratones *Jnk1*^{-/-} y *Jnk3*^{-/-} sugirió que la ausencia de JNK3, pero no la de JNK1, generaba una inducción de la vía de PI3K/AKT, lo que podría contribuir a la neuroprotección observada ante la excitabilidad neuronal. Por este motivo, se decidió caracterizar el papel de la isoforma JNK3, comparativamente con la isoforma JNK1, en procesos de muerte neuronal y neuroinflamación en el modelo de excitotoxicidad inducido por KA.

3.1 Análisis de la neurodegeneración en hipocampo de ratones *Jnk3*^{-/-} y *Jnk1*^{-/-}

Se analizó la degeneración neuronal en el hipocampo a las 24h de tratamiento con KA, mediante la técnica de Fluoro-Jade B. En ratones *Jnk3*^{-/-} se observó una reducción de las células

en neurodegeneración respecto a los WT (Figura IV-27B). Sin embargo, sorprendentemente, en ratones *Jnk1*^{-/-} también se observó esta reducción respecto a los WT (Figura IV-27C).

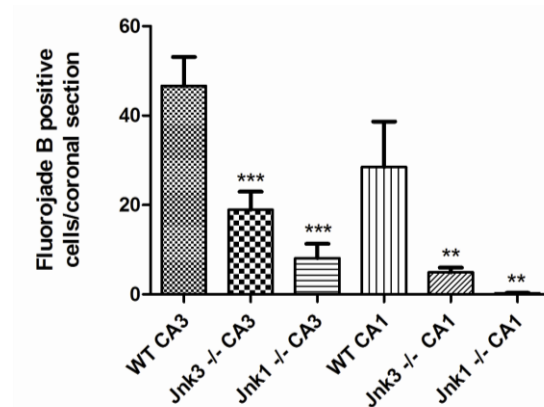
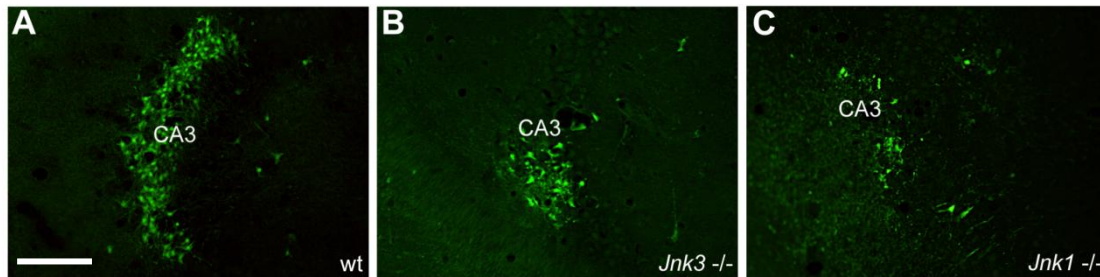


Figura IV-27: Neurodegeneración observada mediante la tinción de Fluoro-Jade B en CA3 de hipocampo de ratones WT (A), *Jnk3*^{-/-} (B), *Jnk1*^{-/-} (C) tratados durante 24h con KA. La gráfica representa la cuantificación de las células neuronales positivas para el marcaje de Fluoro-Jade B de las diferentes áreas hipocámpales de WT, *Jnk3*^{-/-} y *Jnk1*^{-/-}. Los resultados corresponden a la media con su desviación estándar de cinco experimentos independientes. (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ con respecto a WT KA24h). Barra de escala: 100 μ m.

3.2 Activación glial en ratones *Jnk3*^{-/-} y *Jnk1*^{-/-}

Una vez identificado un efecto similar en la disminución de células en neurodegeneración tras el tratamiento con KA en ratones *Jnk3*^{-/-} y *Jnk1*^{-/-}, se estudió la respuesta glial en ambos genotipos, tras 24h y 3 días de tratamiento. Para ello, se realizó una doble-inmunohistoquímica contra los marcadores gliales GFAP para astrocitos, e Iba-1 (*Ionized calcium binding adapter molecule 1*) para microglia/macrófagos. Los resultados mostraron que los ratones WT presentaban reactividad microglial a 24h de tratamiento con KA, y reactividad astrogliar a los 3 días de tratamiento, y ésta prevalecía sobre la reactividad microglial (Figura IV-28).

Respecto a los ratones *Jnk3*^{-/-}, a ningún tiempo tras el tratamiento con KA se detectó reactividad glial (Figura IV-28). Sin embargo, en ratones *Jnk1*^{-/-}, a pesar de que a las 24h se detectó reactividad microglial, a los 3 días no se observó reactividad astrocitaria (Figura IV-28), manifestándose así una activación diferencial a nivel glial entre ambos ratones *Jnk3*^{-/-} y *Jnk1*^{-/-}.

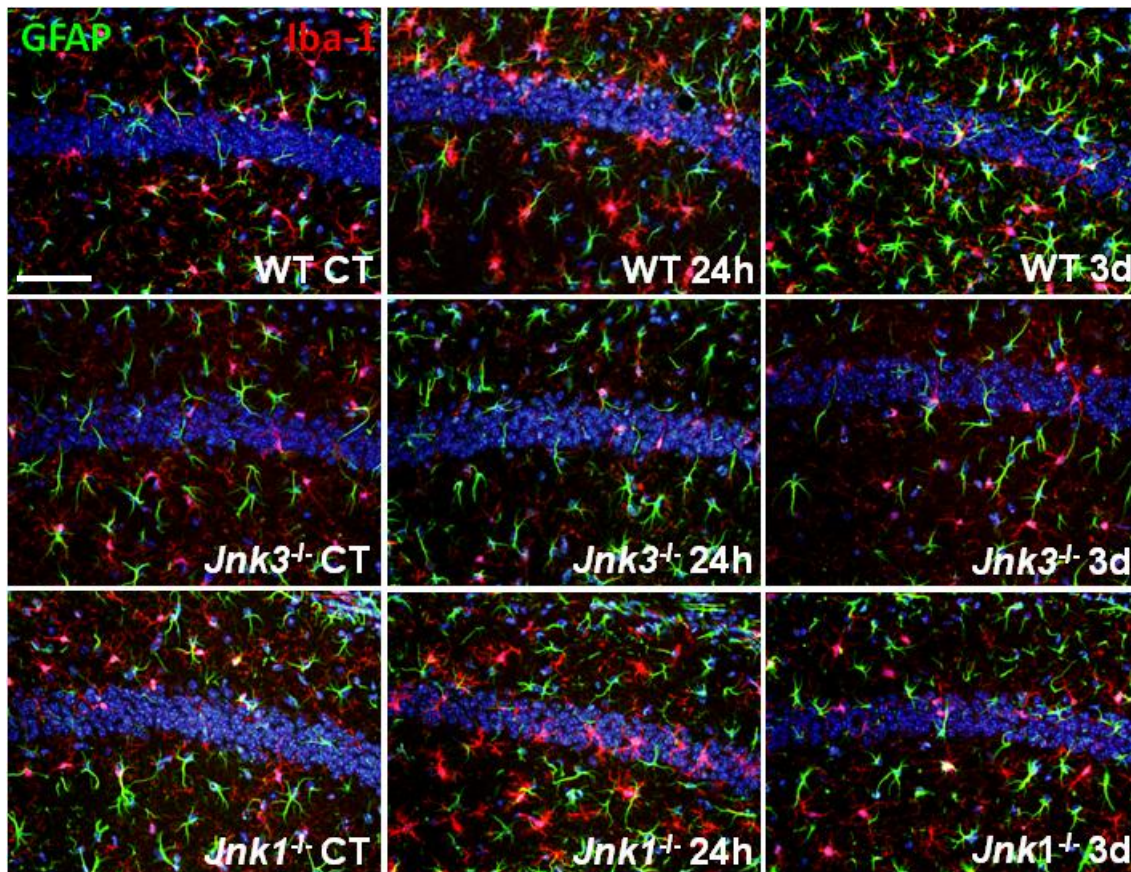


Figura IV-28: Inmunohistoquímica contra GFAP (verde), Iba-1 (rojo) y contraindicación nuclear con Hoescht 33342 (azul) en secciones coronales de hipocampo (CA1) de ratones WT, *Jnk3*^{-/-} y *Jnk1*^{-/-} tratados a 24 h y 3 días con KA. Barra de escala: 500 μ m.

3.3 Expresión de genes implicados en inflamación en ratones *Jnk3*^{-/-} y *Jnk1*^{-/-}

A partir de los resultados observados en la activación diferencial de la glía, se estudió mediante PCR en tiempo real, la expresión de genes implicados en inflamación tras 12h de tratamiento con KA, en ratones WT, *Jnk1*^{-/-} y *Jnk3*^{-/-} (Figura IV-29). De este modo, se analizó la inducción de *Il1b*, *Cox2*, *Ifny* y *Ccl2* (*Mcp1*), observándose cambios significativos en la expresión de *Cox2* y *Ccl2* en los tres genotipos, siendo éstos más evidentes en WT, que en *Jnk3*^{-/-} y *Jnk1*^{-/-} (Figura IV-29). En ratones *Jnk3*^{-/-} tratados no se detectaron niveles de expresión de *Il1b*, ni cambios en la

IV. RESULTADOS

expresión de *Ifn γ* . Sin embargo, en ratones WT y *Jnk1*^{-/-}, estos genes aumentaron su expresión tras el tratamiento con KA, pero sin observarse diferencias entre ambos genotipos (Figura IV-29).

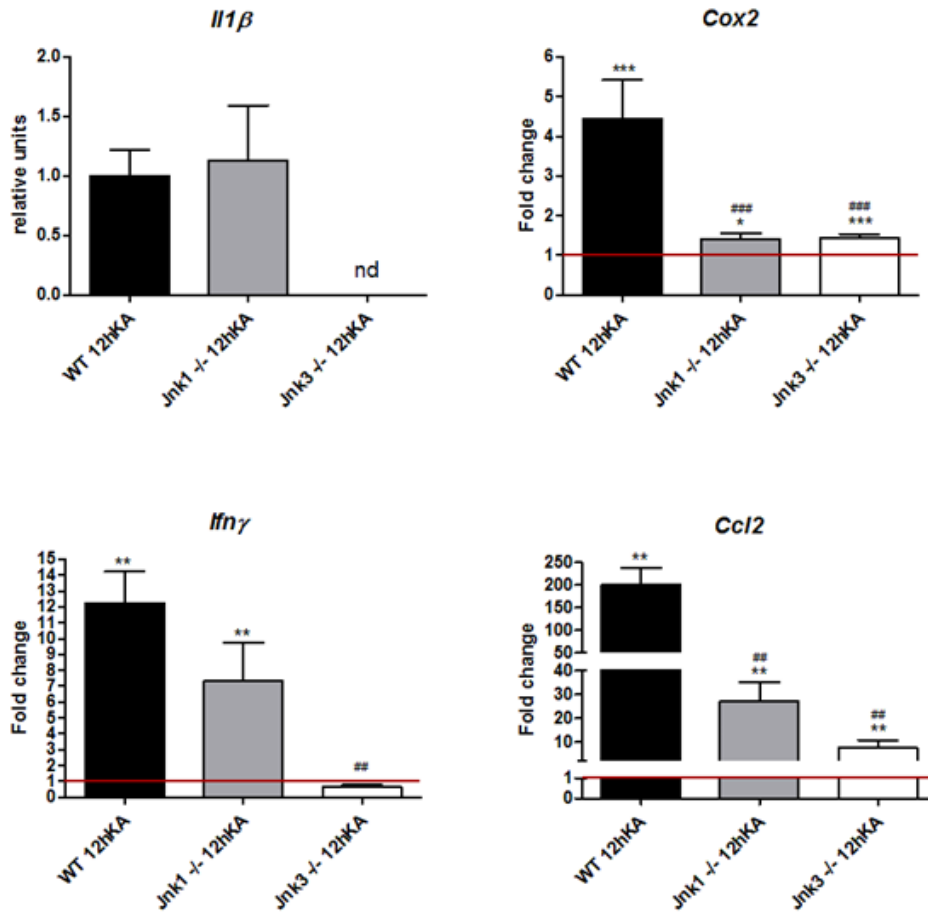


Figura IV-29: Detección de cambios en los niveles de expresión de mRNA (fold increase) de los genes *Il1 β* , *Cox2*, *Ifn γ* y *Ccl2* en WT, *Jnk1*^{-/-} y *Jnk3*^{-/-} tras el tratamiento de 12 h con KA. La línea roja determina la expresión basal (control) de cada gen. Los resultados corresponden a la media con su desviación estándar de tres experimentos independientes (tres replicas por cada grupo) (** p <0.01, *** p <0.001, respecto al CT salino; # p <0.05, ## p <0.01, ### p <0.001, respecto al WT KA 12h).

3.4 Inmunoreactividad de c-Fos en ratones *Jnk3*^{-/-} y *Jnk1*^{-/-}

También se analizó la presencia de la proteína c-Fos a nivel del hipocampo tras 3h, 6h, 12h y 24h de tratamiento con KA en ratones WT, *Jnk3*^{-/-} y *Jnk1*^{-/-} (Figura IV-34). Se detectó un incremento de la inmunoreactividad para c-Fos en el área CA1 de hipocampo en los tres genotipos, WT, *Jnk3*^{-/-} y *Jnk1*^{-/-}, a 3h y 6h de ser tratados con KA (Figura IV-34). A las 12h de tratamiento con KA, se detectó una reducción de la inmunoreactividad para c-Fos en los tres

genotipos, pero siendo más evidente en ratones *Jnk3^{-/-}* y *Jnk1^{-/-}*, recuperando los niveles basales.

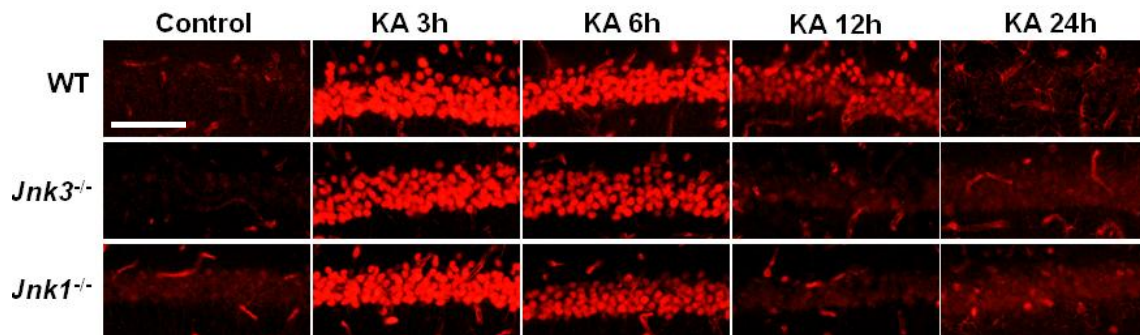


Figura IV-34: Inmunohistoquímica contra c-Fos en secciones coronales de hipocampo correspondientes a el área CA1, de animales WT, *Jnk3^{-/-}* y *Jnk1^{-/-}* tratados a 3h, 6h, 12h y 24h con KA. Barra de escala: 500 μ m.

3.5 Inducción de la fosforilación de JNK y de c-Jun en ratones *Jnk3^{-/-}* y *Jnk1^{-/-}*

La presencia de muerte neuronal, reactividad glial e inducción de c-Fos observada tras la administración de KA, evidencian la inducción de daño cerebral. Además, con los resultados obtenidos en el apartado 1.1.4, se corroboró que este daño induce la activación de la vía de señalización de JNK. Mediante *Western blot* se analizaron los niveles de fosforilación de JNK y de c-Jun a 3h y 6h de tratamiento con KA, en ratones *Jnk3^{-/-}* y *Jnk1^{-/-}* con respecto a WT. Los resultados mostraron una reducción significativa de los niveles de p-JNK, tanto en ratones *Jnk3^{-/-}* como en ratones *Jnk1^{-/-}*, a las 3h y 6h de tratamiento con KA, respecto a WT tratados (Figura IV-30 y Figura IV-31).

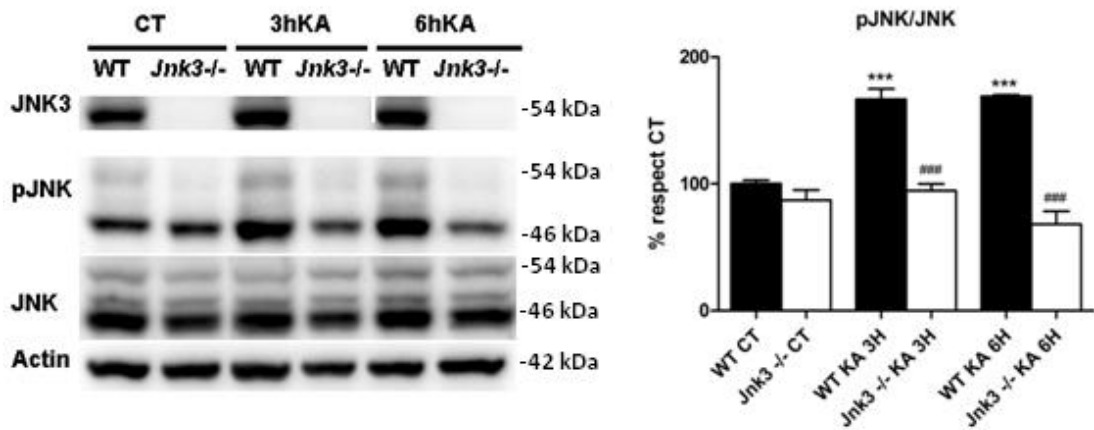


Figura IV-30: Detección de JNK3, pJNK y JNK en ratones WT y *Jnk3*^{-/-} a control y a 3h y 6h del tratamiento con KA. La grafica muestra la cuantificación de las bandas. Los resultados corresponden a la media con su desviación estándar de tres experimentos independientes. (***)*p*<0.001 al WT CT; ###*p*<0.001 respecto al WT KA).

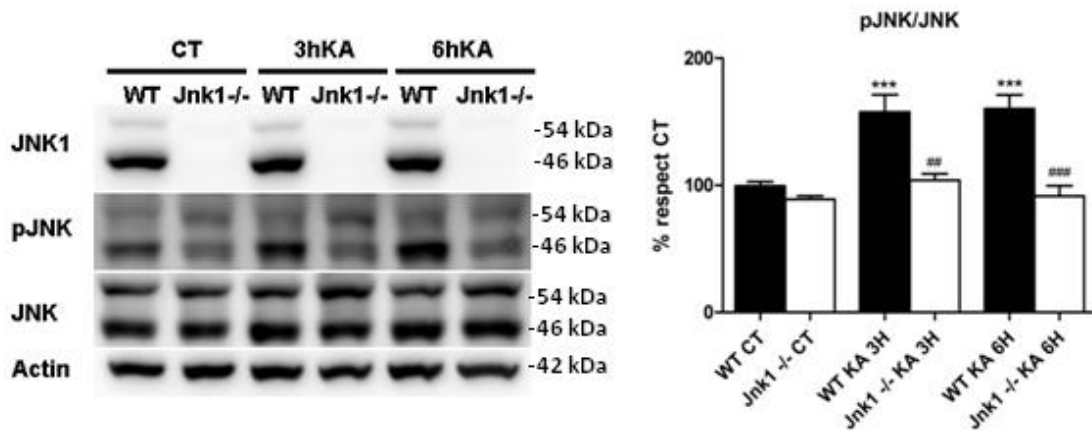


Figura IV-31: Detección de JNK1, pJNK y JNK en ratones WT y *Jnk1*^{-/-} a control, 3h y 6h del tratamiento con KA. La grafica muestra la cuantificación de las bandas. Los resultados corresponden a la media con su desviación estándar de tres experimentos independientes. (***)*p*<0.001 al WT CT; ##*p*<0.01; ###*p*<0.001 respecto al WT KA).

Respecto a los niveles de c-Jun, se observó un patrón de fosforilación diferencial entre *Jnk3*^{-/-} y *Jnk1*^{-/-}. Se detectó una reducción significativa de los niveles de p-c-Jun en ratones *Jnk3*^{-/-}, a las 3h y 6h de tratamiento con KA, respecto a los WT tratados (Figura IV-32). En los ratones *Jnk1*^{-/-} a pesar de que se observó un incremento significativo de los niveles de p-c-Jun a 3h, se detectó una reducción significativa respecto al WT tratado a las 6h (Figura IV-33). Los niveles de c-Jun se encontraron incrementados significativamente a 3h y 6h en WT, *Jnk3*^{-/-} y *Jnk1*^{-/-}.

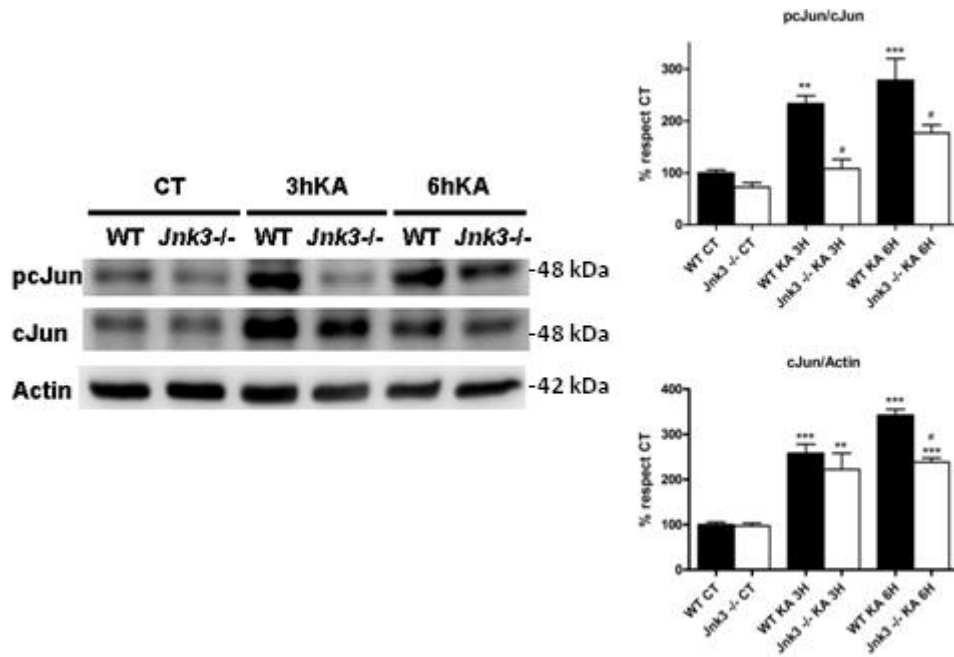


Figura IV-32: Detección de p-c-Jun y c-Jun en ratones WT y *Jnk3*^{-/-} a control, 3h y 6h de tratamiento con KA. La grafica muestra la cuantificación de las bandas. Los resultados corresponden a la media con su desviación estándar de tres experimentos independientes. (**p<0.01; ***p<0.001 respecto a WT CT; #p<0.05 respecto al WT KA).

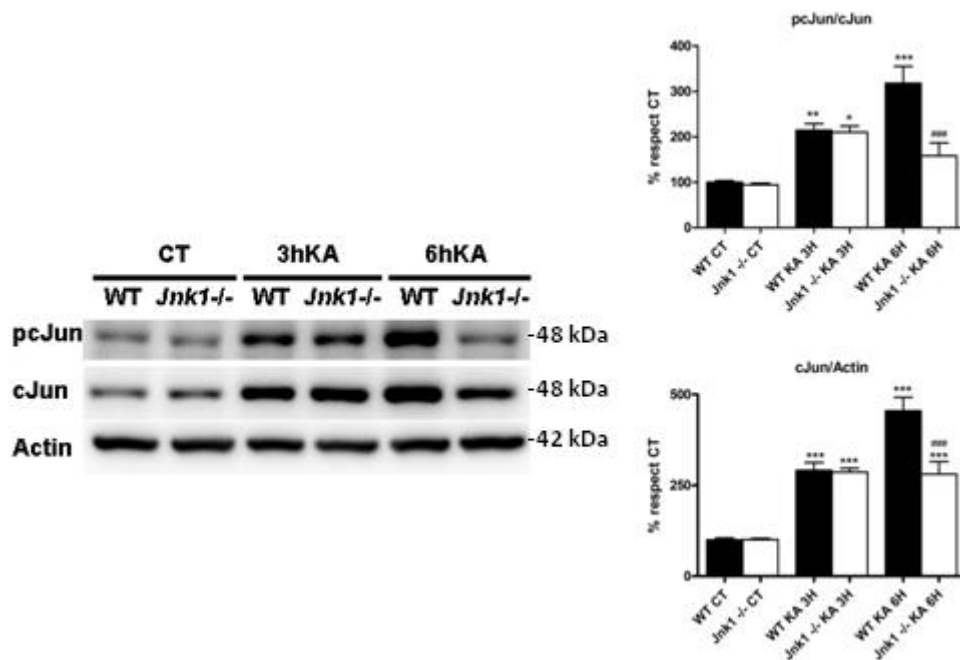


Figura IV-33: Detección de p-c-Jun y c-Jun en ratones WT y *Jnk1*^{-/-} a control, 3h y 6h de tratamiento con KA. La grafica muestra la cuantificación de las bandas. Los resultados corresponden a la media con su desviación estándar de tres experimentos independientes. (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 respecto a WT CT; ###p<0.05 respecto al WT KA).

3.6 Análisis de los niveles de expresión de genes implicados en la apoptosis

Se evaluó la expresión de 84 genes apoptóticos mediante un *array* de PCR en tiempo real (*Mouse Apoptosis RT2 Profiler™ PCR array*) para identificar mediadores implicados en la muerte celular, observada en ratones WT tratados a 12 h con KA. De todos los genes analizados, se consideraron aquellos 23 que mostraron una expresión diferencial significativa de un *fold change* $\geq \pm 1.5$. De éstos, 17 presentaban una expresión a la alza, y 6 a la baja (Tabla IV-2).

En la tabla IV-2, se destaca la elevada expresión de genes involucrados en la vía extrínseca de la apoptosis, como los ligandos de muerte celular, *Tnfa* y *Fas*; sus receptores específicos *Tnfr1a* y *Fas* (Movassagh and Foo 2008); y *Casp3* y *Casp8*. También se destaca la expresión de genes antiapoptóticos, como *Bag3* (Lee et al. 2002), *Cflar* (Wittkopf et al. 2013), *Pak7* (Gu et al. 2013), *Atf5* (Sheng et al. 2010), *Hells* (Thaler et al. 2010), *Mcl1* (Mori et al. 2004) y *Pim2* (Asano et al. 2011), que se sobreexpresaron en ratones WT a 12 h del tratamiento con KA.

GENBANK NUMBER	GENE SYMBOL	GENE NAME	FOLD CHANGE	P-VALUE
NM_013693	<i>Tnfa</i>	Tumor necrosis factor	15,95	0,0017
NM_013863	<i>Bag3</i>	Bcl2-associated athanogene 3	9,03	0,0002
NM_011609	<i>Tnfr1</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a	6,51	0,0004
NM_007987	<i>Fas</i>	Fas (TNF receptor superfamily member 6)	3,53	0,0001
NM_008562	<i>Mcl1</i>	Myeloid cell leukemia sequence 1	3,47	0,0001
NM_009805	<i>Cflar</i>	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	2,91	0,0003
NM_007609	<i>Casp4</i>	Caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase	2,21	0,0002
NM_010177	<i>Fasl</i>	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	2,00	0,0017
NM_010736	<i>LtBr</i>	Lymphotoxin B receptor	1,99	0,0001
NM_009740	<i>Bcl10</i>	B-cell leukemia/lymphoma 10	1,89	0,0336
NM_009422	<i>Traf2</i>	Tnf receptor associated factor 2	1,83	0,0001
NM_138606	<i>Pim2</i>	Proviral integration site 2	1,78	0,0002
NM_009810	<i>Casp3</i>	Caspase3	1,78	0,0086
NM_030693	<i>Atf5</i>	Activating transcription factor 5	1,73	0,0001
NM_172858	<i>Pak7</i>	P21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 7	1,62	0,0003
NM_009812	<i>Casp8</i>	Caspase 8	1,54	0,0002
NM_008234	<i>Hells</i>	Helicase, lymphoid specific	1,50	0,0214
NM_009950	<i>Cradd</i>	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain	-1,56	0,0001
NM_007702	<i>Cidea</i>	Cell death-inducing DNA fragmentation, α subunit-like effector A	-1,56	0,0089
NM_001163138	<i>Card6</i>	Caspase recruitment domain family, member 6	-1,61	0,0003
NM_173378	<i>Trp53bp2</i>	Transformation related protein 53 binding protein 2	-1,69	0,0008
NM_030152	<i>Nol3</i>	Nuclear protein 3 (apoptosis repressor with CARD domain)	-1,88	0,0007
NM_080637	<i>Nme5</i>	Non-metastatic cells 5	-2,34	0,0001

Tabla IV-2: Genes apoptóticos diferencialmente expresados en hipocampo de ratones WT tratados a 12h con KA.

Se consideraron genes que se expresan significativamente cuando presentan un *Fold change* ≥ 1.5 y *p-value* > 0.05 .

Los valores negativos indican genes regulados a la baja.

3.6.1 Análisis de genes apoptóticos en ratones *Jnk3^{-/-}* y *Jnk1^{-/-}*

Se evaluó la expresión de los 23 genes anteriormente mencionados en ratones *Jnk3^{-/-}* y *Jnk1^{-/-}*, tratados con KA a 12h. Este análisis permitió observar la relevancia de la falta de alguna de las isoformas de JNK en la expresión de genes relacionados con la apoptosis inducida por KA. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla (Tabla IV-3).

IV. RESULTADOS

GENE SYMBOL	FOLD CHANGE (mRNA expression levels)		
	WT KA12h	<i>Jnk1</i> ^{-/-} KA12h	<i>Jnk3</i> ^{-/-} KA12h
<i>Tnfa</i>	48,2 ***	18,95***/ ###	11,17***/ ###
<i>Tnfr1</i>	9,44 ***	3,46 ***/ ###	4,86 ***/ #
<i>Bag3</i>	8,82 ***	2,20 **/ ###	2,01 ***/ ###
<i>Cflar</i>	3,99 ***	2,51 **/ #	1,43 ***/ ###
<i>FasR</i>	3,81 **	3,48 **	1,72 **/ #
<i>FasL</i>	2,83 **	0,97 ##	1,20 ##
<i>Casp4</i>	2,51 **	1,85 #	0,9 ##
<i>Ltbr</i>	2,42 **	1,47 **/ ##	1,49 **/ ##
<i>Mcl1</i>	2,36 **	2,40 **	1,22 #
<i>Atf5</i>	1,76 ***	1,10 ###	1,21 ##
<i>Traf2</i>	1,71 ***	1,10 ###	1,27 #
<i>Casp 3</i>	1,70 ***	1,17 ###	1,23 ##
<i>Casp8</i>	1,65 ***	1,17 ##	1,04 ###
<i>Bcl10</i>	1,64 **	1,40 **	1,20 #
<i>Hells</i>	1,62 ***	1,16 #	1,34 **/ #
<i>Pim2</i>	1,47 **	1,41 *	1,66 **
<i>Pak7</i>	1,46 **	0,91 ##	0,93 ##
<i>Card6</i>	0,68 ***	0,7 *	0,68 ***
<i>Trp53bp2</i>	0,64 **	0,65 **	0,66 **
<i>Cradd</i>	0,60 **	0,66 **	0,83 ##
<i>Cidea</i>	0,55 ***	1,15 ###	2,25 ***/ ###
<i>Nol3</i>	0,50 **	0,54 *	0,57 **
<i>Nme5</i>	0,48 **	0,39 *	0,41 **

Tabla IV-3: Genes apoptóticos diferencialmente expresados en hipocampo de ratones WT, *Jnk1*^{-/-} y *Jnk3*^{-/-} a 12h de tratamiento con KA. Representación del *fold change* para cada gen relacionado con apoptosis. Los resultados obtenidos son la media con su desviación estándar de cuatro experimentos independientes (tres replicas por experimento) (**p*<0.05, ***p*<0.01 y ****p*<0.001, respecto al CT salino; #*p*<0.05, ##*p*<0.01 y ###*p*<0.001, respecto al WT KA 12h).

En ratones *Jnk3*^{-/-} y *Jnk1*^{-/-} también se evidenciaron cambios significativos en la expresión de genes responsables de la inducción de la apoptosis por la vía extrínseca, como *Tnfa*, *Tnfr1* y *Fas*. Sin embargo, cabe destacar que ni *FasL* (Figura IV-35), ni los genes *Casp3*, *Casp4* y *Casp8* presentaron cambios en su expresión (Figura IV-36). Así como tampoco variaron en su expresión genes reguladores del mecanismo apoptótico, como *Atf5*, *Pak7* y *Traf2* (Figura IV-37). Los genes *Mcl1*, *Bcl10* y *Cradd* no presentaron diferencias significativas en su expresión en

ratones *Jnk3*^{-/-}, respecto a ratones *Jnk1*^{-/-} y WT (Figura IV-38). Por otra parte, en ratones *Jnk1*^{-/-} no se observaron diferencias de expresión en los genes *Hells* y *Cidea*, respecto a los ratones WT y *Jnk3*^{-/-} (Figura IV-39).

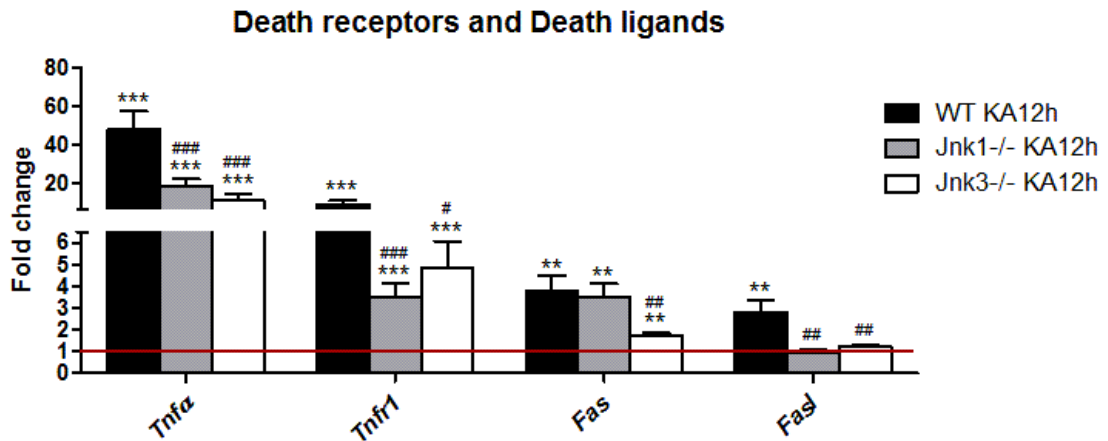


Figura IV-35: Detección de cambios en los niveles de expresión de mRNA (fold increase) de los genes *Tnfa*, *Tnfr1*, *Fas* y *FasL* en WT, *Jnk1*^{-/-} y *Jnk3*^{-/-} a KA 12h. La línea roja determina la expresión basal (control) para cada gen. Los resultados corresponden a la media con su desviación estándar de cuatro experimentos independientes (tres replicas por experimento) (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, respecto al CT salino; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, respecto al WT KA 12h).

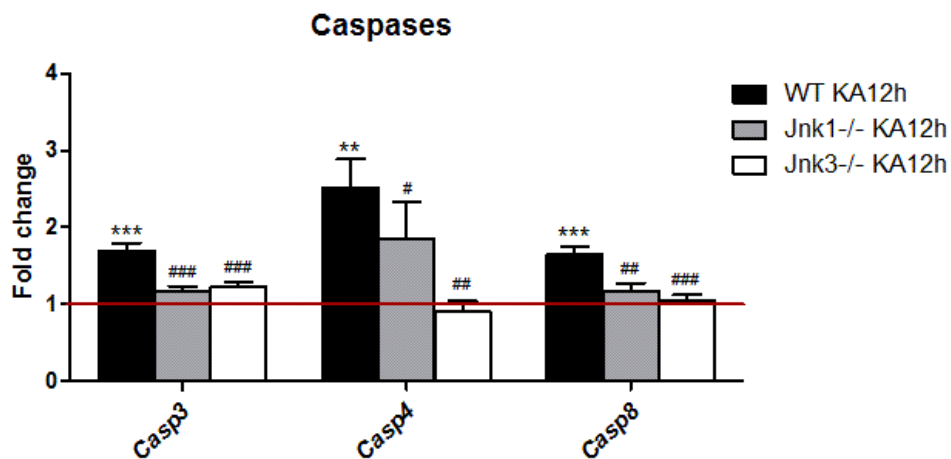


Figura IV-36: Detección de cambios en los niveles de expresión de mRNA (fold increase) de los genes *Casp3*, *Casp4* y *Casp8* en WT, *Jnk1*^{-/-} y *Jnk3*^{-/-} a KA 12h. La línea roja determina la expresión basal para cada gen. Los resultados corresponden a la media con su desviación estándar de cuatro experimentos independientes (tres replicas por experimento) (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, respecto al CT salino; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, respecto al WT KA 12h).

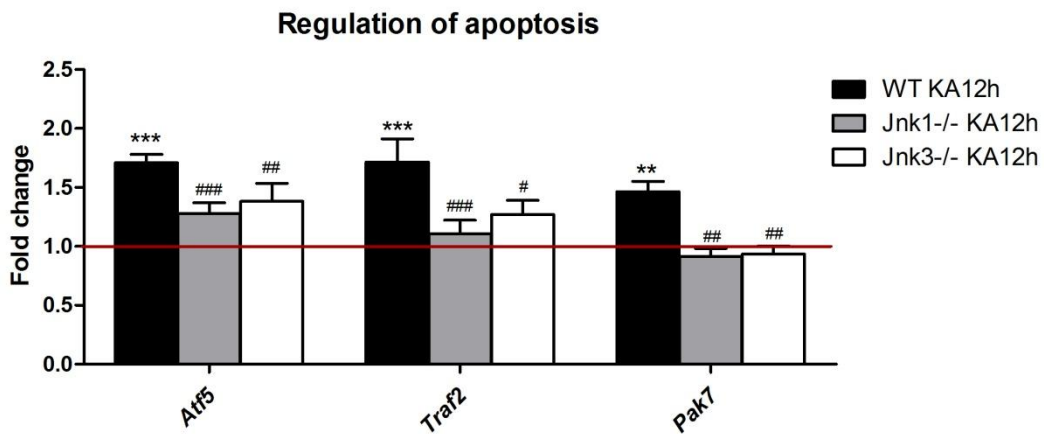


Figura IV-37: Detección de cambios en los niveles de expresión de mRNA (fold increase) de los genes *Atf5*, *Traf2*, *Pak7* en WT, *Jnk1^{-/-}* y *Jnk3^{-/-}* a KA12h. La línea roja determina la expresión basal (control) de cada gen. Los resultados corresponden a la media con su desviación estándar de cuatro experimentos independientes (tres replicas por experimento) (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, respecto al CT salino; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, respecto al WT KA 12h).

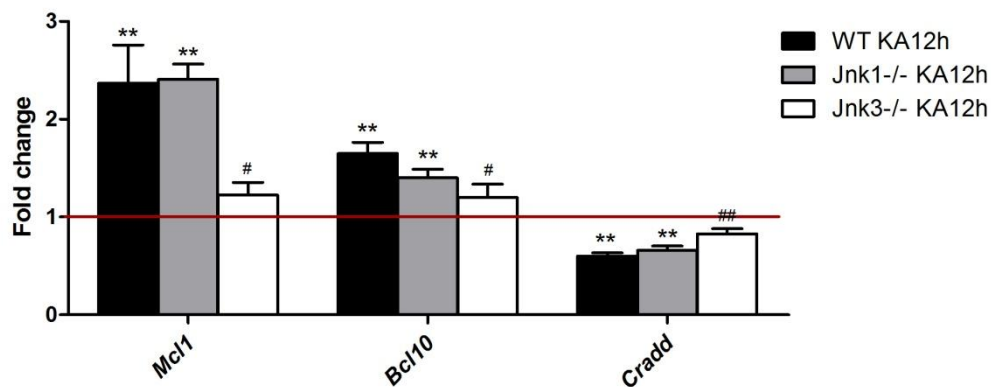


Figura IV-38: Detección de cambios en los niveles de expresión de mRNA (fold increase) de los genes *Mcl1*, *Bcl10* y *Cradd* en WT, *Jnk1^{-/-}* y *Jnk3^{-/-}* a KA12h. La línea roja determina la expresión basal (control) de cada gen. Los resultados corresponden a la media con su desviación estándar de cuatro experimentos independientes (tres replicas por experimento) (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, respecto al CT salino; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, respecto al WT KA 12h).

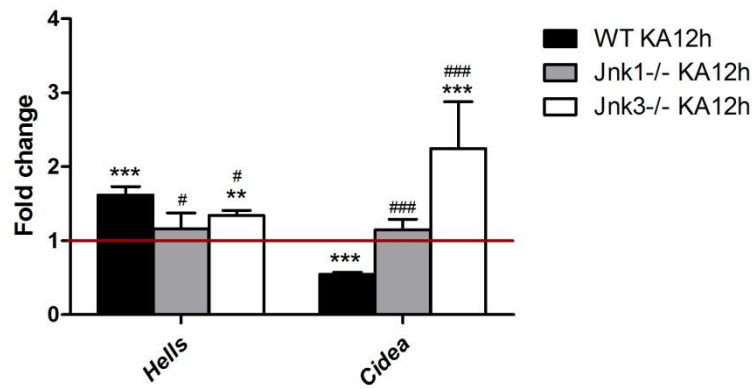


Figura IV-39: Detección de cambios en los niveles de expresión de mRNA (fold increase) de los genes *Hells* y *Cidea* en WT, *Jnk1*^{-/-} y *Jnk3*^{-/-} a KA12h. La línea roja determina la expresión basal (control) de cada gen. Los resultados corresponden a la media y a la desviación estándar de cuatro experimentos independientes, determinados por tres replicados por cada grupo (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, respecto al CT salino; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, respecto al WT KA 12h).

V. DISCUSIÓN

En distintas patologías del SNC, como lesiones traumáticas, isquemia cerebral y enfermedades neurodegenerativas, hay una inducción de la excitotoxicidad. Ésta es debida a la acción de aminoácidos excitadores, como el glutamato y sus análogos, que provocan la despolarización de la membrana plasmática con una entrada masiva de iones Ca^{2+} al espacio intracelular. Este evento induce la despolarización de la membrana mitocondrial, la activación de proteasas y cinasas, junto a un desequilibrio homeostático en general; desencadenándose la muerte neuronal por necrosis y/o apoptosis (Centeno et al. 2007; Lai et al. 2013). Los fenómenos de excitabilidad neuronal afectan a la actividad de las células gliales (microglía y astroglia), provocándose una respuesta inflamatoria característica de las enfermedades neurodegenerativas.

En los últimos años, diferentes trabajos han puesto de manifiesto la participación de las vías de las MAPKs en los mecanismos de muerte neuronal e inflamación, característicos de las enfermedades neurodegenerativas (Chang and Karin 2001; Che et al. 2001; Ferrer et al. 2005; Harper and Wilkie 2003; Lin et al. 2013; Kamat et al. 2014). En concreto, la vía de JNK ha sido ampliamente relacionada con desórdenes neurodegenerativos, como en la enfermedad de Alzheimer, en la enfermedad de Parkinson (Antoniou et al. 2010; Bozyczko-Coyne et al. 2002; Resnick and Fennell 2004) y en la enfermedad de Huntington (Garcia et al. 2002; Hsieh et al. 2003). Además, se ha descrito la activación de la vía de JNK en procesos de muerte neuronal por excitotoxicidad, tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* (Brecht et al. 2005; Borsello et al. 2003; Lai et al. 2013).

En cerebro adulto, las tres isoformas de JNK se expresan de manera diferencial, siendo la isoforma JNK3 la más abundante y específica del SNC (Carboni et al. 1998). Ésta es la isoforma más relacionada con el daño neuronal inducido por la acción de aminoácidos excitadores, como el glutamato. La primera evidencia de la implicación de JNK3 en la excitotoxicidad, deriva de la reducción de la actividad convulsiva y de la prevención de muerte neuronal observada en hipocampo de ratones KO para JNK3 (*Jnk3^{-/-}*), tratados con KA (Yang et al. 1997; Brecht et al. 2005). Además del efecto neuroprotector observado en ratones *Jnk3^{-/-}* ante la inducción de excitabilidad, este efecto se ha descrito también ante el tratamiento con la neurotoxina MPTP, demostrándose así una reducción de la muerte de neuronas dopaminérgicas en *Jnk3^{-/-}* (Hunot et al. 2004). Del mismo modo, se ha observado que el estrés agudo activa las áreas CA1 y CA3 de hipocampo, alterando los procesos de memoria y la respuesta al miedo. Sin embargo, inyecciones intrahipocampales de inhibidores de JNK (SP600125 o D-JNKI) reducen estos déficits (Manasseero et al. 2012; Sherrin et al. 2010).

Dado que el papel específico de JNK3 en la muerte celular no ha sido dilucidado totalmente, el principal objetivo de la presente tesis ha sido entender qué mecanismos permiten que la ausencia de JNK3 tenga un efecto neuroprotector ante el daño inducido. Con dicha finalidad, se establecieron dos modelos experimentales de neurotoxicidad en ratones deficientes para JNK3: i) basado en la administración de KA, y que simula los efectos de la epilepsia del lóbulo temporal (TLE); y ii) basado en la administración de ácido 3-nitropropiónico (3NP) que simula la enfermedad de Huntington.

La ausencia de la isoforma JNK3 confiere neuroprotección ante la acción del KA

El KA es una potente excitotoxina que actúa a través de los receptores ionotrópicos del glutamato, en concreto, por los receptores kainato (KAR) con una elevada afinidad. La activación de estos receptores causa la muerte neuronal en determinadas áreas definidas del cerebro, entre las cuales se incluyen el giro dentado (DG) y las neuronas de las regiones CA3 y CA1 del hipocampo (Castillo et al. 1997, 1999; Wang et al. 2005). El modelo de excitotoxicidad inducida por KA manifiesta un proceso de muerte neuronal y activación glial característicos de procesos neurodegenerativos (Akbar et al. 2001).

La reducción de muerte neuronal y ausencia de astrogliosis observada en hipocampo de ratones *Jnk3*^{-/-}, tras el tratamiento con KA, confirmó los resultados obtenidos por Yang y colaboradores (1997). Además, esta capacidad neuroprotectora se corroboró al analizar por inmunohistoquímica la inmunoreactividad de la proteína c-Fos. Dicha proteína está involucrada en la excitabilidad neuronal, como resultado de la hiperestimulación de receptores de glutamato por excitotoxicidad y la consecuente muerte celular (Lidwell and Griffiths 2000; Rogers et al. 2004). Los resultados obtenidos evidenciaron un incremento de c-Fos en ambos grupos de ratones, WT y *Jnk3*^{-/-}, después del tratamiento con KA. Sin embargo, la recuperación al estado basal se produjo más rápidamente en ratones *Jnk3*^{-/-}, apoyando que la ausencia de JNK3 está relacionada con mecanismos neuroprotectores ante el KA.

La relación entre la ausencia de JNK3 y atenuación del daño celular se observó también en un modelo *in vivo* de isquemia cerebral en rata (Qi et al. 2011). Los autores de este estudio demostraron que el fármaco paclitaxel (taxol) regula negativamente la vía MLK3/JNK3/c-Jun/Bcl-2 y caspasa-3, indicando un efecto neuroprotector ante la muerte neuronal inducida en isquemia cerebral. En este caso, la diana del paclitaxel no es una proteína concreta, sino

una vía de señalización. Además, inhibidores específicos de JNK, como el SP600125, pueden a determinadas dosis, inhibir a otras MAPKK como MKK3, MKK4, MKK6 y MKK7 (Borsello and Forloni 2007). Por tanto, el estudio con ratones deficientes para alguna de las isoformas de JNK, puede aportar nuevos datos acerca de sus funciones específicas. No obstante, debemos considerar los efectos compensatorios que pueden derivarse de la ausencia de una determinada isoforma.

La ausencia de la isoforma JNK3 modula el perfil de fosforilación de las MAPKs ante la acción del KA

Tal y como se ha comentado anteriormente, muchos estudios apoyan que JNK es la principal cinasa implicada en la muerte neuronal y que su activación desempeña un papel clave en modelos de isquemia (Brech et al. 2005; Guz et al. 2001; Kuan et al. 2003), de excitotoxicidad *in vivo* (Yang et al. 1997; Ferrer et al. 2001; Brecht et al. 2005) y en enfermedades neurodegenerativas (Graczyk 2013; Harper and Wilkie 2003; Nijboer et al. 2013). Así, mediante *Western blot* se detectó una disminución de los niveles de fosforilación de JNK y c-Jun en ratones *Jnk3*^{-/-} tratados con KA, respecto al WT. Estos datos evidenciaron que el KA induce la señalización de la vía de JNK y que la isoforma JNK3 juega un papel importante como mediador de la excitotoxicidad, ya que su ausencia está relacionada con la reducción de la inducción de c-Jun (Brecht et al. 2005; Kuan et al. 2001; Moriohshima et al. 2001).

También se ha sugerido que las cinasas ERK1/2 y p38 están implicadas en la activación de vías apoptóticas y necróticas en condiciones neurodegenerativas específicas. Diferentes autores han descrito la activación de p38 en modelos *in vitro* de privación de suero/potasio y en la ausencia de factores de crecimiento (Horstmann et al. 1998; Xia et al. 1995). También se ha detectado la activación de esta cinasa en modelos *in vivo* de isquemia (Irving et al. 2000) y de excitotoxicidad por ácido quinolínico (Ferrer et al. 2001). Además, se ha demostrado la activación de p38 en ovillos neurofibrilares y en los cuerpos de Lewy en cerebros de pacientes con las enfermedades de Alzheimer y Parkinson, respectivamente (Ferrer et al. 2001; Hensley et al. 1999). Los resultados obtenidos mostraron una menor inducción de la fosforilación de p38 en ratones *Jnk3*^{-/-} respecto al WT, tras el tratamiento con KA. Esto sugiere que la neuroprotección inducida por la ausencia de JNK3 también puede estar relacionada con la reducción de los niveles de p38. Además, c-Jun se presenta como sustrato tanto de JNK como de p38, por lo que la reducción de los niveles de fosforilación de c-Jun podría ser debida a una

menor fosforilación de JNK y p38 en ratones *Jnk3^{-/-}*. En concreto, los resultados obtenidos por Namiki y colaboradores (2007) en ratones *p38α^{+/-}* tratados con glutamato, mostraron que la fosforilación de c-Jun estaba suprimida, indicando una correlación positiva entre la vía de c-Jun y la actividad de p38, responsable de una reducción de la muerte neuronal por excitotoxicidad. En otros estudios de excitotoxicidad por KA, la administración *in vivo* del inhibidor específico de p38, SB203580, demostró protección ante la acción del KA (Kim et al. 2004; Segura-Torres et al. 2006). Tanto JNK como p38, son cinasas mayoritariamente activadas por señales de estrés celular, y con sustratos en común. Sin embargo, mientras que JNK es fosforilada por MKK4 y MKK7, p38 es fosforilada por MKK3 y MKK6 (Raman et al. 2007).

A pesar de que se ha propuesto que ERK1/2 está implicada principalmente en el crecimiento y la proliferación de diferentes tipos celulares, algunos estudios postulan que la activación de dicha cinasa está asociada a la toxicidad inducida por glutamato y por acumulación de ROS, tanto en cultivos primarios de neuronas, como en líneas celulares de hipocampo HT22 (Stancium et al. 2000). Del mismo modo, en modelos *in vivo* de isquemia cerebral, la activación de ERK1/2 parece estar involucrada en la muerte neuronal de diferentes áreas del cerebro (Namura et al. 2001; Slevin et al. 2000). Además, se ha demostrado inmunoreactividad de ERK1/2 en cuerpos de Lewy de cerebros de pacientes con la enfermedad de Parkinson (Ferrer et al. 2001), así como la capacidad que tiene ERK1/2 de fosforilar múltiples sitios de la proteína Tau, implicada en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (Ferrer et al. 2001; Perry et al. 1999). Por otro lado, según estudios de privación neurotrófica en células PC12 (Xia et al. 1995) y estudios de excitotoxicidad por ácido domoico (Giordano et al. 2008), se ha postulado que ERK1/2 ejerce efectos opuestos a los de JNK y p38 en la apoptosis. En dichos modelos se ha descrito una disminución de la fosforilación de ERK1/2 seguido de un incremento de la activación de JNK y p38, que precede a la apoptosis. De acuerdo con este patrón de activación, los resultados obtenidos mostraron un incremento de los niveles de p-ERK1/2 tanto en WT como en *Jnk3^{-/-}* a 1 h de tratamiento con KA, seguido de una reducción de p-ERK1/2 al cabo de las 3 h en *Jnk3^{-/-}*, y de las 6 h en WT. Estos datos sugieren que la ausencia de JNK3 modula la actividad de ERK1/2 y que a su vez, el papel de esta proteína podría estar relacionado con señales neuroprotectoras.

Por tanto, además de JNK, se sugiere la participación tanto de p38 como de ERK1/2 en el proceso de excitotoxicidad por KA, y que la ausencia de JNK3 es capaz de conferir neuroprotección ante el KA modulando el perfil de fosforilación de JNK, p38 y ERK1/2. Aunque

los resultados observados apuntan a la participación activa de las cinasas antes mencionadas, no ha sido posible determinar mediante el presente trabajo el papel específico de cada una de ellas en el proceso de excitotoxicidad mediada por KA.

La ausencia de la isoforma JNK3 no muestra un efecto neuroprotector ante la acción del 3NP

La administración sistémica de 3NP inhibe irreversiblemente al enzima succinato deshidrogenasa (SDH), lo que produce una alteración mitocondrial que tiene como consecuencia la disminución del potencial de membrana y la reducción de la tasa de ATP (Nasr et al. 2003). Estas condiciones influyen notablemente en la concentración de Ca^{2+} intracelular, evidenciándose un modelo de excitotoxicidad indirecta en el que la despolarización de la membrana plasmática permite el desbloqueo de los receptores NMDA (Albin and Greenamyre 1992; Beal 1992; Greene and Greenamyre 1996). La administración sistémica de dicho compuesto provoca cambios neurodegenerativos, que recuerdan a aquellos que se dan en casos de alteraciones genéticas mitocondriales, en condiciones de hipoxia, en isquemia localizada en adultos y en la enfermedad de Huntington (Beal 1995; Janavs and Aminoff 1998).

En el modelo de neurotoxicidad inducida por 3NP, se han descrito posibles mecanismos relacionados con la muerte celular, como la activación de calpaína (Araujo et al. 2008; Brouillet et al. 2005; Camins et al. 2006; Crespo Biel et al. 2007) y de caspasas (Bizat et al. 2003). Además, la señalización por JNK parece tener un papel importante, ya que con la administración de 3NP se ha observado la activación de JNK y la hiperfosforilación de c-Jun en roedores (Garcia et al. 2002; Jang et al. 2013; Liu et al. 2000).

Con la finalidad de determinar el papel de JNK en este proceso neurodegenerativo, se analizó el efecto del 3NP en ratones *Jnk3*^{-/-} respecto a los WT. Mediante la tinción de Fluoro-Jade B se observó que el tratamiento inducía muerte neuronal mayoritariamente en estriado, dato que coincide con los estudios realizados por Beal y colaboradores (1993) y Brouillet y colaboradores (1999). Sorprendentemente, los niveles de neurodegeneración en estriado no difirieron entre animales WT y *Jnk3*^{-/-}, evidenciándose la ausencia de neuroprotección en ratones *Jnk3*^{-/-} en este modelo de neurotoxicidad.

Con respecto a las MAPKs, tras el tratamiento con 3NP, y mediante el análisis por *Western blot*, se observó un incremento de los niveles de p-JNK y de p-c-Jun en WT, mientras que en

ratones *Jnk3*^{-/-}, sólo se detectó un aumento de p-c-Jun. Otra proteína de interés en este trabajo fue ERK1/2, cinasa que se ha relacionado con la supervivencia y proliferación celular, tanto en estudios con la línea celular mutante del péptido Htt (*Huntingtin*) (Apostol et al. 2006; Hetman and Gosdz 2004), como ante el tratamiento con 3NP en ratas (Lee et al. 2008). Se observó un incremento de la fosforilación de esta proteína en ambos genotipos, lo que apunta a una inducción de ERK1/2 en la neurodegeneración inducida por 3NP, de manera independiente a JNK3. Respecto a la cinasa p38, si bien hay resultados que demuestran que se activa en el estriado de ratones transgénicos en estadios tardíos de la enfermedad de Huntington (Gianfriddo et al. 2004), en el modelo de neurodegeneración inducido por 3NP, no se observó inducción de fosforilación de esta proteína, en ninguno de los genotipos.

Los resultados obtenidos indicaron que JNK3 no es la cinasa responsable del proceso de muerte neuronal observado en el modelo del 3NP, a pesar de que en otros modelos de neurodegeneración, la ausencia de dicha isoforma produce un efecto de neuroprotección. Por tanto, se sugiere la implicación de otras vías de señalización en la neurodegeneración inducida por 3NP. Una candidata podría ser la vía de la calpaína, una proteasa relacionada extensamente con el daño cerebral asociado a un aumento del flujo de Ca²⁺ y que es activada tras la administración de 3NP (Araujo et al. 2008; Brouillet et al. 2005; Crespo Biel et al. 2007; 2009). Para comprobar la implicación de la calpaína en la inducción de muerte neuronal observada en el modelo del 3NP, se utilizaron dos técnicas diferentes. En primer lugar, mediante un ensayo fluorométrico, se midió de forma directa la actividad de calpaína; y en segundo lugar, a partir de la técnica de *Western blot*, se inmunodetectó la proteína α -espectrina. Esta última ha sido descrita como un importante sustrato de la calpaína, de tal forma que se ha aceptado su fragmentación como un indicador semicuantitativo de la actividad de esta proteasa (Robert-Lewis 1993). Gracias a ambas técnicas, se observó una activación de la calpaína en el modelo 3NP, tanto en ratones WT como *Jnk3*^{-/-}. Por este motivo se estudió la implicación de la ruta calpaína/CDK5 en la muerte neuronal inducida por 3NP. Aunque la activación de CDK5, uno de los sustratos más importantes de la calpaína, no ha sido demostrada en ningún modelo experimental *in vivo* de la enfermedad de Huntington, se ha caracterizado una alteración de la actividad de esta cinasa en otras patologías neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer (Pei et al. 1998) y la enfermedad de Parkinson (Alvira et al. 2008). Del mismo modo, estudios realizados en cultivos primarios neuronales y en animales de experimentación, demuestran el papel destacado del complejo formado por CDK5 y su activador p25 en la muerte neuronal tras un estímulo dañino o

neurotóxico (Smith et al. 2006; Jordà et al. 2005). Para poder ser una proteína activa, CDK5 necesita de su coactivador p35, el cual la mantiene unida a la membrana plasmática. Por acción de las calpaínas, este coactivador es procesado, dando lugar al fragmento p25, liberándose la ciclina CDK5 al citosol, lo que desencadena la apoptosis (Hisanaga and Saito 2003; Patze and Tsai 2002). Aunque en este estudio no se detectaron cambios en los niveles de CDK5 tras el tratamiento con 3NP, sí que se detectó una fragmentación de p35 en p25 en ambos genotipos, que podría ser suficiente para indicar una activación de CDK5 (Crespo-Biel et al. 2007). Estos datos apoyan que la activación de la vía de la calpaína tras el tratamiento con 3NP, es independiente de la vía de JNK.

También se evaluó la implicación de la vía de señalización de AKT, dada su importancia en la supervivencia celular y en diferentes patologías (Datta et al. 1999; Kim and Chung 2002; Song et al. 2005). De esta forma, se ha observado en diferentes enfermedades neurodegenerativas, una inhibición de AKT acompañada de la activación de GSK3 β por desfosforilación en Ser9, y la consecuente hiperfosforilación de la proteína Tau. Además, se ha descrito la participación de GSK3 β tras un tratamiento con el péptido β -amiloide, y tras un tratamiento con KA (Grimes and Jope 2001). De igual modo, en cultivos de neuronas hipocampales tratadas con 3NP, se demostró una disminución de la forma inactiva fosforilada de GSK3 β en Ser 9, lo que se correspondía con una activación de esta proteína (Crespo-Biel et al. 2009). A su vez, la proteína Tau forma parte de una familia de proteínas asociadas a los microtúbulos y su disfunción está relacionada con la formación de agregados proteicos conocidos como ovillos neurofibrilares, característicos de la enfermedad de Alzheimer (Grundke-Igbal et al. 1986; Kopke et al. 1993). La fosforilación anormal o hiperfosforilación de Tau, no sólo inhibe el ensamblaje y estabilización de los microtúbulos, sino que también destruye los microtúbulos formados, promoviendo la muerte neuronal (Alonso et al. 1996; 2001). La ciclina CDK5 y la cinasa GSK3 β , son uno de los principales mediadores de la hiperfosforilación de Tau en diferentes residuos (Ballatore et al. 2007). En concreto, la desregulación de GSK3 β contribuye a la patogenia de la enfermedad de Alzheimer, debido al incremento de los niveles de fosforilación de Tau (Embi et al. 1980).

Los resultados obtenidos mediante *Western blot* mostraron un incremento de p-AKT, que estaba relacionado con un incremento de la fosforilación de GSK3 β en Ser9, tanto en ratones WT como *Jnk3*^{-/-}, tras el tratamiento con 3NP. A pesar de que los ratones *Jnk3*^{-/-} presentaron niveles más elevados de estas proteínas en situación basal, el incremento detectado en esta

vía en ambos genotipos, podría representar un mecanismo neuroprotector compensatorio inducido por la muerte neuronal, que aunque pueda estar activo, no es suficiente para reducir la muerte neuronal generada por 3NP.

En lo que se refiere a la proteína Tau, tras el tratamiento con 3NP, se observó la hiperfosforilación de esta proteína en el residuo Ser199 en ambos genotipos. Sin embargo, la hiperfosforilación de Tau en el residuo Ser202 sólo se detectó en los ratones WT, sugiriendo que la ausencia de JNK3 puede bloquear la hiperfosforilación de Tau en Ser202. Estos resultados se relacionan con los estudios de Reynolds y colaboradores (2000), que han demostrado que las diferentes MAPKs, JNK, p38 y ERK2 son las responsables de la hiperfosforilación de Tau en este residuo Ser202. Con respecto al residuo Ser199, éste se ha descrito como un sustrato directo de la cinasa GSK3 β , sin embargo otras cinasas como JNK o ERK2 también podrían fosforilar Tau en este residuo (Evans et al. 2000; Yoshida et al. 2004).

A modo de conclusión, el modelo del 3NP en ratones *Jnk3*^{-/-}, permitió observar que la ausencia de JNK3 no era capaz de frenar la muerte inducida por esta neurotoxina, tal y como ocurría en el modelo del KA (Apartado 1.1 resultados). La fosforilación mantenida de ERK1/2 y AKT, aunque puede indicar la inducción de vías de supervivencia celular, no es capaz de evitar la muerte neuronal inducida por la acción del 3NP (Lee et al. 2008). Por otro lado, se evidencia la activación de la vía de la calpaína como responsable de la muerte neuronal en este modelo (Camins et al. 2006; Crespo-Biel et al. 2007, 2009).

La ausencia de JNK3 induce la activación de la vía de supervivencia de PI3K/AKT

El daño celular induce señales que median la muerte celular, y/o alternativamente, activa vías de supervivencia que conllevan a la tolerancia y/o a la recuperación de las condiciones previas a la inducción del daño. La vía de AKT es un importante mediador de la supervivencia celular en respuesta a factores de crecimiento y a estímulos que provocan la entrada de Ca²⁺ (Dudek et al. 1997; Yano et al. 1998). Se ha evidenciado que la vía PI3K/AKT/GSK3 β es promotora de la supervivencia celular y de la protección ante la neurotoxicidad inducida por glutamato (Cui et al. 2013; Kim et al. 2004; Lin et al. 2014). De los efectos pro-supervivencia descritos para AKT, destaca la regulación negativa de la vía de JNK. Diferentes estudios han demostrado la activación de AKT, al inhibirse o bloquearse la vía de JNK, en modelos de isquemia cerebral (Miao et al. 2005; Wang et al. 2007). En modelos de excitotoxicidad por glutamato, el pos-

tratamiento con el anti-inflamatorio osmotina, un análogo de la hormona adiponectina, estimula la vía de señalización intracelular de JNK/PI3K/AKT, observándose una reducción de la activación glutamatérgica y de la muerte neuronal en corteza e hipocampo (Shah et al. 2014). También, la acción de proteínas de anclaje como las JIPs apoyan la existencia de interacciones entre la vía de JNK y de AKT, describiéndose que la asociación o disociación entre AKT y JIP previene o induce la formación del complejo apoptótico JIP-JNK, que conduce a la muerte celular (Kim et al. 2002; Song and Lee 2005). En concreto, la interacción directa entre AKT y JIP1 previene la activación de JNK3 en procesos isquémicos (Pan et al. 2006). Igualmente, se ha sugerido que AKT previene la activación de JNK directamente al interactuar con JIP1 y evitando, de este modo, el reclutamiento o la activación de cinasas de la vía de señalización de JNK, como son MLK3 y MKK7 (Barthwal et al. 2003; Li et al. 2005). Ante estos datos, se decidió analizar la existencia de mecanismos moleculares entre vías de supervivencia y la ausencia de la isoforma JNK3.

A partir del estudio del perfil de expresión génica de más de 22.000 genes, realizado mediante *microarrays* de las muestras hipocampales provenientes de WT y *Jnk3*^{-/-}, se obtuvieron 17 genes expresados diferencialmente entre WT y *Jnk3*^{-/-}, con un *z*-score > 2. Los resultados demostraron que los genes *Pi3kcb*, *Banp*, *Skp1a*, *Rsg9*, *Ptpra*, *Sreb2*, *Dysf*, *Ip6k2* y *En1*, estaban relacionados con la señalización de la supervivencia, neuroprotección y/o muerte celular. Entre los genes regulados a la alza, se encontraban: *Pik3cb*, relacionado con la vía de supervivencia PI3K/AKT (Datta et al. 1999; Lawlor and Alessi 2001; Kim and Chung 2002); *Banp*, asociado con la neuroprotección ante radicales libres en una línea celular de fibroblastos (Singh et al. 2010); *Skp1a* y *Rsg9*, cuyos cambios de expresión están relacionados con la susceptibilidad al daño neuronal en la enfermedad de Parkinson (Grunblatt et al. 2004; Fishman-Jacob et al. 2009; Mandel et al. 2009; Potashkin et al. 2007); *Ptpra*, relacionado con la inducción de la apoptosis en modelos *in vitro* de líneas celulares tumorales (Zheng et al. 2008); y *Sreb2*, cuya expresión se vio regulada por la acción del KA en hipocampo de rata (Kim and Ong 2009). Mientras que entre los genes regulados a la baja se encontraban: *Dysf*, que codifica para la proteína citoplasmática disferlina, cuya acumulación está asociada al incremento de las placas neuríticas en cerebro de pacientes de la enfermedad de Alzheimer (Galvin et al. 2006); *Ip6k2*, involucrado en la apoptosis mediada por p53 (Morrison et al. 2009; Koldobskiy et al. 2010; Rao et al. 2014); y *En1*, relacionado con la enfermedad de Parkinson, ya que su expresión es necesaria para la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas nigroestriales (Sgado et al. 2006). Aunque los genes anteriormente mencionados podrían estar relacionados

con la resistencia a la muerte neuronal observada en ratones *Jnk3*^{-/-} (Yang et al. 1997; Brecht et al. 2005), el interés se centró sobre el gen *Pik3cb*, que codifica para la subunidad catalítica p110 β de la cinasa PI3K (Datta et al. 1999; Kim and Chung 2002). Si bien la interacción entre JNK y AKT está ampliamente descrita, en el caso de JNK y PI3K, ésta no es tan clara. Por esta razón, se analizó la existencia de una posible relación entre el incremento de la expresión del gen *Pik3cb* en ratones *Jnk3*^{-/-}, y la activación de las vías de señalización de PI3K/AKT y de JNK. Con la finalidad de comprobar la activación de PI3K y su relación con JNK, se realizó el análisis de estas vías de señalización en ratones *Jnk3*^{-/-}, y también en ratones deficientes para la isoforma JNK1 (*Jnk1*^{-/-}). Se introdujeron los ratones *Jnk1*^{-/-} en este estudio, para evidenciar la función específica de las isoformas de JNK, ya que se ha descrito que los ratones *Jnk1*^{-/-} no muestran resistencia a estímulos neurodegenerativos (Brecht et al. 2005).

Los resultados obtenidos indican que una expresión a la alza de *Pik3cb* en ratones *Jnk3*^{-/-} se traduce en un incremento de los niveles proteicos de p110 β y de la actividad de PI3K. También, se encontraron niveles elevados de pAKT y de pGSK3 β Ser9, y una consecuente reducción de pTau Ser396 en *Jnk3*^{-/-}. Sin embargo, estos cambios no se detectaron en ratones *Jnk1*^{-/-}, que mantenían los niveles de estas proteínas similares a los ratones WT. De este modo, se sugiere una inactivación de GSK3 β que previene el proceso de fosforilación de Tau Ser396, demostrando que la cascada de señalización de AKT está activa en ratones *Jnk3*^{-/-}, y que este hecho puede contribuir en la defensa celular y en el desarrollo de mecanismo antiapoptóticos (Gavaldá et al. 2004; Endo et al. 2006). Además, la falta de JNK3 permite la regulación del gen *Pik3cb*, que activa la cinasa PI3K y consecuentemente, a la vía de supervivencia de AKT. Sin embargo, la presencia de JNK3 en ratones WT y *Jnk1*^{-/-}, no permite la activación de PI3K. Por lo tanto, se propone que la falta de JNK3, pero no de JNK1, activa la cinasa PI3K y a la vía de supervivencia de AKT, mediante la regulación específica del gen *Pik3cb*. Se postula así un posible mecanismo de regulación entre JNK y la vía de PI3K/AKT, independiente de proteínas de anclaje (Figura V-1).

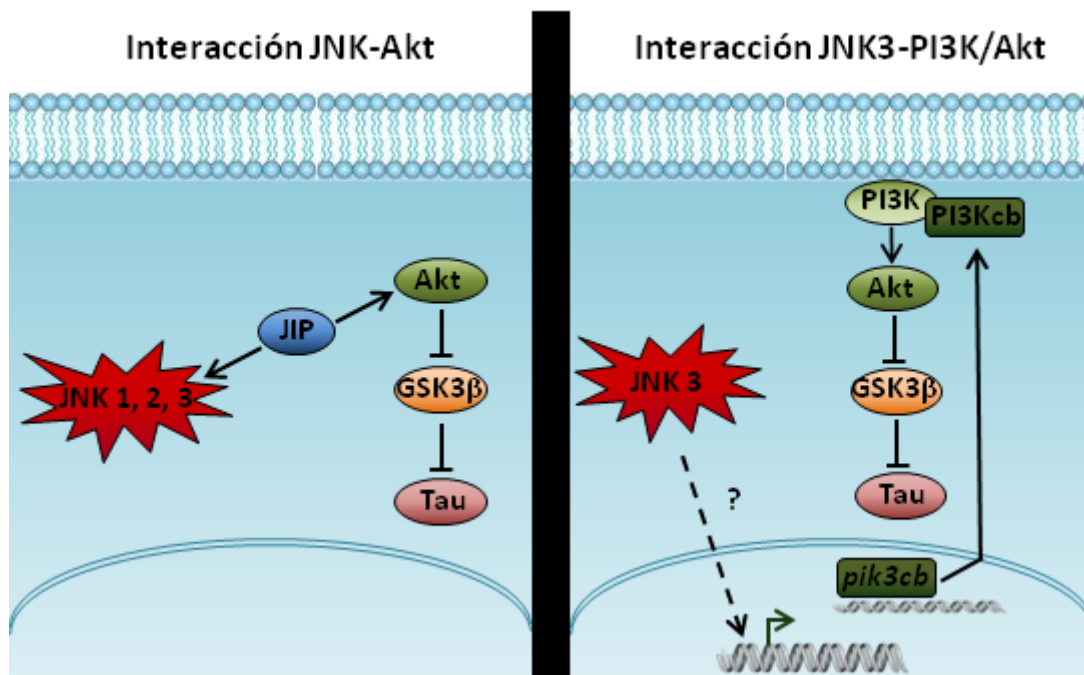


Figura V-1: Representación de un posible mecanismo de interacción entre las vías de JNK y AKT. Activación de la vía de PI3K/AKT a través del incremento del gen *Pik3cb* inducido por la falta de JNK3.

Las isoformas JNK3 y JNK1 regulan diferencialmente los mecanismos neuroinflamatorios inducidos en el modelo del KA

Dada la neuroprotección observada en ausencia de JNK3 en el modelo del KA y a la activación de la vía de supervivencia de PI3K/AKT en ratones *Jnk3^{-/-}*, pero no en *Jnk1^{-/-}*, se decidió comparar funcionalmente las isoformas JNK3 y JNK1 en la muerte neuronal y la activación de los procesos inflamatorios inducidos por KA.

Mediante la tinción de Fluoro-Jade B, se confirmó la neuroprotección ante el KA en ausencia de la isoforma JNK3. Sin embargo, la respuesta de los ratones *Jnk1^{-/-}* fue inesperada, ya que mostraron que la ausencia de la isoforma JNK1 también producía una reducción de la muerte neuronal. Además, en ambos genotipos, *Jnk3^{-/-}* y *Jnk1^{-/-}*, se observó una reducción en los niveles de p-c-Jun y de c-Fos, principales componentes del complejo heterodimérico AP-1. Dicho complejo es el responsable de la regulación de la expresión de genes relacionados con la apoptosis, la neurodegeneración y la diferenciación celular (Diwakar et al. 2007; Herdengen and Waetzig 2001). En esta línea, diversos estudios han demostrado que la inhibición de AP-1 confiere neuroprotección ante la excitotoxicidad por glutamato y KA (Atmaca 2009; Meade et

al. 2010a; 2010b). También se ha descrito en casos de isquemia cerebral que la actividad de AP-1 está asociada con el incremento de la fosforilación de c-Jun (Domanska-Janik et al. 1999; Zhang et al. 2006). Por tanto, la reducción observada en los niveles de p-c-jun y de c-Fos, junto a la reducción de pJNK, en ratones *Jnk3^{-/-}* y *Jnk1^{-/-}* tratados con KA, sugieren que la neuroprotección observada puede ser debida a una menor activación del complejo AP-1.

Tanto en enfermedades neurodegenerativas, como en modelos de excitotoxicidad, ya sea por glutamato o por KA, se reproducen mecanismos de neuroinflamación, como la activación glial asociada al daño neuronal (Chang et al. 2008; Hoozemans et al. 2011; Shrestha et al. 2014). El reclutamiento y activación de células gliales requiere un patrón temporal complejo, y una comunicación organizada y recíproca entre glía y neuronas (Cerbai et al. 2012). En respuesta a un daño o estímulo citotóxico, la glía se activa y prolifera, secretando factores tróficos y metabólicos, y fagocitando restos celulares (Hawuel et al. 2005). Durante la activación glial, también se sintetizan mediadores pro- y anti-inflamatorios que incluyen citocinas y quimiocinas, como Tnf α , Interleucinas, IFN γ y MCP-1, que conducen a la respuesta inflamatoria y que ayudan a reparar el daño celular (Hu and Eldik 1999; Combs et al. 2001). Sin embargo, cuando la activación glial es exacerbada y/o crónica puede llegar a resultar perjudicial debido a la presencia de mediadores proinflamatorios potencialmente neurotóxicos como IL-1 β , IL-6, Tnf α o productos de las enzimas iNOS y COX-2 (Hanisch 2002; Marchetti 2005).

Al analizar el efecto del KA en *Jnk3^{-/-}* y *Jnk1^{-/-}* se detectaron divergencias en la respuesta inflamatoria, ya que a pesar de que ambos son capaces de eludir la reactividad astrogliar tras el tratamiento con KA, sólo la ausencia de JNK3 puede frenar la inducción de reactividad microglial. Esta activación glial diferencial se ve acompañada de una distinta inducción de genes que codifican para importantes mediadores de la respuesta inflamatoria innata, tales como *Il1 β* , *Ifn γ* , *Cox2* y *Ccl2* (Benveniste 1992; McGeer and McGeer 1995; 2003). Así, a 12 horas de tratamiento con KA, la inducción de expresión de *Ifn γ* y *Il1 β* en ratones *Jnk3^{-/-}* resultó baja e incluso no detectable, mientras que en ratones *Jnk1^{-/-}* se detectó un incremento de la expresión de dichos genes. *Il1 β* codifica para una citocina secretada fundamentalmente por macrófagos activados y con un papel clave en la respuesta inflamatoria e inducción de la degeneración neuronal (Perry et al. 2010). *Ifn γ* codifica para la citocina IFN- γ , la cual es sintetizada por linfocitos T y células NK y activa a macrófagos, llevando a cabo el desarrollo de la respuesta inflamatoria (Hoppb et al. 2014). De este modo, en los ratones *Jnk1^{-/-}* se produce una mayor actividad microglial y una mayor secreción de citocinas proinflamatorias, respecto a

los ratones *Jnk3^{-/-}*. Por tanto, se sugiere que la microglía sería la responsable de la síntesis de *I118* e *Ifny* en SNC, a 12 horas de tratamiento con KA.

Los resultados obtenidos evidencian que los ratones *Jnk1^{-/-}* presentan una capacidad neuroprotectora. No obstante, éstos muestran una activación microglial ante el KA, sugiriendo por un lado, que la activación tanto astrogial como microglial, es necesaria para desencadenar una respuesta toxica después del tratamiento con KA; y por otro lado, que la respuesta inflamatoria derivada del KA ocurre a través de diferentes mecanismos. En este sentido, se ha descrito que las MAPKs (p38 y JNK), están involucradas tanto en la activación glial como en la muerte neuronal. Sin embargo, el mecanismo molecular inductor de la activación glial no está totalmente definido (Xie et al. 2004). En concreto, se ha sugerido que la microglía puede promover la supervivencia neuronal en las primeras etapas de la inflamación (Howe and Barres 2012; Streit 2005; Vinet et al. 2012) y también influir en la extensión del daño neuronal en enfermedades neurodegenerativas (Perry et al. 2010).

Los resultados obtenidos con ambos ratones *Jnk3^{-/-}* y *Jnk1^{-/-}*, ante la acción del KA, evidenciaron que las isoformas, JNK1 y JNK3, intervienen en la regulación de la muerte neuronal y de la reactividad glial, aunque posiblemente lo hagan por mecanismos diferentes. Apoyando esta hipótesis, se resaltan los datos obtenidos al analizar la relación de las isoformas JNK3 y JNK1 con la vía de señalización de PI3K/AKT en ratones *Jnk3^{-/-}* y *Jnk1^{-/-}*, en su estado basal, ya que entre éstos se detectaron diferencias en la activación de esta vía de supervivencia.

Las isoformas JNK3 y JNK1 regulan diferencialmente los mecanismos apoptóticos inducidos en el modelo del KA

El análisis de los genes implicados en apoptosis mediante el *array* de PCR en tiempo real, permitió identificar 23 genes apoptóticos diferencialmente expresados en WT tratados a 12 horas con KA. Entre éstos, destacó un grupo de 7 genes estrechamente relacionados con la inducción y la ejecución de la vía extrínseca de la apoptosis, como los receptores de muerte *Fas* y *Tnfr1* y sus respectivos ligandos *Fasl* y *Tnfa*, así como los genes *Casp3*, *Casp4* y *Casp8*. Además, resulta interesante remarcar que en ambos grupos de ratones, *Jnk3^{-/-}* y *Jnk1^{-/-}*, no se detectaron cambios en la expresión de los genes *Fasl*, *Casp3*, *Casp4* y *Casp8* tras el tratamiento con KA. Estos resultados explicarían la neuroprotección detectada en ambos ratones, *Jnk3^{-/-}* y

Jnk1^{-/-}, ya que diversos estudios han evidenciado la vía de señalización apoptótica de FasI/Fas como la responsable de la muerte neuronal por excitotoxicidad (Zhiqun and Tau 2001; Wei et al. 2012). Además, en modelos utilizados para el estudio de mecanismos neurodegenerativos inducidos por β -amiloide y privación neurotrófica, se ha enfatizado la relación entre la vía de JNK y la señalización iniciada por FasI con una consecuente activación de caspasas (Clarke et al. 2009; Morishima et al. 2001; Le-Niculascu et al. 1999; Hu et al. 2008).

En concreto, se ha descrito que la caspasa-8 está involucrada en la muerte celular inducida por receptores de la familia TNF. Además, dicha caspasa tiene la función de activar proteasas responsables de la ejecución de la apoptosis, ya sea por activación de la caspasa-3 implicada en la vía extrínseca, o activando de forma indirecta a la vía mitocondrial por fragmentación proteolítica de Bid (Ashkenazi and Dixit 1998; Krajewska et al. 2011). Además se ha evidenciado la expresión y activación de la caspasa-8 en procesos de isquemia (Velier JJ 1999; Harrison et al. 1989) y tras el padecimiento de crisis convulsivas (Henshall DC 2001; Li et al. 1998). El gen *Casp3* codifica para la proteína caspasa-3, que juega un papel central en la ejecución de la apoptosis. Su expresión está asociada a la muerte neuronal tanto por β -amiloide en estudios *in vitro*, como en modelos *in vivo* de la enfermedad de Alzheimer (Cheng and Li 2014). Además, se ha descrito la activación de caspasa-3 en modelos de excitotoxicidad por KA (Ben-Are and Cossart 2000; Tzeng et al. 2013). La caspasa-3 representa el punto de convergencia entre las vías extrínseca, o de receptores de muerte, y la mitocondrial, responsables de llevar a cabo la apoptosis (Gorbacheva et al. 2013). Se ha sugerido que la proteína caspasa-11, codificada por el gen *Casp4*, tiene un papel similar a las caspasas iniciadoras, como la caspasa-8 y la caspasa-9, responsables de la activación de la caspasa-3 en condiciones patológicas específicas (Kang et al. 2000). También, se ha relacionado la activación de caspasa-11 en la respuesta inflamatoria y en la regulación astrogliar ante un daño neuronal, ya sea por trauma, enfermedad o envejecimiento, aunque de momento su función resulta poco esclarecida (Aras et al. 2012; Vigano and Mortellaro 2013).

Por tanto, la ausencia de inducción de la vía de FasI/Fas en ratones *Jnk3*^{-/-} y *Jnk1*^{-/-} tras el tratamiento con KA, podría explicar la reducción de la muerte neuronal por apoptosis. Además, la ausencia de cambios en la expresión de *Casp3*, *Casp4* y *Casp8* en ratones *Jnk3*^{-/-} y *Jnk1*^{-/-}, se puede traducir en una reducción, tanto de la neurodegeneración, como de la reactividad astrogliar detectada ante la administración de KA.

En cuanto a los genes *Atf5*, *Traf2* y *Pak7*, con funciones antiapoptóticas, no se detectaron cambios en su expresión en ratones *Jnk3^{-/-}* y tampoco en ratones *Jnk1^{-/-}*, frente a los WT tratados con KA. En concreto, *Pak7* regula la movilidad celular y está implicado en vías de señalización de supervivencia. Además, este gen se encuentra sobreexpresado en modelos de cáncer (Robbs et al. 2013). *Atf5* juega un papel importante en la promoción de la supervivencia y estimula la transcripción de otros genes pro-supervivencia, como *Mcl-1*, y se encuentra sobreexpresado en tumores cerebrales (Wang et al. 2012) y ante estímulos que inducen el estrés de retículo, como el *status epilepticus* (Torres-Peraza et al. 2013). El gen *Traf2* parece estar involucrado en diferentes respuestas biológicas relacionadas con la muerte celular o la inflamación, ya que la proteína TRAF2 media la transducción de señales de receptores TNF, interaccionando directamente con ellos. De este modo, esta proteína puede inducir tanto la activación de la vía de NF- κ B, como la de las MAPKs, como p38 o JNK (Xu et al. 2006; Tsai et al. 2014).

A pesar de que dichos genes presentan mayoritariamente una función antiapoptótica, el hecho de detectar una inducción de su expresión sólo en WT tras el tratamiento con KA, puede ser debido a una regulación negativa de la apoptosis o una inducción de los mecanismos de supervivencia. Sin embargo, esta regulación no es suficiente para evitar la apoptosis mediada por los receptores *Tnfr1* y *Fas*. De esta forma, la falta de inducción de estos genes en ratones *Jnk1^{-/-}* y *Jnk3^{-/-}*, puede ser debido en parte, por la neuroprotección intrínseca que presentan dichos animales y a la ausencia en la inducción de genes que codifican moléculas cruciales en la muerte celular por apoptosis, como *Fasl*, *Casp3* y *Casp8*.

Por otro lado, tras el tratamiento con KA, se detectaron genes diferencialmente expresados entre los ratones *Jnk1^{-/-}* y *Jnk3^{-/-}*. Este resultado sugiere una vez más, que la neuroprotección detectada en ratones *Jnk3^{-/-}* y *Jnk1^{-/-}*, ocurre por mecanismos distintos. Cabe destacar a los genes *Mcl-1*, *Bcl-10* y *Cradd*, que no presentaron cambios en su expresión en ratones *Jnk3^{-/-}*, pero sí en *Jnk1^{-/-}* y en ratones WT. El gen *Mcl-1* codifica para un miembro de la familia Bcl-2 con actividad antiapoptótica y reguladora de la vía intrínseca. La sobreexpresión de *Mcl-1* detectada en ratones WT frente al daño inducido por KA, concuerda con los trabajos de Mori y colaboradores (2004), que demuestran el incremento de la expresión de dicho gen tras la presencia de convulsiones. Además, en ratones transgénicos que sobreexpresan *Mcl-1*, se ha observado una reducción del daño neuronal en el modelo de epilepsia inducido por pilocarpina (Henshall and Engel 2013). Se ha descrito que el gen *Bcl-10* codifica para una proteína que, en

presencia de convulsiones, interacciona directamente con TRAF2 y cIAP2 inhibiendo sus funciones antiapoptóticas y por tanto promoviendo la apoptosis (Shinoda et al. 2003). El gen *Cradd* codifica para una molécula apoptótica adaptadora que interacciona con la caspasa-2 y con receptores de la familia TNF, mediando de esta manera la inducción de la apoptosis (Shelton et al. 2010). En estudios basados en el tratamiento con diferentes estímulos apoptóticos, como el péptido β -amiloide o la privación de NGF, se ha visto que la inducción de la caspasa-2 depende de la proteína adaptadora CRADD. Además, se ha observado que tanto la caspasa-2 como CRADD son necesarios para la activación de c-Jun en ambos modelos (Jean et al. 2013). De este modo, la ausencia de JNK3 en el mecanismo apoptótico inducido por KA, se puede relacionar, por un lado, con la regulación de la vía intrínseca ya que no se detecta una inducción de la expresión del gen anti-apoptótico *Mcl-1*; y por otro lado, con la regulación negativa de la vía extrínseca de la apoptosis debida a la ausencia de expresión de los genes apoptóticos *Bcl-10* y *Cradd*.

Otros genes involucrados en la apoptosis, se expresaron en WT y *Jnk3^{-/-}* pero no en *Jnk1^{-/-}*, como *Hells* y *Cidea*. En cuanto a *Hells* (*Helicase, lymphoid specific*) diferentes estudios demuestran que este gen potencia la reparación, metilación y replicación del DNA (Myant and Stancheva 2008) y que juega un papel esencial en la supervivencia celular. Además se ha descrito que *Hells* modula la expresión de *Fas* (Thaler et al. 2010). En cuanto al gen *Cidea* (*Cell Death-Inducing DFFA-Like affector A*) se ha demostrado que en procesos de isquemia su sobreexpresión induce muerte celular. Sin embargo, su papel en la apoptosis no está totalmente esclarecido (Ranganathan et al. 2014). De esta forma, en ratones *Jnk1^{-/-}* se observó una ausencia de expresión de genes relacionados con mecanismos tanto de reparación, como de fragmentación del DNA, lo que sugiere que JNK1 puede estar relacionada con la prevención de daño en el DNA y por tanto, que la neuroprotección observada no dependa de la actividad reparadora de estos genes.

A pesar de que la ausencia, tanto de JNK3 como de JNK1, demostró neuroprotección ante el daño causado por el tratamiento con KA, dichas isoformas parecen tener diferentes funciones en la activación de la muerte neuronal y en los procesos inflamatorios. Esta afirmación está reforzada por la respuesta diferencial observada entre los ratones *Jnk1^{-/-}* y *Jnk3^{-/-}* tratados con KA.

Los resultados obtenidos de este trabajo, evidencian por primera vez, tanto el efecto neuroprotector de la ausencia de JNK1, como la participación diferencial de las isoformas JNK1

y JNK3 en los procesos de apoptosis y de inflamación inducidos por KA. En este sentido, estudios futuros deberán abordar muchas preguntas, como el efecto de la ausencia de JNK2 en los mismos procesos ante la acción del KA, a fin de establecer si la ausencia de cada una de las isoformas puede tener un efecto terapéutico en la apoptosis y en la neuroinflamación. Por otro lado, considerando los efectos deletéreos y compensatorios de los ratones *Jnk*^{-/-} convencionales y las limitaciones del uso de inhibidores específicos de la vía de JNK, la utilización de ratones genéticamente modificados para MKK4 y MKK7, permitiría el silenciamiento total de la vía de JNK y su estudio ante la acción de estímulos excitotóxicos. También, mediante el uso de ratones KO condicionales, que bajo la acción de diferentes promotores, permite el control espaciotemporal de cualquier modificación genética, sería posible el silenciamiento de la actividad de JNK en diferentes tipos celulares específicos (como neuronas, astrocitos o microglía). De este modo, se evidenciarían los efectos del silenciamiento integro de la vía y su posible aplicación clínica en enfermedades neurodegenerativas. Actualmente, se encuentra en fase clínica el fármaco bortezomib, un inhibidor del proteosoma que activa a JNK. Sin embargo, su uso está dirigido a enfermedades cancerígenas (Zhen et al. 2013). Además este fármaco en combinación con Vorinosat, se encuentra en fase I para el tratamiento de tumores sólidos (Deming et al. 2014).

De esta forma, conocer las funciones concretas de cada una de las isoformas de JNK, y la implicación de esta vía de señalización en procesos apoptóticos y neuroinflamatorios, podrá aportar un mayor conocimiento sobre la actividad de JNK y constituir una diana farmacológica en el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central.

VI. CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas en esta tesis son:

1. La ausencia de JNK3 reduce la muerte neuronal ante la acción del ácido kaínico (KA).
2. La ausencia de JNK3, además de reducir la fosforilación de JNK, disminuye la fosforilación de ERK1/2 y p38 tras el tratamiento con KA.
3. La delección de JNK3 no muestra neuroprotección ante la acción del ácido 3-nitropropiónico (3NP). En este contexto, la vía de la calpaína/CDK5 se presenta como uno de los principales mecanismos responsables de la neurodegeneración inducida por 3NP.
4. La ausencia de JNK3 activa la vía de supervivencia de PI3K/AKT mediante la regulación específica del gen *pik3cb*. Postulándose así, un nuevo mecanismo de regulación entre la vía de JNK y de PI3K/AKT.
5. La ausencia de JNK1 no induce la activación de la vía de supervivencia de PI3K/AKT.
6. En contra de lo esperado, la ausencia de JNK1 reduce la muerte neuronal ante la excitotoxicidad inducida por KA.
7. La ausencia de JNK3 evita la reactividad astrogliar y microglial ante la acción del KA, mientras que la falta de JNK1 sólo frena la reactividad astrogliar.
8. La expresión de los genes *Il1b* e *Ifny* está relacionada con la inducción de la actividad microglial en los ratones *Jnk1*^{-/-} después del tratamiento con KA.
9. La falta de inducción de la expresión de *Fasl*, *Casp3* y *Casp8*, principales mediadores de la vía extrínseca de la apoptosis, regula la neuroprotección en ratones *Jnk3*^{-/-} y *Jnk1*^{-/-} ante la acción del KA.
10. La ausencia en la inducción de genes con funciones antiapoptóticas, tales como *Atf5*, *Traf2* y *Pak7*, en ratones *Jnk3*^{-/-} y *Jnk1*^{-/-} tras el tratamiento con KA, sugiere una neuroprotección intrínseca de dichos animales.

VI. CONCLUSIONES

11. La expresión diferencial de genes relacionados con la apoptosis entre ratones *Jnk3*^{-/-} y *Jnk1*^{-/-} indican una especificidad funcional de JNK3 y JNK1 ante la acción del KA.
12. La ausencia de JNK3 reduce la inducción de los genes *Mcl-1*, *Bcl-10* y *Cradd*, relacionados con la regulación de la vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis, tras el tratamiento con KA.
13. La ausencia de JNK1 reduce la inducción de los genes *Cidea* y *Hells*, relacionados con los mecanismos reguladores del DNA, tras el tratamiento con KA.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Alexi T, Hughes PE, Knüsel B, Tobin AJ (1998) Metabolic compromise with systemic 3-nitropropionic acid produces striatal apoptosis in Sprague-Dawley rats but not in BALB/c ByJ mice. *Exp Neurol* 153: 74-93.

Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan Y (1996) Human ICE/CED3 protease nomenclature. *Cell* 87: 171.

Alonso AC, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1996) Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat Med* 2: 783-787.

Alonso A, Zaidi T, Novak M, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2001) Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6923-6928.

Andrioli A, Fabene PF, Spreafico R, Cavalheiro EA, Bentivoglio M (2009) Different patterns of neuronal activation and neurodegeneration in the thalamus and cortex of epilepsy-resistant Proechmys rats versus Wister rats after pilocarpine-induced protracted seizures. *Epilepsia* 50: 832-848.

Aouadi M, Binetruy B, Caron L, Marchando-Brustel Y, Bost F (2006) Role of MAPKs in development and differentiation: lessons from knockout mice. *Biochimic* 88: 1091-1098.

Aoki K, Imajoh S, Ohno S, Emori Y, Koike M, Kosaki G, Suzuki K (1986) Complete amino acid sequence of the large subunit of the low-Ca²⁺-requiring form of human Ca²⁺-activated neutral protease (muCANP) deduced from its cDNA sequence. *FEBS lett* 205: 313-317.

Ashkenazi A, Dixit VM (1998) Death receptors: Signaling and modulation. *Science* 281: 1305-1308.

Ashkenazi A, Dixit VM (1999) Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* 11: 255-260.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Atmaca M (2009) Valproate and neuroprotective effects for bipolar disorder. *Int Rev Psychiatry* 21: 410-413.

Avruch J (2007) MAPKinase pathways: the first twenty years. *Biochim Biophys Acta* 1773: 1150-1160.

Bahn S, Volk B, Wisden W (1994) Kainate receptor gene expression in the developing rat brain. *J Neurosci* 14: 5525-5547.

Ballatore C, Lee VM, Trojanowski JQ (2007) Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci* 8: 663-672.

Barthwal MK, Sathyanarayana P, Kundu CN, Rana B, Pradeep A, Sharma C, Woodgett JR, Rana A (2003) Negative regulation of mixed lineage kinase 3 by protein kinase B/AKT leads to cell survival. *J Biol Chem* 278: 3897-3902.

Beal MF, Kowall NW, Ellison DW, Mazurek MF, Swartz KJ, Martin JB (1986) Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolic acid. *Nature* 321: 168-171.

Beal MF, Brouillet E, Jenkins BG, Ferrante RJ, Kowall NW, Miller JM, Storey E, Srivastava R, Rosen BR, Hyman BT (1993) Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J Neurosci* 13: 4181-4192.

Beal MF, Ferrante RJ, Henshaw R, Matthews RT, Chan PH, Kowall NW, Epstein CJ, Schulz JB (1995) 3-Nitropropionic acid neurotoxicity is attenuated in copper/zinc superoxide dismutase transgenic mice. *J Neurochem* 65: 919-922.

Behrens A, Sibilio M, Wagner EF (1999) Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. *Nat Genet* 21: 326-329.

Ben-Ari Y (1985) Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neurosci* 14: 375-403.

Ben-Ari Y, Gho M (1988) Long-lasting modification of the synaptic properties of rat CA3 hippocampal neurones induced by kainic acid. *J Physiol* 404: 365-384.

Ben-Ari Y, Cossart R (2000) Kainate: double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends Neurosci* 23: 580-587.

Ben-Levy R, Hooper S, Wilson R, Paterson HF, Marshall CJ (1998) Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Curr Biol* 8: 1049-1057.

Berger ML, Charton G, Ben-Ari Y (1986) Effect of seizures induced by intra-amygdaloid kainic acid on kainic acid binding sites in rat hippocampus and amygdala. *J Neurochem* 47: 720-727.

Bi L, Okabe I, Bernard DJ, Wynshaw-Boris A, Nussbaum RL (1999) Proliferative defect and embryonic lethality in mice homozygous for a deletion in the p110_ subunit of PI3K. *J Biol Chem* 274: 10963-10968.

Bi L, Okabe I, Bernard DJ, Nussbaum RL (2002) Early embryonic lethality in mice deficient in the p110 catalytic subunit of PI3K. *Mamm Genome* 13: 169-172.

Biggs WHI, Meisenhelder J, Hunter T, Cavenee WK, Arden KC (1999) Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 7421-7426.

Bidwell GL, Raucher D (2009) Therapeutic peptides for cancer therapy. Part I - peptide inhibitors of signal transduction cascades. *Expert Opin Drug Deliv* 6:1033-1047.

Biondi RM, Nebreda RA (2003) Signalling specificity of Ser/Thr protein kinases through docking-site-mediated interactions. *Biochem J* 372: 1-13.

Bizat N, Hermel JM, Boyer F, Jacquard C, Créminon C, Ouary S, Escartin C, Hantraye P, Kajewski S, Brouillet E (2003) Calpain is a major cell death effector in selective striatal degeneration induced in vivo by 3-nitropropionate: implications for Huntington's disease. *J Neurosci* 23: 5020-5030.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Blum D, Galas MC, Gall D, Cuvelier L, Schiffmann SN (2002) Striatal and cortical neurochemical changes induced by chronic metabolic compromise in the 3-nitropropionic model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 10: 410-426.

Blum D, Galas MC, Pintor A, Brouillet E, Ledent C, Muller C, Bantubungi K, Galluzzo M, Gall D, Cuvelier L, Rolland AS, Popoli P, Schiffmann S (2003) A Dual Role of Adenosine A_{2A} Receptors in 3-Nitropropionic Acid-Induced Striatal Lesions: Implications for the Neuroprotective Potential of A_{2A} Antagonists. *J Neurosci* 23: 5361-5369.

Bloss EB, Hunter RG (2010) Hippocampal kainate receptors. *Vitam Horm* 82: 167-84.

Blumcke I, Becker Aj, Klein C, Scheiwe C, Lie AA, Beck H, Waha A, Friedl MG, Kuhn R, Emson P, Elger C, Wiestler OD (2000) Temporal lobe epilepsy associated up-regulation of metabotropic glutamate receptors: correlated changes in mGluR1 mRNA and protein expression in experimental animals and human patients. *J Neuropathol Exp Neurol* 59: 1-10.

Boatright KM, Renatus M, Scott FL, Sperandio S, Shin H, Pedersen IM, Ricci JE, Edris WA, Sutherlin DP, Green DR, Salvesen GS (2003) A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* 11: 529-541.

Bonny C, Oberson A, Negri S, Sauser C, Schorderet DF (2001) Cell-permeable peptide inhibitors of JNK: novel blockers of beta-cell death. *Diabetes* 50: 77-82.

Borsello T, Clarke PG, Hirt L, Vercelli A, Repici M, Schorderet DF, Bogousslavsky J, Bonny C (2003) A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against excitotoxicity and cerebral ischemia. *Nat Med* 9: 1180-1186.

Borsello T, Forloni G (2007) JNK signalling: a possible target to prevent neurodegeneration. *Curr Pharm Des* 13: 1875-1886.

Boujrad H, Gubkina O, Robert N, Krantic S, Susin SA (2007) AIF-mediated programmed necrosis: a highly regulated way to die. *Cell Cycle* 6:2612-2619.

Boulton TG, Cobb MH (1991) Identification of multiple extracellular signal-regulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies. *Cell Regul* 2: 357-371.

Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH, Yancopoulos GD (1991) ERK's: a family of proteinserine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 65: 663-675.

Bozyczko-Coyne D, O'Kane TM, Wu ZL, Dobrzanski P, Murthy S, Vaught JL, Scott RW (2001) CEP-1347/KT-7515, an inhibitor of SAPK/JNK pathway activation, promotes survival and blocks multiple events associated with Abeta-induced cortical neuron apoptosis. *J Neurochem*. 77: 849-63.

Brecht S, Kirchhof R, Chromik A, Willesen M, Nicolaus T, Raivich G, Wessig J, Waetzig V, Goetz M, Claussen M, Pearse D, Kuan CY, Vaudano E, Behrens A, Wagner E, Flavell RA, Davis RJ, Herdegen T (2005) Specific pathophysiological functions of JNK isoforms in the brain. *Eur Journal Neurosci* 21: 363-377.

Broker LE, Kruyt FA, Giaccone G (2005) Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res* 1: 3155-3162.

Brorson JR, Manzillo PA, Miller RJ (1994) Ca²⁺ entry via AMPA/KA receptors and excitotoxicity in cultured cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* 14: 187-197.

Brouillet E, Jacquard C, Bizat N, Blum D (2005) 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover pathophysiological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. *J Neurochem* 95: 1521-1540.

Browne SE, Bowling AC, MacGarvey U, Baik MJ, Berger SC, Muqit MM, Bird ED, Beal MF (1997) Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann Neurol* 41: 646-653.

Bruckner SR, Tammariello SP, Kuan C-Y, Flavell RA, Rakic R and Estus S (2001) JNK3 contributes to c-Jun activation and apoptosis but not oxidative stress in nerve growth factor-deprived sympathetic neurons. *J Neurochem* 78: 298-303.

Brunet A, Datta SR, Greenberg ME (2001) Transcription -dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol* 11: 297-305.

Cabon L, Galan-malo P, Bouharrou A, Delavallee L, Brunelle-Navas MN, Lorenzo HK, Gross A, Susin SA (2012) BID regulates AIF-mediated caspase-independent ferroptosis by promoting Bax activation. *Cell Death Differ* 19: 245-256.

Candlish E, La Croix J, Unrau AM (1969) The biosynthesis of 3-nitropropionic acid in creeping indigo (*Indigofera spicata*). *Biochemistry* 8: 182-186.

Cantley LC (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 6: 1655-1657.

Cantrell DA (2001) Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways. *J Cell Sci* 114: 1439-1445.

Carboni L, Carletti L, Tacconi S, Corti C, Ferracuti F (1998) Differential expression of SAPK isoforms in the rat brain. An in situ hybridization study in the adult rat brain and during post-natal development. *Brain Res Mol Brain Res* 60: 57-68.

Carboni S, Antonsson B, Gaillard P, Gotteland JP, Gillon JY, Vitte PA (2005) Control of death receptor and mitochondrial-dependent apoptosis by c-Jun N-terminal kinase in hippocampal CA1 neurones following global transient ischaemia. *J Neurochem* 92: 1054-1060.

Cargnello M, Roux PP (2011) Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 75: 50-83.

Cartron PF, Gallenne T, Bougras G, Gautier F, Manero F, Vusio P, Meflah K, Vallette FM, Juin P (2004). The first alpha helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins Bid and PUMA. *Mol Cell* 16: 807-818.

Cavazos JE, Jones SM, Cross DJ (2004) Sprouting and synaptic reorganization in the subiculum and CA1 region of the hippocampus in acute and chronic models of partial-onset epilepsy. *Neuroscience* 126: 677-688.

Cerbai F, Lana D, Nosi D, Petkova-Kirova P, Zecchi S, Brothers HM, Wenk G, Giovannini MG (2012) The Neuron-Astrocyte-Microglia Triad in Normal Brain Ageing and in a Model of Neuroinflammation in the Rat Hippocampus *Plos One* 7: e45250.

Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, Nelson N, Van Ness K, Greenstreet TA, March CJ, Kronheim SR, Druck T, Cannizzaro LA (1992) Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 256: 97-100.

Chang L, Karin M (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410: 37-40.

Chang YC, Kim H, Rapoport SI, Rao JS (2008) Chronic NMDA administration increases neuroinflammation markers in rat frontal cortex: cross-talk between excitotoxicity and neuroinflammation. *Neurochem Res* 33: 2318-2323.

Chao TH, Hayashi M, Tapping RI, Kato Y, Lee JD (1999) MEK3 directly regulates MEK5 activity as part of the big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) signaling pathway, *J Biol Chem* 274: 36035-36038.

Chaudhary D, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Dixit VM (1998) The death of inhibitory molecules CED-9 and CED-4L use a common mechanism to inhibit CED-3 death protease. *J Biol Chem* 273: 17708-17712.

Chauhan D, Li G, Hideshima T, Podar K, Mitsiades C, Mitsiades N, Munshi N, Kharbanda S, Anderson KC (2003) JNK-dependent release of mitochondrial protein, Smac, during apoptosis in multiple myeloma (MM) cells. *J Biol Chem* 278: 17593-17596.

Chen YR, Tan TH (2000) The c-Jun N-terminal Kinase pathway and apoptotic signaling. *Int J Oncol* 16: 651-662.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, Wright A, Vanderbilt C, Cobb MH (2001) MAP kinases. *Chem Rev* 101: 2449-2476.

Chen Z, Duan RS, Quezada HC, Mix E, Nennesmo I, Adem A, Winblad B, Zhu J (2005) Increased microglial activation and astrogliosis after intranasal administration of kainic acid in C57BL/6 mice. *J Neurobiol* 62: 207-218.

Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, Korsmeyer, SJ (2001) BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 8: 705-711.

Cheng XL, Li MK (2014) Effect of topiramate on apoptosis-related protein expression of hippocampus in model rats with alzheimers disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 18: 761-768.

Chicheportiche Y, Bourdon PR, Xu H, Hsu YM, Scott H, Hession C, Garcia I, Browning JL (1997) Tweak, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem* 272: 32401-32410.

Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Yu GL, Lyons RH, Garg M, Duan DR, Xing L, Gentz R, Ni J, Dixit VM (1996) Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR1 and CD95. *Science* 274: 990-992.

Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR (2010) The Bcl-2 family reunion. *Mol Cell* 37: 299-310.

Chiu R, Angel P, Karin M (1989) Jun-B differs in its biological properties from, and is a negative regulator of, c-jun. *Cell* 59: 979-986.

Chong H, Vikis HG, Guan KL (2003) Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal* 15: 463-469.

Chu CT, Levinthal DJ, Kulich SM, Chalovich EM, DeFranco DB (2004) Oxidative neuronal injury. The dark side of ERK1/2. *Eur J Biochem* 271: 2060-2066.

Chuang YC, Chang AY, Lin JW, Hsu SP, Chan SH (2004) Mitochondrial dysfunction and ultrastructural damage in the hippocampus during kainic acid-induced status epilepticus in the rat. *Epilepsia* 45: 1202-1209.

Clarke P, Beckhman JD, Leser JS, Hoyt CC, Tyler KL (2009) Fas-mediated apoptotic signaling in the mouse brain following reovirus infection. *J Virol* 83: 6161-6170.

Coffey ET (2014) Nuclear and cytosolic JNK signaling in neurons. *Nat Rev Neurosci* 15: 285-299.

Coffey ET, Hongisto V, Dickens M, Davis RJ, Courtney MJ (2000) Dual roles for c-Jun N-terminal kinase in developmental and stress responses in cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 20: 7602-7613.

Cohen DM (2005) SRC family kinases in cell volume regulation. *Am J Physiol Cell Physiol* 288: C483-493.

Cohen P (2009) Targeting protein kinases for the development of anti-inflammatory drugs. *Curr Opin Cell Biol* 21: 317-324.

Coles CJ, Edmondson DE, Singer TP (1979) Inactivation of succinate dehydrogenase by 3-nitropropionate. *J Biol Chem* 254: 5161-5167.

Combs CK, Karlo JC, Kao SC, Landreth GE (2001) Beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFalpha-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *J Neurosci* 21: 1179-1188.

Cory S, Adams JM (2002) The Bcl2 family: Regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2: 647-656.

Cory S, Huang DCS, Adams JM (2003) The Bcl-2 Family: Roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22: 8590-8607.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Coyle JT, Puttfarcken P (1993) Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science* 262: 689-695.

Crook NE, Clem RJ, Miller LK (1993) An apoptosis inhibiting baculovirus gene with a zinc finger like motif. *J Virol* 67: 2168-2174.

Cuenda A, Rousseau S (2007) p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 1773: 1358-1375.

Dhanasekaran DN, Reddy EP (1998) Signaling by dual specificity kinases. *Oncogene* 17: 1447-1755.

Dhanasekaran DN, Reddy EP (2008) JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* 27: 6245-6251.

Dhanasekaran DN, Johnson GL (2007) MAPKs: function, regulation, role in cancer and therapeutic targeting. *Oncogene* 26: 3097-3099.

Dhanasekaran DN, Kashef K, Lee CM, Xu H, Reddy EP (2007) Scaffold proteins of MAP-kinase modules. *Oncogene* 26: 3185-3202.

Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M, Davis RJ (1994) JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 76: 1025-1037.

Dashti SR, Efimova T, Eckert RL (2001) MEK7-dependent activation of p38 MAP kinase in keratinocytes. *J Biol Chem* 276: 8059-8063.

Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91: 231-241.

Datta SR, Brunet A, Greenberg ME (1999) Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 13: 2905-2927.

Davis RJ (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 2: 239-252.

Delettre C, Yuste VJ, Moubarak RS, Bras M, Lesbordes-BrionJC, Petres S, Bellalou J, Susin SA (2006) AIFsh, a novel apoptosis inducing factor (AIF) proapoptotic isoform with potential pathological relevance in human cancer. *J Biol Chem* 281: 6413-6427.

Deveraux QL, Stennicke HR, Salvesen GS, Reed JC (1999) Endogenous inhibitors of caspases. *J Clin Immunol* 19: 388-398.

Dickens M, Rogers JS, Cavanagh J, Raitano A, Xia Z, Halpern JR, Greenberg ME, Sawyers CL, Davis RJ (1997) A Cytoplasmic Inhibitor of the JNK Signal Transduction Pathway. *Science* 277: 693-696.

Ding WX, Ni HM, Gao W, Hou YF, Melan MA, Chen X, Stolz DB, Shao ZM, Yin XM (2007) Differential effects of endoplasmatic reticulum stress-induced autophagy on cell survival. *J Biol Chem* 282: 4702-4710.

Dong C, Yang DD, Wysk M, Whitmarsh AJ, Davis RJ, Flavell RA (1998) Defective T cell differentiation in the absence of Jnk1. *Science* 282: 2092-2095.

Donovan N, Becker EB, Konishi Y, Bonni A (2002) JNK phosphorylation and activation of BAD couples the stress-activated signaling pathway to the cell death machinery. *J Biol Chem* 277: 40944-40949.

Dreskin SC, Thomas GW, Dale SN, Heasley LE (2001) Isoforms of Jun kinase are differentially expressed and activated in human monocyte/macrophage (THP-1) cells. *J Immunol* 166: 5646-5653.

Du K, Montminy M (1998) CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J Biol Chem* 273: 32377-32379.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Dudek FE (2002) Role of Glial Cells in Seizures and Epilepsy: Intracellular Calcium Oscillations and Spatial Buffering. *Epilepsy Curr.* 2: 137-139.

Dunn C, Wiltshire C, MacLaren A, Gillespie DA (2002) Molecular mechanism and biological functions of c-Jun N-terminal kinase signalling via the c-Jun transcription factor. *Cell Signal* 14: 585-593.

Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68: 383-424.

Ellis HM, Horvitz HR (1986) Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44: 817-829.

Elmore S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35: 495-516.

Embi N, Rylatt DB, Cohen P (1980) Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur J Biochem* 107: 519-527.

Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391: 43-50.

Engel JR, Babb TL, Crandall PH (1989) Surgical treatment of epilepsy: opportunities for research into basic mechanisms of human brain function. *Acta Neurochir Suppl* 46: 3-8.

Erazo T, Moreno A, Ruiz-Babot G, Rodríguez-Asiain A, Morrice NA, Espadamala J, Bayascas JR, Gómez N, Lizcano JM (2013) Canonical and kinase activity-independent mechanisms for extracellular signal-regulated kinase 5 (ERK5) nuclear translocation require dissociation of Hsp90 from the ERK5-Cdc37 complex. *Mol Cell Biol* 33: 1671-1686.

Evans OB, Rank KB, Bhattachayra K, Thomsen OR, Gurney ME, Sharma SK (2000) Tau phosphorylation at Serine 396 and Serine 404 by Human Recombinant Tau protein kinase II inhibits Tau's Ability to promote microtubule assembly. *J Biol Chem* 275: 24977-24983.

Fan M, Chambers TC (2001) Role of mitogen-activated protein kinases in the response of tumor cells to chemotherapy. *Drug Resist Updat* 4: 253-267.

Fang JY, Richardson BC (2005) The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *Lancet Oncol* 6: 322-327.

Ferlini C, De Angelis C, Biselli R. (1999). Sequence of metabolic changes during X-ray-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 247: 160-167.

Fernández-Espejo E (1996) Basic neurobiology of hippocampal formation. *Rev Neurol* 199624: 779-784.

Ferrer I, Blanco R, Carmona M (2001) Differential expression of active, phosphorylation-dependent MAP kinases, MAPK/ERK, SAPK/JNK and p38, and specific transcription factor substrates following quinolinic acid excitotoxicity in the rat. *Mol. Brain Res* 94: 48-58.

Ferrer I, Gomez-Isla T, Puig B, Freixes M, Ribé E, Dalfo E, Avila J (2005) Current advances on different kinases involved in tau phosphorylation and implications in Alzheimer's disease and tauopathies. *Curr Alzheimer Res* 2: 3-18.

Finegan KG, Tournier C (2010) The mitogen-activated protein kinase kinase 4 has a pro-oncogenic role in skin cancer. *Cancer Res* 70: 5797-5806.

Franklin JL (2011) Redox regulation of the intrinsic pathway in neuronal apoptosis. *Antioxidants and Redox Signaling* 14: 1437-1448.

Foo RS, Mani K, Kitsis RN (2005) Death begets failure in the heart. *J Clin Invest* 115: 565-571.

Foukas LC, Claret M, Pearce W, Okkenhaug K, Meek S, Peskett E, Sancho S, Smith AJ, Withers DJ, Vanhaesebroeck B (2006) Critical role for the p110 α PI3K in growth and metabolic regulation. *Nature* 441: 366-370.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Foukas LC, Berenjano IM, Gray A, Khwaja A, Vanhaesebroeck B (2010) Activity of any class IA PI3K isoform can sustain cell proliferation and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 11381-11386.

Freshney NW, Rawlinson L, Guesdon F, Jones E, Cowley S, Hsuan J, Saklatvala J (1994) Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell* 78: 1039-1049.

Frodin M, Gammeltoft S (1999) Role and regulation of 90kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Mol Cell Endocrinol* 151: 65-77.

Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC (1998) Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem* 67: 481-507.

Fu NY, Sukumaran SK, Kerk SY, Yu VC (2009) Baxbeta: a constitutively active human Bax isoform that is under tight regulatory control by the proteasomal degradation mechanism. *Mol Cell* 33: 15-29.

Fuchs SY, Adler V, Pincus MR, Ronai Z (1988) MEKK1/JNK signaling stabilizes and activates p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 10541-10546.

GGalas MC, Bizat N, Cuvelier L, Bantubungi K, Brouillet E, Schiffmann SN, Blum D (2004) Death of cortical and striatal neurons induced by mitochondrial defect involves differential molecular mechanisms. *Neurobiol Dis* 15: 152-159.

Gaillard P, Jeanclaude-Etter I, Ardisson V, Arkinstall S, Cambet Y, Camps M, Chabert C, Church D, Cirillo R, Gretener D, Halazy S, Nichols A, Szyndralewicz C, Vitte PA, Gotteland JP (2005) Design and synthesis of the first generation of novel potent, selective, and in vivo active (benzothiazol-2-yl) acetonitrile inhibitors of the c-Jun N-terminal kinase. *J Med Chem* 48: 4596-607.

Gall C, Lauterborn J, Isackson P, White J (1990) seizures, neuropeptide regulation, and mRNA expression in the hippocampus. *Prog Brain Res* 83: 371-390.

Gallo KA, Johnson GL (2002) Mixed-lineage kinase control of JNK and p38 MAPK pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 663-672.

Galluzzi L, Maiuri C, Vitale I, Zischaka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G (2007) Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell death differ* 14: 1237-1243.

Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nuñez G, Peter ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon H-U, Vandenabeele P, White E, Yuan J, Zhivotovsky B, Melino G, Kroemer G (2012) Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation* 19: 107-120.

García M, Vanhoutte P, Pages C, Besson MJ, Brouillet E, Caboche J (2002) The mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid induces striatal neurodegeneration via a c-Jun N-terminal kinase/c-Jun module. *J Neurosci* 22: 2174-2184.

Gass P, Herdegen T (1995) Neuronal expression of AP-1 proteins in excitotoxic neurodegenerative disorders and following nerve fiber lesions. *Prog Neurobiol* 47: 257-290.

Gearan T, Castillo OA, Schwarzschild MA (2001) The parkinsonian neurotoxin, MPP⁺ induces phosphorylated c-Jun in dopaminergic neurons of mesencephalic cultures. *Parkinsonism Relat Disord* 8: 19-22.

Goalstone ML (2011) ERK5: a novel IKK α -kinase in rat hippocampal neurons. *Can J Neurol Sci* 38: 639-648.

Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P, Evan GI, Green DR (2000) The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol* 2: 156-162.

Golks A, Brenner D, Fritsch C, Krammer PH, Lavrik IN (2005) c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 280: 14507-14513.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J (2003) The calpain system. *Physiol Rev* 83: 731-801.

Good MC, Zalatan JG, Lim WA (2011) Scaffold Proteins: Hubs for controlling the Flow of Cellular Information. *Science* 332: 680-686.

Gorbacheva L, Strukova S, Pinelis V, Ishiwata S, Stricker R, Reiser G (2013) NF- κ B-dependent and -independent pathways in the protective effects of activated protein C in hippocampal and cortical neurons at excitotoxicity. *Neurochem Int* 63: 101-111.

Green DR, Kroemer G (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305: 626-629.

Green DR, Reed JC (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309-1312.

Griffiths T, Evans MC, Meldrum BS (1984) Status epilepticus: the reversibility of calcium loading and acute neuronal pathological changes in the rat hippocampus. *Neuroscience* 12: 557-567.

Griffiths GJ, Dubrez L, Morgan CP, Jones NA, Whitehouse J, Bernard MC, Dive C, Hickman JA (1999) Cell Damage-induced Conformational Changes of the Pro-Apoptotic Protein Bak in vivo Precede the Onset of Apoptosis. *Journal Cell Biology* 144: 903-914.

Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer, SJ (1999) Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13: 1899-1911.

Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (τ) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 4913-4917.

Gu Z, Jiang Q, Zhang G (2001) Extracellular signal-regulated kinase and c-Jun N-terminal protein kinase in ischemic tolerance. *Neuro report* 12: 3487-3491.

Guan QH, Pei DS, Zhang QG, Hao ZB, Xu TL, Zhang GY (2005) The neuroprotective action of SP600125, a new inhibitor of JNK, on transient brain ischemia/reperfusion-induced neuronal death in rat hippocampal CA1 via nuclear and non-nuclear pathways. *Brain Res* 1035: 51-9.

Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Derijard B, Davis RJ (1996) Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J* 15, 2760-2770.

Hamilton BF, Gould DH (1987) Nature and distribution of brain lesions in rats intoxicated with 3-nitropropionic acid: a type of hypoxic (energy deficient) brain damage. *Acta Neuropathol* 72: 286-297.

Hanks SK, Hunter T (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* 9: 576-596.

He C, Klionsky DJ (2009) Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 43: 67-93.

He S, Wang L, Miao L, Wang T, Du F, Zhao L, Wang X (2009) Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. *Cell* 137: 1100-1111.

Heneka MT, O'Banion MK, Terwel D, Kummer MP (2010) Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 117: 919-947.

Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB (2005) Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 4: 988-1004.

Henry PG, Lebon V, Vaufrey F, Brouillet E, Hantraye P, Bloch G (2002) Decreased TCA cycle rate in the rat brain after acute 3-NP treatment measured by in vivo ¹H-[¹³C] NMR spectroscopy. *J Neurochem* 82: 857-866.

Henshall DC, Bonislowski DP, Skradski SL, Lan JQ, Meller R, Simon RP (2001) Cleavage of bid may amplify caspase-8-induced neuronal death following focally evoked limbic seizures. *Neurobiol Dis* 8: 568-580.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Hensley K, Floyd RA, Zheng NY, Nael R, Robinson KA, Nguyen X, Pye QN, Stewart CA, Geddes J, Markesbery WR, Patel E, Johnson GV, Bing G (1999) p38 kinase is activated in the Alzheimer's disease brain. *J Neurochem* 72: 2053-2058.

Herdegen T, skene P. Bahr M (1997) The c-Jun transcription factor-bipotential mediator of neuronal death, survival and regeneration. *Trends Neurosci* 20: 227-231.

Hetman M, Cavanaugh JE, Kimelman D, Xia Z (2000) Role of glycogen synthase kinase-3beta in neuronal apoptosis induced by trophic withdrawal. *J Neurosci* 20: 2567-2574.

Hetman M, Gozdz A (2004) Role of extracellular signal regulated kinases 1 and 2 in neuronal survival. *Eur J Biochem* 271: 2050-2055.

Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M (1993) Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev* 7: 22135-2148.

Hill MM, Adrain C, Duriez PJ, Creagh EM, Martin SJ (2004) Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *Embo J* 23: 2134-2145.

Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS (2002) A central role for JNK in obesity and insulin resistance *Nature* 420: 333-336.

Hisanaga S, Saito T (2003) The regulation of cyclin-dependent kinase 5 activity through the metabolism of p35 or p39 cdk5 activator. *Neurosignals* 12: 221-229.

Howe ML, Barres BA (2012) A novel role for microglia in minimizing excitotoxicity. *BMC Biol* 10: 7.

Holgado-Madruga M, Moscatello DK, Emlet DR, Dieterich R, Wong AJ (1997) Grb2-associated binder 1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 12419-12424.

Hoppb SC, Royer S, Brothers HM, Kaercher RM, D'Angelo H, Bardoua I, Wenka GL (2014) Age-associated alterations in the time-dependent profile of pro- and anti-inflammatory proteins within the hippocampus in response to acute exposure to interleukin-1 β . *J Neuroimmunol* 267: 86-91.

Horstmann S, Kahle PJ, Borasio GD (1998) Inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase promote neuronal survival *in vitro*. *J Neurosci Res* 52:483-490.

Hotchkiss RS, Nicholson DW (2006) Apoptosis and caspasas regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol* 6: 813-822.

Hresko RC, Murata H, Mueckler M (2003) Phosphoinositide-dependent kinase-2 is a distinct protein kinase enriched in a novel cytoskeletal fraction associated with adipocyte plasma membranes. *J Biol Chem* 278: 21615-21622.

Hu WJ (1986) Isolation and structure determination of Arthrimum toxin causing sugarcane poisoning 3 nitropropionic acid. *Zhonghua Yu Fang Yi. Xue Za Zhi* 20: 321-323.

Hu J, Van Eldik LJ (1999) Glial-derived proteins activate cultured astrocytes and enhance beta amyloid-induced glial activation. *Brain Res* 842: 46-54.

Hu WW, Du Y, Li C, Song YJ, Zhang GY (2008) Neuroprotection of hypothermia against neuronal death in rat hippocampus through inhibiting the increased assembly of GluR6-PSD95-MLK3 signaling module induced by cerebral ischemia/reperfusion. *Hippocampus* 18: 386-97.

Hu C, Huang L, Gest C, Xi X, Janin A, Soria C, Li H, Lu H (2012) Opposite regulation by PI3K/Akt and MAPK/ERK pathways of tissue factor expression, cell-associated procoagulant activity and invasiveness in MDA-MB-231 cells. *J Hematol Oncol* 5: 16.

Hughes MA, Harper N, Butterworth M, Cain K, Cohen GM, Macfarlane M (2009) Reconstitution of the death-inducing signaling complex reveals a substrate switch that determines CD95-mediated death or survival. *Mol Cell* 35: 265-279.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Hunot S, Vila M, Teismann P, Davis RJ, Hirsch EC, Przedborski S, Rakic P, Flavell RA (2004) JNK-mediated induction of cyclooxygenase 2 is required for neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 665-670.

Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattman C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J (1997) Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388: 190-195.

Irving EA, Barone FC, Reitha D, Hadingham SJ, Parsons AA (2000) Differential activation of MAPK/ERK and p38/SAPK in neurones and glia following focal cerebral ischaemia in the rat. *Mol Brain Res* 77: 65-75.

Ito M, Yoshioka K, Akechi M, Yamashita S, Takamatsu N, Sugiyama K (1999) JSAP1, a novel jun N-terminal protein kinase (JNK)-binding protein that functions as a Scaffold factor in the JNK signaling pathway. *Mol Cell Biol* 19: 7539-7548.

Ito M, Akechi M, Hirose R, Ichimura M, Takamatsu N, Xu P (2000) Isoforms of JSAP1 scaffold protein generated through alternative splicing. *Gene* 255: 229-234.

Jaattela M, Tschopp J (2003) Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nat Immunol* 4: 416-423.

Jaeschke A, Rincón M, Doran B, Reilly J, Neubergh D, Greiner DL, Shultz LD, Rossini AA, Flavell RA, Davis RJ (2005) Disruption of the *Jnk2* (*Mapk9*) gene reduces destructive insulinitis and diabetes in a mouse model of type I diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 6931-6935.

Jia S, Liu Z, Zhang S, Liu P, Zhang L, Lee SH, Zhang J, Signoretti S, Loda M, Roberts TM, Zhao JJ (2008) Essential roles of PI(3)K-p110 β in cell growth, metabolism, and tumorigenesis. *Nature* 454: 776-779.

Jin XT, Smith Y (2011) Localization and functions of kainate receptors in the basal ganglia. *Adv Exp Med Biol* 717: 27-37.

Jiang Y, Chen C, Li Z, Guo W, Gegner JA, Lin S, Han J (1996) Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J Biol Chem* 271: 17920-17926.

Jiang Y, Gram H, Zhao M, New L, Gu J, Feng L, Di Padova F, Ulevitch RJ, Han J (1997) Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta. *J Biol Chem* 272: 30122-30128.

Johri A, Chandra A, Beal MF (2013) PGC-1 α , mitochondrial dysfunction, and Huntington's disease. *Free Radic Biol Med*. 62: 37-46.

Kamakura S, Moriguchi T, Nishida E (1999) Activation of the protein kinase ERK5/BMK1 by receptor tyrosine kinases. Identification and characterization of a signaling pathway to the nucleus. *J Biol Chem* 274: 26563-26571.

Kamat PK, Rai S, Swarnkar S, Shukla R, Nath C (2014) Molecular and Cellular Mechanism of Okadaic Acid (OKA)-Induced Neurotoxicity: A Novel Tool for Alzheimer's Disease Therapeutic Application. *Mol Neurobiol* 8.

Kharbanda S, Saxena S, Yoshida K, Pandey P, Kaneki M, Wang Q, Cheng K, Chen YN, Campbell A, Sudha T, Yuan ZM, Narula J, Weichselbaum R, Nalin C, Kufe D (2000) Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl-x(L) in response to DNA damage. *J Biol Chem* 275: 322-327.

Kaplan DR, Miller FD (2000) Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 10: 381-391.

Kato Y, Kravchenko VV, Tapping RI, Han J, Ulevitch RJ, Lee JD (1997) BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. *EMBO J* 16: 7054-7066.

Kato Y, Chao TH, Hayashi M, Tapping RI, Lee JD (2000) Role of BMK1 in regulation of growth factor-induced cellular responses. *Immunol Res* 21: 233-237.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Kato Y, Tapping RI, Huang S, Watson MH, Ulevitch RJ, Lee JD (1998) Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor. *Nature* 395: 713-716.

Kelekar A, Chang BS, Harlan JE, Fesik SW, Thompson CB (1997) Bad is a BH3 domain-containing protein that forms an inactivating dimer with Bcl-XL. *Mol Cell Biol* 17: 7040-7046.

Kelkar N, Gupta S, Dickens M, Davis RJ (2000). Interaction of a mitogen-activated protein kinase signaling module with the neuronal protein JIP3. *Mol Cell Biol* 20: 1030-1043.

Kelkar N, Standen CL, Davis RJ. (2005) Role of JIP4 scaffold protein in the regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Mol Cell Biol* 25: 2733-2743.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257.

Keshet Y, Seger R (2010) The MAP Kinase Signaling Cascades: A system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods in Molecular Biology* 661: 3-38.

Kew JN, Kemp JA (2005) Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology* 179: 4-29.

Kid VJ (1998) Proteolytic activities that mediate apoptosis. *Annu Rev Physiol* 60: 533-73.

Kim HS, Park CH, Cha SH, Lee JH, Lee S, Kim Y, Rah JC, Jeong SJ, Suh YH (2000) Carboxyl-terminal fragment of Alzheimer's APP destabilizes calcium homeostasis and renders neuronal cells vulnerable to excitotoxicity. *Faseb J* 14: 1508-1517.

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

Kim AH, Yano H, Cho H, Meyer D, Monks B, Margolis B, Birnbaum MJ, Chao MV (2002) Akt1 regulates a JNK scaffold during excitotoxic apoptosis. *Neuron* 35: 697-709.

Kim D, Chung J (2002) Akt: versatile mediator of cell survival and beyond. *J Biochem Mol Biol* 35: 106-115.

Kim AH, Sasaki T, Chao MV (2003) JNK-interacting protein 1 promotes Akt1 activation. *J Biol Chem* 278: 29830-29836.

Kim Y, Seger R, Suresh Babu CV, Hwang SY, Yoo YS (2004) A positive role of the PI3-K/Akt signaling pathway in PC12 cell differentiation. *Mol Cells* 31: 353-359.

Kim JH, Ong WY (2009) Localization of the transcription factor, sterol regulatory element binding protein-2 (SREBP-2) in the normal rat brain and changes after kainate-induced excitotoxic injury. *J Chem Neuroanat* 37: 71-77.

Kim EK, Choi EJ (2010) Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 1802: 396-405.

Kischkel FC, Hellbardt S, Bermann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME (1995) Cytotoxic-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO* 14: 5579-5588.

Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ, Ashkenazi A (2000) Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* 12: 611-620.

Kishimoto H, Nakagawa K, Watanabe T, Kitagawa D, Momose H, Seo J, Nishitai G, Shimizu N, Ohata S, Tanemura S, Asaka S, Goto T, Fukushi H, Yoshida H, Suzuki A, Sasaki T, Wada T, Penninger JM, Nishina H, Katada T (2003) Different properties of SEK1 and MKK7 in dual phosphorylation of stress-induced activated protein kinase SAPK/JNK in embryonic stem cells. *J Biol Chem* 278: 16595-16601.

Kitson J, Raven T, Jiang YP, Goeddel DV, Giles KM, Pun KT, Grinham CJ, Brown R, Farrow SN (1996) A death-domain-containing receptor mediates apoptosis. *Nature* 384: 372-375.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Kondoh K, Terasawa K, Morimoto H, Nishida E (2006) Regulation of nuclear translocation of extracellular signal-regulated kinase 5 by active nuclear import and export mechanisms. *Mol Cell Biol* 26: 1679-1690.

Kondratyev A, Gale K (2004) Latency to onset of status epilepticus determines molecular mechanisms of seizure-induced cell death. *Brain Res Mol Brain Res* 5: 86-94.

Konopleva M, Zhao S, Xie Z, Segall H, Younes A, Claxton DF, Estrov Z, Kornblau SM, Andreeff M (1999) Apoptosis. Molecules and mechanisms. *Adv Exp Med Biol* 457: 217-236.

Kopke E, Tung YC, Shaikh S, Alonso AC, Iqbal K, Grundke-Iqbal I (1993) Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J Biol Chem* 268: 24374-24384.

Kops GJ, de Ruiter ND, De Vries-Smits AM, Powell DR, Bos JL, Burgering BM (1999) Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature* 398: 630-634.

Korhonen JM, Said FA, Wong AJ, Kaplan DR (1999) Gab1 mediates neurite outgrowth, DNA synthesis, and survival in PC12 cells. *J Biol Chem* 274: 37307-37314.

Kosaka T, Wu JY, Benoit R (1988) GABAergic neurons containing somatostatin-like immunoreactivity in the rat hippocampus and dentate gyrus. *Exp Brain Res* 71: 388-398.

Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Shiber MJ, Fenton W, Reed JC (1993) Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res* 53: 4701-4704.

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

Kroemer G, Marino G, Levine B (2010) Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* 40: 280-293.

Kuan CY, Yang DD, Samanta Roy DR, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA (1999) The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron* 22: 667-676.

Kuan CY, Whitmarsh AJ, Yang DD, Liao G, Schloemer AJ, Dong C, Bao J, Banasiak KJ, Haddad GG, Flavell RA, Davis RJ, Rakic P (2003) A critical role of neural-specific JNK3 for ischemic apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 15184-15189.

Kuan CY, Burke RE (2005) Targeting the JNK signaling pathway for stroke and Parkinson's diseases therapy. *Curr Drug Targ CNS Neurol Disord* 4: 63-67.

Kumar A, Redondo-Muñoz J, Perez-García, V, Cortes I, Chagoyen M, Carrera A (2011) Nuclear but not cytosolic phosphoinositide 3-kinase beta has an essential function in cell survival. *Mol and Cell Biol* 31: 2122-2133.

Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, Bonzon C, Sullivan BA, Green DR, Newmeyer DD(2005) BH3domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell* 17:525-535.

Kyriakis JM, App H, Zhang FX, Banerjee P, Brautigan DL, Rapp UR, Avruch J (1992) Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* 358: 417-421.

Kyriakis JM, Avruch J (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81: 807-869.

Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR (1994) The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 369: 156-160.

Lawler S, Fleming Y, Goedert M, Cohen P (1998) Synergistic activation of SAPK1/JNK1 by two MAP kinase kinases in vitro. *Curr Biol* 8: 1387-1390.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Lawlor MA, Alessi DR (2001) PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Sci* 114: 2903-2910.

Le-Niculescu H, Bonfoco E, Kasuya Y, Claret FX, Green DR, Karin M (1999) Withdrawal of survival factors results in activation of the JNK pathway in neuronal cells leading to Fas ligand induction and cell death. *Mol Cell Biol* 19: 751-763.

Lee N, MacDonald H, Reinhard C, Halenbeck R, Roulston A, Shi T, Williams LT (1997) Activation of hPAK65 by caspase cleavage induces some of the morphological and biochemical changes of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 13642-13647.

Lee JK, Park J, Lee YD, Lee SH, Han PL (1999) Distinct localization of SAPK isoforms in neurons of adult mouse brain implies multiple signaling modes of SAPK pathway. *Brain Res Mol Brain Res* 70: 116-124.

Lee CL, Onesime D, Reddy CD, Dhanasekaran N, Reddy EP (2002) JLP: A scaffolding protein that tethers JNK/p38MAPK signaling modules and transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 14189-14194.

Lee ST, Park JE, Kim DH, Kim S, Im WS, Kang L, Jung SH, Kim MW, Chu K, Kim M (2007) Granulocyte-colony stimulating factor attenuates striatal degeneration with activating survival pathways in 3-nitropropionic acid model of Huntington's disease. *Brain Res* 1194: 130-137.

Lechner C, Zahalka MA, Giot JF, Moller NP, Ullrich A (1996) ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 4355-4359.

Levine B, Klionsky DJ (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 6: 463-477.

Levine B, Kroemer G (2008) Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132: 27-42.

Lévesque M, Langlois JM, Lema P, Courtemanche R, Bilodeau GA, Carmant L (2009) Synchronized gamma oscillations (30-50 Hz) in the amygdalo-hippocampal network in relation with seizure propagation and severity. *Neurobiol Dis.* 35: 209-218.

Lévesque M, Avoli M (2013) The kainic acid model of temporal lobe epilepsy. *Neurosci Biobehav Rev* 37: 2887-2899.

Li Z, Jiang Y, Ulevitch RJ, Han J (1996) The primary structure of p38gamma: a new member of p38 group of MAP kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 228: 334-340.

Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of APaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91: 479-489.

Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94: 491-501.

Li CH, Wang RM, Zhang QG, Zhang GY (2005) Activated mitogen-activated protein kinase kinase 7 redistributes to the cytosol and binds to Jun N-terminal kinase-interacting protein 1 involving oxidative stress during early reperfusion in rat hippocampal CA1 region. *J Neurochem* 93: 290-298.

Liang J, Shao SH, Xu ZX, Hennessy B, Ding Z, Larrea M, Kondo S, Dumont DJ, Gutterman JU, Walker CI, Singerland JM, Mills GB (2007) The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27 (kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nat Cell Biol* 9: 218-224.

Lidwell K, Griffiths R (2000) Possible role for the FosB/JunD AP-1 transcription factor complex in glutamate-mediated excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J Neurosci Res* 62: 427-439.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Lieberman AP, Pitha PM, Shin HS, Shin ML (1989) Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 6348-6352.

Lin Y, Devin A, Rodriguez Y, Liu ZG (1999) Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *GenesDev* 13: 2514-2526.

Lin A, Dibling B (2002) The true face of JNK activation in apoptosis. *Aging Cell* 1: 112-116.

Lin CC, Hsieh HL, Shih RH, Chi PL, Cheng SE, Yang CM (2013) Up-regulation of COX-2/PGE2 by endothelin-1 via MAPK-dependent NF- κ B pathway in mouse brain microvascular endothelial cells. *Cell Commun Signal* 11: 8.

Lin SS, Zhu B, Guo ZK, Huang GZ, Wang Z, Chen J, Wei XJ, Li Q (2014) Bone marrow mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect rat pheochromocytoma PC12 cells from glutamate-induced injury via a PI3K/Akt dependent pathway. *Neurochem Res* 39: 922-931.

Liot G, Bossy B, Lubitz S, Kushnareva Y, Sejbuk N, Bossy-Wetzl E (2009) Complex II inhibition by 3-NP causes mitochondrial fragmentation and neuronal cell death via an NMDA- and ROS-dependent pathway. *Cell Death Differ* 16: 899-909.

Liu X, Luo X, Hu W (1992) Studies on the epidemiology and etiology of moldy sugarcane poisoning in China. *Biomed Environ Sci* 5:161-177

Liu YF (1998) Expression of polyglutamine-expanded Huntingtin activates the SEK1-JNK pathway and induces apoptosis in a hippocampal neuronal cell line. *J Biol Chem* 273: 28873-28877.

Liu YF, Dorow D, Marshall J (2000) Activation of MLK2-mediated signaling cascades by polyglutamine-expanded huntingtin. *J Biol Chem* 275: 19035-19040.

Liu J, Lin A (2005) Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword. *Cell Res* 15: 36-42.

Lopez-Martin E, Bregains J, Relova-Quinteiro JL, Cadarso-Suarez C, Jorge-Barreiro FJ, Ares-Pena FJ (2009) The action of pulse-modulated GSM radiation increases regional changes in brain activity and c-Fos expression in cortical and subcortical areas in a rat model of picrotoxin-induced seizure proneness. *J Neurosci Res* 87: 1484-1499.

Ludolph AC, He F, Spencer PS, Hammerstad J, Sabri M (1991) 3-Nitropropionic acid-exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin. *Can J Neurol Sci* 18: 492-498.

Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X (1998) Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94: 481-490.

Madesh M, Antonsson B, Srinivasula SM, Alnemri ES, Hajnóczky G (2002) Rapid kinetics of tBid-induced cytochrome c and Smac/DIABLO release and mitochondrial depolarization. *J Biol Chem* 277: 5651-5659.

Mack CL, Vanderlugt-Castaneda CL, Neville KL, Miller SD (2003) Microglia are activated to become competent antigen presenting and effector cells in the inflammatory environment of the Theiler's virus model of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 144: 68-79.

Marani M, Tenev T, Hancock D, Downward J, Lemoine NR (2002) Identification of novel isoforms of the BH3 domain protein Bim which directly activate Bax to trigger apoptosis. *Mol Cell Biol* 22: 3577-3589.

Mariani SM, Matiba B, Armandola EA, Krammer PH (1997) Interleukin 1 beta-converting enzyme related proteases/caspases are involved in TRAIL-induced apoptosis of myeloma and leukemia cells. *J Cell Biol* 137: 221-229.

Marmor MD, Skaria KB, Yarden Y (2004) Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58: 903-913.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Marqués M, Kumar A, Cortés I, Gonzalez-García A, Hernández C, Moreno-Ortiz MC, Carrera AC (2008) PI3K p110 α and p110 β regulate cell cycle entry, exhibiting distinct activation kinetics in G1 phase. *Mol Cell Biol* 28: 2803-2814.

Marqués M, Kumar A, Poveda AM, Zuluaga S, Hernández C, Jackson S, Pasero P, Carrera AC (2009) Specific function of PI3K beta in the control of DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 7525-7530.

Martelli AM, Faenza I, Billi AM, Manzoli L, Evangelisti C, Falà F, Cocco L (2006) Intranuclear 3'-phosphoinositide metabolism and Akt signaling: new mechanisms for tumorigenesis and protection against apoptosis? *Cell Signal* 18: 1101-1107.

Martin LJ (2001) Neuronal Cell death in nervous system development, disease and injury. *Int J Mol Med* 7: 455-478.

Martin SJ, O'Brien GA, Nishioka WK, McGahon AJ, Mahboubi A, Saido TC, Green DR (1995) Proteolysis of fodrin (nonerythroid spectrin) during apoptosis. *J Biol Chem* 270: 6425-6428.

Marsters SA, Pitti RM, Donahue CJ, Ruppert S, Bauer KD, Ashkenazi A (1996) Activation of apoptosis by Apo2 ligand is independent of FADD but blocked by CrmA. *Curr Biol* 6: 750-752.

Marsters SA, Sheridan JP, Pitti RM, Brush J, Goddard A, Ashkenazi A (1998) Identification of a ligand for the death-domain-containing receptor Apo3. *Curr Biol* 8: 525-528.

Meade AJ, Meloni BP, Cross J, Bakker AJ, Fear MW, Mastaglia FL, Watt PM, Knuckey NW (2010a) AP-1 inhibitory peptides are neuroprotective following acute glutamate excitotoxicity in primary cortical neuronal cultures. *J Neurochem* 112: 258-270.

Meade AJ, Meloni BP, Mastaglia FL, Watt PM, Knuckey NW (2010b) AP-1 inhibitory peptides attenuate in vitro cortical neuronal cell death induced by kainic acid. *Brain Res* 1360: 8-16.

Migheli A, Piva R, Atzori C, Troost D, Schiffer D (1997) c-Jun, JNK/SAPK kinases and transcription factor NF-kappa B are selectively activated in astrocytes, but not motor neurons, in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 56: 1314-1322.

Mirandola SR, Melo DR, Saito A, Castillo RF (2010) 3-nitropropionic acid-induced mitochondrial permeability transition: comparative study of mitochondria from different tissues and brain regions. *J Neurosci Res* 88: 630-639.

Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451: 1069-1075.

Momeni HR (2011) Role of calpain in apoptosis. *Cell Journal* 13: 65-72.

Monaghan P, Robertson D, Amos TAS, Dyer MJ, Mason DY, Greaves MF (1992) Ultrastructural localization of bcl-2 protein. *J HistochemCytochem* 40: 1819-1825.

Morales I, Guzmán-Martinez L, Cerdo-Trancoso C, Farías GA, Maccioni RB (2014) Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel work therapeutic approaches. *Front Cell Neurosci* 8: 112.

Mori H, Masaki H, Yamakura T, Mishina M (1992) Identification by mutagenesis of a Mg(2+)-block site of the NMDA receptor channel. *Nature* 358: 673-675.

Mori M, Burgess DL, Gefrides LA, Foreman PJ, Opferman JT, Korsmeyer SJ, Cavalheiro EA, Naffah-Mazzacoratti MG, Noebels JL (2004) Expression of apoptosis inhibitor protein Mcl1 linked to neuroprotection in CNS neurons. *Cell Death Differ* 11: 1223-1233.

Morishima Y, Gotoh Y, Zieg J, Barrett T, Takano Flavell R, davis RJ, Shirasaki Y, Greenberg ME (2001) Beta-amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand. *J Neurosci* 21: 7551-60.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Morrison BH, Haney R, Lamarre E, Drazba J, Prestwich GD, Lindner DJ (2009) Gene deletion of inositol hexakisphosphate kinase 2 predisposes to aerodigestive tract carcinoma. *Oncogene* 28: 2383-2392.

Morrison DK, Davis RJ (2003) Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 91-118.

Mouatt-Prigent A, Karlsson JO, Agid Y, Hirsch EC (1996) Increased m-calpain expression in the mesencephalon of patients with Parkinson's disease but not in other neurodegenerative disorders involving the mesencephalon: a role in nerve cell death? *Neuroscience* 73: 979-987.

Moubarak RS, Yuste VJ, Artus C, Bouharrou A, Greer PA, Minissier-de Murcia J, Susin SA (2007) Sequential activation of poly(ADP-ribose) polymerase 1, calpains, and Bax is essential in apoptosis-inducing factor-mediated programmed necrosis. *Mol Cell Biol* 27: 4844-4862.

Movassagh M, Foo RSY (2008) Simplified apoptotic cascades. *Heart Fail Rev* 13: 111-119.

Murakami S, Takemoto T, and Shimizu Z (1953) The effective principle of *Diginea simplex* Aq. I. Separation of the effective fractions by liquid chromatography. *J Pharm Soc Japan* 73: 1026.

Nadler JV (1981) Kainic acid as a tool for the study of temporal lobe epilepsy. *Life Sci* 29: 2031-2042.

Nagata S (1997) Apoptosis mediated by Fas and its related diseases. *Nihon Ika Daigaku Zasshi* 64: 459-462.

Nagata S, Golstein P (1995) The Fas death factor. *Science* 267: 1449-1456.

Nakaki T, Mishima A, Suzuki E, Shintani F, Fujii T (2000) Glufosinate ammonium stimulates nitric oxide production through N-methyl D-aspartate receptors in rat cerebellum. *Neurosci Lett* 290: 209-212.

Namura S, Iihara K, Takami S, Nagata I, Kikuchi H, Matsushita, Moskowitz MA, Bonventre JV, Alessandrini A (2001) Intravenous administration of MEK inhibitor U0126 affords brain

protection against forebrain ischemia and focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 11569-11574.

Naor Z, Benard O, Seger R (2000) Activation of MAPK cascades by G-protein coupled receptors: the case of gonadotropin-releasing hormone receptor. *Trends Endocrinol Metab* 11: 91-99.

Negri S, Oberson A, Steinmann M, Sauser C, Nicod P, Waeber G (2000). cDNA cloning and mapping of a novel islet-brain/JNK-interacting protein. *Genomics* 64: 324-330.

Neumar RW, Meng FH, Mills AM, Xu Ya, Zhang C, Welsh FA (2001) Calpain activity in rat brain after transient forebrain ischemia. *Exp Neurol* 170: 27-35.

Nguyen Q, Lee CM, Reddy EP (2005) JLP associates with kinesin light chain 1 through a novel leucine zipper-like domain. *J Biol Chem* 280: 30185-30191.

Nihalani D, Wong HN, Holzman LB (2003) Recruitment of JNK to JIP1 and JNK-dependent JIP1 phosphorylation regulates JNK module dynamics and activation. *J Biol Chem* 278: 28694-28702.

Nikoletopoulou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N (2013) Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* 1833.

Niquet J, Ben-Ari Y, Represa A (1994) Glial reaction after seizure induced hippocampal lesion: immunohistochemical characterization of proliferating glial cells. *J Neurocytol* 23: 641-656.

Nishina H, Vaz C, Billia P, Nghiem M, Sasaki T, De la Pompa JL, Furlonger K, Paige C, Hui C, Fischer KD, Kishimoto H, Iwatsubo T, Katada T, Woodgett JR, Penninger JM (1999) Defective liver formation and liver cell apoptosis in mice lacking the stress signaling kinase SEK1/MKK4. *Development* 126: 505-516.

Nishiyama K, Kwak S, Takekoshi S, Watanabe K, Kanazawa I (1996) In situ nick end-labeling detects necrosis of hippocampal pyramidal cells induced by kainic acid. *Neurosci Lett* 212: 139-142.

Novelli A, Reilly JA, Lysko PG, Henneberry RC (1988) Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain Res* 451: 205-212.

Oberst A, Pop C, Tremblay AG, Blais V, Denault JB, Salvesen GS, Green DR (2010) Inducible dimerization and inducible cleavage reveal a requirement for both processes in caspase-8 activation. *J BiolChem* 285: 16632-16642.

Oleinik NV, Krupenko NI, Krupenko SA (2007) Cooperation between JNK1 and JNK2 in activation of p53 apoptotic pathway. *Oncogene* 26: 7222-7230.

Oo TF, Henchcliffe C, James D, Burke RE (1999) Expression of c-fos, c-jun, and c-jun N-terminal kinase (JNK) in a developmental model of induced apoptotic death in neurons of the substantia nigra. *J Neurochem* 72: 557-564.

Osaki M, Oshimura M, Ito H (2004) PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis* 6: 667-676.

Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB (1999) NF- κ B activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* 401: 82-85.

Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J, Dixit VM (1997) The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 276: 111-113.

Pan G, Ni J, Yu G, Wei YF, Dixit VM (1998) TRUNDD, a new member of the TRAIL receptor family that antagonizes TRAIL signaling. *FEBS Lett* 424: 41-45.

Pan J, Pei DS, Yin XH, Hui L, Zhang GY (2006) Involvement of oxidative stress in the rapid Akt1 regulating a JNK scaffold during ischemia in rat hippocampus. *Neuroscience Letters* 392: 47-51.

Pan J, Xiao Q, Sheng CY, Hong Z, Yang HQ, Wang G, Ding JQ, Chen SD (2009) Blockade of the translocation and activation of c-Jun N-terminal kinase 3 (JNK3) attenuates dopaminergic neuronal damage in mouse model of Parkinson's disease. *Neurochem Int* 54: 418-425.

Patel S, Meldrum BS, Collins JF (1986) Distribution of [3H]kainic acid and binding sites in the rat brain: in vivo and in vitro receptor autoradiography. *Neurosci Lett* 70: 301-307.

Patzke H, Tsai LH (2002) Calpain-mediated cleavage of the cyclin-dependent kinase-5 activator p39 to p29. *J Biol Chem* 277: 8054-8060.

Pearson AG, Byrne UT, MacGibbon GA, Faull RL, Dragunow M (2006) Activated c-Jun is present in neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease brains. *Neurosci Lett* 398: 246-250.

Perez-De La Cruz V, Santamaria A (2007) Integrative hypothesis for Huntington's disease: a brief review of experimental evidence. *Physiol Res*. 56: 513-526.

Perry G, Roder H, Nunomura A, Takeda A, Friedlich AL, Zhu X, Raina AK, Holbrook N, Siedlak SL, Harris PL, Smith MA (1999) Activation of neuronal extracellular receptor kinase (ERK) in Alzheimer disease links oxidative stress to abnormal tau phosphorylation. *Neuro report* 10: 2411-2415.

Perry VH, Nicoll JAR, Holmes C (2010) Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 6: 193-201.

Pietrobon D, Di Virgilio F, Pozzan T (1990) Structural and functional aspects of calcium homeostasis in eukaryotic cells. *Eur J Biochem* 193: 599-622.

Pirianov G, Brywe KG, Mallard C, Edwards AD, Flavell RA, Hagberg H, Mehmet H (2007) Deletion of the c-Jun N-terminal kinase 3 gene protects neonatal mice against cerebral hypoxic-ischaemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 27: 1022-1032.

Pitkanen A, Sutula TP (2002) Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. *Lancet Neurol* 1: 173-181.

Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A (1996) Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* 271: 12687-12690.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Ploia C, Antoniou X, Sclip A, Grande V, Cardinetti D, Colombo A, Canu N, Benussi L, Ghidoni R, Forloni G, Borsello T (2011) JNK plays a key role in tau hyperphosphorylation in Alzheimer's disease models. *J Alzheimers Dis* 26: 315-329.

Pozas E, Ballabriga J, Planas AM, Ferrer I (1997) Kainic acid-induced excitotoxicity is associated with a complex c-Fos and c-Jun response which does not preclude either cell death or survival. *J Neurobiol* 33: 232-246.

Prast H, Philippu A. (2001) Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol* 64: 51-68.

Pulverer BJ, Kyriakis JM, Avruch J, Nikolakaki E, Woodgett JR (1991) Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* 353: 670-674.

Qi Sh, Zhao H, Gong JJ, Sun FM, Yue J, Guan QH, Wang M (2011) Neuroprotection of paclitaxel against cerebral ischemia/reperfusion-induced brain injury through JNK3 signaling pathway. *J Recept Signal Transduct Res* 31: 402-407.

Rane SG (1999) Ion channels as physiological effectors for growth factor receptor and Ras/ERK signaling pathways. *Adv Second Messenger Phospho protein Res* 33: 107-127.

Rao F, Cha J, Xu J, Xu R, Vandiver MS, Tyagi R, Tokhunts R, Koldobskiy MA, Fu C, Barrow R, Wu M, Fiedler D, Barrow JC, Snyder SH (2014) Inositol Pyrophosphates Mediate the DNA-PK/ATM-p53 Cell Death Pathway by Regulating CK2 Phosphorylation of Tti1/Tel2. *Molecular Cell* 54: 119-132.

Ray SK, Shields DC, Saïdo TC, Matzelle DC, Wilford GG, Hogan EL (1999) Calpain activity and translational expression increased in spinal cord injury *Brain Res* 816: 375-380.

Ray SK, Neuberger TJ, Deadwyler G, Wilford G, DeVries GH, Banik NL (2002) Calpain and calpastatin expression in primary oligodendrocyte culture: preferential localization of membrane calpain in cell processes. *J Neurosci Res* 70: 561-569.

Ray SK, Hogan EL, Banik NL (2003) Calpain in the pathophysiology of spinal cord injury: neuroprotection with calpain inhibitors. *Brain Res Rev* 42: 169-185.

Ravizza T, Rizzi M, Perego C, Richichi C, Veliskova J, Moshe SL, De Simoni MG, Vezzani A (2005) Inflammatory response and glia activation in developing rat hippocampus after status epilepticus. *Epilepsia* 5: 113-117.

Recipi M, Borsello T (2006) Jnk pathway as a therapeutic target to prevent degeneration in the central nervous system. *Adv Exp Med Biol* 588: 145-155.

Reed JC (1999) Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol* 17:2941-53.

Reynolds CH, Betts JC, Blackstock WP, Nebreda AR, Andeson BH (2000) Phosphorylation sites on Tau identified by Nanoelectrospray mass spectrometry: differences in vitro between the Mitogen-Activated Protein Kinase ERK2, C-Jun N-terminal Kinase and p38, and Glycogen Synthase Kinase 3b. *J Neurochem* 74: 1587-1595.

Ribak CE, Seress L, Amaral DG (1985) The development, ultrastructure and synaptic connections of the mossy cells of the dentate gyrus. *J Neurocytol* 14: 835-857.

Riedl SJ, Shi Y (2004) Molecular mechanism of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 897-907.

Roberts PJ, Der CJ (2007) Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 26: 3291-3310.

Robbins DJ, Zhen E, Owaki H, Vanderbilt CA, Ebert D, Geppert TD, Cobb MH (1993) Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in vitro. *J Biol Chem* 268: 5097-5106.

Robinson JH, Deadwyler SA (1981) Kainic acid produces depolarization of CA3 pyramidal cells in the vitro hippocampal slice. *Brain Res* 221: 117-127.

Rogawski MA, Gryder D, Castaneda D, Yonekawa W, Banks MK, Lia H (2003) GluR5 kainate receptors, seizures, and the amygdala. *Ann N Y Acad Sci* 985: 150-162.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Romashkova JA, Makarov SS (1999) NF- κ B is a target of AKT in antiapoptotic PDGF signalling. *Nature* 401: 86-90.

Rosenstock TR, Carvalho AC, Jurkiewicz A, Frussa-Filho R, Smaili SS (2004) Mitochondrial calcium, oxidative stress and apoptosis in a neurodegenerative disease model induced by 3-nitropropionic acid. *J Neurochem* 88: 1220-1228.

Rotonda J, Nicholson DW, Fazil KM, Gallant M, Gareau Y, Labelle M, Peterson EP, Rasper DM, Ruel R, Vaillancourt JP, Thornberry NA, Becker JW (1996) The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat Struct Biol* 3: 619-625.

Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, Hunt T, Nebreda AR (1994) A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* 78: 1027-1037.

Roux PP, Blenis J (2004) ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 68: 320-344.

Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC (1997) The c-IAP-1 and C-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J* 16:6914-6925.

Sabapathy K, Jochum W, Hochedlinger K, Chang L, Karin M, Wagner EF (1999) Defective neural tube morphogenesis and altered apoptosis in the absence of both JNK1 and JNK2. *Mech Dev* 89: 115-124.

Saikumar P, Dong Z, Weinberg JM, Venkatachalam MA (1998) Mechanisms of cell death in hypoxia/reoxygenation injury. *Oncogene* 17: 3341-3349.

Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Dentol M, Weinberg JM, Venkatachalam MA (1999) Apoptosis: Definition, mechanisms and Relevance to disease. *Am J Med* 107: 489-506.

Salvesen GS, Dixit VM (1999) Caspase activation: The induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 10964-10967.

Sánchez-Perez I, Murguía JR, Perona R (1998) Cisplatin induces a persistent activation of JNK that is related to cell death. *Oncogene* 16: 533-540.

Santella L, Carafoli E (1997) Calcium signaling in the cell nucleus. *Faseb J* 11: 1091-1109.

Saporito MS, Thomas BA, Scott RW (2000) MPTP activates c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK) and its upstream regulatory kinase MKK4 in nigrostriatal neurons in vivo. *J Neurochem* 75: 1200-1208.

Saporito MS, Hudkins RL, Maroney AC (2002) Discovery of CEP-1347/KT-7515, an inhibitor of the JNK/SAPK pathway for the treatment of neurodegenerative diseases. *Prog Med Chem* 40:23-62.

Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH (1999) The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem* 274: 1541-1548.

Schauwecker PE (2000) Seizure-induced neuronal death is associated with induction of c-Jun N terminal kinase and is dependent on genetic background. *Brain Res* 884: 116-128.

Scheller C, Knoferle J, Ullrich A, Pröttinger J, Racek T, Sopper S, Jassoy C, Rethwilm A, Koutsillieri E (2006) Caspase inhibition in apoptotic T cells triggers necrotic cell death depending on the cell type and the proapoptotic stimulus. *J Cell Biochem* 1350-1361.

Schmitz I, Kirchhoff S, Krammer PM (2000) Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 32: 1123-1136.

Schmued LC, Albertson C, Slikker WJ (1997) Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. *Brain Res* 751: 37-46.

Schneider P, Bodmer JL, Thome M, Hofmann K, Holler N, Tschopp J (1997) Characterization of two receptors for TRAIL. *FEBS Lett* 416: 329-334.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Schoorlemmer J, Goldfarb M (2002) Fibroblast growth factor homologous factors and the islet brain-2 scaffold protein regulate activation of a stress-activated protein kinase. *J Biol Chem* 277: 49111-49119.

Schulz JB, Matthews RT, Jenkins BG, Ferrante RJ, Siwek D, Henshaw DR, Cipolloni PB, Mecocci P, Kowall NW, Rosen BR (1995) Blockade of neuronal nitric oxide synthase protects against excitotoxicity in vivo. *J Neurosci* 15: 8419-8429.

Schutze S, Tchikov V, Schneider-Brachert W (2008) Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 655-662.

Sclip A, Antoniou X, Colombo A, Camici GG, Pozzi L, Cardinetti D, Feligioni M, Veglianese P, Bahlmann FH, Cervo L, Balducci C, Costa C, Tozzi A, Calabresi P, Forloni G, Borsello T (2011) c-Jun N-terminal kinase regulates soluble A β oligomers and cognitive impairment in AD mouse model. *J Biol Chem*. 286:43871-43880.

Sclip A, Tozzi A, Abaza A, Cardinetti D, Colombo I, Calabresi P, Salmona M, Welker E, Borsello T (2014) c-Jun N-terminal kinase has a key role in Alzheimer disease synaptic dysfunction in vivo. *Cell Death Dis*. 5: e1019.

Seger R, Seger D, Lozeman FJ, Ahn NG, Graves LM, Campbell JS (1992) Human T-cell Map kinase kinases are related to yeast signal transduction kinases. *J Biol Chem* 267: 25628-25631.

Segura T, Galindo MF, Rallo-Gutiérrez B, Ceña V, Jordán J (2003) Pharmacological targets in neurodegenerative diseases. *Rev Neurol* 36: 1047-1057.

Segura-Torres JE, Chaparro-Huerta V, Rivera Cervantres MC, Montes-González R, Flores Soto ME, Beas-Zárate C (2006) Neuronal cell death due to glutamate excitotoxicity is mediated by p38 activation in the rat cerebral cortex. *Neurosci Lett* 403: 233-238.

Seo J, Hong J, Lee SJ, Choi SY (2012) c-Jun N-terminal phosphorylation is essential for hippocampal synaptic plasticity. *Neurosci Lett* 531:14-19.

Seshagiri S, Miller LK. (1997), *Caenorhabditis elegans* CED-4 stimulates CED-3 processing and CED-3-induced apoptosis. *Curr Biol.* 7: 455-460.

Silva RM, Kuan CY, Rakic P, Burke RE (2005) Mixed lineage kinase-c-jun N-terminal kinase signaling pathway: a new therapeutic target in Parkinson's disease. *Mov Disor* 20: 653-64.

Sgado P, Albéri L, Gherbassi D, Galasso S, Ramakers GMJ, Alavian KN, Smidt MP, Dyck RH, Simon HH (2006) Slow progressive degeneration of nigral dopaminergic neurons in postnatal Engrailed mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 15242-15247.

Shah GM, Shah RG, Poirier GG (1996) Different cleavage pattern of poly(ADP-ribose)polymerase during necrosis and apoptosis in HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 229: 838-844.

Shastri A, Bonifati DM, Kishore V (2013) Innate Immunity and Neuroinflammation. *Mediators Inflamm* 2013: 342931.

Shinoda S, Skradski SL, Araki T, Schindler CK, Meller R, Lan JQ, Taki W, Simon RP, Henshall DC (2003) Formation of a tumour necrosis factor receptor 1 molecular scaffolding complex and activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 during seizure-induced neuronal death. *Eur J Neurosci* 17: 2065-2076.

Shinoda S, Araki T, Lan JQ, Schindler CK, Simon RP, Taki W, Henshall DC (2004) Development of a model of seizure-induced hippocampal injury with features of programmed cell death in the BALB/c mouse. *J Neurosci Res* 76: 121-128.

Siman R, Card JP, Davis LG (1990) Proteolytic processing of beta amyloid precursor by calpain I. *J Neurosci* 10: 2400-2411.

Skulachev VP (2006) Bioenergetics aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. *Apoptosis* 11: 473-485.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Slevin M, Krupinski J, Slowik A, Rubio F, Szczudlik A, Gaffney J (2000) Activation of MAP kinase (ERK-1/ERK-2), tyrosine kinase and VEGF in the human brain following acute ischaemic stroke. *Neuro report* 11: 2759-2764.

Smith CA, Farrah T, Goodwin RG (1994) The receptor TNF superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation and death. *Cell* 76: 959-962.

Smith PD, Mount MP, Shree R, Callaghan S, Slack RS, Anisman H, Vincent I, Wang X, Mao Z, Park DS (2006) Calpain-regulated p35/cdk5 plays a central role in dopaminergic neuron death through modulation of the transcription factor myocyte enhancer factor 2. *J Neurosci* 26: 440-447.

Smith MA, Schnellmann RG (2012) Calpains, mitochondria and apoptosis. *Cardiovascular Research* 96: 32-37.

Song JJ, Lee YJ (2005) Dissociation of Akt1 from its negative regulator JIP1 is mediated through the ASK1-MEK-JNK signal transduction pathway during metabolic oxidative stress: a negative feedback loop. *J Cell Biol* 4: 61-72.

Spector MS, Desnoyers S, Hoepfner DJ, Hengartner MO (1997), Interaction between the C. elegans cell death regulators CED-9 and CED-4. *Nature*. 385: 653-656.

Sprick MR, Weigand MA, Rieser E, Rauch CT, Juo P, Blenis J, Krammer PH, Walczak H (2000) FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity* 6: 599-609.

Springer JE, Azbill RD, Kennedy SE, George J, Geddes JW (1997) Rapid calpain I activation and cytoskeletal protein degradation following traumatic spinal cord injury: attenuation with riluzole pretreatment. *J Neurochem* 69: 1592-1600.

Stancium M, Wang Y, Kentor R, Burke N, Watkins S, Kress G, Reynolds I, Klann E, Angiolieri MR, Johnson JN, DeFranco DB (2000) Persistent activation of ERK contributes to glutamate-induced

oxidative toxicity in a neuronal cell line and primary cortical neuron cultures. *J Biol Chem* 275: 12200-12206.

Stegh AH, Peter ME (2002) Apoptosis and caspases. *Cardiol Clin* 19: 13-29.

Streit WJ (2005) Microglia and neuroprotection: implications for Alzheimer's disease. *Brain Res Rev* 48: 234-239.

Strasser A (2005) The role of BH3 only proteins in immune system. *Nat Rev Immunol* 5: 189-200.

Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S (1993) Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75: 1169-1178.

Sullivan PG, Rabchevsky AG, Waldmeier PC, Springer JE (2005) Mitochondrial permeability transition in CNS trauma: causa or effect of neuronal cell death? *J Neurosci Res* 79: 231-239.

Sun W, Gould TW, Newbern J, Milligan C, Choi SY, Kim H, Oppenheim RW (2005) Phosphorylation of c-Jun in avian and mammalian motoneurons in vivo during programmed cell death: an early reversible event in the apoptotic cascade. *J Neurosci* 25: 5595-5603.

Sweatt JD (2004) Hippocampal function in cognition. *Psychopharmacology* 174: 99-110.

Takeda K, Ichijo H (2002) Neuronal p38 MAPK signalling: an emerging regulator of cell fate and function in the nervous system. *Genes to Cells* 7: 1099-1111.

Tanoue T, Adachi M, Moriguchi T, Nishida E (2000) A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nat Cell Biol* 2:110-116.

Tapia R, Medina-Ceja L, Peña F (1999) On the relationship between extracellular glutamate, hyperexcitation and neurodegeneration, *in vivo*. *Neurochem Int* 34: 23-31.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Tararuk T, Ostman N, Li W, Bjorkblom B, Padzik A, Zdrojewska J, Hongisto V, Herdegen T, Konopka W, Courtney MJ, (2006) JNK1 phosphorylation of SCG10 determines microtubule dynamics and axodendritic length. *J Cell Biol.* 173: 265–277.

Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH (1993) A novel domain within the 55 kD TNF receptor signals cell death. *Cell* 74: 845-853.

Tartaglia LA, Goeddel DV (1992) Two TNF receptors. *Immunol Today* 13: 151-153.

Thome M, Schneider MP, Hofmann K, Fickenscher H, Meinil E, Neipel F, Krammer PH, Peter ME, Tschopp JT (1997) Viral FLICE-inhibitor proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 386: 517-521.

Toker A, Newton AC (2000) Cellular signaling: pivoting around PDK-1. *Cell* 103: 185-188.

Tournier C, Hess P, Yang DD, Xu J, Turner TK, Nimnual A, Bar-Sagi D, Jones SN, Flavell RA, Davis RJ (2000) Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome *c*-mediated death pathway. *Science* 288: 870-4.

Tournier C, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Barrett T, Davis RJ (1999) The MKK7 gene encodes a group of c-Jun NH2-terminal kinase kinases. *Mol Cell Biol* 19: 1569-1581.

Torii S, Nakayama K, Yamamoto T, Nishida E (2004) Regulatory mechanisms and function of ERK MAP Kinases. *J Biochem* 136: 557-561.

Tschopp J, Irmeler M, Thome M (1998) Inhibition of fas death signals by FLIPs. *Curr Opin Immunol* 10: 552-558.

Tsuji T, Shimohama S, Kimura J, Shimizu K (1998) m-Calpain (calcium-activated neutral proteinase) in Alzheimer's disease brains. *Neurosci Lett* 248: 109-112.

Tsujimoto Y, Shimizu S (2007) Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. *Apoptosis* 12: 835-840.

Túnez I, Tasset I, Pérez-De La Cruz V, Santamaría A (2010) 3-Nitropropionic acid as a tool to study the mechanisms involved in Huntington's disease: past, present and future. *Molecules* 15: 878-916.

Turan N, Csonka C, Csont T, Giricz Z, Fodor G, Bencsik P, Gyöngyösi M, Cakici I, Ferdinandy P (2006) The role of peroxynitrite in chemical preconditioning with 3-nitropropionic acid in rat hearts. *Cardiovasc Res.* 70: 384-390.

Ubeda M, Vallejo M, Habener JF (1999) CHOP enhancement of gene transcription by interactions with Jun/Fos AP-1 complex proteins. *Mol Cell Biol* 19: 7589-7599.

Ueyama H, Kumamoto T, Fujimoto S, Murakami T, Tsuda T (1998) Expression of three calpain isoform genes in human skeletal muscles. *J Neurol Sci* 155: 163-169.

Uhlik MT, Abell AN, Cuevas BD, Nakamura K, Johnson GL (2004) Wiring diagrams of MAPK regulation by MEKK1, 2, and 3. *Biochem Cell Biol* 82: 658-663.

Vandenabeele P, Galluzi L, VandenBerghe T, Kroemer G (2010) Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 700-714.

Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Ahmadi K, Timms J, Katso R, Driscoll PC, Woscholski R, Parker PJ, Waterfield MD (2001) Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem* 70: 535-602.

Vanhaesebroeck B, Waterfield MD (1999) Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp Cell Res* 253: 239-254.

Vercammen D, Brouckaert G, Denecker G, Van de Craen M, Declercq W, Fiers W, Vandenabeele P (1998) Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways. *J Exp Med* 188: 919-930.

Vincent P, Mulle C (2009) Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity. *Neuroscience* 158: 309-323.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Vila M, Przedborski S (2003) Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience* 4: 365-375.

Vilta P, Kaufmann SH, Earnshaw WC (1997) Caspases and caspase inhibitors. *TIBS* 22: 388-393.

Vinet J, Weering HR, Heinrich A, Kalin RE, Wegner A, Brouwer N, Heppner FL, Rooijen Nv, Boddeke HW, Biber K (2012) Neuroprotective function for ramified microglia in hippocampal excitotoxicity. *J Neuroinflammation* 9: 27.

Vincenz C (2001) Death receptors and apoptosis. Deadly signaling and evasive tactics. *Cardiol Clin* 19: 31-43.

Wada T, Joza N, Cheng HY, Sasaki T, Kozieradzki I, Bachmaier K, Katada T, Schreiber M, Wagner EF, Nishina H, Penninger JM (2004) MKK7 couples stress signalling to G2/M cell-cycle progression and cellular senescence. *Nat Cell Biol* 6: 215-226.

Waetzig V, Herdegen T (2005) Context-specific inhibition of JNKs: Overcoming the dilemma of protection and damage. *Trends Pharmacol Sci* 26: 455-461.

Wajant H, Pfizenmaier P, Scheurich P (2003) Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10: 45-65.

Walker NP, Talanian RV, Brady KD, Dang LC, Bump NJ, Ferez CR, Franklin S, Ghayur T, Hackett MC, Hammill LD (1994) Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell* 78: 343-352.

Wallace DC (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283: 1482-1488.

Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS (1998) NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and cIAP-2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281: 1680-1683.

Wang KKW (2000) Calpain and caspase: can you tell the difference? *TINS* 23: 20-26.

Wang W, Shi L, Xie Y, Ma C, Li W, Su X, Huang S, Chen R, Zhu Z, Mao Z, Han Y, Li M (2004) SP600125, a new JNK inhibitor, protects dopaminergic neurons in the MPTP model of Parkinson's disease. *Neurosci Res* 48: 195-202.

Wang Q, Yu S, Simonyi A, Sun GY, Sun AY (2005) Kainic acid-mediated excitotoxicity as a model for neurodegeneration. *Mol Neurobiol* 31: 3-16.

Wang Q, Zhang QG, Wu DN, Yin XH, Zhang GY (2007) Neuroprotection of selenite against ischemic brain injury through negatively regulating early activation of ASK1/JNK cascade via activation of PI3K/AKT pathway. *Acta Pharmacol Sin* 28: 19-27.

Wang L, Jia D, Duan F, Sun Z, Liu X, Zhou L, Sun L, Ren S, Ruan Y, Gu J (2012) Combined anti-tumor effects of IFN- α and sorafenib on hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 422: 687-692.

Wang W, Pan YW, Wietecha T, Zou J, Abel GM, Kuo CT, Xia Z (2013) Extracellular signal-regulated kinase 5 (ERK5) mediates prolactin-stimulated adult neurogenesis in the subventricular zone and olfactory bulb. *J Biol Chem* 288: 2623-2631.

Werner P, Voigt M, Keinänen K, Wisden W, Seeburg PH (1991) Cloning of putative high-affinity kainate receptor expressed predominantly in hippocampal CA3 cells. *Nature* 351: 742-744.

Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Itoh N, Yonehara S (1992) The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *Journal Immunology* 148: 1274-1279.

Watanabe T, Nakagawa K, Ohata S, Kitagawa D, Nishitai G, Seo J, Tanemura S, Shimizu N, Kishimoto H, Wada T, Aoki J, Arai H, Iwatsubo T, Mochita M, Watanabe T, Satake M, Ito Y, Matsuyama T, Mak TW, Penninger JM, Nishina H, Katada T (2002) SEK1/MKK4-mediated SAPK/JNK signaling participates in embryonic hepatoblast proliferation via a pathway different from NF-kappaB-induced anti-apoptosis. *Dev Biol* 250: 332-347.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, Thompson CB, Korsmeyer SJ (2000) tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev* 14: 2060-2071.

Wei XW, Yan H, Xu, B, Wu YP, Li C, Zhang GY (2012) Neuroprotection of co-activation of GABA receptors by preventing caspase-3 denitrosylation in KA-induced seizures. *Brain Res Bull* 88: 617-623.

Wessel TC, Joh TH, Volpe BT (1991) In situ hybridization analysis of c-fos and c-jun expression in the rat brain following forebrain ischemia. *Brain Res* 567: 231-240.

Wiley SR, Scooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA (1995) Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3: 673-682.

Wilson KP, Black JA, Thomson JA, Kim EE, Griffith JP, Navia MA, Murcko MA, Chambers SP, Aldape RA, Raybuck SA (1994) Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature* 370: 270-275.

Wingrave JM, Schaecher KE, Sribnick EA, Wilford GG, Ray SK, Hazen-Martin DJ (2003) Early induction of secondary injury factors causing activation of calpain and mitochondria-mediated neuronal apoptosis following spinal cord injury in rats. *J Neurosci Res* 73: 95-104.

Wisden W, Seeburg PH (1993) A complex mosaic of high-affinity kainate receptors in rat brain. *J Neurosci* 13: 3582-3598.

Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Tournier C, Yasuda J, Davis RJ (1998) A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation. *Science* 281: 1671-1674.

Whitmarsh AJ (2006) The JIP family of MAPK scaffold proteins. *Biochem Soc Trans* 34: 828-832.

Whitmarsh AJ, Kuan CY, Kennedy NJ, Kelkar N, Haydar TF, Mordas JP (2001). Requirement of the JIP1 scaffold protein for stress-induced JNK activation. *Genes Dev* 15: 2421-2432.

Wolf BB, Green DR (1999), Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteases. *J Biol Chem* 274: 20049-20052.

Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ (1997) Movement of Bax from the Cytosol to Mitochondria during Apoptosis. *J Cell Biology* 139: 1281-1292.

Wood DE, Thomas A, Devi LA, Berman Y, Beavis RC, Reed JC, Newcomb EW (1998) Bax cleavage is mediated by calpain during drug-induced apoptosis. *Oncogene* 17: 1069-1078.

Wyllie AH (1997) Apoptosis: an overview. *Br Med Bull* 53: 451-465.

Yamada M, Ohnishi H, Sano S, Nakatani A, Ikeuchi T, Hatanaka H (1997) Insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2 are tyrosine phosphorylated and associated with phosphatidylinositol 3-kinase in response to brain-derived neurotrophic factor in cultured cerebral cortical neurons. *J Biol Chem* 272: 30334-30339.

Yamasaki T, Kawasaki H, Nishina H (2012) Diverse Roles of JNK and MKK Pathways in the Brain. *J Signal Transduct* 459265 doi: 10.1155/2012/459265.

Yang DD, Kuan CY, Whitmarsh AJ, Rincón M, Zheng TS, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA (1997) Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature* 389: 865-870.

Yang Z, Klionsky DJ (2010) mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol* 22: 124-131.

Yang CC, Ornatsky OI, McDermott JC, Cruz TF, Prody CA (1998) Interaction of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) with a mitogen-activated protein kinase, ERK5/BMK1. *Nucleic Acids Res* 26: 4771-4777.

Yasuda J, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sharma M, Davis R (1999) The JIP group of Mitogen-Activated Protein kinase Scaffold Proteins. *Mol Cell Biol* 19: 7245-7254.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Yeh WC, de la Pompa JL, McCurrach ME, Shu HB, Elia AJ, Shahinian A, Ng M, Wakeham A, Khoo W, Mitchell K, El-Deiry WS, Lowe SW, Goeddel DV, Mak TW (1998) FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science* 279: 1954-1958.

Yoshida H, Hastie CJ, McLauchlan H, Cohen P, Goedert M (2004) Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by isoforms of c-Jun N-terminal kinase (JNK) *J Neurochem* 90: 352-358.

Youn DH, Randic M (2004) Modulation of excitatory synaptic transmission in the spinal substantia gelatinosa of mice deficient in the kainate receptor GluR5 and/or GluR6 subunit. *J Physiol* 555: 683-698.

Yuan J (1996) Evolutionary conservation of a genetic pathway of programmed cell death. *J Cell Biochem* 60: 4-11.

Yuan J, Lipinski M, Degtrev A (2003) Diversity in the mechanisms of neuronal cell death. *Neuron* 40: 401-413.

Xia Z, Dickens M, Raingeau DJ, Davis RJ, Greenberg ME (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270: 1326-1331.

Xia XG, Harding T, Weller M, Bieneman A, Uney JB, Schulz JB (2001) Gene transfer of the JNK interacting protein-1 protects dopaminergic neurons in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci* 98:10433-10438.

Xiao C, Srinivasan L, Calado DP, Patterson HC, Zhang B, Wang J, Henderson JM, Kutok JL, Rajewsky K (2008) Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat Immunol* 9:405-414.

Zarubin T, Han J (2005) Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* 15: 11-18.

Zhang DW, Shao J, Lin J, Zhang N, Lu BJ, Lin SC, Dong MQ, Han J (2009) RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science* 325: 332-336.

Zhang J, Cado D, Chen A, Kabra NH, Winoto A (1998) Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature* 392: 296-300.

Zhang H, Burrows F (2004) Targeting multiple signal transduction pathways through inhibition of Hsp90. *J Mol Med* 82: 488-499.

Zhang QG, Xu YL, Li HC, Han D, Zhang GY (2006) NMDA receptor/L-VGCC-dependent expression and AMPA/KA receptor-dependent activation of c-Jun induced by cerebral ischemia in rat hippocampus. *Neurosci Lett* 398: 268-273.

Zheng X, Resnick RJ, Shalloway D (2008) Apoptosis of estrogen receptor negative breast cancer and colon cancer cell lines by PTPalpha and src RNAi. *Int J Cancer* 122: 1999-2007.

Zheng H, Zhu W, Zhao H, Wang X, Wang W, Li Z (2010) Kainic acid-activated microglia mediate increased excitability of rat hippocampal neurons in vitro and in vivo: crucial role of interleukin-1beta. *Neuroimmunomodulation* 17: 31-38.

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

Zheng XY, Zhang HL, Luo Q, Zhu J (2011) Kainic acid-induced neurodegenerative model: potentials and limitations. *J Biomed Biotechnol* 2011: 457079.

Zhu X, Raina AK, Rottkamp CA, Aliev G, Perry G, Bux H, Smith MA (2001) Activation and redistribution of c-jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase in degenerating neurons in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 76: 435-441.

Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR (2001) The machinery of programmed cell death. *Pharmacology & Therapeutics* 92: 57-70.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Zipfel GJ, Babcock DJ, Lee JM, Choi DW (2000) Neuronal apoptosis after CNS injury: the roles of glutamate and calcium. *J Neurotrauma* 17: 857-869.

VIII. ANEXOS: Publicaciones

Differences in activation of ERK1/2 and p38 kinase in *Jnk3* null mice following KA treatment

Luisa de Lemos,^{*,1} Fèlix Junyent,^{*,†,1} Ester Verdaguer,^{*} Jaume Folch,[†] Rafael Romero,[‡] Mercè Pallàs,^{*} Isidre Ferrer,[§] Carme Auladell^{¶,2} and Antoni Camins^{*,2}

^{*}Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia Facultat de Farmàcia, Institut de Biomedicina (IBUB), Centros de Investigació Biomèdica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

[†]Unitat de Bioquímica, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Tarragona, Spain

[‡]Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

[§]Servei Anatomia Patològica, Institut de Neuropatologia, CIBERNED, IDIBELL-Hospital Universitari de Bellvitge, Universitat de Barcelona, Hospitalet de Llobregat, Spain

[¶]Departament de Biologia Cel·lular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Abstract

The MAPK family is formed by extracellular signal-regulated kinases p38 kinase and stress-activated protein kinases (SAPK/JNK). There are three genes that encode for three JNK proteins. JNK3 is mainly expressed in the central nervous system and has been related to various processes in that tissue. Specifically, JNK3 plays a crucial role in neuronal death in several neurodegenerative diseases. The activation of this kinase has been described in epilepsy, Alzheimer's disease, Parkinson's disease and Huntington's disease. Different studies have shown that the lack of the *Jnk3* gene confers neuroprotection. However, the specific mechanism involved in such neuroprotection has not yet been elucidated.

Therefore, in the present study, we analyzed the neuroprotection in mice lacking *Jnk3* against neuronal death induced by kainic acid. Moreover, we analyzed the activation of different MAPKs. The results revealed that neuronal death was attenuated and different activation/inactivation of p38 and extracellular signal-regulated kinases 1/2 was reported with respect to control. Therefore, the data indicate that the lack of the JNK3 protein modulates other MAPKs and these changes could also have a pivotal role in neuroprotection.

Keywords: epilepsy, neuronal death, neuroprotection, stress-activated protein kinases.

J. Neurochem. (2010) **114**, 1315–1322.

The MAPKs family comprises threonine (Thr)/tyrosine (Tyr) or serine (Ser)/Thr kinases, which are activated by sequential phosphorylation of upstream kinases: a MAPK kinase kinase (MAP3K), a MAPK kinase (MAP2K), and a MAPK (Whitmarsh *et al.* 1998). Activated MAPKs phosphorylate various substrate proteins, including transcription factors such as Elk-1, *c-jun* and ATF2. The MAPK family in mammals is composed of extracellular signal-regulated kinases (ERK), p38 kinase and stress-activated protein kinases (SAPK/JNK). Each of these proteins adopts several isoforms: ERK1 to ERK8; p38- α , - β , - γ , and - δ ; and JNK1 to JNK3 (Schaeffer and Weber 1999). MAPK pathways are activated either as a result of a series of binary interactions between the kinase components or through the formation of a signaling complex containing multiple kinases which are guided by a scaffold protein. Specifically, in the JNK signaling pathway, JNK is

activated through phosphorylation by a MAP2K such as SEK1 (also known as MKK4), and SEK1 (or MKK4) is activated by ASK1 or MEKK1 (MAPKKK) phosphorylation (Davis 1994; Robinson and Cobb 1997; Takeda *et al.* 2003).

Received April 14, 2010; revised manuscript received May 26, 2010; accepted May 28, 2010.

Address correspondence and reprint requests to Antoni Camins PhD, Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Spain. Avda/Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain. E-mail: camins@ub.edu

¹Both authors contributed equally to this work.

²Both contributed as senior authors.

Abbreviations used: ERK, extracellular signal-regulated kinases; GFAP, glial fibrillar acidic protein; JIPs, JNK-interacting proteins; KA, kainic acid; PB, phosphate buffer; PBS, phosphate-buffered saline; SAPK/JNK, stress-activated protein kinases; wt, wild-type.

One of the targets of activated JNK is *c-jun*, which is specifically phosphorylated on Ser63 and/or Ser73. These phosphorylations render this protein capable of binding AP-1 sites in DNA (Hibi *et al.* 1993; Pulverer *et al.* 1991). In the p38 signaling pathway, distinct MAP2Ks such as MKK3 and MKK6 activate p38 and are themselves activated by the same MAP3Ks (such as ASK1 and TAK1) also functioning in the JNK pathway. In the ERK signaling pathway, ERK1 or ERK2 (ERK1/2) is activated by MEK1/2, which in turn is activated by Raf isoforms such as A-Raf, B-Raf, or Raf-1 (also known as C-Raf). Moreover, specific scaffold proteins facilitate the activation of MAPK signaling pathways. Thus, JNK activity may be regulated by JNK-interacting proteins (JIPs). Therefore, Jip-1 in mice, or its human and rat homolog IB-1, contains a JNK binding domain which mediates the sequestration of JNK in the cytoplasm and acts as a functional JNK inhibitor (Barr *et al.* 2002; Bonny *et al.* 1998; Dickens *et al.* 1997; Mooser *et al.* 1999; Whitmarsh *et al.* 1998). Kinase suppressor of Ras-1 and MEK partner 1 function as scaffold proteins for the ERK signaling pathway, and β -Arrestin 2 acts as a scaffold protein for both the ERK and the JNK signaling pathways (Morrison and Davis 2003; Whitmarsh 2006).

The MAPKs signaling pathways are activated by pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β or in response to cellular stresses such as heat shock, UV irradiation, death receptor activation and oxidative stress leading to apoptotic cell death, a common response to stress (Bruckner *et al.* 2001; Sherman and Goldberg 2001).

There are three genes to which encode JNK proteins in mammals (*Jnk1*, *Jnk2* and *Jnk3*). JNK1 and JNK2 are expressed in different tissues, while JNK3 is mainly expressed in CNS. From *in vitro* and *in vivo* models of neurodegeneration, such as the induced by glutamate, kainic acid (KA), MPTP and neurotrophic deprivation (Behrens *et al.* 1999; Eilers *et al.* 2001; Pan *et al.* 2009; Schwarzschild *et al.* 1997; Yang *et al.* 1997), it has been demonstrated that JNK3 plays a role in cell death. Consistent with these data, the activation of JNK has been described in chronic neurodegenerative disease such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease (Antoniou *et al.* 2010, Bozyczko-Coyne *et al.* 2002; Resnick and Fennell 2004). Other studies have also demonstrated the deleterious effect of the activation of JNK in experimental models of Huntington's disease (Garcia *et al.* 2002; Ham *et al.* 1995; Liu 1998; Liu *et al.* 2000; Meriin *et al.* 2001). Similarly, there is a murine model of ischemia in which the inhibition of JNK, achieved through the administration of a peptide that mimics the JNK binding domain of Jip-1, exerts a neuroprotective effect (Borsello *et al.* 2003). In addition, the lack of the *Jnk3* gene has been reported as providing neuroprotection against different injuries (Brecht *et al.* 2005). Despite all these data supporting a specific role of JNK3 in neuronal death, the cellular mechanisms involved have not yet been elucidated. Here we explored the neuroprotection in *Jnk3* null mice against KA,

and also examined whether the activity of other MAPKs is modulated. Analyses are given for different times after treatment, both for wild-type (wt) and *Jnk3* knock-out mice.

Material and methods

Animals

The generation of *Jnk3* null mice has been described elsewhere (Yang *et al.* 1997, 1998), as have methods for determining genotype (Kuan *et al.* 1999). The mice used had been backcrossed to the C57BL/6 strain. Animals were kept under controlled temperature, humidity and light conditions with food and water provided *ad libitum*. They were treated according to European Community Council Directive 86/609/EEC and the procedure established by the *Department d'Agricultura, Ramaderia i Pesca* of the *Generalitat de Catalunya*. Every effort was made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used.

KA treatment and sample preparation

A total of 66 mice were used for the present study. Six-week-old mice were treated with a single intraperitoneal (i.p.) dose (30 mg/kg) of KA (30 mg/kg; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) or with saline solution for controls. For western blot, 18 *Jnk3* null mice and 18 wt mice were used. Three mice from each group were used as controls and were treated with KA and killed at different times (after 1, 3, 6 and 12 h), and the hippocampus was then excised and frozen. For Fluoro-Jade B, three wt and three *Jnk3* null mice were injected with KA acid and killed after 24 h. For Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) immunohistochemistry, six wt and six *Jnk3* null mice were used, three from each group as control animals and were injected with KA and killed after 3 days. To analyze *c-fos* expression, we used nine wt and nine *Jnk3* null mice. Three from each group were used as controls and were injected with KA and killed after 6 and 12 h (three mice per time). All mice were anesthetized by injection (i.p.) of Ketamine (100 mg/kg) and Xylazine (10 mg/kg). After that, the mice were perfused with 40 g/L paraformaldehyde in 0.1 mol/L phosphate buffer (PB) and the brains were removed and post-fixed for 24 h. The brains were subsequently rinsed in 40 g/L paraformaldehyde in 0.1 mol/L phosphate buffer (PB) with 300 g/L of sucrose for 24 h and then frozen. Coronal sections of 20 μ m were obtained.

Fluoro-Jade B staining

Slides were defatted by dehydration in ethanol before being rehydrated, rinsed with phosphate-buffered saline (PBS) and incubated with 5 nmol/L of Hoechst 33342 for 30 min in the dark. After two washes in distilled water, slides were immersed in 0.6 g/L potassium permanganate (KMnO₄), for 15 min in the dark. Then, after two washes in distilled water, the slides were transferred to the staining solution containing 0.1 mL/L acetic acid and 0.004 mL/L of the fluorochrome Fluoro-Jade B, for 30 min in the dark. Slides were rinsed in distilled water, dried, and then submerged directly into xylene and mounted in DPX medium. Slides were analyzed using an epifluorescence microscope (Olympus BX61, Olympus España, Barcelona, Spain). To determine the positive cell number for Fluoro-Jade B we counted the cells in each area from serial sections of hippocampus from each mice brain.

Immunohistochemistry

Free-floating coronal sections, 20 μm thick, were rinsed in 0.1 mol/L PB pH 7.2, and then treated with 5 mL/L H_2O_2 and 100 mL/L methanol in PBS. After that, they were pre-incubated in a blocking solution (100 mL/L of fetal bovine serum (FBS), 2.5 g/L of bovine serum albumin and 0.2 mol/L of glycine in PBST, PBS with 5 mL/L of Triton X-100). Then, sections were incubated overnight (O/N) at 4°C with different primary antibodies: rabbit anti-*c-fos* (1 : 1000; Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA) and rabbit anti-GFAP (1 : 1000; DAKO, Glostrup, Denmark). Sections were then sequentially incubated for 2 h with Alexa Fluor 594 goat antirabbit antibody (1 : 500, Invitrogen, Eugene, OR, USA). Sections were mounted onto gelatinized slides, and stained sections were examined under a fluorescence microscope (Olympus BX61).

Western blot

For western blot analysis, tissue was homogenized in lysis buffer (50 mM Tris-HCl 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100) and protease inhibitor mixture (Complete, Roche Diagnostics, Barcelona, Spain). The homogenates were centrifuged at 12 000 g for 5 min at 4°C. The protein content in the supernatant was determined using a Pierce BCA Protein Assay Kit (Pierce Company, Rockford, MI, USA). Then, 30 μg of protein was denatured at 95°C for 5 min in sample buffer (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% glycerol, 2% sodium dodecyl sulfate, 5% β -mercaptoethanol, 0.05% bromophenol blue). Samples were subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (7.5%) and subsequently transferred onto polyvinylidene fluoride sheets (Immobilon-P; Millipore Corp., Bedford, MA, USA). For immunoblotting, membranes were blocked with 5% non-fat dry milk in Tris-Buffered Saline Tween-20 (TBST) (50 mM Tris-HCl, pH 8.1, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20). Then they were incubated overnight at 4°C with primary antibodies against JNK3, total JNK, phospho-JNK (Thr183/Tyr185), phospho ERK1/2 (Thr202/Tyr204), total ERK1/2, phospho-p38 (Thr180/Tyr182), total p38, phospho-*c-jun* (Ser73), total *c-jun* (1 : 1000; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), and β -actin (1 : 20 000; Sigma-Aldrich). The blots were then washed thoroughly in Tris-Buffered Saline Tween-20 (TBST) and incubated for 2 h with a horseradish peroxidase-conjugated anti-IgG antibody (Amersham, GE Healthcare, Barcelona, Spain), followed by the enhanced chemiluminescence detection system (Amersham), according to the supplier's instructions. Chemiluminescence measurements and semi-quantitative values were obtained using the software Quantity One (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and the results were expressed as a percentage with respect to wt controls. The corresponding β -actin was taken for each sample to normalize for any differences in gel loading.

Statistical analysis

Results of the assays were compared by one-way ANOVA using the Bonferroni post-test. All data are presented as means \pm SEM, and differences are considered significant at $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***)

Results

Firstly, we evaluated neurodegeneration induced by KA in wt and *Jnk3* null mice at 24 h after treatment. Fluoro-Jade B

staining revealed neuronal death in the hippocampus of wt mice in the hilus, CA1 and CA3. This neuronal death was significantly reduced in *Jnk3* null mice in different areas of the hippocampus (Fig. 1). Next, at 3 days after KA treatment, we analyzed astrogliosis by GFAP immunohistochemistry. No differences in immunolabeling were detected between wt and *Jnk3* null mice injected with saline solution (Fig. 2a and c). However, KA treatment induced astrogliosis in different hippocampal areas of wt mice, but not in *Jnk3* null treated mice (Fig. 2d vs. b). We also evaluated the presence of *c-fos*, an inducible transcription factor of the immediate-early genes family (Kovacs 2008) highly expressed in the hippocampus following KA treatment, and it has been used as a nuclear marker of neuronal activation following seizures (Andrioli *et al.* 2009; Lopez-Martin *et al.* 2009). Thus, the immunohistochemistry against *c-fos* revealed an increase of this protein in different areas of the hippocampus following KA treatment in wt and *Jnk3* null mice (Fig. 3). Although no differences in immunolabeling were observed at 3 and 6 h after treatment between wt and *Jnk3* null mice (3 h, data not shown; 6 h, Fig. 3c and d), a significant reduction in *c-fos* immunoreactivity was detected after 12 h of KA treatment in *Jnk3* null mice, in contrast to wt mice (Fig. 3f vs. e).

We next analyzed the activation of different MAPK (JNK, p38 and ERK) as all of them are related with cell death signaling and belongs to the same family of kinase (Kim and Choi 2010; Subramaniam and Unsicker 2006). Moreover, the phosphorylation of *c-jun* at Ser73 together with their total amounts were analyzed. JNK3 protein expression was not observed in hippocampal samples obtained from *Jnk3* null mice (Fig. 4). Increase of phosphorylation of JNK at Thr183/Tyr185 sites was observed in wt mice under KA treatment, with levels maintained over the different times analyzed (from 1 to 12 h). Moreover, phosphorylation of JNK in *Jnk3* null mice increased progressively from 1 to 3 h after KA administration. However, this phosphorylation was lower than that detected in wt mice at the same times (Fig. 4).

Western blots of p38, another MAPK related to cell death, revealed an increase of its phosphorylation at Thr180/Tyr182 in KA treated mice. This increase was significant at 3 h after KA injection, being higher in wt than in *Jnk3* null mice. Moreover, the increase in wt was also significant at 6 and 12 h after treatment, whereas it was not detected in *Jnk3* null mice at the same times (Fig. 5).

Extracellular signal-regulated kinases 1/2 phosphorylated at Thr202/Tyr204 sites were significantly increased at 1 h after KA treatment, both in wt and *Jnk3* null mice. However, whereas in *Jnk3* null mice this phosphorylation decreased 3 h after treatment, it was maintained in wt mice until 6 h following treatment (Fig. 6).

As *c-jun* and its phosphorylation have a crucial role in neurodegeneration, we evaluated its protein levels as well as

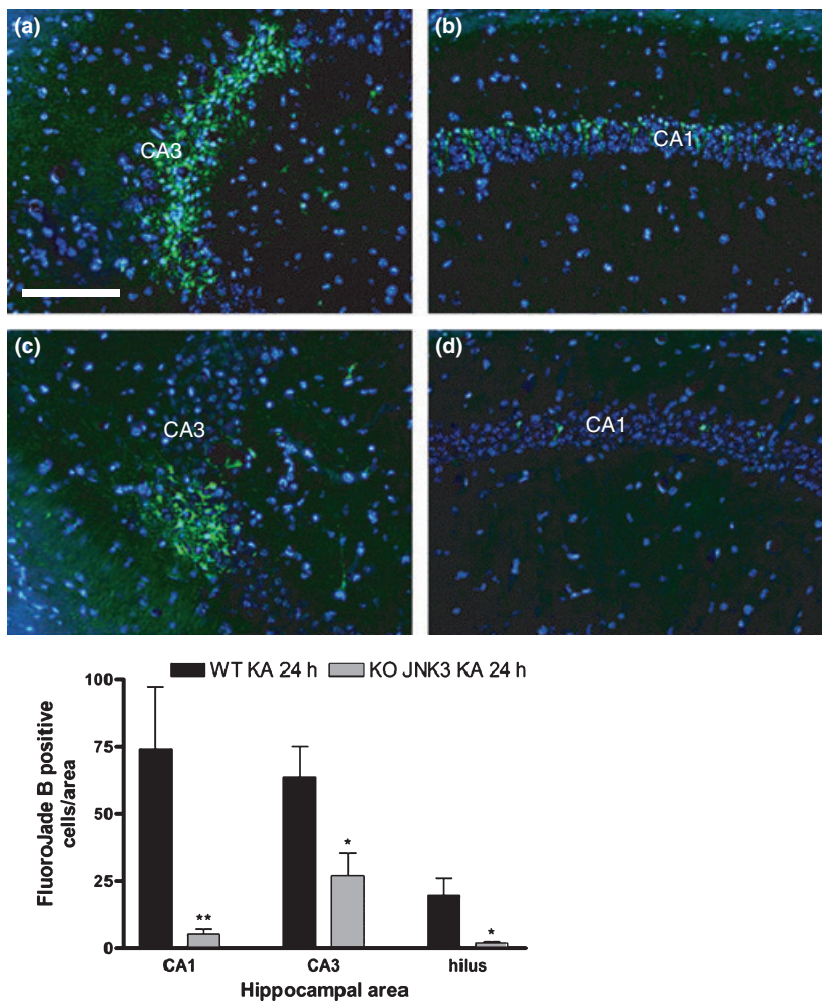


Fig. 1 Fluoro-Jade B staining (green) in the hippocampus counter-stained with Hoechst 33342 (blue) and quantification of positive cells for Fluoro-Jade B. a and b, presence of labeled neurons in CA3 and CA1 in kainic acid (KA) treated wild-type (wt) mice was detected 24 h after KA treatment. c and d, reduction of Fluoro-Jade B labeling in *Jnk3* null mice in CA3 and CA1. CA1, CA1 field, hippocampus; CA3, CA3 field, hippocampus. Scale bar: 100 μ m. A bar graph shows the quantification of positive neurons for Fluoro-Jade B labeling in different areas of the hippocampus of wild-type and *Jnk3* null mice. Each point is the mean \pm SEM of three independent experiments, determined in five pictures per experiment. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; with respect to control). JNK, stress-activated protein kinases.

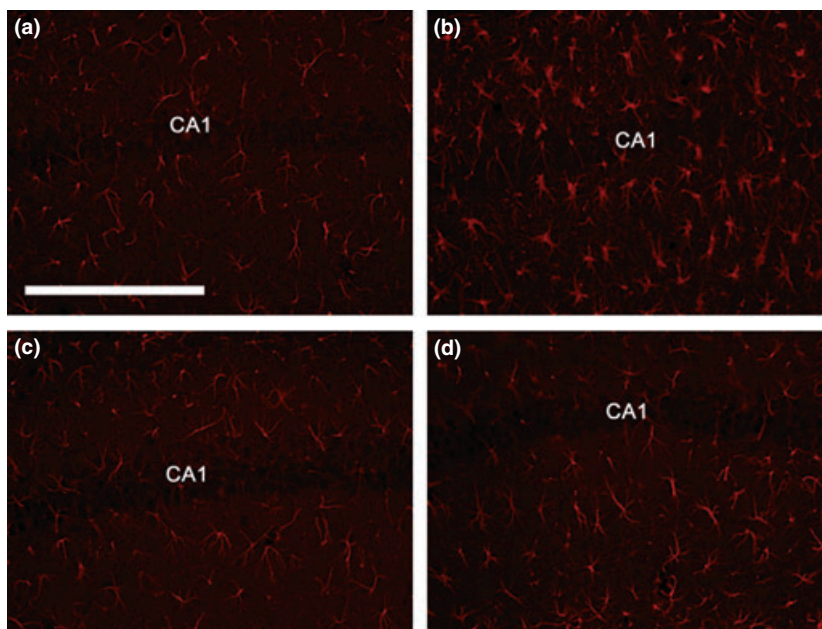


Fig. 2 GFAP immunohistochemistry in CA1 area of wild-type saline control (a), wild-type mice treated with kainic acid (b), *Jnk3* null mice injected with saline solution (c) and *Jnk3* null mice treated with kainic acid (d). CA1, CA1 field, hippocampus. Scale bar: 100 μ m.

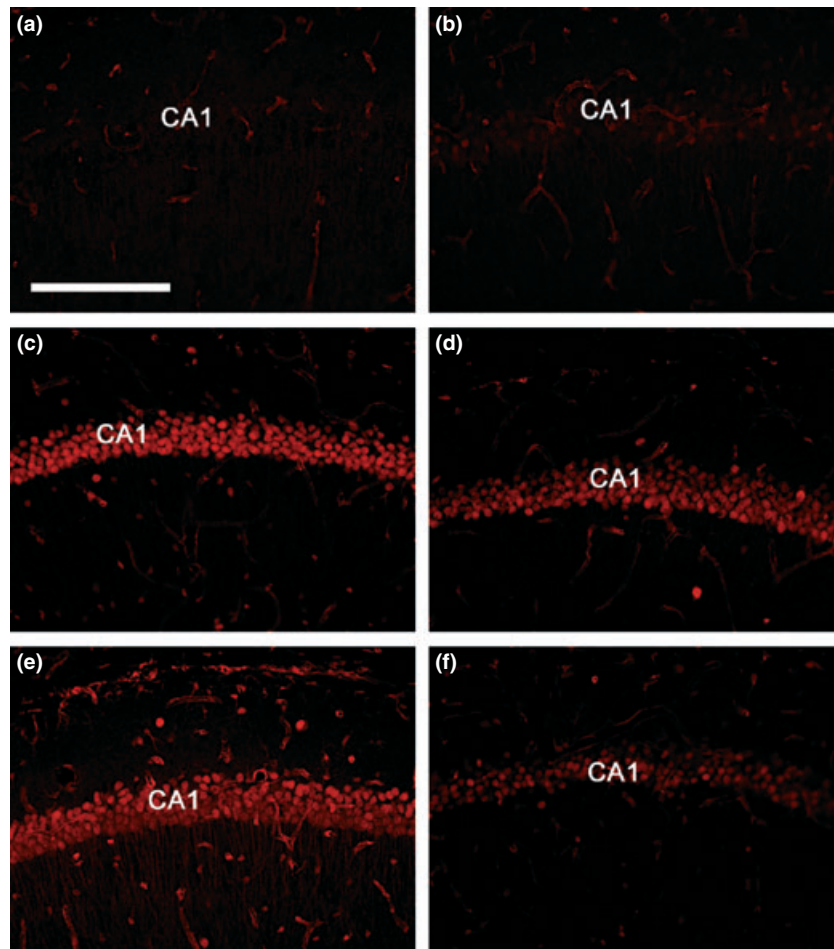


Fig. 3 Immunohistochemistry against *c-fos* in CA1 of the hippocampus of wild-type (a,c,e) and *Jnk3* null mice (b,d,f). a and b, saline controls; c and d, 6 h after kainic acid treatment; e and f, 12 h after kainic acid treatment. CA1, CA1 field, hippocampus. Scale bar: 100 μ m.

its phosphorylation. Results obtained by western blot indicated an increase in *c-jun* phosphorylation in wt mice at 3 and 6 h after KA treatment. However, in *Jnk3* null mice this phosphorylation was only detected at 3 h after KA treatment. Moreover, this increase in *c-jun* phosphorylation was lower in *Jnk3* null mice than in wt mice (Fig. 7). We also observed differences in total *c-jun* levels, increasing at 3 and 6 h in both genotypes. However, the levels of *c-jun* in *Jnk3* null mice were significantly lower than in wt mice at 6 h after KA treatment (Fig. 7).

Discussion

Consistent with the findings of Yang *et al.* (1997), the present study corroborates the reduction in neuronal death in the hippocampus of mice lacking *Jnk3*, at 24 h after KA administration. In addition, in contrast to wt mice, the absence of astrogliosis 3 days after treatment was evidenced in these knock-outs, also as described by Yang *et al.* (1997).

Immunohistochemistry against *c-fos* revealed that the increase in this protein occurs in both wt and knock-out mice shortly after KA administration; however differences in levels were detected some hours later. Thus, the decrease

detected in knock-out mice 12 h after KA treatment correlated with the reduction found in cell death and in gliosis. These data indicate that the expression of *c-fos* could be involved in neuronal excitability, consistent with the findings of various authors (Lidwell and Griffiths 2000; Rogers *et al.* 2004), who have established that the over-stimulation of glutamate receptors in primary rat cortical neurons by excitotoxins triggered neuronal cell death. Therefore, while it seems that KA can induce neural excitability in knock-out and wt mice, neurodegeneration in the mice lacking *Jnk3* is blocked or reduced.

Differences in MAPK activation between both genotypes were also revealed. Thus, using western blots, a decrease in JNK phosphorylation was observed in KA treated *Jnk3* null mice with respect to wt mice. This data indicates that JNK3 is one of the JNK proteins which is more phosphorylated following KA treatments, and as we have shown that its absence is related to a reduction in the measured parameters of cellular damage, as was previously suggested (Brecht *et al.* 2005), it could play an important role in triggering KA-induced neurodegeneration. The lower phosphorylation of JNK in *Jnk3* null mice is consistent with the absence of an increase in phosphorylation of *c-jun* at Ser73 observed in this study.

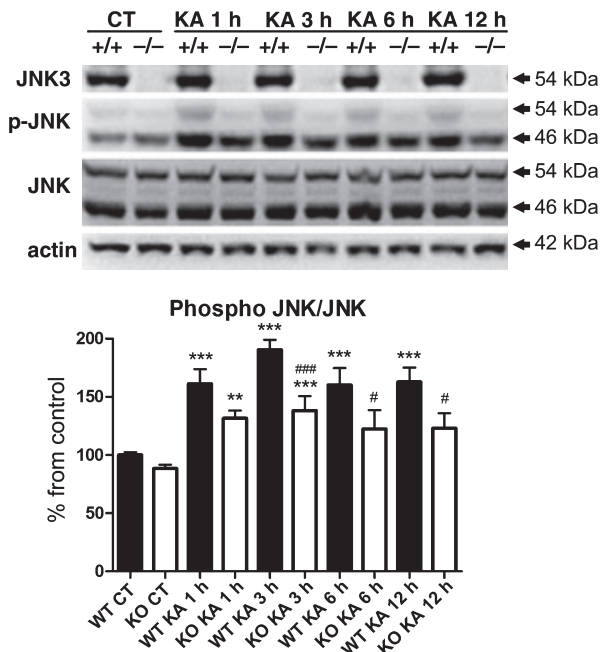


Fig. 4 Immunoblot against stress-activated protein kinases (JNK) 3, phospho-JNK (Thr183/Tyr185) and JNK in wild-type (wt) and *Jnk3* null mice at different times after kainic acid (KA) treatment. A bar graph shows the quantification of the bands. Each point is the mean \pm SEM of three independent experiments. (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ with respect to saline controls and # $p < 0.05$; ### $p < 0.001$ with respect to wild-type).

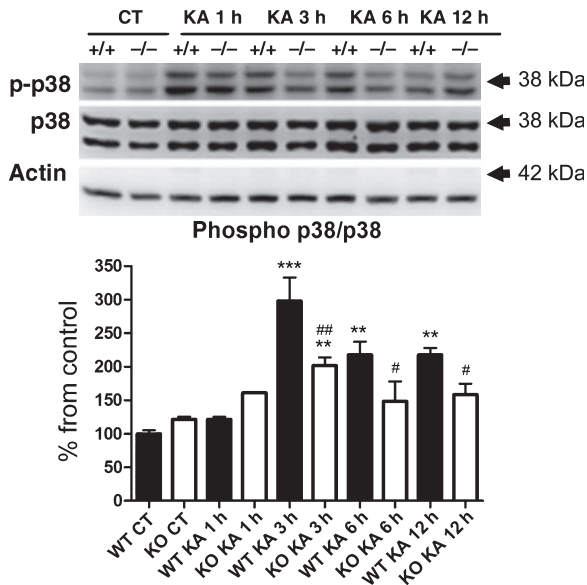


Fig. 5 Immunoblot against p38 phosphorylated at Thr180/Tyr182 and p38 in wild-type (wt) and *Jnk3* null mice at different times after kainic acid (KA) treatment. A bar graph shows the quantification of the bands. Each point is the mean \pm SEM of three independent experiments. (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ with respect to saline controls and # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$ with respect to wild-type)

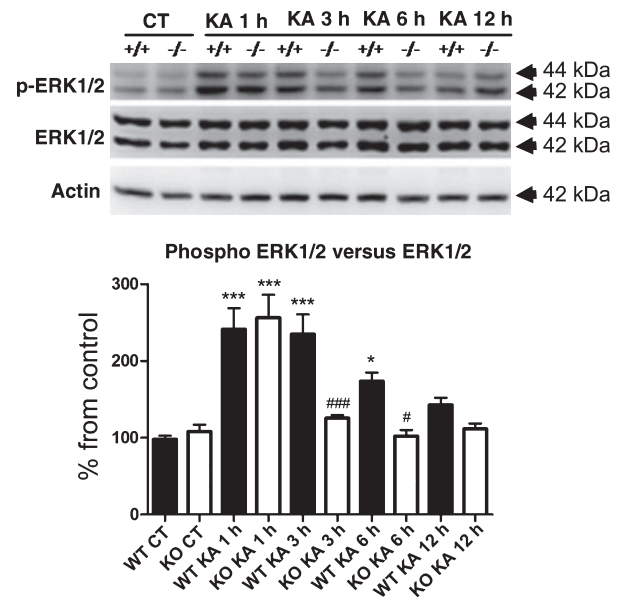


Fig. 6 Immunoblot against extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2) phosphorylated at Thr202/Tyr204 and ERK in wild-type (wt) and *Jnk3* null mice at different times after kainic acid (KA) treatment. A bar graph shows the quantification of the bands. Each point is the mean \pm SEM of three independent experiments. (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ with respect to saline controls and # $p < 0.05$; ### $p < 0.001$ with respect to wild-type).

Of most interest were the differences in p38 and ERK1/2 phosphorylation between both genotypes. p38 may play an important role in the CNS and neuronal death (Cao *et al.* 2004). Specifically, the results obtained by Namiki *et al.* (2007), demonstrated that p38 α ^{+/-} mice are more resistant to kainate induced epileptic seizures than wt mice. Moreover, they demonstrated that in p38 α ^{+/-} mice the phosphorylation of *c-jun* was suppressed, indicating a correlation between the *c-jun* pathway and p38 activity. Likewise, in the present study, it was observed that the KA-induced increase in phosphorylation of p38 in wt mice 3 h after treatment was lower than that detected in *Jnk3* null mice, and absent 6 and 12 h after treatment. These data indicate that the lack of *Jnk3* reduces the activation of p38. This reduction of p38 phosphorylation may play a role in the neuroprotection observed by Namiki *et al.* (2007), who reported that p38 positively contributes to neuronal death in glutamate-induced excitotoxicity.

With respect to ERK1/2 phosphorylation, which increases significantly following KA administration, a similar effect of p38 phosphorylation was detected between knock-out and wt mice following KA injection. In this case, the phosphorylation level because of KA was similar in both genotypes at 1 h after treatment. However, in contrast to wt mice, no changes in phosphorylation were observed after this time in *Jnk3* null mice. This result indicates that the lack of *Jnk3* also modulates the ERK activation/inactivation pathway. As

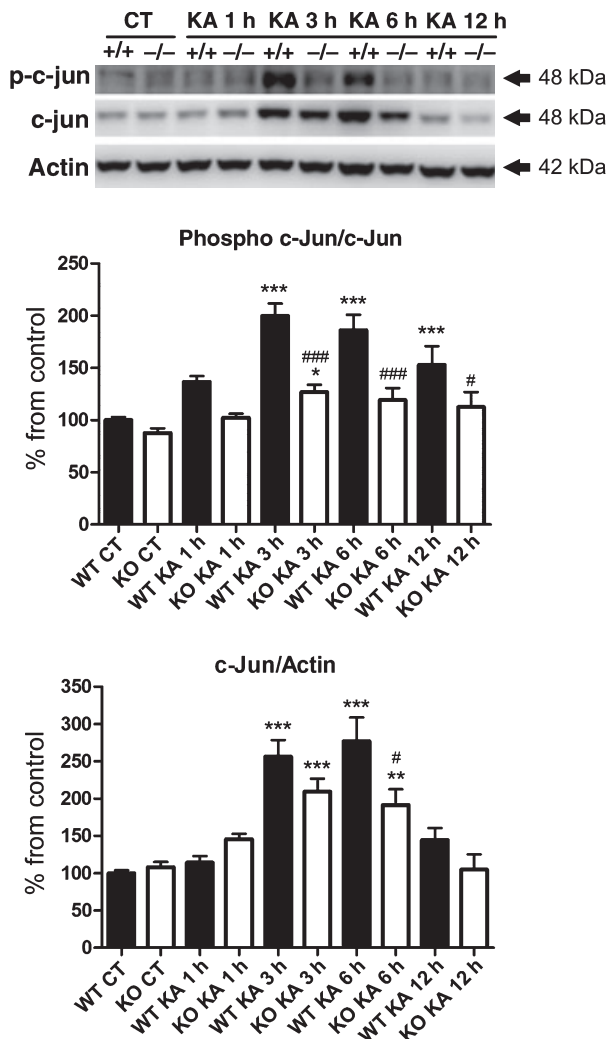


Fig. 7 Immunoblot against *c-jun* phosphorylated at Ser73 and *c-jun* in wild-type (wt) and *Jnk3* null mice at different times after kainic acid (KA) treatment. A bar graph shows the quantification of the bands. Each point is the mean \pm SEM of three independent experiments. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ with respect to saline controls and # $p < 0.05$; ### $p < 0.001$ with respect to wild-type).

ERK1/2 regulates the transcription of *c-jun* and *c-fos* genes, the rapid dephosphorylation of ERK1/2 in *Jnk3* null mice could be related to the lower levels of *c-fos* and *c-jun* observed in these mice than in wt mice following KA treatment. Moreover, the quick reduction of phosphorylation of ERK1/2 may be related with neuroprotection observed as it is known that the magnitude and the duration of ERK1/2 activity determine its effect as a pro-apoptotic signal (Subramaniam and Unsicker 2010).

Therefore we observed a decrease in the magnitude and duration of different MAPK (JNK, p38 and ERK1/2) in *Jnk3* null mice, all of them related directly with cell death (Kim and Choi 2010; Subramaniam and Unsicker 2006). However

we don't know which specific role plays each kinase in cell death signals.

Our study shows for the first time the regulation of p38 and ERK1/2 induced by the lack of JNK3, as the studies performed about neuroprotection in *Jnk3* null mice were focused just in the JNK activity but not in the other MAPK.

Taking all the data into consideration, our results indicate that a lack of *Jnk3* could modulate the activation/inactivation of other MAPK such as p38 and ERK1/2. Thus, although activation occurs immediately after treatment in both genotypes, there is a decrease in phosphorylation over longer times in the knock-out mice. Therefore, the data presented in this study suggests that the neuroprotective effects observed in *Jnk3* null mice could be a consequence of a blockade of the induced activation of JNK as well as of the other MAPK, all of them related to neuronal death.

Acknowledgements

We would like to thank to the Language Advisory Service of the University of Barcelona for revising this manuscript. This study was funded by grant 2009/SGR00853 from the *Generalitat de Catalunya* (autonomous government of Catalonia), by grants BFU2007-63209/BFI and SAF2009-13093 from the Spanish *Ministerio de Educaci3n y Ciencia*, grant PI080400 and PS09/01789 from the Instituto de Salud Carlos III, grant 063230 from the Fundaci3n la Marat3 TV3 and grant 610RT0405 from Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnologia para el Desarrollo (CYTED). Ester Verdaguer holds a 'Batriu de Pin3s' postdoctoral contract awarded by the *Generalitat de Catalunya* (autonomous government of Catalonia).

References

- Andrioli A., Fabene P. F., Spreafico R., Cavalheiro E. A. and Bentivoglio M. (2009) Different patterns of neuronal activation and neurodegeneration in the thalamus and cortex of epilepsy-resistant Proechimys rats versus Wistar rats after pilocarpine-induced protracted seizures. *Epilepsia* **50**, 832–848.
- Antoniou X., Falconi M., Di Marino D. and Borsello T. (2010) JNK3 as a therapeutic target for neurodegenerative diseases. *J. Alzheimers Dis.* DOI: 10.3233/JAD-2010-1413.
- Barr R. K., Kendrick T. S. and Bogoyevitch M. A. (2002) Identification of the critical features of a small peptide inhibitor of JNK activity. *J. Biol. Chem.* **277**, 10987–10997.
- Behrens A., Sibia M. and Wagner E. F. (1999) Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. *Nat. Genet.* **21**, 326–329.
- Bonny C., Nicod P. and Waeber G. (1998) IB1, a JIP-1-related nuclear protein present in insulin-secreting cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 1843–1846.
- Borsello T., Clarke P. G., Hirt L., Vercelli A., Repici M., Schorderet D. F., Bogousslavsky J. and Bonny C. (2003) A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against excitotoxicity and cerebral ischemia. *Nat. Med.* **9**, 1180–1186.
- Bozyczko-Coyne D., Saporito M. S. and Hudkins R. L. (2002) Targeting the JNK pathway for therapeutic benefit in CNS disease. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* **1**, 31–49.

- Brecht S., Kirchoff R., Chromik A. *et al.* (2005) Specific pathophysiological functions of JNK isoforms in the brain. *Eur. J. Neurosci.* **21**, 363–377.
- Bruckner S. R., Tammariello S. P., Kuan C. Y., Flavell R. A., Rakic P. and Estus S. (2001) JNK3 contributes to c-Jun activation and apoptosis but not oxidative stress in nerve growth factor-deprived sympathetic neurons. *J. Neurochem.* **78**, 298–303.
- Cao J., Semenova M. M., Solovyan V. T., Han J., Coffey E. T. and Courtney M. J. (2004) Distinct requirements for p38alpha and c-Jun N-terminal kinase stress-activated protein kinases in different forms of apoptotic neuronal death. *J. Biol. Chem.* **279**, 35903–35913.
- Davis R. J. (1994) MAPKs: new JNK expands the group. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 470–473.
- Dickens M., Rogers J. S., Cavanagh J., Raitano A., Xia Z., Halpern J. R., Greenberg M. E., Sawyers C. L. and Davis R. J. (1997) A cytoplasmic inhibitor of the JNK signal transduction pathway. *Science* **277**, 693–696.
- Eilers A., Whitfield J., Shah B., Spadoni C., Desmond H. and Ham J. (2001) Direct inhibition of c-Jun N-terminal kinase in sympathetic neurones prevents c-jun promoter activation and NGF withdrawal-induced death. *J. Neurochem.* **76**, 1439–1454.
- Garcia M., Vanhoutte P., Pages C., Besson M. J., Brouillet E. and Caboche J. (2002) The mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid induces striatal neurodegeneration via a c-Jun N-terminal kinase/c-Jun module. *J. Neurosci.* **22**, 2174–2184.
- Ham J., Babij C., Whitfield J., Pfarr C. M., Lallemand D., Yaniv M. and Rubin L. L. (1995) A c-Jun dominant negative mutant protects sympathetic neurons against programmed cell death. *Neuron* **14**, 927–939.
- Hibi M., Lin A., Smeal T., Minden A. and Karin M. (1993) Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev.* **7**, 2135–2148.
- Kim E. and Choi E. (2010) Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **1802**, 396–405.
- Kovacs K. J. (2008) Measurement of immediate-early gene activation-c-fos and beyond. *J. Neuroendocrinol.* **20**, 665–672.
- Kuan C. Y., Yang D. D., Samanta Roy D. R., Davis R. J., Rakic P. and Flavell R. A. (1999) The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron* **22**, 667–676.
- Lidwell K. and Griffiths R. (2000) Possible role for the FosB/JunD AP-1 transcription factor complex in glutamate-mediated excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J. Neurosci. Res.* **62**, 427–439.
- Liu Y. F. (1998) Expression of polyglutamine-expanded Huntingtin activates the SEK1-JNK pathway and induces apoptosis in a hippocampal neuronal cell line. *J. Biol. Chem.* **273**, 28873–28877.
- Liu Y. F., Dorow D. and Marshall J. (2000) Activation of MLK2-mediated signaling cascades by polyglutamine-expanded huntingtin. *J. Biol. Chem.* **275**, 19035–19040.
- Lopez-Martin E., Bregains J., Relova-Quinteiro J. L., Cadarso-Suarez C., Jorge-Barreiro F. J. and Ares-Pena F. J. (2009) The action of pulse-modulated GSM radiation increases regional changes in brain activity and c-Fos expression in cortical and subcortical areas in a rat model of picrotoxin-induced seizure proneness. *J. Neurosci. Res.* **87**, 1484–1499.
- Meriin A. B., Mabuchi K., Gabai V. L., Yaglom J. A., Kazantsev A. and Sherman M. Y. (2001) Intracellular aggregation of polypeptides with expanded polyglutamine domain is stimulated by stress-activated kinase MEKK1. *J. Cell Biol.* **153**, 851–864.
- Mooser V., Maillard A., Bonny C. *et al.* (1999) Genomic organization, fine-mapping, and expression of the human islet-brain 1 (IB1)/c-Jun-amino-terminal kinase interacting protein-1 (JIP-1) gene. *Genomics* **55**, 202–208.
- Morrison D. K. and Davis R. J. (2003) Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**, 91–118.
- Namiki K., Nakamura A., Furuya M. *et al.* (2007) Involvement of p38alpha in kainate-induced seizure and neuronal cell damage. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* **27**, 99–111.
- Pan J., Xiao Q., Sheng C. Y., Hong Z., Yang H. Q., Wang G., Ding J. Q. and Chen S. D. (2009) Blockade of the translocation and activation of c-Jun N-terminal kinase 3 (JNK3) attenuates dopaminergic neuronal damage in mouse model of Parkinson's disease. *Neurochem. Int.* **54**, 418–425.
- Pulverer B. J., Kyriakis J. M., Avruch J., Nikolakaki E. and Woodgett J. R. (1991) Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* **353**, 670–674.
- Resnick L. and Fennell M. (2004) Targeting JNK3 for the treatment of neurodegenerative disorders. *Drug Discov. Today* **9**, 932–939.
- Robinson M. J. and Cobb M. H. (1997) Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 180–186.
- Rogers A., Schmuck G., Scholz G. and Williams D. C. (2004) c-fos mRNA expression in rat cortical neurons during glutamate-mediated excitotoxicity. *Toxicol. Sci.* **82**, 562–569.
- Schaeffer H. J. and Weber M. J. (1999) Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2435–2444.
- Schwarzschild M. A., Cole R. L. and Hyman S. E. (1997) Glutamate, but not dopamine, stimulates stress-activated protein kinase and AP-1-mediated transcription in striatal neurons. *J. Neurosci.* **17**, 3455–3466.
- Sherman M. Y. and Goldberg A. L. (2001) Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron* **29**, 15–32.
- Subramaniam S. and Unsicker K. (2006) Extracellular signal-regulated kinase as an inducer of non-apoptotic neuronal death. *Neuroscience* **138**, 1055–1065.
- Subramaniam S. and Unsicker K. (2010) ERK and cell death: ERK1/2 in neuronal death. *FEBS J.* **277**, 22–29.
- Takeda K., Matsuzawa A., Nishitoh H. and Ichijo H. (2003) Roles of MAPKKK ASK1 in stress-induced cell death. *Cell Struct. Funct.* **28**, 23–29.
- Whitmarsh A. J. (2006) The JIP family of MAPK scaffold proteins. *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 828–832.
- Whitmarsh A. J., Cavanagh J., Tournier C., Yasuda J. and Davis R. J. (1998) A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation. *Science* **281**, 1671–1674.
- Yang D. D., Kuan C. Y., Whitmarsh A. J., Rincon M., Zheng T. S., Davis R. J., Rakic P. and Flavell R. A. (1997) Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature* **389**, 865–870.
- Yang J., New L., Jiang Y., Han J. and Su B. (1998) Molecular cloning and characterization of a human protein kinase that specifically activates c-Jun N-terminal kinase. *Gene* **212**, 95–102.

Gene expression profile in JNK3 null mice: a novel specific activation of the PI3K/AKT pathway

Fèlix Junyent,^{*,†,1} Luisa de Lemos,^{*,1} Ester Verdaguer,^{*} Jaume Folch,[†] Isidre Ferrer,[‡] Daniel Ortuño-Sahagún,[§] Carlos Beas-Zárate,^{§,¶} Rafael Romero,^{**} Merce Pallàs,^{*} Carme Auladell^{†,†,2} and Antoni Camins^{*,2}

^{*}Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Institut de Biomedicina (IBUB), Centros de Investigació Biomèdica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

[†]Unitat de Bioquímica, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Tarragona, Spain; CIBERNED

[‡]Servei Anatomia Patològica, Institut de Neuropatologia, CIBERNED, IDIBELL-Hospital Universitari de Bellvitge, Universitat de Barcelona, Hospitalet de Llobregat, Spain

[§]Laboratorio de Desarrollo y Regeneración Neural, Instituto de Neurobiología, Departamento de Biología Celular y Molecular, CUCBA, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, Mexico

[¶]Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular, División de Neurociencias, CIBO, IMSS, Guadalajara, Mexico

^{**}Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

^{††}Departament de Biologia Cel·lular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Abstract

JNK3 is mainly expressed in the CNS and it plays a crucial role in neuronal death in several neurodegenerative diseases. By contrast, the isoforms JNK1 and JNK2 seem to be involved in brain development. The lack of *Jnk3* confers neuroprotection, although mechanisms responsible are unknown. The present study analyzes the gene expression profile in hippocampus from mice lacking *Jnk3* in comparison to wild-type mice. The microarray analysis showed that 22 genes are differentially expressed (z -score > 2 in two independent arrays) in *Jnk3* null mice. Among these, we focused on *pik3cb*, as it is directly related to the prosurvival phosphoinositide-3-kinase

(PI3K)/AKT pathway. Results from *Jnk3* null mice showed an increase in *pik3cb* transcript and protein, together with an increase in PI3K activity and phosphorylation of AKT. By contrast, these changes were not observed in *Jnk1* null mice, which do not present neuroresistance to certain neurodegenerative insults. Therefore, our results indicate that the activation of PI3K/AKT pathway in hippocampus because of the increase in *pik3cb* transcription and that this mechanism is specifically related to the lack of *Jnk3*.

Keywords: AKT, gene profiling, JNK, neurodegeneration, neuroprotection, PI3K.

J. Neurochem. (2011) **117**, 244–252.

The mitogen-activated protein kinase (MAPK) family comprises threonine (Thr)/tyrosine (Tyr) or serine (Ser)/Thr kinases which are activated by sequential phosphorylation of upstream kinases: a MAPK kinase kinase (MAP3K), a MAPK kinase (MAP2K), and a MAPK (Whitmarsh *et al.* 1998). Activated MAPKs phosphorylate various substrate proteins, including transcription factors such as Ets like 1 (Elk-1), *c-Jun* and activating transcription factor 2 (ATF2). The MAPK signalling pathways are activated by proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β or in response to cellular stresses such as heat shock, UV irradiation, death receptor activation and oxidative stress leading to

apoptosis which is a common response to stress (Bruckner *et al.* 2001; Sherman and Goldberg 2001).

Received December 15, 2010; revised manuscript received/accepted January 16, 2011.

Address correspondence and reprint requests to Fèlix Junyent, Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Spain; Avda/Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain.
E-mail: felixjunyent@ub.edu

¹These authors contributed equally to this study.

²Both contributed as senior authors.

Abbreviations used: AKT, protein kinase B; JNK, c-JUN N-terminal kinase; GSK3 β , glycogen synthase kinase 3 β ; PI3K, phosphoinositide-3-kinase; SDS, sodium dodecyl sulphate.

Specifically, in the JNK signalling pathway, c-JUN N-terminal Kinase (JNK) is phosphorylated by a MAP2K such as SEK1 (SAPK/ERK kinase 1) (also known as MKK4), while SEK1 is phosphorylated by apoptosis signal regulating kinase 1 or MEKK1 (MAP3K) phosphorylation (Davis 1994; Robinson and Cobb 1997; Takeda *et al.* 2003). One of the targets of activated JNK is *c-Jun*, which is specifically phosphorylated on Ser63 and/or Ser73. The phosphorylated protein can then bind activation protein 1 sites in DNA (Pulverer *et al.* 1991; Hibi *et al.* 1993).

There are three genes which encode JNK proteins in mammals (*Jnk1*, *Jnk2* and *Jnk3*). JNK1 and JNK2 are expressed in different tissues, while JNK3 is mainly expressed in the CNS. JNK3 plays a role in promoting cell death in various models of neurodegeneration, such as that induced by glutamate, kainic acid, MPTP and neurotrophic deprivation (Schwarzschild *et al.* 1997; Yang *et al.* 1997; Behrens *et al.* 1999; Eilers *et al.* 2001; Pan *et al.* 2009). The activation of JNK has also been described in chronic neurodegenerative disorders such as Alzheimer's and Parkinson's disease (Bozyczko-Coyne *et al.* 2002; Resnick and Fennell 2004; Antoniou *et al.* 2010). Furthermore, the deleterious effect of JNK activation has also been demonstrated in experimental models of Huntington's disease (Ham *et al.* 1995; Liu 1998; Liu *et al.* 2000; Meriin *et al.* 2001; Garcia *et al.* 2002). Similarly, in a murine model of ischemia the inhibition of JNK, following administration of a peptide that mimics the *c-Jun* N-terminal kinase binding domain of Jip-1, exerts a neuroprotective effect (Borsello *et al.* 2003). In addition, the lack of *Jnk3* gene has been reported to provide neuroprotection against various injuries (Brecht *et al.* 2005).

Although these data support a specific role for JNK3 inducing neuronal death, the mechanism remains to be elucidated. In order to get a more integral approach about the role of JNK3, we compared the gene expression profile of *Jnk3* null mice with the wild-type. Interestingly, *pik3cb* was one of the genes up-regulated in *Jnk3* null mice, that encodes for the protein p110 beta, directly related to the phosphoinositide-3-kinase (PI3K)/AKT (protein kinase B) pro-survival pathway. To test whether the novel mechanism observed in *Jnk3* null mice was specific to this isoform or related with any JNK protein, we analyzed the PI3K pathway in *Jnk1* null mice. The results show a novel mechanism in which the lack of *Jnk3* increases PI3K activity because of the increase in *pik3cb* transcript. Moreover, this novel cross-talk between the JNK and PI3K pathway is specific to the JNK3 isoform.

Material and methods

Animals

The generation of *Jnk3* and *Jnk1* null mice and methods for determining genotype are described elsewhere (Yang *et al.* 1997, 1998; Kuan *et al.* 1999). Mice were kindly provided by Richard A. Flavell. The mice used had been backcrossed to the C57/BL6 strain.

Animals were kept under controlled temperature, humidity and light conditions with food and water provided *ad libitum*.

Ethics statement

Mice were treated according to European Community Council Directive 86/609EEC and the procedure established by the *Department d'Agricultura, Ramaderia i Pesca* of the *Generalitat de Catalunya*. The procedure approved by the ethic committee of Universitat de Barcelona has the number 108/10 and is called: 'Mecanismes moleculars implicats en malalties neurodegeneratives: estudi de la degeneració induïda per acid kainic en ratolins knock-out per *Jnk3* i *Jnk1*'. Every effort was made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used.

Sample preparation

Thirty 6-week-old male mice were used for the present study. The array analysis was performed on six wild-type (wt) and six *Jnk3* null mice. For the PI3K activity assay, three wt mice, three *Jnk3* null mice and three *Jnk1* null mice were used. Three wt mice, three *Jnk3* null mice and three *Jnk1* null mice were used for western blot analysis.

RNA extraction and quantification

Total RNA was isolated from hippocampus of six wild-type and six *Jnk3* null mice as described previously (Chomczynski and Sacchi 1987). Briefly, tissue was homogenized in the presence of TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Chloroform was added and the RNA was precipitated from the aqueous phase with isopropanol at 4°C. RNA was reconstituted in RNase-free water, and the quantified and checked for RNA integrity with Agilent 2100 Bioanalyzer. After that, two RNA pools per group were created, each one with equal amounts of RNA from three mice. The two RNA pools per group were used to perform two independent arrays.

Array printing

A *mus musculus* 22 000 65-mer oligo library from Sigma-Genosys sets was resuspended to 50 mM in the Micro Spotting solution (ArrayIt Brand Products). SuperAmine-coated slides 25 × 75 mm (TeleChem International, Inc., Sunnyvale, CA, USA) were printed in duplicate, and fixed at 80°C for 4 h. For pre-hybridization, the slides were re-hydrated with water vapor at 60°C and fixed two cycles of UV light (1200 J). After boiling for 2 min at 92°C, the slides were washed in 95% ethanol for 1 min and pre-hybridized in 5× saline sodium citrate, 0.1% sodium dodecyl sulphate (SDS), and 1% bovine serum albumin for 1 h at 42°C. The slides were then washed and dried for further hybridization.

Probe preparation and hybridization to arrays

For cDNA synthesis, 10 µg of total RNA was used as the template, incorporating dUTP-Cy3 or dUTP-Cy5 with the CyScribe First-Strand cDNA labeling kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). Incorporation of the fluorophore was analyzed by measuring the absorbance at 555 nm for Cy3 and at 655 nm for Cy5. Equal quantities of labeled cDNA were hybridized for 14 h at 42°C to the 22 000 oligo mouse arrays in UniHyb hybridization solution (TeleChem International, Inc.).

Data acquisition

Array images were acquired and quantified in a ScanArray 4000 using the accompanying software (Packard Bioscience, Perkin-

Elmer, Minnesota, USA). All images were captured at a 50% scan rate using 65% PMT gain, 70–75% laser power, and 10 μm resolution. For each spot, the Cy3 and Cy5 mean density value and the Cy3 and Cy5 mean background value were calculated with ArrayPro Analyzer software (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA). In all cases, the fluorescence signal was between seven and ten times more intense than the background signal, and the background was evaluated just beside the labeled spot.

Data analysis

Microarray data analysis were analyzed with the GenArise software, developed by the Computing Unit at the Cellular Physiology Institute of the UNAM (Gómez-Mayen *et al.* 2006). GenArise carries out a number of transformations: background correction, lowest normalization, intensity filter, replicate analysis, and selection of differentially expressed genes. The goal of GenArise is to provide evidence that genes are differentially expressed, and it has been successfully used in other studies (Mendez-Ortiz *et al.* 2006; Luna-Moreno *et al.* 2007; Ramirez-Trujillo *et al.* 2007; Rojas-Mayorquin *et al.* 2008). The software identifies differentially expressed genes by calculating an intensity-dependent z -score. It uses a sliding window algorithm to calculate the mean and standard deviation within a window surrounding each data point, and it defines a z -score that measures the number of standard deviations that separate a data point from the mean: $z_i = (R_i - \text{mean}(R))/\text{SD}(R)$, where z_{ii} is the z -score for each element, R_i is the log-ratio for each element, and $\text{SD}(R)$ is the standard deviation of the log-ratio. Applying these criteria, the elements with a z -score > 2 standard deviations correspond to genes that are likely to be differentially expressed.

Data from microarrays is MIAME compliant and the raw data has been deposited in MIAME compliant database (accession numbers: GPL10521, GSM554206, GSM554207 and GSE22266).

qRT-PCR validation

The transcriptional activity of selected genes identified in the array, was validated using the RNA isolated from the same animals used in the arrays. These genes were selected on the basis of their potential involvement in neurodegenerative disorders. First-strand cDNA was reverse transcribed from 1 μg of mRNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The same amounts of cDNA were subsequently used for qRT-PCR and each sample was analyzed in triplicate for each gene. Taqman gene expression assays (Applied Biosystems) were used for *pi3kcb*, *banp*, *En1* and *dysf* and data were obtained with the MiniOpticon Real Time PCR system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and normalized to *gapdh* using the delta-delta Ct method.

PI3K activity assay

Tissue was homogenized in lysis buffer (50 mM Tris-HCl 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100) and protease inhibitor mixture (Complete, Roche Diagnostics, Indianapolis, USA). The homogenates were centrifuged at 16 000 g for 5 min at 4°C. The protein content in the supernatant was measured using a Pierce BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, USA). PI3K was determined with a PI3-Kinase HTRF™ Assay (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA), using 20 μg of protein for each sample, as stated in the manufacturer's protocol. Briefly, 0.5 μL of

dimethylsulfoxide was added to samples, before adding 14.5 μL of 1 \times Reaction Buffer PIP2 (Phosphatidylinositol 4-5, bisphosphate) mix to each well and pre-incubating the plate for 10 min. Next, 5 μL of ATP solution was added to each well and the plate was incubated at 22°C for 30 min. After the incubation, 5 μL of Stop Solution and 5 μL of Detection Mix were added to wells and the plate was incubated for 18 h at 22°C in the dark. HTRF was then measured with an excitation wavelengths of 335 nm and emission wavelengths of 620 and 665 nm with spectrofluorometer (Victor 3 1420, PerkinELmer, Boston, MA, USA).

Western blot

For western blot analysis, 30 μg of protein was denatured at 95°C for 5 min in sample buffer [0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% glycerol, 2% SDS, 5% β -mercaptoethanol, 0.05% bromophenol blue]. Samples were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (7.5%) and subsequently transferred onto polyvinylidene fluoride sheets (Immobilon-P; Millipore Corp.). For immunoblotting, membranes were blocked with 5% non-fat dry milk in TBST (50 mM Tris-HCl, pH 8.1, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20). They were then incubated overnight at 4°C with primary antibodies against p110beta, JNK3, JNK1, total JNK, phospho-JNK (Thr183/Tyr185), phospho-*c-Jun* (Ser73), total *c-Jun*, phospho-glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) (Ser9), total GSK3 β , phospho-AKT (Ser473), total AKT (1 : 1000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), phospho-Tau (Ser396), total Tau (1 : 1000; BioSource, Carlsbad, CA, USA) and β -actin (1 : 20 000; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). The blots were then washed thoroughly in TBST and incubated for 2 h with a horseradish peroxidase-conjugated anti-IgG antibody (Amersham), followed by the enhanced chemiluminescence detection system (Amersham), according to the supplier's instructions. Chemiluminescence measurements and semi-quantitative values were obtained using the software Quantity One (Bio-Rad) and the results were expressed as a percentage with respect to wild-type controls. The corresponding β -actin was taken for each sample to normalize for any differences in gel loading.

Statistical analysis

Phosphoinositide-3-kinase assay and western blots were compared by the non-parametric Mann-Whitney U -test. All data are presented as means \pm SEM, and differences are considered significant at $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***). Differences in gene expression between samples were evaluated using a t -test for independent samples.

Results

Identification of differentially expressed hippocampal transcripts in *Jnk3* null mice

Differences in hippocampal gene expression of *Jnk3* null mice were identified using the microarray technique. Each array that contains 22 000 oligo library reports a list of genes with z -score values. From these data, we only looked for genes with a z -score > 2 . From the two lists generated by the two independent arrays, we selected those genes that were differentially expressed in both arrays with a z -score > 2 . By this criterion, a list of 22 differentially expressed transcripts

was obtained. Among these, 5 are RIKEN cDNA and 17 are transcripts that encode for known proteins. Of these 17 identified transcripts, 10 were up-regulated and 7 were down-regulated (Table 1). From this list we verified the differences

in expression by qRT-PCR of *phosphoinositide-3-kinase catalytic beta polypeptide (pik3cb)*, *BTG3 associated nuclear protein (banp)*, *dysferlin (dysf)* and *engrailed 1 (En1)*. These genes were selected on the basis of their potential involve-

Table 1 Genes differentially expressed in the hippocampi of Jnk3 null mice vs. wild-type mice

GenBank number	Gene symbol	Gene name	z-score	SD
AK012938	<i>Tmem107</i>	Transmembrane protein 107	2.79	0.08
AK013609	<i>Zdhhc4</i>	Zinc finger, DHHC domain containing 4	2.61	0.06
AK003230	<i>Pik3cb</i>	Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, beta polypeptide	2.55	0.61
NM_016812	<i>Banp</i>	BTG3 associated nuclear protein	2.40	0.36
NM_011543	<i>Skp1a</i>	S-phase kinase-associated protein 1A	2.31	0.38
NM_008980	<i>Ptpra</i>	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, A	2.29	0.20
NM_019473	<i>Olf155</i>	Olfactory receptor 155	2.22	0.15
AF374267	<i>Srebf2</i>	Sterol regulatory element binding factor 2	2.10	0.10
NM_007674	<i>Cdx4</i>	Caudal type homeobox 4	2.09	0.12
AK007679	<i>1810033B17Rik</i>	RIKEN cDNA 1810033B17	2.09	0.05
NM_011268	<i>Rgs9</i>	Regulator of G-protein signaling 9	2.04	0.02
AK019660	<i>4930488B04Rik</i>	RIKEN cDNA 4930488B04	-2.05	0.06
AF282278	<i>Olf1893</i>	Olfactory receptor 893	-2.10	0.04
AF188290	<i>Dysf</i>	Dysferlin	-2.12	0.08
AK005708	<i>Cox8c</i>	Cytochrome c oxidase, subunit VIIIc	-2.12	0.06
AK005166	<i>Ip6k2</i>	Inositol hexaphosphate kinase 2	-2.16	0.08
AK013367	<i>2810459M11Rik</i>	RIKEN cDNA 2810459M11	-2.17	0.03
NM_010133	<i>En1</i>	Engrailed 1	-2.23	0.14
AK006550	<i>1700030I03Rik</i>	RIKEN cDNA 1700030I03	-2.31	0.33
AK020104	<i>Rnf170</i>	Ring finger protein 170	-2.44	0.53
AK018452	<i>Rbm22</i>	RNA binding motif protein 22	-2.51	0.19
AK015928	<i>4930528J11Rik</i>	RIKEN cDNA 4930528J11	-2.68	0.67

z-scores are the mean value of two independent arrays from genes that present a z-score $\geq \pm 2$ in the two arrays. Standard deviation (SD) of the mean of each z-score value is also shown.

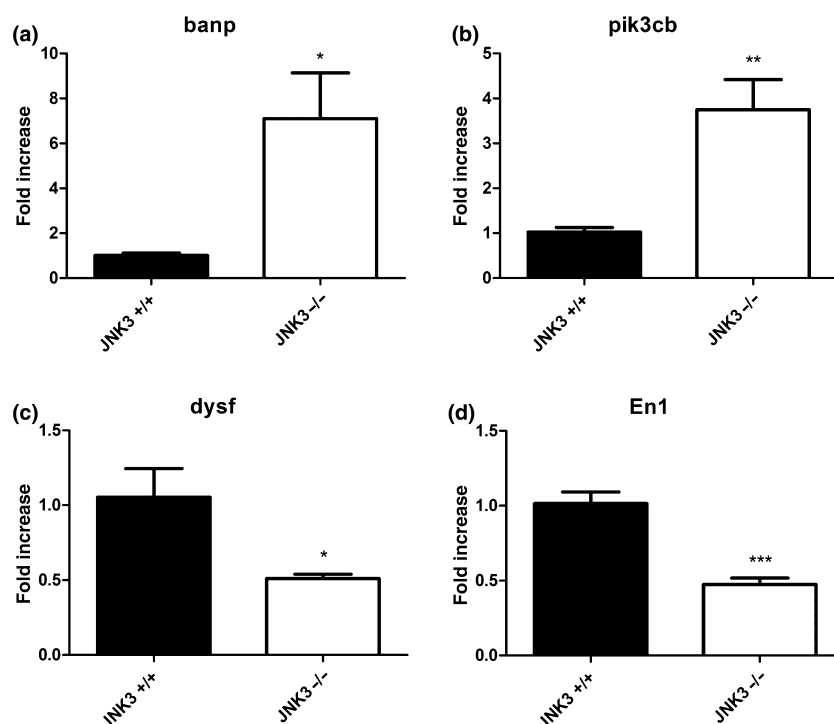


Fig. 1 qRT-PCR performed for *banp*, *pik3cb*, *dysf* and *En1*. A significant increase in *banp* and *pik3cb* and a decrease in *dysf* and *En1* were observed. Each point is the mean \pm SEM of three independent experiments, determined from three samples per group (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ with respect to wild-type).

ment in neurodegenerative disorders and also to confirm the results obtained from the array. Data obtained from qRT-PCR showed an increase in *pik3cb* and *banp* transcripts and a decrease in *dysf* and *En1* transcripts in *Jnk3* null mice with respect to wt mice (Fig. 1). These data confirm that the results obtained by microarray analysis were consistent.

p110 beta and PI3K activity in *Jnk3* and *Jnk1* null mice

From the list of genes differentially expressed in *Jnk3* null mice with respect to wt, particular attention was paid to *pik3cb*, as it encodes for the catalytic subunit of PI3K (p110 beta), a pivotal kinase involved in survival pathways in many neurodegenerative diseases. Western blots for p110 beta revealed an increase of this protein in *Jnk3* null mice, while no changes were observed in *Jnk1* null mice (Fig. 2a). These

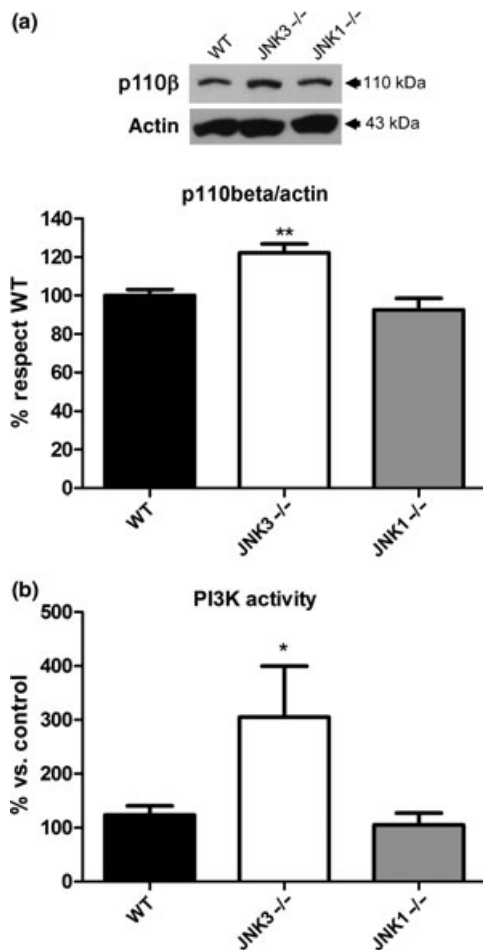


Fig. 2 (a) Western blot against p110 beta in *Jnk3* and *Jnk1* null mice with respect to wild type mice. Each point is the mean \pm SEM of three independent experiments, determined from three samples per group (** $p < 0.01$; with respect to wild-type). (b) PI3K activity determined in wild-type, *Jnk3* and *Jnk1* null mice. A significant increase of PI3K activity was observed in *Jnk3* null mice. Each point is the mean \pm SEM of three independent experiments, determined from three samples per group (* $p < 0.05$; with respect to wild-type).

data demonstrate that the increase of *pik3cb* transcription, also results in an increase of protein p110 beta in *Jnk3* null mice. Moreover, the comparison of PI3K activity in *Jnk3* and *Jnk1* null mice with the wt revealed increased PI3K activity in *Jnk3* null mice, whereas no changes were observed in *Jnk1* null mice (Fig. 2b). The data indicate that this novel mechanism of activation of PI3K is specifically attributable to the lack of *Jnk3*.

PI3K/AKT pathway in *Jnk3* and *Jnk1* null mice

As we detected an increase of the *pik3cb* transcript as well as increased PI3K activity in *Jnk3* null mice, we then analyzed the PI3K/AKT pathway in *Jnk3* and *Jnk1* null mice. The levels of JNK, phospho JNK and phospho *c-Jun* were also analyzed in both kinds of *Jnk* null mice. A reduction in total JNK levels was observed in *Jnk3* null mice, together with a decrease in JNK phosphorylation at Thr183/Tyr185 (Fig. 3). These decreases in total JNK levels and phospho JNK were accompanied by a reduction in *c-Jun* phosphorylation at Ser73 in *Jnk3* null mice with respect to wt mice (Fig. 3). The analysis of AKT phosphorylation levels at Ser473 revealed an increase in *Jnk3* null mice with respect to wt (Fig. 4). Furthermore, an increase in GSK3 β phosphorylation at Ser9 was also detected in *Jnk3* null mice, along with a decrease in Tau protein phosphorylation at Ser396. (Fig. 4).

Results from *Jnk1* null mice also revealed a decrease in total JNK levels with respect to wt, as well as a reduction in JNK phosphorylation at Thr183/Tyr185 (Fig. 5). We also detected a decrease in *c-Jun* phosphorylation at Ser73 (Fig. 5). As we expected, as previous results showed no increase in *pik3cb* transcript, p110 beta protein or PI3K activity in *Jnk1* null mice, no differences were observed in AKT phosphorylation at Ser473 (data not shown). Similarly, no differences in GSK3 β phosphorylation at Ser9 were detected, and no changes in Tau phosphorylation at Ser396 were observed in *Jnk1* null mice with respect to wt mice (data not shown).

Discussion

The aim of the present study was to identify the gene expression profile in *Jnk3* null mice with their neuroresistance (Yang *et al.* 1997; Brecht *et al.* 2005). The results showed that some of the genes that are differentially expressed with respect to the wild-type participate in survival signalling, neuroprotection, cell death and certain neurodegenerative disease. The genes that were up-regulated included the following: *pik3cb*, related to survival signalling (Datta *et al.* 1999; Lawlor and Alessi 2001; Kim and Chung 2002), *banp*, which protects cells from free radical induced apoptosis (Singh *et al.* 2010), *skp1a*, related to Parkinson's disease (Grunblatt *et al.* 2004; Fishman-Jacob *et al.* 2009; Mandel *et al.* 2009), *ptpra*, because the use of RNAi for RPTPalpa induces apoptosis (Zheng *et al.*

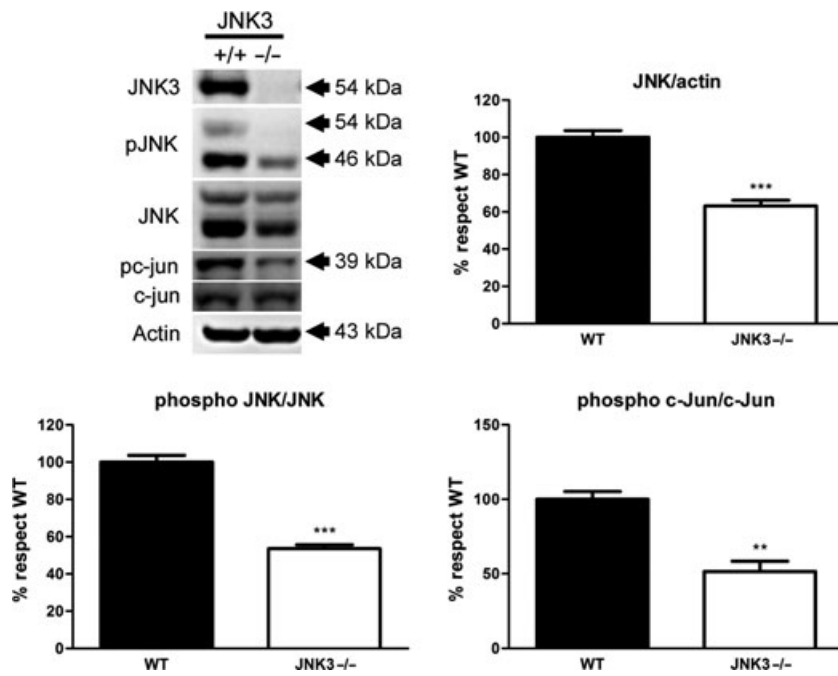


Fig. 3 Western blots of JNK3, phospho JNK (Thr183/Tyr185), JNK, phospho *c-Jun* (Ser73), and *c-Jun* for wild-type and *Jnk3* null mice. All bands were normalized by the corresponding beta-actin. For JNK density quantification, both bands (46 and 54 kDa) were evaluated.

Bar graphs are shown for JNK vs. actin, phospho JNK vs. JNK and phospho *c-Jun* vs. *c-Jun*. Each point is the mean ± SEM of three independent experiments (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ with respect to wild-type).

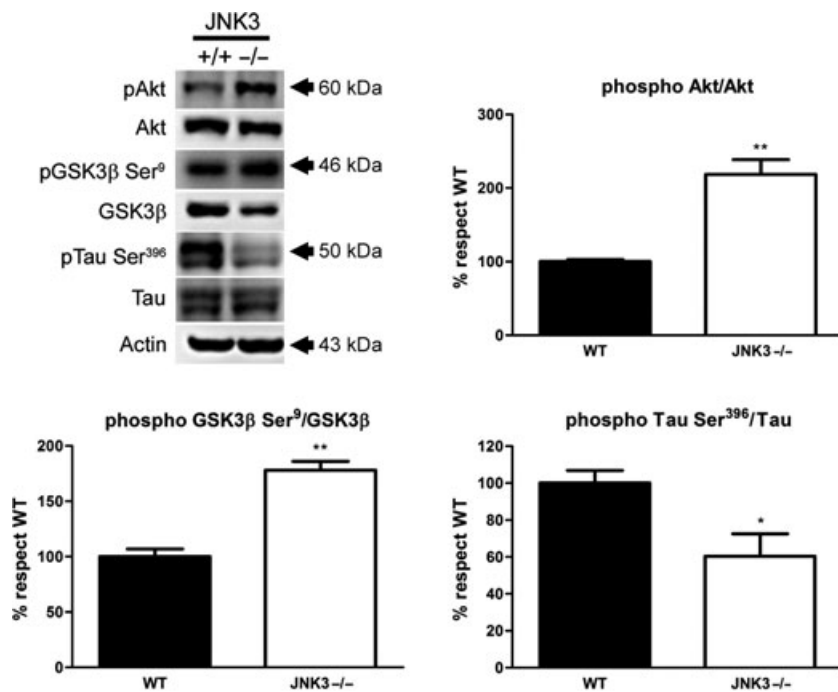


Fig. 4 Western blots of phospho AKT (Ser473), AKT, phospho GSK3β (Ser9), GSK3β, phospho Tau (Ser396) and Tau for wild-type and *Jnk3* null mice. All bands were normalized by the corresponding beta-actin. Bar graphs are shown for phospho AKT vs. AKT, phospho

GSK3β (Ser9) vs. GSK3β and phospho Tau vs. Tau. Each point is the mean ± SEM of three independent experiments (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ with respect to wild-type).

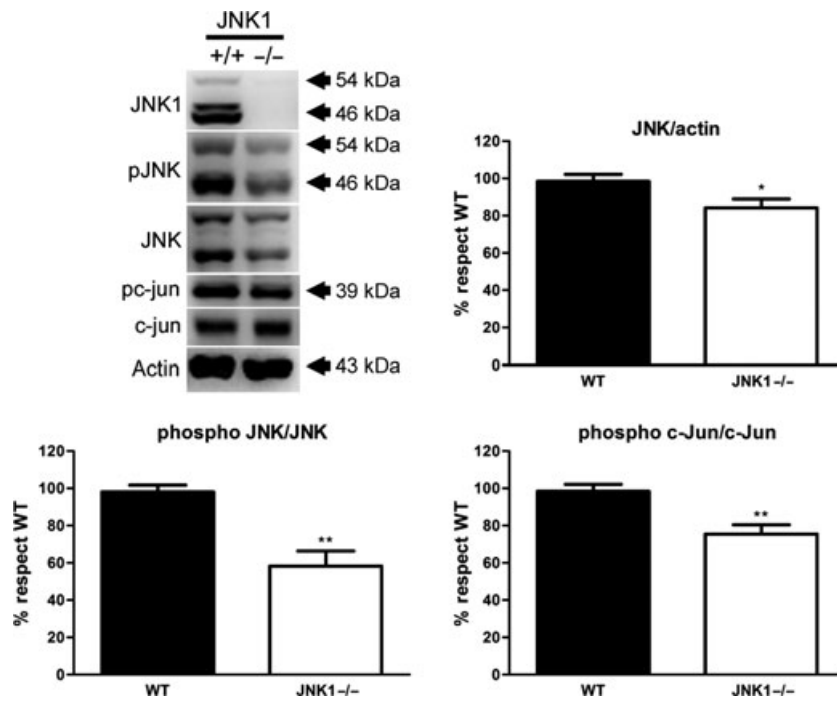


Fig. 5 Western blots of JNK1, phospho JNK (Thr183/Tyr185), JNK, phospho *c-Jun* (Ser73), and *c-Jun* for wild-type and *Jnk1* null mice. All bands were normalized by the corresponding beta-actin. For JNK density quantification, both bands (46 and 54 kDa) were evaluated.

Bar graphs are shown for JNK vs. actin, phospho JNK vs. JNK and phospho *c-Jun* vs. *c-Jun*. Each point is the mean ± SEM of three independent experiments (**p* < 0.05; ***p* < 0.01 with respect to wild-type).

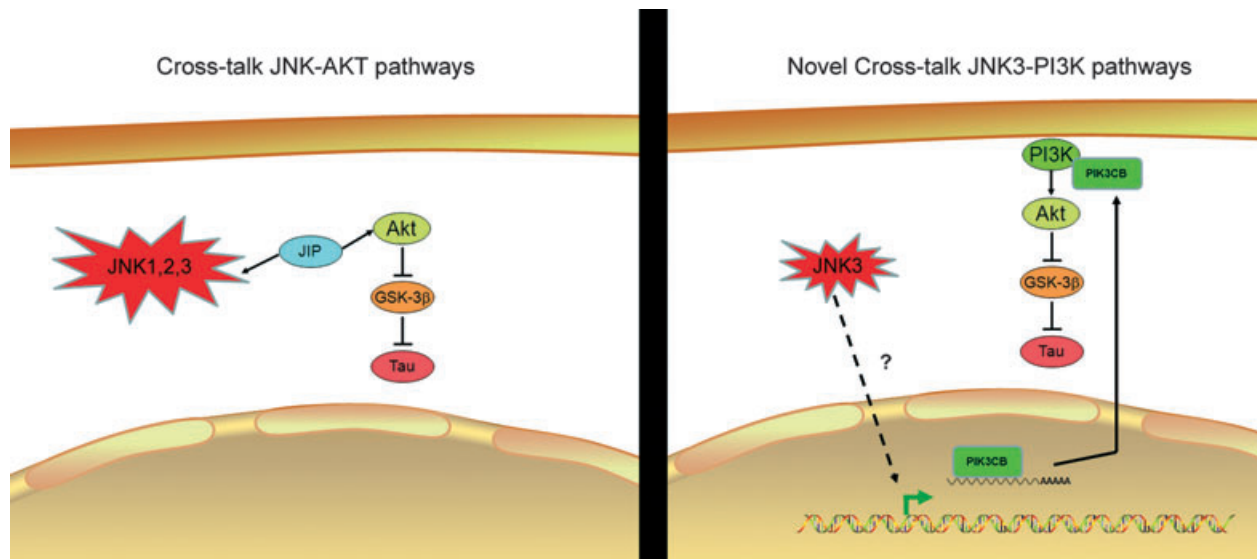


Fig. 6 Activation of PI3K/AKT pathway through the increase of pik3cb transcript induced by the lack of JNK3 represents a novel cross-talk between JNK and AKT pathways.

2008), *sreb2*, which has been reported to be decreased in kainate injury (Kim and Ong 2009) and *rsg9*, which is altered in Parkinson's disease (Potashkin *et al.* 2007). The genes that were down-regulated included the following: *dysf*, which encodes for Dysferlin, a protein that has been

found to be accumulated in the Alzheimer brain (Galvin *et al.* 2006), *ip6k2*, which is involved in cell death (Zhang and Burrows 2004; Shames and Minna 2008; Morrison *et al.* 2009) and *En1*, related to Parkinson's disease (Sgado *et al.* 2006).

Thus, of the 17 transcripts that we identified as differentially expressed in *Jnk3* null mice, nine are related to neurodegenerative diseases, cell death, and cell survival. Therefore, results indicate that the gene expression profile found in *Jnk3* null mice may be responsible for the neuroresistance to cell death that is observed in some experimental models (Yang *et al.* 1997; Brecht *et al.* 2005).

Although all the above mentioned genes are of great interest for future research into *Jnk3* null mice and the relationship between this gene and neurodegenerative diseases, we focused on *pik3cb*. This gene encodes for PI3K catalytic beta polypeptide. This protein forms part of PI3K which is activated in response to various mitogenic signals and catalyzes the formation of second messenger lipid phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate. The increase of this second messenger activates the Akt pathway, which is involved in survival signaling in several cell types including neurons (Datta *et al.* 1999; Lawlor and Alessi 2001; Kim and Chung 2002). Some studies demonstrate a cross-talk between AKT and JNK pathways by means of JNK-interacting protein scaffold proteins (Kim *et al.* 2002, 2003; Song and Lee 2005; Song *et al.* 2005). This interaction has been reported in different JNK isoforms and the cross-talk is directly associated with AKT but not with PI3K. On the basis of the data from the array analysis we hypothesized that the increase in *pik3cb* transcript in *Jnk3* null mice could activate the PI3K/AKT pathway, a mechanism of cross-talk that has not been described until now. Moreover, as *Jnk3* null mice show greater neuroresistance than do *Jnk1* null mice (Brecht *et al.* 2005), we studied the JNK and PI3K/AKT pathways in both genotypes.

The results indicate that in *Jnk3* null mice there is an increase in p110 beta protein and in PI3K activity because of the up-regulation of *pik3cb*. Thus, the AKT pathway was activated in this genotype through the increase in *pik3cb* transcript. However, in *Jnk1* null mice we did not detect either of these increases. In concordance with these data, no activation of AKT pathway was observed in *Jnk1* null mice. Therefore, the data indicate that the lack of JNK3 activates PI3K activity through regulation of the *pik3cb* gene in a specific manner (Fig. 6). However, further studies in cell culture or *in vivo* models shall confirm this JNK3 specific activation of the PI3K/Akt signaling pathway. Although some previous studies indicate the regulation of AKT pathway because of the increase or inhibition of the JNK pathway, the present study demonstrate for the first time a novel cross-talk between these pathways and that is specific for JNK3 isoform.

Acknowledgements

We thank Lorena Chávez, José Luis Santillán, Simón Guzmán and Jorge Ramírez for microarray analysis. We are also grateful to the Language Advisory Service of the University of Barcelona

for revising this manuscript. This study was funded by grant 2009/SGR00853 from the *Generalitat de Catalunya* (autonomous government of Catalonia), by grants BFU2007-63209/BFI, BFU2010-19119/BFI and SAF2009-13093 from the Spanish *Ministerio de Ciencia e Innovación*, grant PI080400 and PS09/01789 from the Instituto de Salud Carlos III, grant 063230 from the Fundació la Marató TV3 and grant 610RT0405 from Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). Ester Verdaguer holds a ‘Batriu de Pinós’ postdoctoral contract awarded by the *Generalitat de Catalunya* (autonomous government of Catalonia). Authors have no conflict of interest.

References

- Antoniou X., Falconi M., Di Marino D. and Borsello T. (2010) JNK3 as a therapeutic target for neurodegenerative diseases. *J. Alzheimers Dis.* DOI: 10.3233/JAD-2010-1413.
- Behrens A., Sibilía M. and Wagner E. F. (1999) Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. *Nat. Genet.* **21**, 326–329.
- Borsello T., Clarke P. G., Hirt L., Vercelli A., Repici M., Schorderet D. F., Bogousslavsky J. and Bonny C. (2003) A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against excitotoxicity and cerebral ischemia. *Nat. Med.* **9**, 1180–1186.
- Bozyczko-Coyne D., Saporito M. S. and Hudkins R. L. (2002) Targeting the JNK pathway for therapeutic benefit in CNS disease. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* **1**, 31–49.
- Brecht S., Kirchhof R., Chromik A. *et al.* (2005) Specific pathophysiological functions of JNK isoforms in the brain. *Eur. J. Neurosci.* **21**, 363–377.
- Bruckner S. R., Tammariello S. P., Kuan C. Y., Flavell R. A., Rakic P. and Estus S. (2001) JNK3 contributes to c-Jun activation and apoptosis but not oxidative stress in nerve growth factor-deprived sympathetic neurons. *J. Neurochem.* **78**, 298–303.
- Chomczynski P. and Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156–159.
- Datta S. R., Brunet A. and Greenberg M. E. (1999) Cellular survival: a play in three Acts. *Genes Dev.* **13**, 2905–2927.
- Davis R. J. (1994) MAPKs: new JNK expands the group. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 470–473.
- Eilers A., Whitfield J., Shah B., Spadoni C., Desmond H. and Ham J. (2001) Direct inhibition of c-Jun N-terminal kinase in sympathetic neurones prevents c-jun promoter activation and NGF withdrawal-induced death. *J. Neurochem.* **76**, 1439–1454.
- Fishman-Jacob T., Reznichenko L., Youdim M. B. and Mandel S. A. (2009) A sporadic Parkinson disease model via silencing of the ubiquitin-proteasome/E3 ligase component SKP1A. *J. Biol. Chem.* **284**, 32835–32845.
- Galvin J. E., Palamand D., Strider J., Milone M. and Pestronk A. (2006) The muscle protein dysferlin accumulates in the Alzheimer brain. *Acta Neuropathol.* **112**, 665–671.
- García M., Vanhoutte P., Pages C., Besson M. J., Brouillet E. and Caboche J. (2002) The mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid induces striatal neurodegeneration via a c-Jun N-terminal kinase/c-Jun module. *J. Neurosci.* **22**, 2174–2184.
- Gómez-Mayen A., Corral-Guillé G., Riego-Ruiz L. and Coello Coutino G. (2006) The Package ‘GenArise’ (API) Version 1.7.3 Microarray analysis tool. <http://www.ifc.unam.mx/genarise/>.
- Grunblatt E., Mandel S., Jacob-Hirsch J. *et al.* (2004) Gene expression profiling of parkinsonian substantia nigra pars compacta; alterations

- in ubiquitin-proteasome, heat shock protein, iron and oxidative stress regulated proteins, cell adhesion/cellular matrix and vesicle trafficking genes. *J. Neural Transm.* **111**, 1543–1573.
- Ham J., Babij C., Whitfield J., Pfarr C. M., Lallemand D., Yaniv M. and Rubin L. L. (1995) A c-Jun dominant negative mutant protects sympathetic neurons against programmed cell death. *Neuron* **14**, 927–939.
- Hibi M., Lin A., Smeal T., Minden A. and Karin M. (1993) Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev.* **7**, 2135–2148.
- Kim D. and Chung J. (2002) Akt: versatile mediator of cell survival and beyond. *J. Biochem. Mol. Biol.* **35**, 106–115.
- Kim J. H. and Ong W. Y. (2009) Localization of the transcription factor, sterol regulatory element binding protein-2 (SREBP-2) in the normal rat brain and changes after kainate-induced excitotoxic injury. *J. Chem. Neuroanat.* **37**, 71–77.
- Kim A. H., Yano H., Cho H., Meyer D., Monks B., Margolis B., Birnbaum M. J. and Chao M. V. (2002) Akt1 regulates a JNK scaffold during excitotoxic apoptosis. *Neuron* **35**, 697–709.
- Kim A. H., Sasaki T. and Chao M. V. (2003) JNK-interacting protein 1 promotes Akt1 activation. *J. Biol. Chem.* **278**, 29830–29836.
- Kuan C. Y., Yang D. D., Samanta Roy D. R., Davis R. J., Rakic P. and Flavell R. A. (1999) The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron* **22**, 667–676.
- Lawlor M. A. and Alessi D. R. (2001) PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J. Cell Sci.* **114**, 2903–2910.
- Liu Y. F. (1998) Expression of polyglutamine-expanded Huntingtin activates the SEK1-JNK pathway and induces apoptosis in a hippocampal neuronal cell line. *J. Biol. Chem.* **273**, 28873–28877.
- Liu Y. F., Dorow D. and Marshall J. (2000) Activation of MLK2-mediated signaling cascades by polyglutamine-expanded huntingtin. *J. Biol. Chem.* **275**, 19035–19040.
- Luna-Moreno D., Vazquez-Martinez O., Baez-Ruiz A., Ramirez J. and Diaz-Munoz M. (2007) Food restricted schedules promote differential lipoperoxidative activity in rat hepatic subcellular fractions. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **146**, 632–643.
- Mandel S. A., Fishman-Jacob T. and Youdim M. B. (2009) Modeling sporadic Parkinson's disease by silencing the ubiquitin E3 ligase component, SKP1A. *Parkinsonism Relat. Disord.* **15**(Suppl 3), S148–S151.
- Mendez-Ortiz M. M., Hyodo M., Hayakawa Y. and Membrillo-Hernandez J. (2006) Genome-wide transcriptional profile of *Escherichia coli* in response to high levels of the second messenger 3', 5'-cyclic diguanylic acid. *J. Biol. Chem.* **281**, 8090–8099.
- Meriin A. B., Mabuchi K., Gabai V. L., Yaglom J. A., Kazantsev A. and Sherman M. Y. (2001) Intracellular aggregation of polypeptides with expanded polyglutamine domain is stimulated by stress-activated kinase MEKK1. *J. Cell Biol.* **153**, 851–864.
- Morrison B. H., Haney R., Lamarre E., Drazba J., Prestwich G. D. and Lindner D. J. (2009) Gene deletion of inositol hexakisphosphate kinase 2 predisposes to aerodigestive tract carcinoma. *Oncogene* **28**, 2383–2392.
- Pan J., Xiao Q., Sheng C. Y., Hong Z., Yang H. Q., Wang G., Ding J. Q. and Chen S. D. (2009) Blockade of the translocation and activation of c-Jun N-terminal kinase 3 (JNK3) attenuates dopaminergic neuronal damage in mouse model of Parkinson's disease. *Neurochem. Int.* **54**, 418–425.
- Potashkin J. A., Kang U. J., Loomis P. A., Jodelka F. M., Ding Y. and Meredith G. E. (2007) MPTP administration in mice changes the ratio of splice isoforms of fosB and rgs9. *Brain Res.* **1182**, 1–10.
- Pulverer B. J., Kyriakis J. M., Avruch J., Nikolakaki E. and Woodgett J. R. (1991) Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* **353**, 670–674.
- Ramirez-Trujillo J. A., Encarnacion S., Salazar E., de los Santos A. G., Dunn M. F., Emerich D. W., Calva E. and Hernandez-Lucas I. (2007) Functional characterization of the *Sinorhizobium meliloti* acetate metabolism genes aceA, SMC00767, and glcB. *J. Bacteriol.* **189**, 5875–5884.
- Resnick L. and Fennell M. (2004) Targeting JNK3 for the treatment of neurodegenerative disorders. *Drug Discov. Today* **9**, 932–939.
- Robinson M. J. and Cobb M. H. (1997) Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 180–186.
- Rojas-Mayorquin A. E., Torres-Ruiz N. M., Ortuno-Sahagun D. and Gudino-Cabrera G. (2008) Microarray analysis of striatal embryonic stem cells induced to differentiate by ensheathing cell conditioned media. *Dev. Dyn.* **237**, 979–994.
- Schwarzschild M. A., Cole R. L. and Hyman S. E. (1997) Glutamate, but not dopamine, stimulates stress-activated protein kinase and AP-1-mediated transcription in striatal neurons. *J. Neurosci.* **17**, 3455–3466.
- Sgado P., Alberi L., Gherbassi D., Galasso S. L., Ramakers G. M., Alavian K. N., Smidt M. P., Dyck R. H. and Simon H. H. (2006) Slow progressive degeneration of nigral dopaminergic neurons in postnatal Engrailed mutant mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103**, 15242–15247.
- Shames D. S. and Minna J. D. (2008) IP6K2 is a client for HSP90 and a target for cancer therapeutics development. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **105**, 1389–1390.
- Sherman M. Y. and Goldberg A. L. (2001) Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron* **29**, 15–32.
- Singh K., Sinha S., Malonia S. K. and Chattopadhyay S. (2010) Tumor Necrosis Factor alpha (TNFalpha) regulates CD40 expression through SMAR1 phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **391**, 1255–1261.
- Song J. J. and Lee Y. J. (2005) Dissociation of Akt1 from its negative regulator JIP1 is mediated through the ASK1-MEK-JNK signal transduction pathway during metabolic oxidative stress: a negative feedback loop. *J. Cell Biol.* **170**, 61–72.
- Song J., Clair T., Noh J. H. *et al.* (2005) Autotaxin (lysoPLD/NPP2) protects fibroblasts from apoptosis through its enzymatic product, lysophosphatidic acid, utilizing albumin-bound substrate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **337**, 967–975.
- Takeda K., Matsuzawa A., Nishitoh H. and Ichijo H. (2003) Roles of MAPKKK ASK1 in stress-induced cell death. *Cell Struct. Funct.* **28**, 23–29.
- Whitmarsh A. J., Cavanagh J., Tournier C., Yasuda J. and Davis R. J. (1998) A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation. *Science* **281**, 1671–1674.
- Yang D. D., Kuan C. Y., Whitmarsh A. J., Rincon M., Zheng T. S., Davis R. J., Rakic P. and Flavell R. A. (1997) Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature* **389**, 865–870.
- Yang J., New L., Jiang Y., Han J. and Su B. (1998) Molecular cloning and characterization of a human protein kinase that specifically activates c-Jun N-terminal kinase. *Gene* **212**, 95–102.
- Zhang H. and Burrows F. (2004) Targeting multiple signal transduction pathways through inhibition of Hsp90. *J. Mol. Med.* **82**, 488–499.
- Zheng X., Resnick R. J. and Shalloway D. (2008) Apoptosis of estrogen-receptor negative breast cancer and colon cancer cell lines by PTP alpha and src RNAi. *Int. J. Cancer* **122**, 1999–2007.

Lack of Jun-N-terminal kinase 3 (JNK3) does not protect against neurodegeneration induced by 3-nitropropionic acid

F. Junyent*†, L. de Lemos*, E. Verdaguer‡, M. Pallàs*, J. Folch†, C. Beas-Zárate§, A. Camins* and C. Auladell‡

*Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Institut de Biomedicina (IBUB), Centros de Investigació Biomèdica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Universitat de Barcelona, Barcelona, †Unitat de Bioquímica, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Tarragona, ‡Departament de Biologia Cel·lular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, and §Departamento de Biología Celular y Molecular, C.U.C.B.A, Universidad de Guadalajara and División de Neurociencias, Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Jalisco, Mexico

F. Junyent, L. de Lemos, E. Verdaguer, M. Pallàs, J. Folch, C. Beas-Zárate, A. Camins and C. Auladell (2012) *Neuropathology and Applied Neurobiology* 38, 311–321

Lack of Jun-N-terminal kinase 3 (JNK3) does not protect against neurodegeneration induced by 3-nitropropionic acid

Aims: 3-Nitropropionic acid (3-NP) is a toxin that replicates most of the clinical and pathophysiological symptoms of Huntington's disease, inducing neurodegeneration in the striatum due to the inhibition of mitochondrial succinate dehydrogenase. Different pathways have been implicated in the cell death induced by 3-NP in rodents. One of them is the Jun-N-terminal kinase (JNK) pathway, which may play a role in the neurodegenerative process in different diseases. Moreover, the lack of one isoform of JNK (JNK3) has been associated with neuroprotection in different experimental models of neurodegeneration. Therefore, in the present study the role of JNK3 in the experimental Huntington's model induced by 3-NP administration was evaluated. **Methods:** 3-NP was intraperitoneally administered once a day for 3 days to wild-type and *Jnk3*-null mice. Coronal brain sections

were used to determine cell death and astrogliosis in striatum. Western blots were performed to determine the involvement of different pathways in both wild-type and *Jnk3*-null mice. **Results:** Although JNK activation was observed following 3-NP administration, the results indicate that the lack of JNK3 does not confer neuroprotection against 3-NP toxicity. Thus, other pathways must be involved in the neurodegeneration induced in this model. One of the possible pathways towards 3-NP-induced apoptosis could involve the calpains, as their activity was increased in wild-type and *Jnk3*-null mice. **Conclusion:** Although JNK3 is a key protein involved in cell death in different neurodegenerative diseases, the present study demonstrates that the lack of JNK3 does not confer neuroprotection against 3-NP-induced neuronal death.

Keywords: Huntington, JNK3, neurodegeneration, nitropropionic acid

Correspondence: Fèlix Junyent, Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Avda/ Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain. Tel: +34 93 4024531; Fax: +34 93 4035982; E-mail: felixjunyent@ub.edu

Fèlix Junyent and Luisa de Lemos contributed equally to this study. Antoni Camins and Carme Auladell contributed as senior authors.

Introduction

The neurotoxin 3-nitropropionic acid (3-NP) is an irreversible inhibitor of succinate dehydrogenase (SDH; mitochondrial complex II), which causes prolonged energy impairment and replicates most of the clinical and

pathophysiological symptoms of Huntington's disease (HD) [1–3].

Chronic 3-NP administration in rodents and non-human primates induces striatal lesions that resulted in dystonia and other abnormal motor behaviour. Therefore, 3-NP can mimic the neurochemical and behavioural features of HD in humans [4,5]. Thus in some animals the 3-NP-triggered neurodegeneration model mimics the cascade of processes leading to cell death in HD as well as some of the histological and pathological characteristics associated with this neurodegenerative disease.

Although not entirely elucidated, the mechanisms of 3-NP-induced neurotoxicity involve the depletion of ATP, mitochondrial membrane depolarization, deregulation of intracellular calcium homeostasis, generation of oxidative stress, calpain activation and release of pro-apoptotic proteins from mitochondria with the consequent activation of caspases and apoptotic pathways [6–10]. There is also evidence that 3-NP induces the release of apoptosis-inducing factor and caspase-independent apoptosis. Moreover, several studies have demonstrated that 3-NP-induced striatal degeneration is mediated by glutamatergic activation. In addition, N-Methyl-D-aspartic acid (NMDA) antagonists such as MK-801 and orphenadrine exert neuroprotective effects against 3-NP [11].

It is also known that 3-NP could activate CDK5/p35 via the action of calpain, favouring the formation of CDK5/p25, which is involved in neuronal cell death [12,13].

Jun-N-terminal kinase (JNK) activity may play an important role in the pathogenesis of the selective lesion induced by 3-NP [14]. As 3-NP induces neuronal death through the activation of multiple pathways, the objective of this study was to identify and better clarify the activation of apoptotic pathways in cell death induced by 3-NP, specifically the stress-activated protein kinase/JNK pathway. Three JNK isoforms (JNK1–3) have been described, from which JNK3 is mainly localized in brain. This isoform has been related to the induction of neuronal apoptosis in different experimental models [15–17]. The first evidence of the involvement of JNK in excitotoxicity derived from the treatment of *Jnk3*-null mice with kainic acid, since a reduction in convulsions and prevention of apoptosis was shown [17]. However, it is not known whether the specific isoform JNK3 plays a prominent role in 3-NP neurotoxicity. For this reason we used the *Jnk3*-null mice in the present study to evaluate the role of this isoform in a HD model.

Materials and methods

Animals

The generation of *Jnk3*-null mice and methods for determining their genotype are described elsewhere [17,18]. The mice used had been backcrossed to the C57BL/6 strain. Animals were housed in controlled temperature, humidity and light conditions with food and water provided *ad libitum*.

Experimental procedures were performed in accordance with the European Community Council Directive 86/609EEC and the procedure established by the Departament d'Agricultura, Ramaderia I Pesca of the Generalitat de Catalunya.

All efforts were made to minimize animal suffering and the number of animals used.

Treatment and tissue processing

A total of 44 6-week-old male mice were used. Twenty animals were intraperitoneally (i.p.) injected with 3-NP at a dose of 70 mg/kg once a day for 3 days. The control mice ($n = 12$) were injected with saline solution (i.p.) instead of 3-NP. All mice were sacrificed 24 h after the last injection.

Mice were evaluated daily from day 0 until day 4 of the experiment for both body weight loss and motor impairment. 3-NP-treated mice followed a normal time course of effects [19].

Animals treated as described above were separated to form four experimental groups (six wild-type mice as controls, six *Jnk3*-null mice as controls, 10 wild-type mice treated with 3-NP and 10 *Jnk3*-null mice treated with 3-NP).

All animals were anaesthetized by injection (i.p.) of Ketamine (100 mg/kg) and Xylazine (10 mg/kg). Subsequently, half of the animals in each group were perfused with 40 g/l paraformaldehyde in 0.1 ml/l phosphate buffer (PB) and the brains were removed and post-fixed for 24 h. The brains were subsequently rinsed in 40 g/l paraformaldehyde in 0.1 mol/l PB with 300 g/l of sucrose for 24 h and then frozen. Coronal sections of 20 μm were obtained.

For biochemical studies, mice were perfused with saline solution [phosphate-buffered saline (PBS)] and striatum was dissected out and tissues were rapidly frozen and stored at -80°C until analysis.

For SDH activity assay, six mice (three wild-type mice treated with 3-NP and three *Jnk3*-null mice treated with

3-NP) were i.p. injected with 3-NP at a dose of 70 mg/kg and six mice (three wild-type mice as controls, three *Jnk3*-null mice as controls) injected with saline solution (i.p.) instead of 3-NP and were sacrificed after 3 h of administration.

Fluoro-Jade B staining

Slides were defatted by dehydration in ethanol before being rehydrated. After two washes in distilled water, slides were immersed in 0.6 g/l potassium permanganate (KMnO₄) for 15 min in the dark. Then, after two washes in distilled water, the slides were transferred to the staining solution containing 0.1 ml/l acetic acid and 0.004 ml/l of the fluorochrome Fluoro-Jade B for 30 min in the dark. Slides were rinsed in distilled water, dried, and then submerged directly into xylene and mounted in DPX medium. Slides were analysed using an epifluorescence microscope (Olympus BX61, Olympus Europa Gmb, Hamburg, Germany).

GFAP immunohistochemistry

Free-floating 20- μ m thick coronal sections were rinsed in 0.1 ml/l PB pH 7.2 and pre-incubated in a blocking solution [100 ml/l of foetal bovine serum, 2.5 g/l of bovine serum albumin (BSA) and 0.2 mol/l of glycine in PBS–Triton X-100, PBS with 5 ml/l of Triton X-100]. Sections were then incubated overnight (O/N) at 4°C with primary antibody: rabbit anti-GFAP (1:1000; DAKO, Glostrup, Denmark) before being sequentially incubated for 2 h with Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit antibody (1:500; Invitrogen, Eugene, OR, USA). Sections were mounted onto gelatinized slides, and stained sections were examined under a fluorescence microscope (Olympus BX61).

Western blot

For Western blot analysis, tissue was homogenized in lysis buffer (50 mM Tris-HCl 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100) and protease inhibitor mixture (Complete, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). The homogenates were centrifuged at 12 000 g for 5 min at 4°C. The protein content in the supernatant was determined using a Pierce BCA Protein Assay Kit (Pierce, Company, Rockford, MI, USA). Then, 30 μ g of protein was denatured at 95°C for 5 min in sample buffer (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% glycerol, 2% sodium dodecyl sulphate, 5%

β -mercaptoethanol, 0.05% bromophenol blue). Samples were subjected to sodium dodecyl-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE 7.5%) and subsequently transferred onto polyvinylidene fluoride sheets (Immobilon-P, Millipore Corp., Bedford, MA, USA). For immunoblotting, membranes were blocked with 5% non-fat dry milk in TBST (50 mM Tris-HCl, pH 8.1, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20). They were then incubated overnight at 4°C with primary antibodies against JNK3, total JNK, phospho JNK (Thr183/Tyr185), phospho extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) (Thr202/Tyr204), total ERK1/2, phospho p38 (Thr189/Tyr182), total p38, phospho c-Jun (Ser73), total c-Jun, phospho Akt (Ser473), total Akt, p35, phospho GSK3 β (Ser9), total GSK3 β (1:1000; Cell Signalling, Danvers, MA, USA), α -spectrin (1:5000; Millipore), CDK5 (1:500; Santa Cruz, Heidelberg, Germany), phospho Tau Ser202, phospho Tau Ser199, total Tau (1:4000; Biosource-Life Technologies, Madrid, Spain) and β -actin (1:20 000; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The blots were then washed thoroughly in TBST and incubated for 2 h with a horseradish peroxidase-conjugated anti-IgG antibody (Amersham, GE Healthcare, Madrid, Spain), followed by the enhanced chemiluminescence detection system (Amersham), according to the supplier's instructions. Chemiluminescence measurements and semi-quantitative values were obtained using the software Quantity One (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and the results were expressed as a percentage with respect to wild-type controls. The corresponding β -actin was measured for each sample to normalize for any differences in gel loading.

Calpain activity assay

Calpain activity was measured using a commercial Kit (MBL Co., Ltd, Madrid, Spain). In brief, the fluorimetric calpain substrate Ac-LLY-AFC was used according to the following method. For each sample, 15 μ g of protein was incubated with 200 μ mol/l fluorimetric substrate in assay buffer (50 mmol/l HEPES, 100 mmol/l NaCl, 1 g/l CHAPS, 10 mmol/l dithiothreitol, 0.1 mmol/l EDTA, pH 7.4) in 96-well plates at 37°C for 24 h. The calpain inhibitor Z-LLY-FMK was used as a negative control. The fluorescence intensity of the liberated AFC was monitored using a microplate spectrofluorometer (Victor 3), with an excitation wavelength of 400 nm and an emission wavelength of 505 nm. Calpain activity was expressed as a percentage with respect to the wild-type control group using the relative fluorescence units (RFU) per milligram protein.

Succinate dehydrogenase activity

The striatum of mice treated for SDH activity measurement was used and mitochondria isolated by differential centrifugation [20]. The striatum was homogenized in 800 μ l of homogenizing buffer containing 225 mM mannitol, 75 mM sucrose, 5 mM HEPES, 1 mM ethylene glycoltetraacetic acid (EGTA) and 1 mg/ml BSA, pH 7.4. The homogenate was brought to 1200 μ l and centrifuged at 2000 g for 3 min at 4°C. The pellet was discarded, and the supernatant centrifuged at 12 000 g for 10 min. The pellet containing the mixture of synaptosomes and mitochondria was suspended in 400 μ l of homogenization buffer containing 0.02% digitonin to lyse synaptosomes followed by centrifugation at 12 000 g for 10 min to pellet down both extrasynaptosomal and intrasynaptosomal mitochondria. The mitochondrial pellet was washed twice in the same buffer without EGTA, BSA or digitonin, and suspended in 200 μ l.

After mitochondrial isolation SDH was measured spectrophotometrically according to King [21]. The method involves oxidation of succinate by an artificial electron acceptor, potassium ferricyanide. The reaction mixture contained 0.2 M PB, pH 7.8, 1% BSA, 0.6 M succinic acid and 0.03 M potassium ferricyanide. The reaction was initiated by the addition of 100 μ l of mitochondrial sample to 100 μ l of reaction mixture, and absorbance change was followed at 420 nm. Data obtained were normalized to protein content using a Pierce BCA Protein Assay Kit (Pierce, Company).

Statistical analysis

The assay results were compared by one-way ANOVA using the Bonferroni post-test. All data are presented as means \pm SEM, and differences were considered significant at $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) and $P < 0.001$ (***)

Results

Striatal neurodegeneration induced by 3-nitropropionic acid

Body weight loss due to 3-NP was observed in wild-type and *Jnk3*-null mice, although to a greater extent in *Jnk3*-null mice (Figure 1B). Fluoro-Jade B staining revealed the presence of neurodegeneration in the striatum induced by 3-NP in both *Jnk3*-null mice and wild-type mice (Figure 1A). Moreover, a significant increase in the

lesioned brain area was detected in *Jnk3*-null mice with respect to wild-type mice (Figure 1C). Furthermore, a strong immunoreaction to IgG was observed in the striatum in both genotypes treated with 3-NP (Figure 1D). SDH activity assay shows the inhibition of this enzyme due to 3-NP in both wild-type and *Jnk3*-null mice (Figure 1E).

An immunohistochemical GFAP study was conducted to assess the astrogliosis induced by 3-NP treatment. The results showed the presence of reactive astrocytes in both wild-type and *Jnk3*-null mice treated with 3-NP with respect to the controls (Figure 2).

MAPKinase involvement in 3-nitropropionic acid-treated mice

The activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) was analysed to determine the involvement of these kinases in neuronal cell death induced by 3-NP. The data revealed that 3-NP increases the levels of phospho JNK in wild-type mice, but not in *Jnk3*-null mice (Figure 3A). In contrast, phosphorylation of p38 was not significantly affected by 3-NP treatment in either wild-type or *Jnk3*-null mice (Figure 3B), and phosphorylation of ERK1/2 increased significantly in both genotypes after 3-NP treatment (Figure 3C). The phosphorylation of c-Jun was also analysed as this protein is targeted by MAPKs. The results showed an increase in the phosphorylation of c-Jun in wild-type mice treated with 3-NP, but not in *Jnk3*-null mice (Figure 4).

Activation of calpain due to 3-nitropropionic acid treatment

As the participation of a specific cysteine protease, namely calpain, in neuronal cell death in the 3-NP model has been demonstrated, we studied the activation of this protease. First, the fragmentation of α -spectrin was examined as it is a substrate of calpain. The results showed that 3-NP treatment resulted in an increase in the 145 kDa spectrin breakdown fragment in both wild-type and *Jnk3*-null mice as a result of calpain activation (Figure 5A). Moreover, a calpain activity assay revealed the activation of this protease in both genotypes due to 3-NP treatment (Figure 5A). p35 was also analysed as it is a target of calpain, and might be cleaved to p25, resulting in activation of CDK5. Western blotting revealed a decrease in p35 levels after 3-NP in both genotypes (Figure 5B), while the levels of CDK5 remained unchanged (Figure 5C).

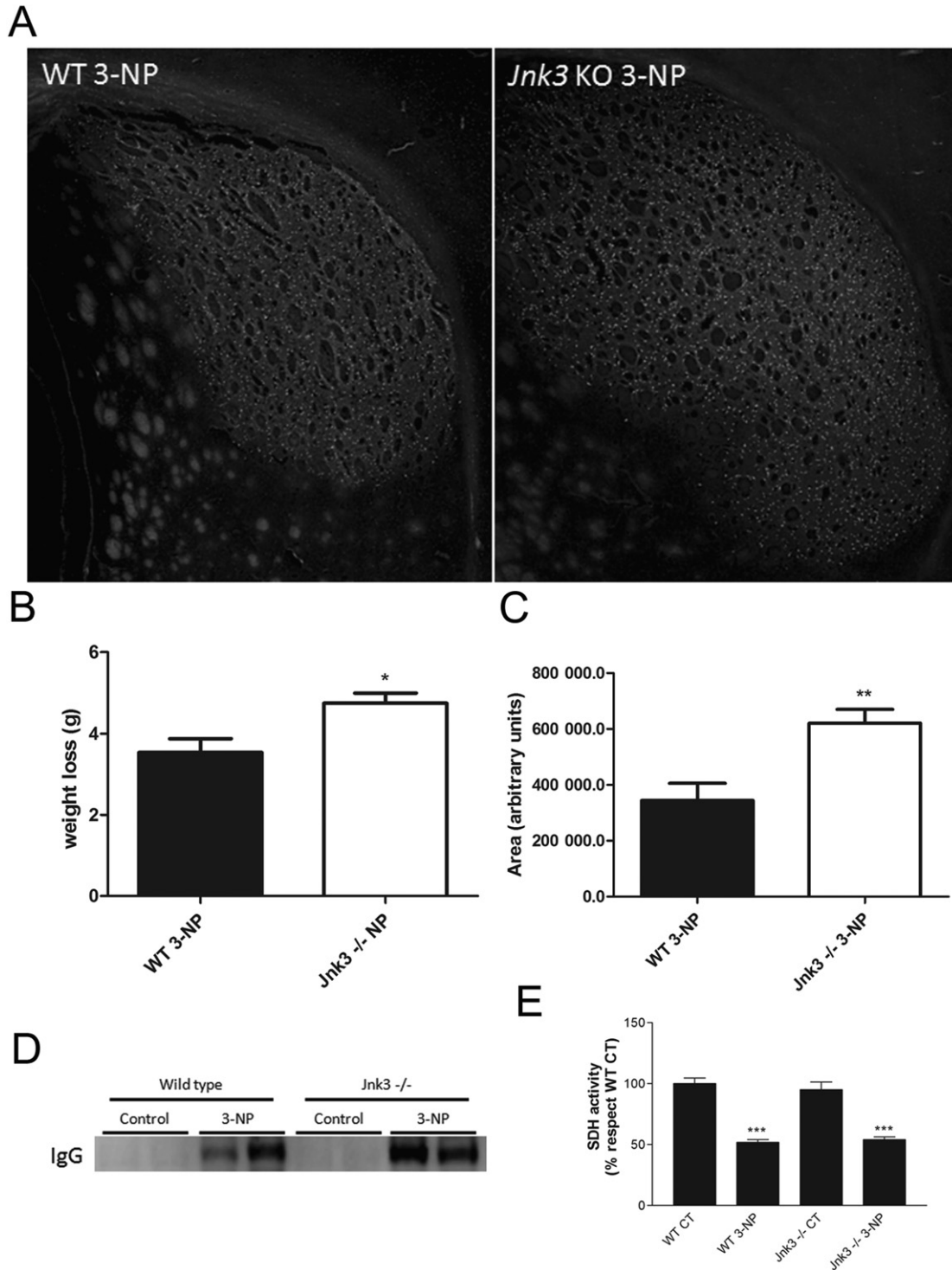


Figure 1. Neurodegeneration induced by 3-NP. (A) Fluoro-Jade B staining showing neuronal death in wild-type and *Jnk3*-null mice after 3-NP treatment. (B) Weight loss in both 3-NP-treated littermates in contrast with non-treated mice. (C) Area of lesion in wild-type and *Jnk3*-null mice treated with 3-NP. (D) Immunoblot against IgG showing the presence of immunoglobulins in the striatum of both wild-type and *Jnk3*-null mice treated with 3-NP in contrast with non-treated mice. (E) Succinate dehydrogenase (SDH) activity after 3-NP treatment in wild-type and *Jnk3*-null mice striatum with respect to their controls. Each point is the mean \pm SEM of three independent experiments, determined from five replicates per experiment (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared to control).

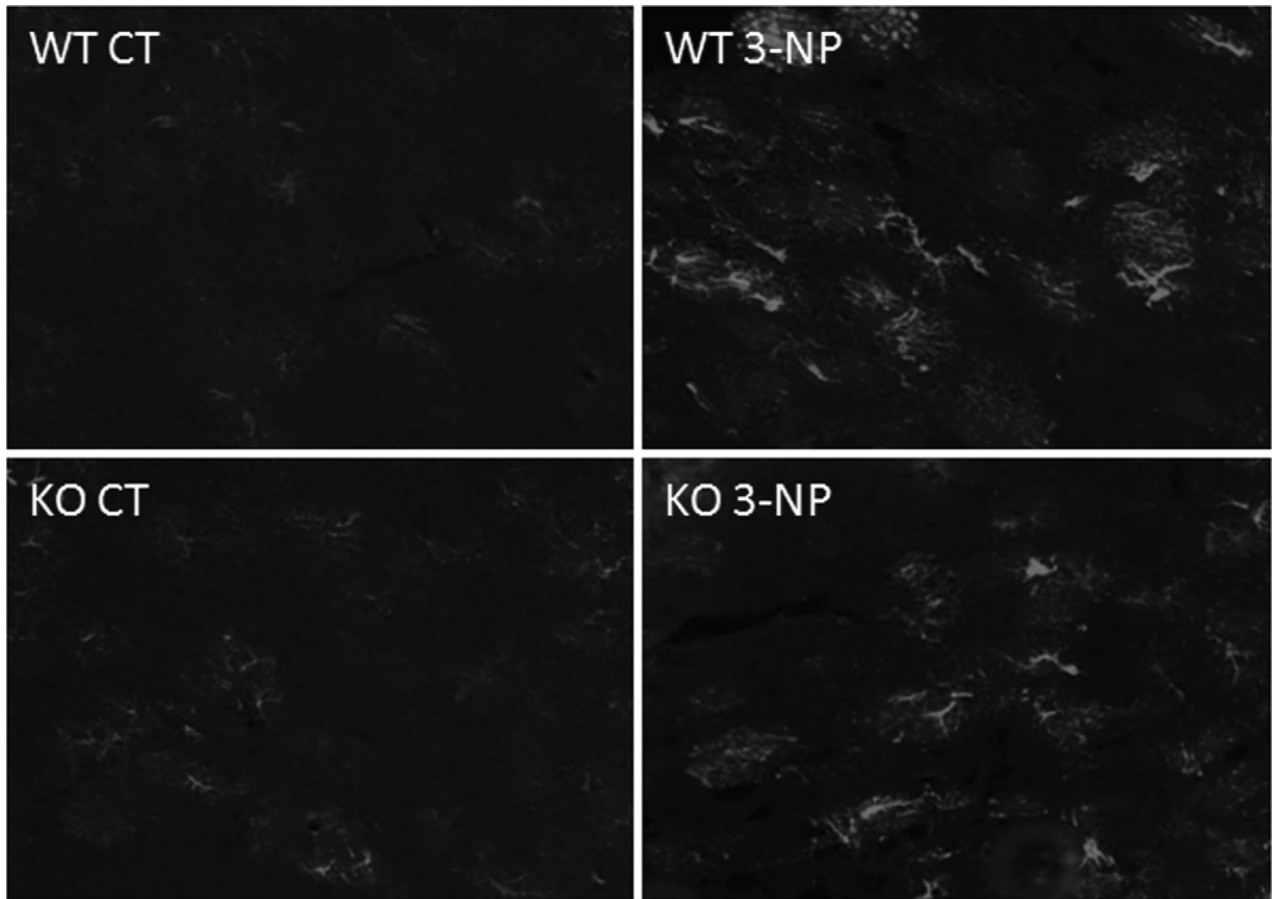


Figure 2. Immunohistochemistry against GFAP. Increased immunolabelling was observed in the striatum of both wild-type and *Jnk3*-null mice treated with 3-NP compared with non-treated mice.

Induction of Akt activation by 3-nitropropionic acid

To investigate the involvement of Akt in 3-NP neurotoxicity, we analysed the activation of this protein and its downstream substrate GSK3 β . The results showed an increase in Akt phosphorylation due to 3-NP acid in both genotypes, although this was higher in *Jnk3*-null mice (Figure 6A). Analysis of GSK3 β phosphorylation at Ser9 revealed that this was higher after 3-NP treatment, and higher in *Jnk3*-null mice with respect to wild-type mice (Figure 6B).

Tau hyperphosphorylation was also analysed as this protein is a target of JNK, CDK5 and GSK3 β . Our results showed that 3-NP treatment induced an increase in the phosphorylation of Tau at Ser202 in wild-type mice but not in *Jnk3*-null mice (Figure 7). However, Tau

phosphorylation at Ser199 was higher in both genotypes after 3-NP treatment (Figure 7).

Discussion

In recent years it has been proposed that the specific deletion of the *Jnk3* gene alone is neuroprotective. This hypothesis was first demonstrated by studies using the neurotoxin kainic acid, in which mice lacking the *Jnk3* gene were protected from hippocampal neuronal death [16,17]. Further studies demonstrated that deletion of the *Jnk3* gene also protects neurones against several other forms of injury, such as MPTP-induced neuronal apoptosis, ischaemia/hypoxia, and the axotomy of facial motor neurones or dorsal root ganglion neurones [15–17,22]. Moreover, it has been reported that JNK activation may play an important role in the neurodegeneration induced

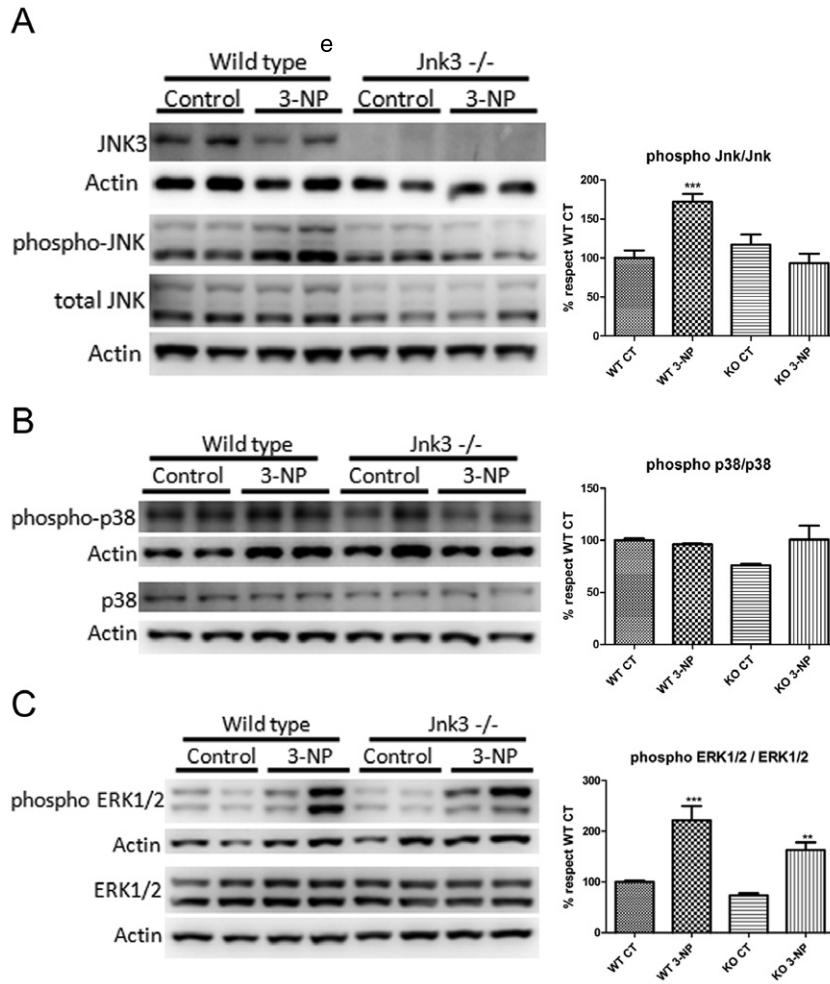


Figure 3. Activation of MAPK after 3-NP treatment. (A) Immunoblot against JNK3, phospho JNK (Thr183/Tyr185) and JNK. (B) Immunoblot against phospho p38 (Thr180/Tyr182) and p38. (C) Immunoblot against phospho ERK1/2 (Thr202/Tyr204) and ERK. Bar graphs show the quantification of the bands. Each point is the mean \pm SEM of three independent experiments (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ with respect to saline controls).

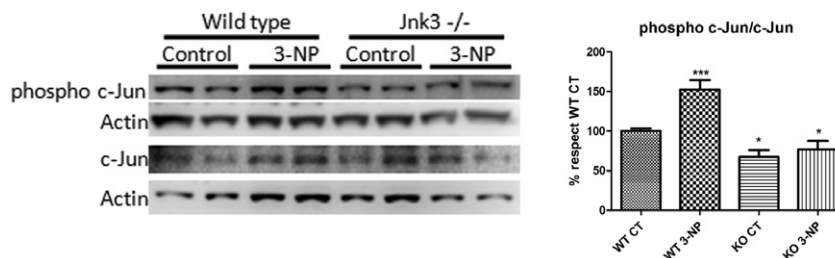


Figure 4. Immunoblot against c-Jun phosphorylated at Ser73 and c-Jun in wild-type and *Jnk3*-null mice after 3-NP treatment in contrast with saline controls. Bar graph shows the quantification of the bands. Each point is the mean \pm SEM of three independent experiments (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ with respect to saline controls).

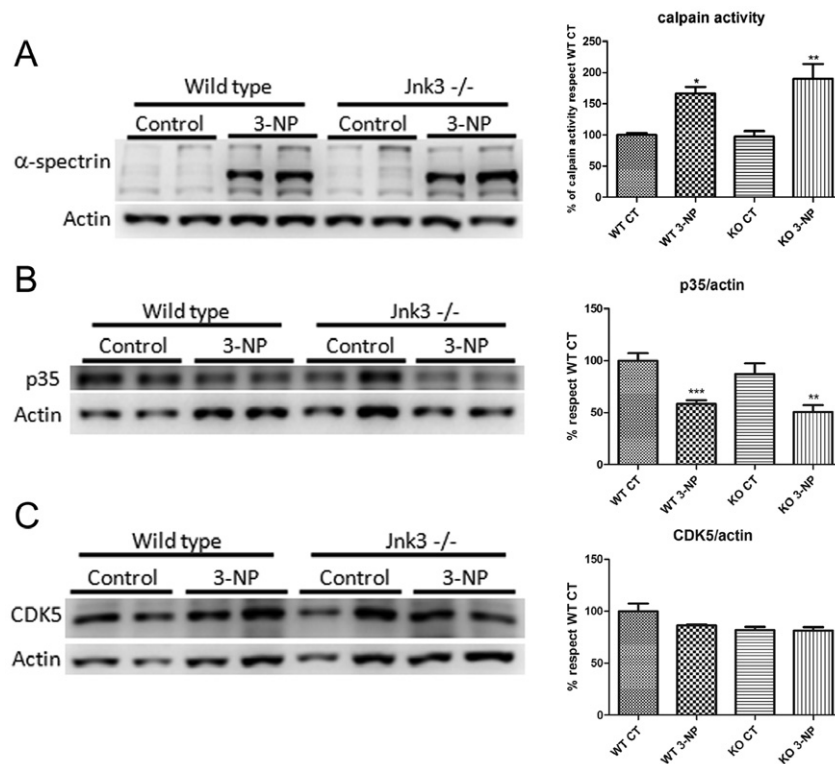


Figure 5. Evaluation of calpain activity after 3-NP treatment. (A) Immunoblot of α -spectrin. Breakdown of full protein to 145/150 KDa was observed after 3-NP treatment. Bar graph shows calpain activity. (B) Immunoblot against p35 showing a decrease in this protein after 3-NP treatment, as also apparent in a bar graph of band quantification. (C) Immunoblot of CDK5 and a bar graph that shows the quantification of the bands. Each point is the mean \pm SEM of three independent experiments (* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 with respect to saline controls).

by 3-NP [14]. Therefore, inhibition of the JNK pathway is an appropriate strategy for the development of drugs for the treatment of neurodegenerative disorders. Compounds that inhibit the JNK pathway, such as AS601245 and SP600125, have the disadvantage that they non-selectively block the three isoforms JNK1, JNK2 and JNK3. Thus it has been hypothesized that a selective JNK3 inhibitor would be preferable for the treatment of neurodegenerative disorders. For this reason, it is necessary to use genetically modified animal models to study the role of a specific isoform in neuroprotection. Thus, we evaluated the neurotoxicity induced by 3-NP in *Jnk3*-null mice.

In the present study, in contrast to what we expected, 3-NP-treated *Jnk3*-null mice presented similar levels of striatum neurodegeneration to treated wild-type mice, suggesting the lack of neuroprotection in *Jnk3*-null mice. Moreover, the levels of IgG in the lesioned area were also similar due to dysfunction of the blood–brain barrier [23].

In agreement with the results of Garcia *et al.* [14], activation of JNK and hyperphosphorylation of c-Jun was

observed in 3-NP-treated wild-type mice and this activation was attenuated in *Jnk3*-null mice, as expected. Moreover, an increase in the phosphorylation of ERK1/2 was observed after 3-NP treatment in wild-type and *Jnk3*-null mice, suggesting the involvement of this MAPK in 3-NP-induced neurodegeneration.

Although attenuation of JNK was observed in *Jnk3*-null mice, neurodegeneration was not reduced in comparison with wild-type mice. Therefore, the results indicate that JNK3 is not the main cause of neuronal death in the 3-NP experimental model, unlike in other experimental models [15–17].

Thus, other pathways were analysed in both littermates to determine which are involved in the neurodegeneration induced by 3-NP. Calpains could play an important role in the neurodegeneration induced by 3-NP [24]. This was confirmed by evaluating the activation of this protease, revealing an increase in calpain activity in wild-type and *Jnk3*-null mice together with an increase in the CDK5/p25 complex.

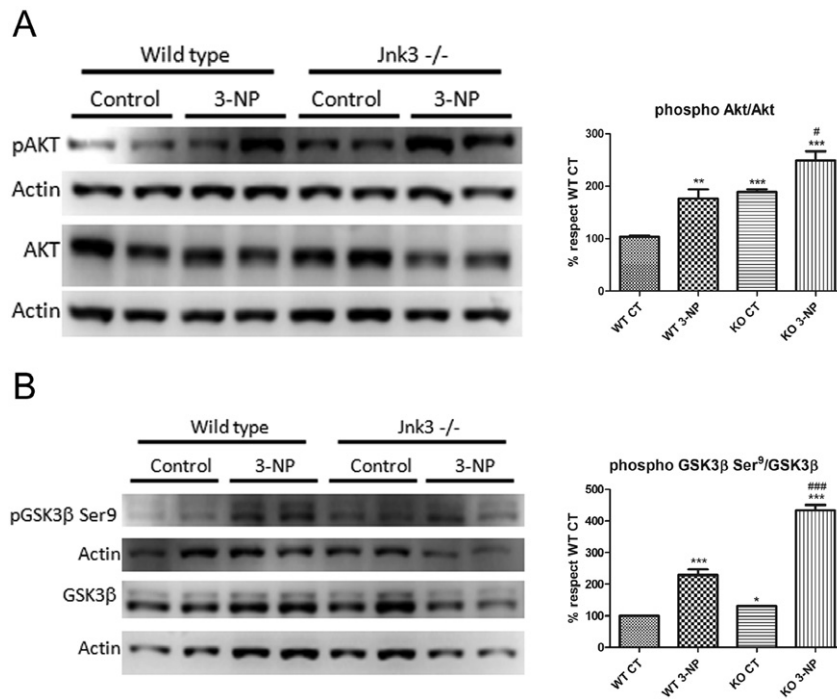


Figure 6. Activation of Akt pathway due to 3-NP treatment. (A) Immunoblot against phospho Akt (Ser473) and Akt. (B) Immunoblot against phospho GSK3β (Ser9) and GSK3β. Bar graphs show the quantification of the bands. Each point is the mean \pm SEM of three independent experiments (* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 with respect to saline controls and # P < 0.05, ### P < 0.001 for treated *Jnk3*-null mice with respect to treated wild-type mice).

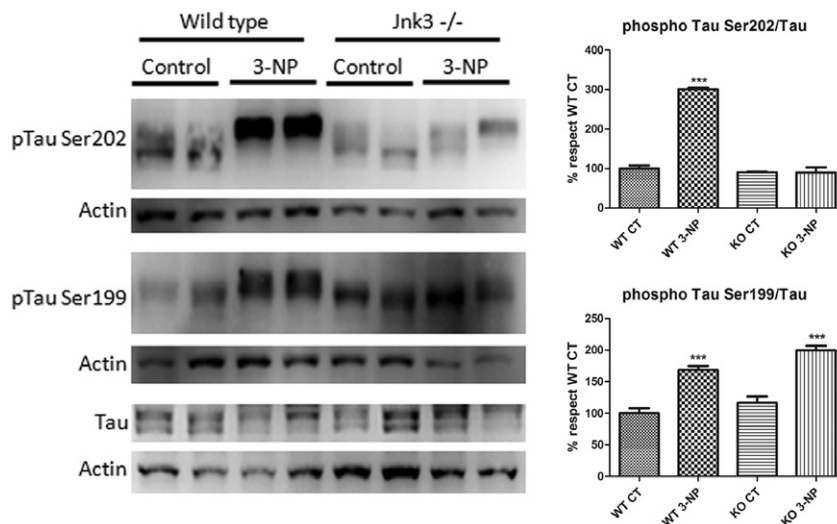


Figure 7. Immunoblot against Tau protein phosphorylated at Ser199 and Ser202 and Tau in wild-type and *Jnk3*-null mice after 3-NP treatment in contrast with saline controls. Bar graph shows the quantification of the bands. Each point is the mean \pm SEM of three independent experiments (*** P < 0.001 with respect to saline controls).

We also evaluated the Akt signalling pathway as it is essential for the survival of various cell types and specific pathologies [25–28]. Inhibition of Akt occurs in different neurodegenerative diseases, enhancing the activation of GSK3 β by dephosphorylation at Ser9, and consequently inducing tau hyperphosphorylation. Earlier studies showed that hyperphosphorylation of tau inhibits its binding to microtubules, resulting in neuronal cell death [29]. Previously, we demonstrated that the PI3K/Akt pathway is activated in *Jnk3*-null mice due to an increase in the *pik3cb* transcript, thus enhancing the inhibition of GSK3 β by phosphorylation at Ser9, and consequently inhibiting tau hyperphosphorylation [30]. In accordance with these previous results, we observed an increase in Akt phosphorylation in *Jnk3*-null mice. Moreover, an increase in Akt phosphorylation was found after treatment with 3-NP in both controls and *Jnk3*-null mice, which was correlated with an increase in GSK3 β phosphorylation at Ser9 (GSK3 β inhibition), suggesting that it may compensate for the induced neuronal death.

Differences in tau hyperphosphorylation were also observed. Whereas hyperphosphorylation occurred at Ser199 in both wild-type and *Jnk3*-null mice, hyperphosphorylation at Ser202 only occurred in the wild type, suggesting that kinases such as JNK were activated in wild-type mice but not in *Jnk3*-null mice, whereas others such as CDK5 were activated in both littermates.

In summary, the present investigation provides evidence that 3-NP treatment activates the ERK1/2 and JNK pathways in wild-type mice. However, although the JNK pathway is attenuated in *Jnk3*-null mice, neuronal death was not reduced, suggesting that this pathway is not the main mechanism involved in the striatal neurodegeneration induced by 3-NP treatment.

Acknowledgements

We thank the Language Advisory Service of the University of Barcelona for revising this paper. This study was funded by grant 2009/SGR00853 from the *Generalitat de Catalunya* (autonomous government of Catalonia), by grants BFU2007-63209/BFI, BFU2010-19119/BFI and SAF2009-13093 from the Spanish *Ministerio de Ciencia e Innovación*, grant PI080400 and PS09/01789 from the Instituto de Salud Carlos III, grant 063230 from the Fundació la Marató TV3 and grant 61ORT0405 from the Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED).

Conflicts of interest

The authors have no conflict of interest.

References

- Alston TA, Mela L, Bright HJ. 3-Nitropropionate, the toxic substance of *Indigofera*, is a suicide inactivator of succinate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **74**: 3767–71
- Brouillet E, Jacquard C, Bizat N, Blum D. 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. *J Neurochem* 2005; **96**: 1521–40
- Huang LS, Sun G, Cobessi D, Wang AC, Shen JT, Tung EY, Anderson VE, Berry EA. 3-nitropropionic acid is a suicide inhibitor of mitochondrial respiration that, upon oxidation by complex II, forms a covalent adduct with a catalytic base arginine in the active site of the enzyme. *J Biol Chem* 2006; **281**: 5965–72
- Bogdanov MB, Ferrante RJ, Mueller G, Ramos LE, Martinou JC, Beal MF. Increased vulnerability to 3-nitropropionic acid in an animal model of Huntington's disease. *J Neurochem* 1998; **71**: 2642–4
- Túnez I, Tasset I, Pérez-De La Cruz V, Santamaría A. 3-Nitropropionic acid as a tool to study the mechanisms involved in Huntington's disease: past, present and future. *Molecules* 2010; **15**: 878–916
- Almeida S, Brett AC, Gois IN, Oliveira CR, Rego AC. Caspase-dependent and -independent cell death induced by 3-nitropropionic acid in rat cortical neurons. *J Cell Biochem* 2006; **98**: 93–101
- Almeida S, Domingues A, Rodrigues L, Oliveira CR, Rego AC. FK506 prevents mitochondrial-dependent apoptotic cell death induced by 3-nitropropionic acid in rat primary cortical cultures. *Neurobiol Dis* 2004; **17**: 435–44
- Bizat N, Hermel JM, Humbert S, Jacquard C, Creminon C, Escartin C, Saudou F, Krajewski S, Hantraye P, Brouillet E. In vivo calpain/caspase cross-talk during 3-nitropropionic acid-induced striatal degeneration: implication of a calpain-mediated cleavage of active caspase-3. *J Biol Chem* 2003; **278**: 43245–53
- Lee WT, Itoh T, Pleasure D. Acute and chronic alterations in calcium homeostasis in 3-nitropropionic acid-treated human NT2-N neurons. *Neuroscience* 2002; **113**: 699–708
- Minn Y, Cho KJ, Kim HW, Kim HJ, Suk SH, Lee BI, Kim GW. Induction of apoptosis signal-regulating kinase 1 and oxidative stress mediate age-dependent vulnerability to 3-nitropropionic acid in the mouse striatum. *Neurosci Lett* 2008; **430**: 142–6
- Pubill D, Verdaguer E, Canudas AM, Sureda FX, Escubedo E, Camarasa J, Pallàs M, Camins A. Orphenadrine prevents 3-nitropropionic acid-induced neurotoxicity in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 2001; **132**: 693–701

- 12 Crespo-Biel N, Camins A, Pallas M, Canudas AM. Evidence of calpain/cdk5 pathway inhibition by lithium in 3-nitropropionic acid toxicity in vivo and in vitro. *Neuropharmacology* 2009; **56**: 422–8
- 13 Crespo-Biel N, Camins A, Pelegri C, Vilaplana J, Pallas M, Canudas AM. 3-Nitropropionic acid activates calpain/cdk5 pathway in rat striatum. *Neurosci Lett* 2007; **421**: 77–81
- 14 Garcia M, Vanhoutte P, Pages C, Besson MJ, Brouillet E, Caboche J. The mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid induces striatal neurodegeneration via a c-Jun N-terminal kinase/c-Jun module. *J Neurosci* 2002; **22**: 2174–84
- 15 Brecht S, Kirchhof R, Chromik A, Willesen M, Nicolaus T, Raivich G, Wessig J, Waetzig V, Goetz M, Claussen M, Pearce D, Kuan CY, Vaudano E, Behrens A, Wagner E, Flavell RA, Davis RJ, Herdegen T. Specific pathophysiological functions of JNK isoforms in the brain. *Eur J Neurosci* 2005; **21**: 363–77
- 16 de Lemos L, Junyent F, Verdaguer E, Folch J, Romero R, Pallas M, Ferrer I, Auladell C, Camins A. Differences in activation of ERK1/2 and p38 kinase in Jnk3 null mice following KA treatment. *J Neurochem* 2010; **114**: 1315–22
- 17 Yang DD, Kuan CY, Whitmarsh AJ, Rincon M, Zheng TS, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA. Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature* 1997; **389**: 865–70
- 18 Yang J, New L, Jiang Y, Han J, Su B. Molecular cloning and characterization of a human protein kinase that specifically activates c-Jun N-terminal kinase. *Gene* 1998; **212**: 95–102
- 19 Duran-Vilaregut J, del Valle J, Camins A, Pallas M, Pelegri C, Vilaplana J. Blood-brain barrier disruption in the striatum of rats treated with 3-nitropropionic acid. *Neurotoxicology* 2009; **30**: 136–43
- 20 Berman SB, Hastings TG. Inhibition of glutamate transport in synaptosomes by dopamine oxidation and reactive oxygen species. *J Neurochem* 1997; **69**: 1185–95
- 21 King TE. Preparation of succinate dehydrogenase and reconstitution of succinate oxidase. *Methods Enzymol* 1967; **10**: 322–31
- 22 Hunot S, Vila M, Teismann P, Davis R, Hirsch E, Przedborski S, Rakic P, Flavell R. JNK-mediated induction of cyclooxygenase 2 is required for neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**: 665–70
- 23 Nishino H, Shimano Y, Kumazaki M, Sakurai T. Chronically administered 3-nitropropionic acid induces striatal lesions attributed to dysfunction of the blood-brain barrier. *Neurosci Lett* 1995; **186**: 161–4
- 24 Camins A, Verdaguer E, Folch J, Pallas M. Involvement of calpain activation in neurodegenerative processes. *CNS Drug Rev* 2006; **12**: 135–48
- 25 Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Acts. *Genes Dev* 1999; **13**: 2905–27
- 26 Kim D, Chung J. Akt: versatile mediator of cell survival and beyond. *J Biochem Mol Biol* 2002; **35**: 106–15
- 27 Lawlor MA, Alessi DR. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Sci* 2001; **114**: 2903–10
- 28 Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* 2005; **9**: 59–71
- 29 Avila J, Perez M, Lim F, Gomez-Ramos A, Hernandez F, Lucas JJ. Tau in neurodegenerative diseases: tau phosphorylation and assembly. *Neurotox Res* 2004; **6**: 477–82
- 30 Junyent F, de Lemos L, Verdaguer E, Folch J, Ferrer I, Ortuno-Sahagun D, Beas-Zarate C, Romero R, Pallàs M, Auladell C, Camins A. Gene expression profile in Jnk3 null mice: a novel specific activation of the PI3K/AKT pathway. *J Neurochem* 2011; **117**: 244–52

Received 18 May 2011

Accepted after revision 11 August 2011

Published online Article Accepted on 23 August 2011