

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

PAPEL DE PKC ζ EN LA ESTIMULACIÓN DE ERK5 POR
GPCRs ACOPLADOS A PROTEÍNAS Gq Y SU
REPERCUSIÓN EN HIPERTROFIA CARDIACA

Carlota García-Hoz Jiménez

Memoria presentada por la licenciada
CARLOTA GARCÍA-HOZ JIMÉNEZ
Para aspirar al grado de
DOCTOR EN CIENCIAS

Directores de esta tesis:
Dr. Federico Mayor Menéndez
Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Departamento de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid

Dra. Catalina Ribas Núñez.
Profesora Contratada Doctor
Departamento de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid

Madrid, 2008

EL PRESENTE TRABAJO HA SIDO REALIZADO EN EL DEPARTAMENTO BIOLOGÍA MOLECULAR Y EN EL CENTRO DE BIOLOGÍA MOLECULAR SEVERO OCHOA (CSIC-UAM) DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID, CON LA AYUDA DE UNA BECA PREDOCTORAL FPI, DEL FONDO DE INVESTIGACIÓN DEL MINISTERIO DE EDUCACIÓN Y CIENCIA (MEC) Y UN CONTRATO DE LA RED DE INVESTIGACIÓN COOPERATIVA EN ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES (RECAVA) DEL INSTITUTO DE SALUD CARLOS III. PARTE DEL TRABAJO PRESENTADO HA SIDO REALIZADO EN EL DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE BERGEN, CON LA AYUDA DE UNA BECA DE ESTANCIA BREVE DEL FONDO DE INVESTIGACIÓN DEL MINISTERIO DE EDUCACIÓN Y CIENCIA (MEC) Y CON LA AYUDA DE UNA BECA DE ESTANCIA BREVE EMBO CONCEDIDA POR LA *EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION*.

A mi familia.

“La verdad no existe, no ha existido nunca. La verdad es siempre la verdad de algunos, que aceptan que otros tengan su propia verdad o, al contrario, imponen su verdad a la verdad de los otros.....”

JOSE SARAMAGO

Nunca he sido muy buena expresándome, por lo que va a ser imposible para mí poder reflejar realmente todo el agradecimiento que siento a las personas que he ido conociendo durante estos años en el CBM, que me han ayudado tanto en mi trabajo y con las que he pasado tan buenos momentos.

En primer lugar querría agradecer a Fede la oportunidad que me dio al aceptarme en su grupo y el interés que siempre ha mostrado por mi trabajo. Los esquemas post-reunión siempre han sido de gran ayuda, aunque a veces costara descifrarlos.

A Cati, mi “jefa” (aunque no le gusta que la llame así) por tener siempre una sonrisa en la cara, incluso en momentos complicados, por estar siempre dándole vueltas pensando cómo sacar el trabajo, por empujarme para que me fuera de estancia, por dejar cualquier cosa que esté haciendo para ayudarme con mis dudas y por ser una amiga. Espero ser la primera de una larga lista de felices doctorandos bajo tu dirección.

A mis compañeros de laboratorio, que son como la familia, aunque no se escogen a mí me han tocado los mejores, gracias por vuestro apoyo y consejos en todo momento. A mis “hermanas” de tesis Alicia, Helena y Elvira (que casi eres del labo), sois de los gajos más importantes de mi mandarina, gracias por ser como sois y al resto de mis niñas, Ivette (que pronto te has ido), Vero y Maria por compartir risas y lágrimas. Al laboratorio que me acogió, a la Ruiz y a Espe por su generosidad y su alegría, y por todos los buenos momentos que hemos pasado, a Nila porque siempre resuelve las dudas, a Cristina por su amabilidad y a mis “hermanos mayores” Sandra y Antonio por demostrarme vuestro cariño y ayudar en todo momento, sois únicos. A los que habéis ido llegando, a Guzmán, por animar el cotarro, a ver si vuelves ya, a Pedro, a Raúl, a Juanjo que nos ayuda tanto con los bichos, a Susana, a Alejandro y a Paula, por ser buenos compañeros en el labo y fuera de él.

A Anna Aragay por permitirme pasar una estancia en su laboratorio, acogerme con tanta amabilidad y simpatía y gastar su tiempo conmigo en el microscopio.

A Ramón por toda su ayuda y porque ha sido otra cabeza pensante en este trabajo.

A Jorge Moscat y Maria Teresa Díaz-Meco por todo el material que nos han dejado y sus consejos para continuar con el trabajo.

A todas las personas que forman los servicios del CBM, en especial a Ignacio Segovia que tanto nos ayudó con los ratones, porque es un lujo poder contar con tan buenos profesionales, siempre dispuestos a ayudar y que nunca ponen una mala cara.

A Michel Herranz, por su ayuda con los electrocardiogramas.

A Marta por ser genial y tratarme como a una hermana, y a Alfredo y a Isma (Chirliiii) por tantos momentos de risas.

A Laura, Juanfra, Jose, Nano y Aitor, porque siempre me he encontrado muy a gusto con vosotros y me habéis enseñado lo bueno y lo malo de este trabajo, aunque sigo pensando en el chiringuito.

A todo el 340, uno de los momentos más tristes es cuando os fuisteis la mitad, por ser el labo hermano y colaborar tanto en el trabajo como en los momentos de divertimento. Gracias a Juan por su ayuda con las tinciones y a Esther por su amistad.

A Alberto porque es un crack.

A mis supernenas, María, Cris C, Cris G, Martita, Nuria, Sarita y Ana, porque nuestras quedadas anuales se hayan convertido en semanales, no se que haría sin vosotras.

A Ana y a Ángel por adoptarme.

A Cris porque siempre estarás ahí, aunque sea a kilómetros de distancia.

A mi padre porque siempre ha sabido mostrarme su orgullo y su cariño y porque de él me viene el interés por la ciencia. A mi madre porque siempre me ha hablado con sinceridad y gracias a ella soy como soy. A mi hermana, porque a pesar de ser muy distintas somos amigas y porque hemos pasado momentos muy duros que no habría superado sin ella. Y a toda mi familia, no os cambiaría por nada.

INDICE DETALLADO.....15

ABREVIATURAS.....19

SUMMARY.....21

INTRODUCCIÓN.....25

OBJETIVOS.....57

MATERIALES Y MÉTODOS.....59

RESULTADOS.....79

DISCUSIÓN.....123

CONCLUSIONES.....141

BIBLIOGRAFÍA.....143

ANEXO I.....157



Abreviaturas.....	19
Summary.....	21
Introducción.....	25
1. Receptores acoplados a proteínas G.....	28
1.1. Características generales de los GPCRs.....	29
1.2. Proteínas G heterotriméricas.....	30
1.3. Mecanismos de regulación de los GPCRs.....	31
2. Familia de las quinasas mitogénicas MAPKs.....	35
2.1. Mecanismos de activación de las MAPKs.....	36
2.2. Mecanismos de activación de ERK5.....	37
2.3. Activación de MAPKs por GPCRs.....	39
3. Familia de las proteínas quinasas C, PKC.....	44
3.1. Estructura de las isoformas de PKC.....	45
3.2. Regulación y función de PKC ζ	45
4. Hipertrofia cardíaca y rutas de señalización implicadas.....	47
4.1. Papel de G α q en hipertrofia cardíaca.....	49
4.2. Papel de GRKs en el sistema cardiovascular.....	51
4.3. Papel de MAPKs en el sistema cardiovascular.....	53
4.4. Papel de PKCs en el sistema cardiovascular.....	55
Objetivos.....	57
Materiales y Métodos.....	59
1. Productos.....	61
2. Cultivos celulares.....	62
2.1. Líneas celulares establecidas.....	62
2.2. Cultivos primarios.....	62
2.2.1. Fibroblastos embrionarios primarios de ratón (MEFs).....	62
2.2.2. Cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de ratón.....	62
2.3. Transfecciones.....	63



2.4. Plásmidos y construcciones utilizadas.....	64
2.5. Tratamientos celulares.....	65
3. Electroforesis.....	66
3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.....	66
3.2. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa-TAE.....	66
4. Utilización de anticuerpos.....	66
4.1. Inmunodetección tras electroforesis ("Western blot").....	66
4.2. Inmunoprecipitación.....	67
4.3. Anticuerpos utilizados.....	68
5. Ensayo de interacción de proteínas <i>in Vitro</i>.....	70
5.1. Asociación <i>in vitro</i> de Gαq y PKCζ.....	70
5.2. Asociación <i>in vitro</i> de Gαq y GST-MEK5.....	71
6. Microscopía.....	71
6.1. Microscopía confocal (LCSM Laser Scanning Confocal Microscopy).....	71
6.2. Inmunofluorescencia.....	72
6.2. Transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET).....	72
7. Modelo animal de hipertrofia cardiaca.....	73
7.1. Medida de los niveles en plasma del factor natrurético del atrio (ANP).....	74
7.2. Electrocardiograma (ECG).....	74
7.3. Relación masa del corazón/masa del cuerpo.....	75
7.4. Parámetros morfométricos del corazón.....	75
7.5. Microarrays <i>GeneChip</i> de Affymetrix.....	75
8. Análisis estadístico.....	77
Resultados.....	79
1. Caracterización de la vía de activación de ERK5 mediada por receptores acoplados a Gq.....	81
1.1. ERK5 es estimulada por receptores acoplados a Gq.....	81
1.2. La activación de ERK5 mediada por m1(Ach)R es independiente de tirosina quinasas de la familia c-Src.....	83
1.3. La activación de ERK5 mediada por GPCR es independiente de mecanismos de transactivación del receptor de EGF.....	83



1.4. La activación de ERK5 mediada por m1(Ach)R es dependiente de mecanismos de internalización.....	84
1.5. La sobreexpresión de un mutante de $G\alpha_q$ activo constitutivamente es suficiente para provocar la activación de ERK5.....	86
2. Asociación específica entre la subunidad $G\alpha_q$ y la proteína quinasa C atípica, PKCζ.....	88
2.1. PKC ζ se asocia preferentemente al estado activado de $G\alpha_q$	89
2.2. Otras familias de subunidades $G\alpha$ no se asocian con PKC ζ	90
2.3. $G\alpha_q$ no interacciona con la proteína quinasa C atípica PKC ι/λ	91
2.4. El tratamiento con un agonista de GPCR incrementa la asociación entre $G\alpha_q$ y PKC ζ	92
2.5. $G\alpha_q$ y PKC ζ colocalizan en membrana tras la activación por agonista.....	93
2.6. Análisis de la asociación $G\alpha_q$ /PKC ζ mediante transferencia de energía de resonancia (FRET).....	95
2.7. La interacción entre $G\alpha_q$ y PKC ζ es directa.....	99
3. Papel de PKCζ en la activación de ERK5 inducida por receptores acoplados a proteínas Gq.....	99
3.1. La activación de ERK5 a través de receptores acoplados a Gq es bloqueada por un inhibidor específico de PKC ζ	100
3.2. La activación de ERK5 a través de receptores acoplados a Gq se encuentra bloqueada en células deficientes en PKC ζ	102
4. Estudio de los mecanismos de activación implicados en la vía $G\alpha_q$/PKCζ/ERK5.....	103
4.1. Estado de activación de PKC ζ en respuesta a carbacol.....	103
4.2. PKC ζ , $G\alpha_q$ y MEK5 α están presentes en el mismo complejo macromolecular....	105
4.3. MEK5 α y $G\alpha_q$ se asocian de forma independiente de PKC ζ y del dominio PB1 de MEK5 α	106
4.4. Caracterización de la interfase de interacción entre $G\alpha_q$ y PKC ζ	107
5. Papel de PKCζ en el desarrollo de hipertrofia cardíaca inducida por $G\alpha_q$.....	114
Discusión.....	123
Conclusiones.....	141
Bibliografía.....	143

Anexo I.....157

AC	Adenilato Ciclasa	IP₃	inositol-1,4,5-trifosfato
ADAM	Desintegrina y metaloproteasa	JNK	Quinasa del dominio N-terminal de Jun
ADN	Acido desoxirribonucleico	LARG	GEF de Rho asociado con leucemia
AG1478	4-(3-Chloroanilino)-6,7-dimethoxyquinazolina	LIF	Factor inhibidor de leucemia
AGS	Activador de la señal de proteínas G	MAPK	Quinasa activada por mitógenos
AKAP	Proteína de anclaje de PKA	MDC	Monodansilcaderiverina
AngII	Angiotensina II	MEF2	Factor potenciador de miocito
ANP	Péptido Natriuretico del Atrio	βMHC	Cadena pesada de la miosina β
α₁AR	Receptor α ₁ Adrenérgico	MMP	Metaloproteasa de matriz
βAR	Receptor β Adrenérgico	mTOR	Diana de rapamicina
ARN	Acido ribonucleico	NES	Señal de exportación nuclear
AT₁R	Receptor de Angiotensina 1	NFAT	Factor nuclear de células T activadas
BDGF	Factor de crecimiento derivado de la médula	NGF	Factor de crecimiento neural
BMK1	Quinasa mitógena grande 1	NLS	Señal de localización nuclear
BSA	Albúmina de suero bovina	NP40	Nonidet P-40
BTK	Tirosina quinasa de Bruton	PAF	Factor activador de Plaquetas
C3G	Intercambiador de nucleótidos con dominio de unión a Crk	PBS	Tampón fosfato salino
CFP	Proteína fluorescente cian	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
CMH	cardiomiopatía hipertrófica	PDE4D3	Fosfodiesterasa de AMPc 4D3
CREB	elemento de unión de respuesta de Ca ²⁺ y AMPc	PDK	Quinasa dependiente de fosfoinosítidos
CSP	Proteína con cadena de Cisteinas	PI	Fosfatidilinositol
CT-1	Cardiotrofina-1	PI3K	Fosfatidil-inositol 3 quinasa
DAG	sn-1,2-diacilglicerol	PIP₃	Fosfatidil-inositol-3,4,5-trifosfato
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco	PKA	Proteína quinasa A
DMSO	Dimetilsulfoxido	PKC	Proteína quinasa C
DTT	DL-Ditiotreitol	PLA	Fosfolipasa A
ECA	Enzima Convertidora de Angiotensina	PLC	Fosfolipasa C
ECG	Electrocardiograma.	PLD	Fosfolipasa D
EDTA	Ácido etilén diamino tetra acético	PMSF	Fenil metil sulfonil fluoruro
EGF	Factor de crecimiento epitelial	PP2	4-Amino-5-(4-clorofenil)-7-(t-butyl)pirazolo[3,4-d]pirimidina
EGTA	Ácido etilenglicol-bis-β-amino etil eter N, N' tetraacético	PS-ζ	Péptido pseudosustrato miristoilado de PKCζ
Epac	Proteína intercambiadora activada por AMPc	PTX	Toxina Pertúsica
ERK	Quinasa regulada por factores extracelulares	RACK	Receptor para PKCs activadas
ESM	Error estándar de la media	RGS	Regulador de la señal de proteínas G
ET-R	Receptor de endotelina	RH	Dominio de homología RGS
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos	RSK	Quinasa ribosomal S6 de 90 kDa
FRET	Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia	SIP	Esfingosina-1-fosfato
GAP	Proteína activadora de GTPasa	SAPK	Proteína quinasa activada por estrés
GDI	Inhibidor de la disociación de GDP	SDS	Dodecil sulfato sódico
GEF	Factor intercambiador de nucleótidos	SGK	Quinasa inducible por suero y glucocorticoides
GPCR	Receptor acoplado a proteína G	SHR	Ratas espontáneamente hipertensas
Grb2	Proteína 2 unida a receptor de factores de crecimiento	STI	Inhibidor de la tripsina
GRK	Quinasa de los receptores acoplados a proteínas G	TEMED	N, N, N', N'-tetrametil-etilen-diamina
GSK3	Glucógeno sintasa quinasa	TGFβ	Factor de crecimiento transformante β
HDAC	Histona deacetilasa	TNFα	Factor de necrosis tumoral α
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico	U73122	1-(6-((17β-3-Methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)hexyl)-1H-pyrrole-2,5-dione
IKK	Quinasa del inhibidor IκB	VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
IL-1	Interleuquina-1	YFP	Proteína fluorescente amarilla

RESUMEN EN INGLÉS





SUMMARY

In this work we show that PKC ζ plays a key role in the activation of the ERK5 pathway by Gq-coupled GPCR in epithelial cells and in cardiomyocytes as well as in the induction of cardiac hypertrophy by agonists acting through Gq-coupled GPCR such as angiotensin II.

Several lines of evidence support the notion that a functional interaction between G α q and PKC ζ mediates the triggering of the ERK5 cascade by Gq-coupled GPCR. First, ERK5 stimulation by carbachol or angiotensin II does not appear to require the activity of EGF-Receptors (EGFR) or cytosolic tyrosine kinases, known to participate in ERK5 activation in response to different mitogens, thus suggesting that potential GPCR/EGFR transactivation mechanisms are not involved. Second, over-expression of a constitutively active G α q subunit mutant promotes “per se” ERK5 stimulation, independently of its ability to interact with the classical G α q effector PLC β . Third, G α q (and not other G α subunits) associates with PKC ζ in cells, and co-immunoprecipitation of these endogenous proteins can be promoted upon Gq-coupled GPCR activation. Moreover, a direct G α q/PKC ζ interaction can be observed using purified proteins. Fourth, G α q, PKC ζ and MEK5 (the upstream ERK5 activator) are present in the same multimolecular complex as assessed by co-immunoprecipitation experiments. Interestingly, G α q also directly interacts with MEK5, suggesting a scaffold role for this G protein subunit in the stimulation of this pathway. Finally, stimulation of ERK5 by Gq-coupled GPCR is blocked by PKC ζ pharmacological inhibitors and absent in MEFs or cardiomyocytes derived from PKC ζ -deficient mice. Thus, these data put forward PKC ζ as a novel G α q effector required for ERK5 activation by Gq-coupled GPCR. Moreover, the finding that PKC ζ -deficient mice do not develop angiotensin-induced cardiac hypertrophy indicates an important physiopathological role for this novel G α q/PKC ζ /ERK5 signaling axis.

In sum, the novel G α q/PKC ζ /ERK5 signal transduction route presented in this study may help to better understand the mechanisms underlying GPCR-induced cardiac hypertrophy and in the design of new therapeutic strategies. On the other hand, it opens new avenues to investigate the potential role of this pathway in other cell types and physiological processes.

INTRODUCCIÓN





En el desarrollo y en la homeostasis de los organismos multicelulares es necesaria la coordinación en el espacio y en el tiempo de tres principales procesos: la proliferación celular, la diferenciación celular y la organización de las células resultantes en tejidos y órganos. Resulta obvia, para todo ello, la necesidad de sistemas de comunicación entre las células, que lleven a cabo dicha coordinación. A lo largo de la evolución, las células han desarrollado complejos sistemas de detección de las condiciones ambientales, tanto dentro como fuera del organismo. De forma muy simplificada, las células detectan señales químicas presentes en el medio, capaces de unirse a un receptor (con frecuencia situado en el lado externo de la membrana celular). La señal se transmite al interior de la célula por la activación del receptor, que inicia cascadas de señalización cuyo fin último es controlar el estado de activación de distintas proteínas y factores de transcripción, que van a regular la función, la morfología celular y la expresión de los genes apropiados en cada respuesta biológica. A partir de este esquema general, se ha desvelado una enorme diversidad y complejidad en los distintos sistemas de señalización.

El conocimiento adquirido en los últimos años de investigación dentro del campo de la biología molecular ha permitido definir tres importantes conceptos relativos al nivel de organización celular. Así, el transcriptoma comprende el conjunto de genes expresados en un momento y en un tipo celular determinado; el proteoma define el conjunto de proteínas resultantes de la expresión de esos genes; por último, el interactoma comprende la multitud de interacciones físicas que se establecen entre las distintas proteínas, los ácidos desoxirribonucleicos (ADN) y los ácidos ribonucleicos (ARN), a través de las cuales se llevan a cabo todas las funciones necesarias para el funcionamiento de la célula y, por extensión, del organismo completo. La célula, a través del reconocimiento e integración de las señales que llegan a ella, “sabe” en que momento tiene que sintetizar o degradar a una proteína determinada, si dicha proteína debe activarse o inhibirse, así como en qué localización celular debe encontrarse. Por tanto, el conocimiento de los mecanismos de señalización celular es imprescindible para la comprensión de los complejos procesos que rigen la vida de la célula y sus implicaciones fisiopatológicas a nivel del organismo.

En este contexto, nuestro objetivo en este trabajo de investigación ha consistido en la caracterización de los mecanismos de activación de la quinasa mitogénica ERK5 (del inglés Extracelular Regulated Kinase 5) a través de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, del inglés G Protein-Coupled Receptors), y su implicación en el desarrollo de ciertas patologías del sistema cardiovascular. En esta introducción se pretende llevar a cabo un repaso general a la estructura y función de los GPCRs, así como de las quinasas mitogénicas de la familia MAPK (del inglés Mitogen Activated Protein Kinase), a la que pertenece ERK5, para terminar con una descripción del papel que juegan estas proteínas en la función del sistema cardiovascular.



1. Receptores acoplados a proteínas G.

Uno de los sistemas de detección de señales extracelulares con más éxito evolutivo es el de los receptores de membrana acoplados a proteínas G, denominados también receptores de siete dominios transmembrana o heptahélicos. Son el mayor grupo de proteínas implicadas en transducción de señales.

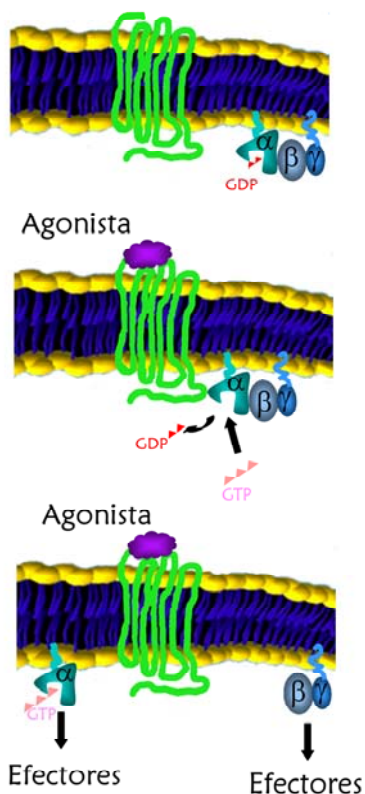


Figura 11. Mecanismo de transmisión de la señal de los GPCR

Se han identificado más de mil GPCRs (lo que constituye cerca del 3% del genoma humano), que responden a una amplia diversidad de ligandos capaces de transmitir señales tan diferentes como las de los fotones, aromas, nucleótidos, nucleósidos, péptidos, lípidos y proteínas (Lagerström y Schiöth, 2008). Reciben su nombre debido a su interacción con las proteínas G heterotriméricas, localizadas en el lado interno de la membrana citoplasmática. Tras la llegada del ligando, el receptor sufre cambios conformacionales que provocan el intercambio de GDP por GTP en la subunidad $G\alpha$, con lo que ésta se disocia del dímero $G\beta\gamma$ y del receptor. A partir de este momento, tanto $G\alpha$ como $G\beta\gamma$ pueden acceder a sus efectores iniciando distintas vías de señalización (Figura 11). Además, los GPCRs también interaccionan con otros tipos de proteínas celulares, modulando así tanto vías de transducción dependientes de la activación de las proteínas G heterotriméricas como independientes de éstas (Hall y cols. 1999). Recientemente también se han descrito otras proteínas conocidas como AGS (del inglés Activators of G protein signaling) y CSP (del inglés Cysteine String Protein) capaces de activar a las proteínas G heterotriméricas de forma independiente de GPCRs (Blumer y cols. 2007; Natochin y cols. 2005).

Los GPCRs controlan muy diversos efectores, como adenilato ciclasas, fosfolipasas, canales iónicos y, descrito más recientemente, cascadas de quinasas mitogénicas, por lo que son capaces de modular múltiples funciones celulares. Así, los GPCRs regulan la secreción de glándulas exo y endocrinas, la exocitosis, la quimiotaxis, el control de la presión sanguínea, la función plaquetaria, así como la embriogénesis, angiogénesis, regeneración tisular y el control del crecimiento celular tanto normal como aberrante. Debido a su implicación en tal variedad de procesos fisiológicos, los GPCRs son dianas terapéuticas de más del 50% de los fármacos desarrollados por las empresas farmacéuticas (Marinissen y Gutkind, 2001; Jacoby y cols., 2006).



1.1. Características generales de los GPCRs.

La comparación de la secuencia aminoacídica de los distintos GPCRs revela que aunque la identidad de secuencia es muy limitada, todos tienen en común un módulo central constituido por siete α -hélices que atraviesan la membrana lipídica, conformando siete dominios transmembrana (TM-I hasta TM-VII), conectados

mediante tres bucles intracelulares y tres extracelulares, denominados i_1 , i_2 , i_3 y e_1 , e_2 , e_3 , respectivamente. Existen dos residuos de cisteína conservados (en el bucle extracelular 1 y 2) en la mayor parte de los GPCRs, que forman un puente disulfuro implicado en la estabilización de un número restringido de conformaciones. Es interesante destacar que la longitud y función de los dominios N-terminal extracelular y C-terminal intracelular, así como de

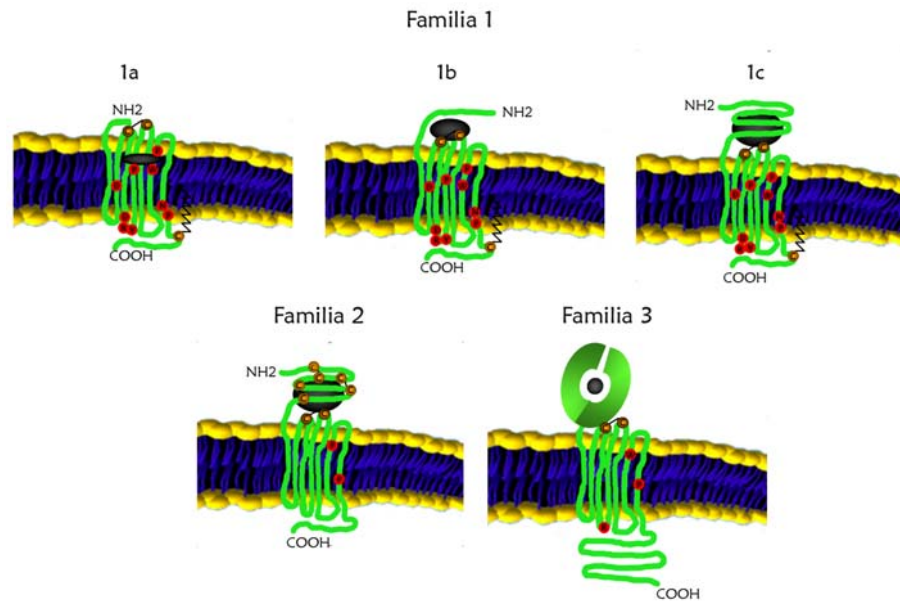


Figura 12. Clasificación de la familia de receptores acoplados a proteínas G. Basándose en la secuencia primaria, los GPCRs fueron clasificados en tres familias, cuyos componentes comparten más de un 25% de homología en su secuencia. La familia 1 es la más numerosa e incluye a la rodopsina, receptores olfatorios, receptores de opsina, receptores de hormonas de pequeño tamaño y receptores de hormonas glicoproteicas. La familia 2 está compuesta por unos 50 GPCRs que unen hormonas como calcitonina, hormona paratiroidea y secretina, y que en general están acoplados a proteínas *Gas*. En la familia 3 podemos encontrar al receptor de glutamato, receptor sensible a Ca^{2+} y los receptores de feromonas (Jacoby y cols., 2006).

los bucles, difieren entre los distintos receptores, proporcionándoles propiedades específicas (Dixon y cols., 1986; Baldwin, 1994; Gudermann y cols., 1997a; Gudermann y cols., 1997b; Palczewski y cols., 2000; Eglén y cols., 2007). En función de estas diferencias los GPCRs son clasificados en distintas familias (figura 12). En primer lugar, la familia 1 se divide en la subfamilia 1a, donde el ligando, que es de tamaño pequeño, interactúa fundamentalmente con los dominios transmembrana III y IV. En la familia 1b las principales interacciones ligando-receptor son con el dominio N-terminal así como con bucles extracelulares, aunque parece ser que parte del ligando también se introduce en una cavidad formada por dominios transmembrana del receptor. Los receptores de la familia 1c presentan un dominio N-terminal grande, con el que interactúan con hormonas proteicas, permitiendo que éstas también contacten con los bucles extracelulares e_1 y e_3 . Por otra parte, los ligandos de receptores de la familia 2 son péptidos grandes que interactúan con el dominio N-terminal del receptor, el cual



también presenta un tamaño considerable. Por último, la familia 3 se une a ligandos pequeños, como puede ser el Ca^{2+} , a través del dominio N-terminal y es el mismo dominio extracelular el que sufre un cambio conformacional e interacciona con el resto del receptor para que tenga lugar la activación. Aparte de estas tres principales familias, también se distinguen la familia 4, formada por receptores de feromonas (VRs y Go-VNs) y la familia 5, que la constituyen Frizzled y Smoothened, receptores implicados en la polaridad celular y la segmentación durante el desarrollo embrionario. Esta nueva clasificación, denominada GRAFS (de Glutamato, Rodopsina, Adhesión, Frizzled y Secretina como receptores representativos de las distintas familias) está basada en el análisis filogenético de los distintos GPCRs (Bockaert y Pin, 1999; Pierce, 2002; Jacoby y cols., 2006; Eglén y cols., 2007).

1.2. Proteínas G heterotriméricas.

Los GPCRs transmiten la señal al interior celular mediante el acoplamiento con las proteínas G heterotriméricas. Estas proteínas están formadas por la subunidad $G\alpha$, con actividad guanosina-trifosfatasa (GTPasa, promueve la hidrólisis de GTP a GDP y Pi), y el dímero $G\beta\gamma$. Tras la llegada del agonista, el receptor provoca la salida del GDP unido a la subunidad $G\alpha$, con lo que entra el GTP provocando un cambio conformacional en tres regiones flexibles de la subunidad $G\alpha$, conocidas como switch I, II y III, promoviendo de este modo la disociación de la subunidad $G\beta\gamma$. A partir de este

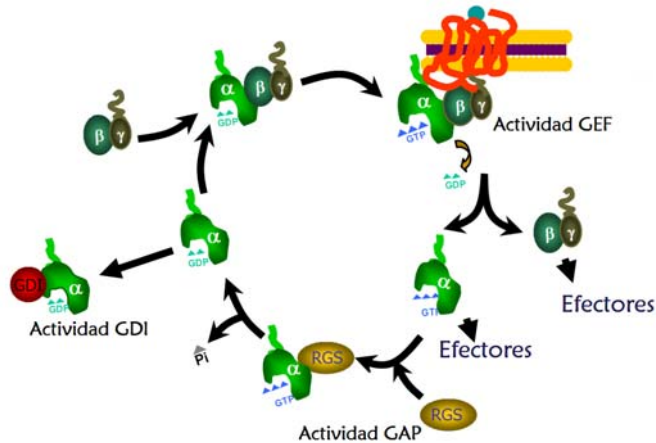


Figura 13. Ciclo de activación-desactivación de las proteínas G heterotriméricas.

momento, tanto $G\alpha$ como $G\beta\gamma$ pueden acceder a sus respectivos efectores. La señal finaliza cuando la subunidad $G\alpha$ hidroliza el GTP, volviéndose a formar el trímero inactivo. Distintos mecanismos, que más adelante se describirán, regulan negativamente la señal. En estos mecanismos participan las proteínas RGS (del inglés Regulators of G protein Signaling) que aceleran la hidrólisis del GTP, GRKs (del inglés, G protein-coupled Receptor Kinases) y arrestinas, que provocan el desacoplamiento de las

proteínas G con el receptor y proteínas con actividad GDI (del inglés GDP-dissociation inhibitor), como las proteínas AGS, que impiden la reasociación entre $G\alpha$ -GDP y $G\beta\gamma$ (Figura 13).

Se han identificado 16 genes de subunidades $G\alpha$ en el genoma humano, que codifican a 23 proteínas $G\alpha$ conocidas. Estas proteínas se clasifican en cuatro familias en función de su similitud de secuencia: $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ y $G\alpha_{12}$ (McCudden y cols., 2005). Presentan uniones covalentes con ácidos



grasos que las dirigen a regiones específicas de la membrana celular. Todas las subunidades $G\alpha$, excepto $G\alpha_t$ que interviene en la fotorrecepción, presentan una molécula de palmitato, unida reversiblemente a una cisteína presente en el dominio N-terminal. A su vez, algunas de estas subunidades pueden encontrarse miristoiladas. Por otro lado, se conocen 5 isoformas humanas de subunidades $G\beta$ y 12 de subunidades $G\gamma$, siendo funcionales la mayoría de las posibles combinaciones para formar el dímero $\beta\gamma$. En este dímero, es $G\gamma$ la que se encuentra unida a ácidos grasos que permiten la asociación con la membrana, a través de grupos farnesil o geranil-geranil. Se ha establecido que para la interacción con el dominio C-terminal y los bucles intracelulares del receptor son importantes los últimos aminoácidos del extremo C-terminal de $G\alpha$, aunque también intervienen otros residuos que confieren especificidad a la unión, así como ciertos segmentos del dímero $G\beta\gamma$ (Cabrera-Vera y cols., 2003; McCudden y cols., 2005).

Las subunidades α de las proteínas G son clasificadas en distintas subfamilias en función de su homología de secuencia (Figura 14) y cada una de estas subfamilias es responsable de activar distintos efectores. El primer efector de subunidades $G\alpha$ que se describió fue la adenilato ciclasa (AC), cuya actividad es regulada positivamente por la subfamilia $G\alpha_s$, con lo que se genera AMP cíclico (AMPc) como segundo mensajero. La subfamilia $G\alpha_i$, además de inhibir a la AC, regula canales iónicos y fosfodiesterasas. Dentro de esta familia se incluye $G\alpha_t$, implicada en fototransducción al activar fosfodiesterasas de GMP cíclico (GMPc). La subfamilia $G\alpha_q$ activa a fosfolipasa β (PLC β), que genera sn-1,2-diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-trifosfato (IP $_3$) como segundos mensajeros, que a su vez, provocan la liberación

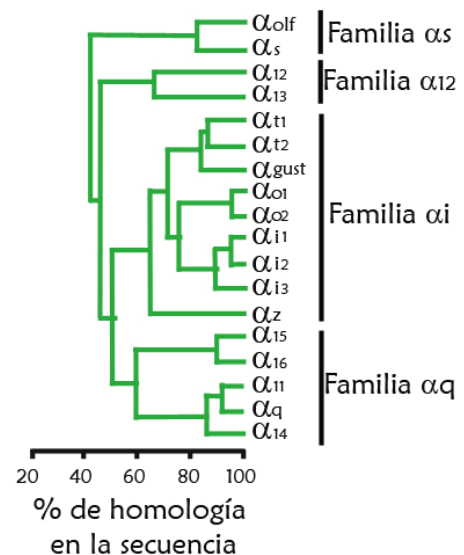


Figura 14. Familias de subunidades $G\alpha$.

de Ca^{2+} almacenado en el retículo o la activación de quinasas. Por último, la subfamilia $G\alpha_{12}$ activa a Rho y otras GTPasas monoméricas implicadas en la regulación del citoesqueleto. Además, por su parte, el dímero $\beta\gamma$ también regula la actividad de ciertas enzimas, como AC, PLC, fosfatidil-inositol 3 quinasa (PI3K), MAPKs y canales iónicos (Birnbaumer, 2007).



1.3. Mecanismos de regulación de los GPCRs.

Una característica esencial de los GPCRs es que muestran complejos mecanismos de regulación tanto de su expresión como de su funcionalidad y localización subcelular, modulando su capacidad de respuesta a los estímulos. La desensibilización, o pérdida de respuesta ante la presencia crónica o aguda de un estímulo, se lleva a cabo al regular el acoplamiento con las proteínas G y el número de receptores disponibles en membrana, iniciando mecanismos de internalización, reciclaje o degradación. Se distinguen dos mecanismos por los cuales se produce este fenómeno. Los GPCRs pueden ser fosforilados y modulados por quinasas activadas por segundos mensajeros, como la quinasa dependiente de AMPc (PKA), la proteína quinasa C (PKC) o quinasas citosólicas de la familia Src, proceso que se ha denominado regulación o desensibilización heteróloga. Mediante este proceso además de desensibilizar a los receptores activados por agonista, también son fosforilados los receptores que no han unido agonista, lo que previene su posible activación. De este modo, cualquier receptor de la célula que module la señal del AMPc o del Ca^{2+} podrá iniciar procesos de desensibilización (Chuang y cols., 1996; Lefkowitz y cols., 1998a; Lefkowitz y cols., 1998b; Moore y cols., 2007). Estas fosforilaciones provocan el desacoplamiento de los receptores con las proteínas G, aunque no está muy claro si también reclutan a las proteínas β -arrestinas, encargadas de iniciar procesos de internalización (Moore y cols., 2007).

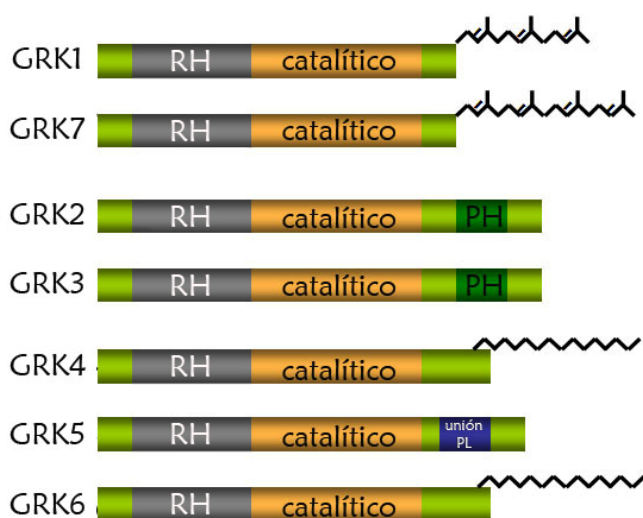


Figura 15. Familia GRK. En la figura se representa la organización estructural en dominios de las siete GRK identificadas en mamíferos. RH, dominio de homología a los reguladores de proteínas G, RGS; PH, dominio de homología a plekstrina; PL, fosfolípido.

rodopsina quinasa (RK), se expresa en retina y glándula pineal; GRK2 y 3, también llamadas inicialmente quinasas del receptor β -adrenérgico (β ARK-1 y β ARK-2, respectivamente) son ubicuas; GRK4 se expresa principalmente en testículos; GRK5 y 6 son también ubicuas y GRK7 es específica del

Por contraposición, en la desensibilización homóloga, sólo los receptores que han unido agonista son fosforilados específicamente por las quinasas de la familia GRK (del inglés, G protein-coupled Receptor Kinases) produciéndose el reclutamiento de las proteínas β -arrestinas al receptor fosforilado, lo que promueve el desacoplamiento con las proteínas G e inicia los mecanismos de internalización (Ferguson, 2007; Moore y cols., 2007).

La familia de serina-treonina quinasas denominada GRK comprende siete miembros identificados hasta la fecha, los cuales muestran en torno a un 70% de homología en su secuencia. GRK1 o



sistema visual (conos). Todas ellas constan de un dominio central catalítico muy conservado, que varía de 263 a 266 aminoácidos, un dominio N-terminal de 183-188 residuos y un dominio C-terminal más variable en extensión y en funcionalidad. En el dominio N-terminal se encuentra un dominio de homología a proteínas RGS (del inglés Regulators of G protein Signaling), llamado RH (del inglés RGS Homology domain), que en el caso de GRK2/3 permite su interacción con las subunidades $G\alpha_q$ (Carman y cols. 1999). El dominio C-terminal contiene los determinantes necesarios para la correcta localización de estas proteínas. Así, GRK2 y 3 poseen un dominio de homología a plekstrina (PH), capaz de interactuar con fosfolípidos de membrana, mientras que GRK5 presenta secuencias ricas en aminoácidos básicos en los extremos N- y C-terminal de la proteína que potencian su asociación con lípidos. GRK1, GRK4, GRK6 y GRK7 se hallan constitutivamente ancladas a la membrana plasmática mediante la modificación post-traducciona de cisteínas tioesterificables con palmitato o farnesilo (Figura 15).

La característica principal de las GRK es que fosforilan específicamente la forma unida a agonista del receptor, y lo hacen en residuos de serina y treonina del tercer bucle intracelular y del extremo C-terminal, en entornos de residuos ácidos, aunque carecen de una secuencia consenso clara de fosforilación (Penela y cols. 2003; Ribas y cols. 2007). Es interesante destacar que distintas GRK pueden fosforilar al mismo receptor en residuos diferentes, lo que puede promover distintas consecuencias funcionales (Cao y cols., 1999). Cada vez resulta más evidente que la función de estas quinasas está altamente regulada, bien controlando su localización celular, su actividad enzimática o sus niveles de expresión. Esta fina regulación contribuye a que un número reducido de isotipos de GRK puedan modular coordinadamente la capacidad de respuesta de los numerosos GPCRs que se expresan en un determinado tipo celular (Penn y cols., 2000; Ferguson, 2007).

La familia de arrestinas se compone de diversos miembros: la arrestina visual (arrestina 1) se localiza en retina, mientras que β arrestina 1 y β arrestina 2 (también llamadas arrestina 2 y arrestina 3, respectivamente) son ubicuas

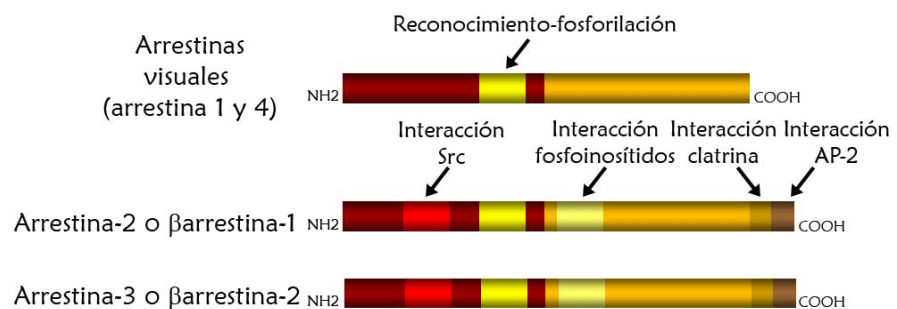


Figura 16. Familia de las arrestinas. En la figura se representa la organización estructural en dominios de las arrestinas identificadas en mamíferos.

(Lefkowitz, 1998; Moore y cols., 2007) (Figura 16). Se han descrito dos subtipos de β -arrestina-1 (1A y 1B) que difieren en el extremo C-terminal. A su vez, β -arrestina 2 también presenta dos variantes de



procesamiento alternativo. Las arrestinas se unen al receptor tanto por los sitios de fosforilación como por el tercer bucle intracelular y parte de la región C-terminal del receptor, lo que impide la unión del GPCR activado a las proteínas G, y por tanto conduce a la desensibilización del receptor por desacoplamiento de la proteína G heterotrimérica (Pitcher y cols., 1998; Shenoy y Lefkowitz, 2003; Moore y cols., 2007). En los últimos años ha quedado patente que arrestina tiene un papel crucial en el secuestro de los receptores, actuando como molécula adaptadora de componentes claves de la

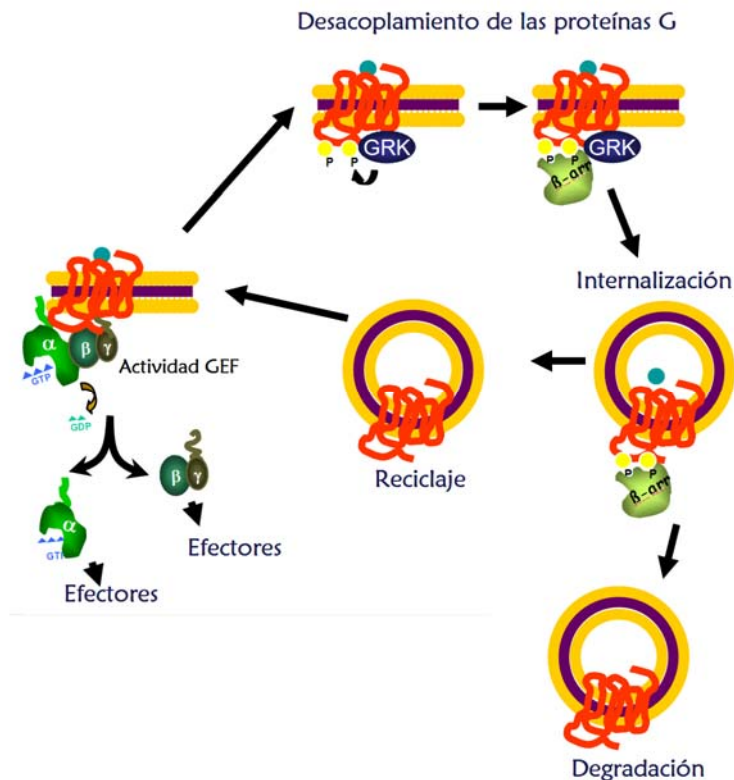


Figura 17. Regulación de la señal de GPCRs. La llegada del agonista al receptor induce la fosforilación específica del receptor por las quinasas GRKs, lo que lleva al desacoplamiento de las proteínas G y al reclutamiento de arrestinas. Éstas inician los procesos de internalización con lo que el receptor puede ser degradado o reciclado.

que éste se dirija al proteosoma; o dirigirse a endosomas de reciclaje, donde es defosforilado y vuelve a la membrana (Figura 17). Es en estos endosomas tempranos donde arrestina media preferentemente la activación de MAPKs.

Otras proteínas encargadas de la regulación de la señal de los GPCRs son la familia de las RGS (del inglés Regulators of G protein Signalling). Esta familia fue identificada por su capacidad de acelerar la velocidad de hidrólisis del GTP en la subunidad $G\alpha$, lo que se conoce como actividad GAP (del inglés GTPase Activating Proteins). De esta forma se regula el tiempo de activación de $G\alpha$ y $G\beta\gamma$. Todos los miembros de la familia RGS presentan una región de 120 aminoácidos a través de la cual ejercen su función, llamado dominio RGS. En mamíferos se han descrito 20 genes que codifican a proteínas RGS,

maquinaria endocítica (clatrina, dinamina, AP-2), dirigiendo los receptores a vesículas de clatrina (Zhang y cols., 1996; Lefkowitz y Shenoy, 2005; Moore y cols., 2007). Además de regular el tráfico de GPCRs, arrestina sirve de proteína adaptadora que conecta a los receptores con componentes de las vías de activación de quinasas de las familias MAPK y Src, por lo que también tiene un papel crítico en la regulación de la expresión de ciertos genes (Moore y cols., 2007). Una vez que el receptor es endocitado puede seguir distintos caminos; puede acabar en endosomas tardíos, donde es degradado, en un proceso en el que también la arrestina media en la ubiquitinación del receptor para



que se dividen en cuatro familias: RZ/A, R4/B, R7/C y R12/D. Todas ellas presentan actividad GAP frente a los miembros de la familia $G_{\alpha i}$ y $G_{\alpha q}$, pero no $G_{\alpha s}$ o $G_{\alpha 12}$. También se han descrito otras proteínas, denominadas RGS-like, que son capaces de regular a la familia $G_{\alpha 12}$, como las proteínas p115RhoGEF. Como se ha comentado anteriormente, los miembros de la familia GRK presentan un dominio de homología a RGS en su extremo N-terminal, pero dicho dominio no acelera la velocidad de hidrólisis del GTP en las subunidades G_{α} . Sin embargo, en el caso de GRK2 le permite interactuar con subunidades $G_{\alpha q}$ y regular su señalización al evitar que éstas accedan a sus efectores (Carman y cols. 1999; Ribas y cols. 2007). Algunos de los miembros de la familia RGS presentan dominios funcionales adicionales con los que ejercen otras funciones, como la interacción con el dímero $G_{\beta\gamma}$ o con proteínas que contienen motivos GPR (del inglés G Protein Regulatory), las cuales, a través de su actividad GDI (del inglés GDP-dissociation inhibitor) son otros reguladores de la señal de proteínas G (Wieland y cols., 2007). Las proteínas RGS también son capaces de interactuar con el receptor, bien directamente o a través de proteínas adaptadoras, con lo que se aproximan a sus sustratos y provocan el desacoplamiento de las proteínas G (Ferguson, 2007).

En resumen, la señal iniciada por los GPCRs se encuentra regulada a nivel del receptor, por los mecanismos que determinan el número de receptores en la membrana y por el desacoplamiento de las proteínas G, ambos sucesos mediados por GRKs y arrestinas, y a nivel de las proteínas G por los mecanismos que apagan la señal, mediados por las proteínas RGS y GDI.

2. Familia de las quinasas mitogénicas MAPKs.

La familia de quinasas mitogénicas MAPK desempeña un papel relevante en señalización ya que inicia distintas respuestas celulares ante estímulos mitogénicos, apoptóticos, relacionados con estrés o de supervivencia, modulando la función de ciertas proteínas y la expresión de distintos genes en el núcleo. En humanos se han descrito hasta 11 proteínas de esta familia que pueden clasificarse en 6 grupos: las quinasas que responden a señales extracelulares (ERK1 y ERK2, del inglés Extracellular Regulated Kinase), las quinasas que fosforilan el extremo N-terminal de Jun (JNK1, JNK2 y JNK3 del inglés Jun N-terminal Kinase), quinasas que responden a estrés p38 (p38 α , p38 β , p38 γ y p38 δ) también conocidas como SAPK (del inglés Stress Activated Protein Kinase), ERK5 o BMK1 (del inglés Big Mitogen Kinase ya que su tamaño es dos veces más grande que el de cualquier otra MAPK), ERK3s (ERK3, p97 MAPK y ERK4) y ERK7 (ERK7 y ERK8) (Turjanski y cols., 2007; Goldsmith y Dhanasekaran, 2007). Cada miembro de la familia MAPK es activado por una cascada de señalización que se compone de al menos tres serina/treonina quinasas (MAPKKK, MAPKK y MAPK) que se fosforilan y activan secuencialmente, obteniendo así la amplificación de la señal.



Para su completa activación las MAPKs deben ser fosforiladas en dos residuos altamente conservados, una serina y una treonina localizadas en el bucle de activación. Estos dos residuos se encuentran separados por un glutámico en el caso de ERK1, ERK2 y ERK5, por una glicina en el caso de p38 o por una prolina en el caso de JNK. Parece ser que esta diferencia proporciona cierta especificidad a la hora de ser activadas por las correspondientes MAPKK. En general, se puede decir que ERK1 y ERK2 se activan preferentemente en respuesta a mitógenos que se unen a receptores de factores de crecimiento o a GPCRs, mientras que p38 y JNK se activan sobre todo en respuesta a estímulos relacionados con estrés, ERK5 es capaz de responder a las dos clases de señales (Turjanski y cols. 2007).

2.1. Mecanismos de activación de las MAPKs.

Uno de los mecanismos de activación mejor establecidos es el de ERK1/2 en respuesta a factores de crecimiento como EGF (del inglés Epitelial Growth Factor). El receptor de EGF dimeriza tras la llegada del agonista y es capaz de autofosforilarse en residuos de tirosina, con lo que se generan sitios de unión para proteínas con dominios SH2. Una proteína adaptadora que presenta estos dominios es Shc (del inglés, Src homology collagen-like), que interacciona con el receptor, es fosforilada en tirosinas y recluta a otra proteína adaptadora, Grb2 (del inglés Growth factor Receptor-Bound protein 2). Esta a su vez recluta a un factor intercambiador de nucleótidos, SOS, que activa a la proteína GTPasa

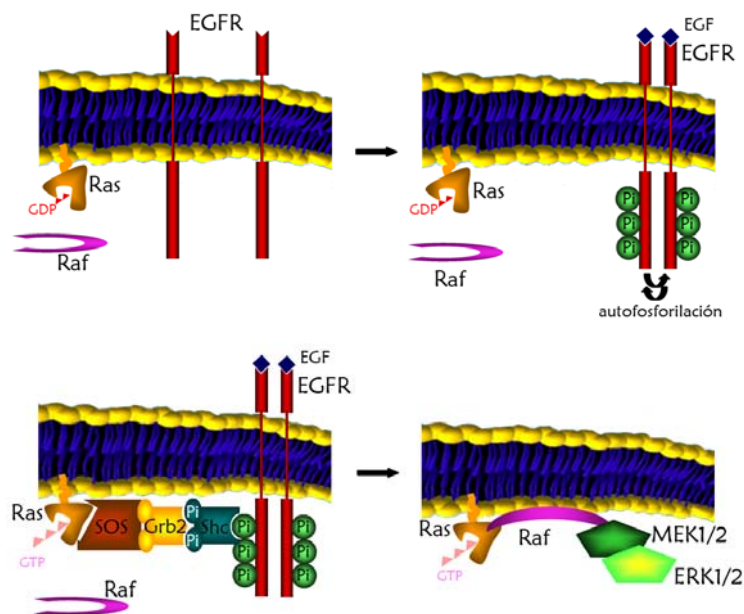


Figura 18. Mecanismo de activación de ERK1/2 en respuesta a EGF.

monomérica Ras. Mediante mecanismos complejos, Ras activa a Raf, que es una MAPKKK que fosforila y activa a MEK1/2 (MAPKK), que a su vez fosforilan y activan a ERK1/2 (MAPK), las cuales se translocan al núcleo y modulan distintos factores de transcripción (Figura 18). A su vez, cada componente de la cascada regula otras proteínas citosólicas, por lo que se inicia una compleja red de rutas de señalización que dan lugar a la respuesta celular correspondiente (Ullrich y Schlessinger, 1990; Turjanski y cols., 2007).



Los mecanismos de activación de JNK son más complejos. Se ha descrito la implicación de GTPasas momoméricas de la familia Rho, como Rac y Cdc42, y se han identificado dos quinasas capaces de fosforilar a JNK, MKK4 y MKK7. Parece ser que la primera se encarga de fosforilar a la tirosina del bucle de activación, mientras que la segunda fosforila a la treonina (Lisnock y cols., 2000).

Por otro lado, las principales funciones del subgrupo de p38 son participar en la respuesta inflamatoria y en la inducción de apoptosis cuando hay daño en el ADN. Se conocen dos quinasas, MKK3 y MKK6, capaces de activar a los cuatro isotipos de p38. Por tanto, la especificidad de la respuesta dependerá de los niveles de expresión y de la localización de cada p38 (Turjanski y cols., 2007).

Se ha demostrado que existe bastante especificidad entre las MAPKs y las MKKs que las activan (MEK1/2 activan ERK1/2, MKK3 y MKK6 activan a p38, MKK4 y MKK7 activan a JNK y MEK5 activa a ERK5). Sin embargo, las quinasas que activan a MKKs (MEKKs o MKKKs) pueden tener más de un sustrato, por ejemplo MEKK2 puede intervenir en la ruta de p38 o de ERK5, mientras que MEKK3 se puede encontrar en la ruta de ERK5 y de JNK. Por lo tanto, se ha propuesto que los mecanismos que rigen la especificidad de la señal a este nivel son, por un lado, la existencia de proteínas adaptadoras, que ensamblan a los distintos componentes de una cascada de señalización en una localización celular concreta, y por otro, la existencia de interacciones directas entre los componentes de dichas cascadas. Ambos mecanismos operan en paralelo, permitiendo que una sola cascada de MAPK induzca distintas respuestas celulares ante distintos estímulos (Wang y Tournier, 2006). A continuación se detallarán los mecanismos de activación de la quinasa ERK5,

2.2. Mecanismos de activación de ERK5.

ERK5, también conocida como BMK1, contiene un dominio catalítico muy similar al de ERK1/2, con el mismo motivo de fosforilación Treonina-Glutámico-Tirosina, pero se diferencia en su dominio C-terminal, que es más grande que el de cualquier otra MAPK. Este dominio contiene secuencias de transporte nuclear (NES, del inglés Nuclear Export Signal y NLS, del inglés Nuclear Localization Signal) y regiones ricas en prolina con las que interacciona con dominios SH3. También se encuentran secuencias de interacción con factores de transcripción de la familia MEF2 (del inglés Myocyte Enhancer Factor) y un dominio de activación transcripcional (Wang y Turnier, 2006). Existen indicios de que una región inhibitoria en el dominio C-terminal oculta el sitio de unión a sustratos y a las secuencias NLS, por lo que en situaciones basales ERK5 se acumula en el citoplasma. Con la llegada del estímulo, MEK5 fosforila a ERK5 y su estructura se abre con lo que ya es accesible a las proteínas que regulan su transporte al núcleo y puede interactuar con sus sustratos (Nishimoto y Nishida, 2006). Se ha descrito que ERK5 es activada en respuesta a factores de crecimiento como EGF, BDNF, NGF, VEGF y FGF, así



como en presencia de quimioquinas, ésteres de forbol, shock hiperosmótico, estrés oxidativo, rayos ultravioletas y estrés laminar (Hayashi y Lee, 2004; Wang y Tournier, 2006) (Figura 19).

Como se ha comentado, MEK5 es la quinasa que fosforila y activa a ERK5. El par MEK5/ERK5 es altamente específico, ya que no se conocen otras quinasas que fosforilen a ERK5 ni otros sustratos de MEK5. En cambio, se han descrito varias quinasas capaces de interactuar y activar a MEK5. El que actúe una quinasa u otra parece depender tanto del tipo celular como del estímulo (Hayashi y Lee, 2004). Por ejemplo, en la línea celular CCL64, MEKK2 forma un complejo con la proteína Lad; éstas dos proteínas se separan cuando la célula es estimulada con EGF, proceso en el que intervienen quinasas

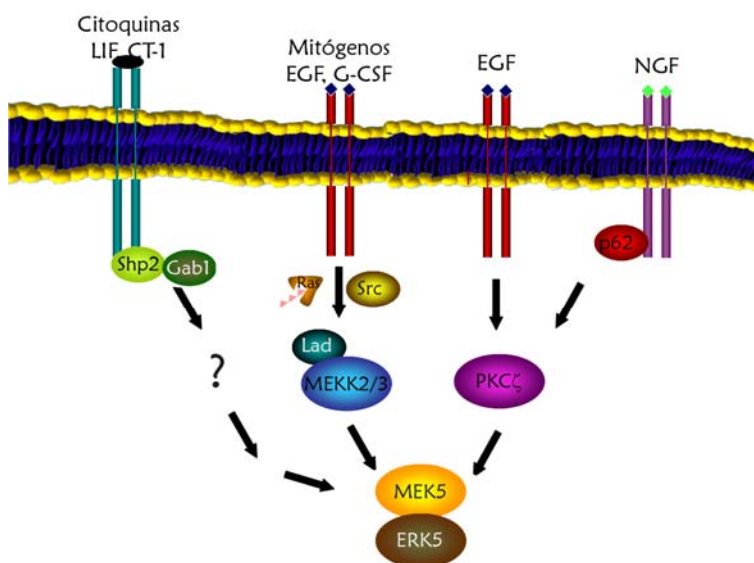


Figura 19. Mecanismos de activación de ERK5 en respuesta a factores de crecimiento y citoquinas.

de la familia Src. De esta manera, MEKK2 ya puede acceder y activar a MEK5/ERK5 (Sun y cols., 2003). En cambio, en células HEK293 la activación de ERK5 por EGF no está mediada por MEKK2; su lugar lo ocupa la proteína quinasa C atípica, PKC ζ , que en respuesta al estímulo interacciona con MEK5, interacción necesaria para la activación de ERK5 (Díaz-Meco y Moscat, 2001). También en neuronas, PKC ζ y la proteína adaptadora p62 están implicadas en la activación de ERK5 inducida por ciertas neurotrofinas (Geetha y Wooten, 2003). La quinasa MEKK3 también se encuentra en la ruta de activación de ERK5, jugando un papel importante en la supervivencia de células endoteliales (Deng y cols., 2007). Ratones deficientes en ERK5 o en MEKK3 muestran el mismo fenotipo, muriendo en el día 10 del desarrollo embrionario debido a defectos en las células endoteliales, lo que implica que la angiogénesis no tiene lugar de forma correcta. En cambio, los ratones deficientes en MEKK2 son viables, aunque presentan una mayor proliferación de células T y defectos en la producción de ciertas citoquinas (Hayashi y Lee, 2004).

ERK5 puede activar distintos factores de transcripción. Los factores MEF2A, C y D, de la familia MEF (del inglés Myocyte Enhancer Factor), son las dianas de ERK5 mejor caracterizadas. Entre otros ejemplos encontramos c-Myc, Sap1, c-Fos, Fra 1, Sap1a, CREB y Ste1 (Turjanski y cols, 2007). Mediante la modulación de estos factores de transcripción, ERK5 interviene en la activación de la expresión de genes relacionados con la progresión del ciclo celular, como c-Jun, c-Fos y ciclina D1, en respuesta a



factores de crecimiento (Nishimoto y Nishida, 2006). Es evidente que ERK5 puede jugar un papel importante en oncogénesis, ya que se ha descrito que en cierto porcentaje de tumores agresivos es común encontrar altos niveles de receptores ErbB, que correlacionan con una mayor activación de ERK5 y con mayores niveles de MEK5. A su vez, la activación de metaloproteinasas, que facilitan la invasión de tejidos por las células tumorales, ha sido relacionada con la activación de la vía MEK5/ERK5 (Wang y Tournier, 2006).

Otra diana conocida de ERK5 es la proteína proapoptótica Bad. En respuesta a estrés laminar, ERK5 fosforila e inhibe a esta proteína, mediante mecanismos dependientes de tirosina-quinasa y Ca^{2+} e independientes de especies reactivas de O_2 , producción de NO o quinasa de la familia c-Src (Hayashi y Lee, 2004). De esta forma, ERK5 contribuye en la supervivencia de células del endotelio. Ratones deficientes en ERK5 sólo en células del endotelio presentan el mismo fenotipo que los ratones que carecen de ERK5 por completo, mueren en el día 10 del desarrollo embrionario con claros defectos en el desarrollo del sistema cardiovascular. La angiogénesis tiene lugar, pero las células del endotelio son redondeadas y no se organizan de manera adecuada, lo que tiene como consecuencia un desarrollo deficiente del miocardio (Nishimoto y Nishida, 2006).

Además, se ha descrito la función de ERK5 en supervivencia neuronal. En este sentido, la quinasa RSK (del inglés, p90 ribosomal S6 kinase), implicada en la activación del factor de transcripción CREB (del inglés, Ca^{2+} /AMPc response element binding protein), se activa en respuesta a neurotrofinas y de forma dependiente de ERK5. De esta forma ERK5 media en la activación de CREB, el cual es un factor importante en la regulación de la supervivencia neuronal (Hayashi y Lee, 2004). Otro dato que refleja la importancia de ERK5 en supervivencia neuronal, es el hecho de que la ausencia de esta quinasa en *Xenopus Laevis* provoca una reducción de las estructuras de la cabeza e inhibe la diferenciación neuronal (Nishimoto y Nishida, 2006). En cambio, ratones deficientes en ERK5 sólo en células neuronales son viables y no presentan un fenotipo distinto al de ratones silvestres. Esta discrepancia puede deberse a funciones redundantes de las MAPKs en mamíferos (Hayashi y Lee, 2004). Otra diana de ERK5 implicada en supervivencia es la quinasa SGK (del inglés Serum- and Glucocorticoid-induced Kinase), que fosforila a la proteína proapoptótica Foxo3a, impidiendo su translocación al núcleo donde promueve la expresión del ligando de Fas (Wang y Tournier, 2006). De esta forma, ERK5 bloquea la activación de caspasas inducida por dicho ligando. Por último, ERK5 juega un papel importante en el sistema cardiovascular y en el desarrollo de ciertas patologías cardíacas, pero estas funciones serán comentadas más adelante.



2.3. Activación de MAPKs por GPCRs.

Los GPCRs, principalmente a través de las proteínas G, son capaces de activar a las distintas MAPKs y de esta forma intervienen en el control de la proliferación y diferenciación. El primer indicio del potencial oncogénico de los GPCRs fue encontrado en ciertos adenomas de tiroides y pituitaria, donde los GPCRs presentaban mutaciones que los mantenían constitutivamente activos (Luttrell, 2003).

Los mecanismos por los que los GPCRs activan MAPKs varían mucho dependiendo del tipo celular y del receptor implicado. En general, a través de las subunidades $G\alpha$ o $G\beta\gamma$ tiene lugar la activación de proteínas GEF (del inglés Guanine nucleotide Exchange Factor) que activan distintas GTPasas monoméricas, como Ras, Rho, Cdc42 y Rac. Éstas se encargan de iniciar las rutas de MAPKs. Se ha descrito la implicación de tirosina quinasas citosólicas, como Src, Csk, Btk, Pyk2, Fak, entre otras, en la activación de GEF. Estos mecanismos y las proteínas implicadas varían en función del tipo celular.

Otra forma por la que los GPCRs activan a MAPKs es mediante la transactivación de receptores de factores de crecimiento con actividad tirosina quinasa. Uno de los mecanismos empleados por los GPCRs implica la activación de metaloproteasas de la familia ADAM y/o MMP, las cuales cortan el ligando de EGF unido a membrana (HB-EGF) generando EGF soluble (Goldsmith y Dhanasekaran, 2007). También las proteínas adaptadoras β -arrestinas conectan a los GPCRs con componentes de las rutas MAPKs, así como con la quinasa Src (Luttrell, 2003; Lefkowitz y Shenoy, 2005). De esta forma, β -arrestina dirige la internalización del complejo receptor-MAPK-Src en vesículas de clatrina donde tiene lugar la activación de ERK. Es importante resaltar que, en este caso, las proteínas ERK activadas no se translocan al núcleo, promoviendo la fosforilación de sus sustratos citosólicos frente a los nucleares. La cinética de activación es distinta a la observada tras la activación por factores de crecimiento, siendo más lenta pero sostenida en el tiempo.

En el caso de la activación de ERK1/2 por receptores acoplados a $G\alpha_s$, se ha descrito que distintos GEFs se activan de forma dependiente de AMPc. En este sentido, Epac (del inglés Exchange protein directly activated by cAMP) y C3G (del inglés Crk SH3 domain-binding guanine nucleotide-realising factor) se expresan en distintos tipos celulares y activan a Rap-1 en respuesta a AMPc. A su vez, Rap-1 activa a B-Raf y éste inicia la ruta de activación de ERK1/2 (Vossler y cols., 1997). Sin embargo, se ha comprobado que sólo la activación de Rap-1 por C3G correlaciona con activación de ERK1/2, mientras que la activación por Epac, que es independiente de PKA, debe estar implicada en la regulación de otros procesos (Wang y cols., 2006). En cambio, en otros tipos celulares, PKA ejerce un efecto inhibitorio sobre C-Raf (GTPasa monomérica capaz de activar la ruta de ERK1/2, también conocido como Raf-1) al fosforilarlo en la serina 259 (Wu et al., 1993; Dhillon et al., 2002). Además, Rap-1 puede activar a ERK1/2 a través de B-Raf, pero también es capaz de unirse y secuestrar a C-Raf

impidiendo que ERK1/2 sea activado por Ras/C-Raf en células NIH3T3, en respuesta a factores de crecimiento (Schmitt y Stork, 2001). En las células en las que funciona este sistema, la activación de receptores acoplados a $G_{\alpha i}$ revierte la inhibición de PKA al disminuir los niveles de AMPc y reclutar a la membrana a Rap1GAPII, que acelera la velocidad de hidrólisis de GTP de Rap-1, desactivándolo, y liberando de esta manera la inhibición de C-Raf (Mochizuki y cols., 1999).

Las subunidades $G_{\beta\gamma}$ de receptores acoplados a $G_{\alpha i}$, así como a subunidades $G_{\alpha q}$, activan a ERK1/2 por mecanismos en los que intervienen $PLC\beta$, iniciando la señal de Ca^{2+} , y quinasas como Src y Pyk2 que terminan reclutando a SOS, proteína con actividad GEF para Ras (Della Rocca y cols., 1997). En otros casos, $G_{\beta\gamma}$, a través de la activación de PI3K y de mecanismos de internalización mediados por dinamina II, media la fosforilación de dinamina II y se recluta a Grb2, proteína adaptadora que a su vez recluta a SOS iniciando la cascada ERK1/2 (Roy y cols., 2002).

En otros tipos celulares, como Cos-7 y CHO, la activación de PKC por subunidades $G_{\alpha q}$ lleva a la fosforilación y activación de c-Raf (Kolch y cols., 1993). Este proceso ocurre cuando el receptor implicado es m1(Ach)R (receptor muscarínico tipo m1) mientras que receptores de bradikina o LPA activan ERK1/2 a través de Ca^{2+} , Src y Pyk2 (Dikic y cols., 1996). Otro mecanismo empleado por receptores acoplados

a $G_{\alpha q}$ para activar ERK1/2 consiste en la activación de Rap-1-GEF de forma dependiente a DAG y Ca^{2+} (CalDAG-GEFI) (Guo y cols., 2001). En ciertos tejidos se expresan de forma específica las proteínas Ras-GRF y Ras-GRP

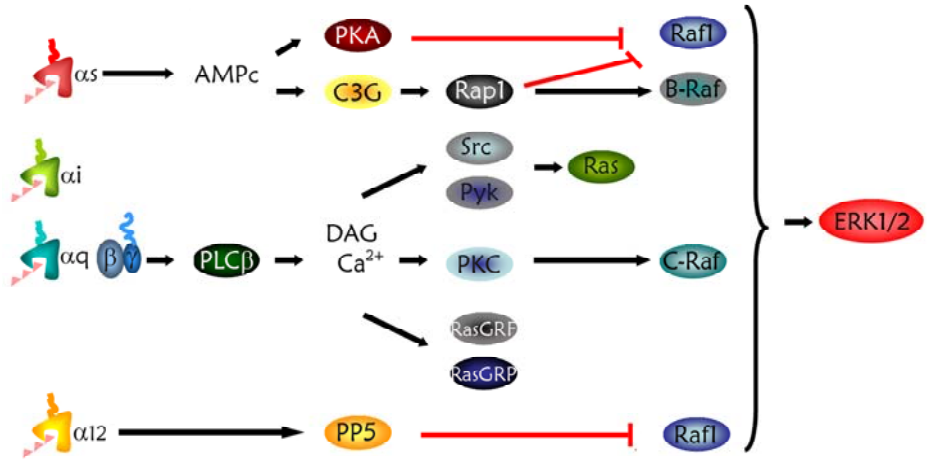


Figura 110. Mecanismos de activación de ERK1/2 mediados por GPCRs.

(también conocidas como CalD-GEF) también sensibles a DAG y Ca^{2+} (Marinissen y Gutkind, 2001). En resumen, dependiendo del tipo celular y de los niveles de expresión de los receptores, la activación de ERK1/2 mediada por $G_{\alpha q}$ puede ser dependiente de PKC y de Ras, sólo de PKC o sólo de Ras. Hasta el momento no se ha desentrañado el papel que juega PKC en la activación de Ras, ya que su fosforilación directa por PKC no es suficiente para que tenga lugar activación de ERK1/2. Por tanto, es posible que PKC deba tener un papel secundario que ayude a la completa activación de Raf por Ras.



Hasta la fecha, no se ha descrito la activación de ERK1/2 por receptores acoplados a $G\alpha_{12/13}$, aunque sí hay ejemplos en los que la señal iniciada por estos receptores lleva a la activación de fosfatasa, como PP5, que defosforilan e inactivan a Raf-1 (Yamaguchi y cols., 2002) (Figura I10).

Por otra parte, se ha visto que la subfamilia de JNK puede ser activada por GPCRs. Así, en células HEK293 algunos isotipos de $G\alpha_i$ y $G\beta\gamma$ asociados son capaces de activar ciertos GEF que, a su vez, activan a las GTPasas monoméricas Rho y Cdc42, las cuales activan a JNK de forma independiente de MKK4 y MKK7 (Yamauchi y cols., 2000). En cambio, en otros contextos celulares la subunidades $G\beta\gamma$, asociadas a $G\alpha_i$, activan a JNK por mecanismos en los que están implicadas Ras, Rac, MKK4 y MKK7 (Coso y cols., 1996). En cualquier caso, en la activación de las GTPasas monoméricas median tirosina quinasas que están aún por identificar.

Estudios *in vivo* han demostrado la implicación de MEKK1 en la activación de JNK inducida por sobreexpresión de $G\alpha_q$ (Minamino y cols., 2002). De nuevo, los mecanismos de activación de JNK por receptores acoplados a $G\alpha_q$ son específicos del tipo celular. En general, tanto subunidades $G\alpha_q$ como $G\beta\gamma$ asociadas activan a JNK a través de las vías PLC β /DAG/PKC y PLC β /IP $_3$ /Ca $^{2+}$. De este modo, tanto Src como Pyk2 actuando de forma dependiente de PKC o de Ca $^{2+}$, respectivamente, han sido implicadas en la activación de ciertos GEFs para Rac-1 o R-Ras. Estas GTPasas monoméricas inician la cascada de JNK al activar MAPKKK específicas como MKK3 (Goldsmith y Dhanasekaran, 2007).

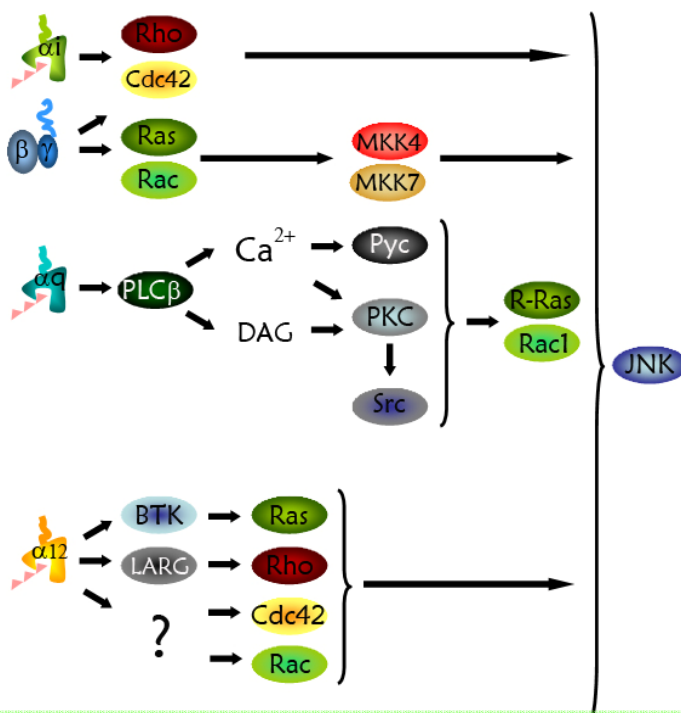


Figura I11. Mecanismos de activación de JNK mediados por GPCRs.

Por otra parte, la sobreexpresión de mutantes activos de $G\alpha_{12}$ o $G\alpha_{13}$ induce una potente activación de JNK (Goldsmith y Dhanasekaran, 2007). Las GTPasas monoméricas implicadas en este proceso pueden ser Ras, Rac, Rho o Cdc42, dependiendo del tipo celular (Collins y cols., 1996; Voyno-Yasenetskaya y cols., 1996). Se tiene poca información sobre las proteínas GEFs implicadas en estas rutas de señalización, sin que se haya identificado ninguna GEF que conecte la señal de $G\alpha_{12/13}$ con la activación de Rac o Cdc42. En el caso de Ras se tiene algo más de información; así, se

ha descrito que $G\alpha_{12}$ es capaz de activar a la tirosina quinasa de la familia Tek, BTK (del inglés Bruton's tyrosin kinases, Jiang et al., 1998), que ha sido implicada en la activación de JNK vía Shc/Grb2/Ras (Deng y cols., 1998). En el caso de Rho, un posible GEF es la proteína LARG (del inglés leukemia-associated RhoGEF). La activación de esta proteína por $G\alpha_{12}$ es dependiente de la quinasa Src, aunque todavía no se conocen los mecanismos de activación de Src vía $G\alpha_{12}$ (Suzuki y cols., 2003). Por su parte, $G\alpha_{13}$ es capaz de interactuar directamente con p115RhoGEF y estimular su actividad hacia RhoA (Hart y cols., 1998) (Figura I11).

Los mecanismos de activación de la familia p38 por receptores acoplados a $G\alpha_s$ todavía no se conocen con detalle. En cardiomiocitos, el receptor adrenérgico, β_2 -AR, activa a p38 a través del clásico eje $G\alpha_s$ /AMPC/PKA (Zheng y cols., 2000). Ya que Rap-1 se activa en respuesta a AMPC y se ha descrito su capacidad

de activar a p38 en distintos tejidos, seguramente sea la proteína que conecte a los receptores acoplados a $G\alpha_s$ con la activación de p38 (Ahn y cols, 2006).

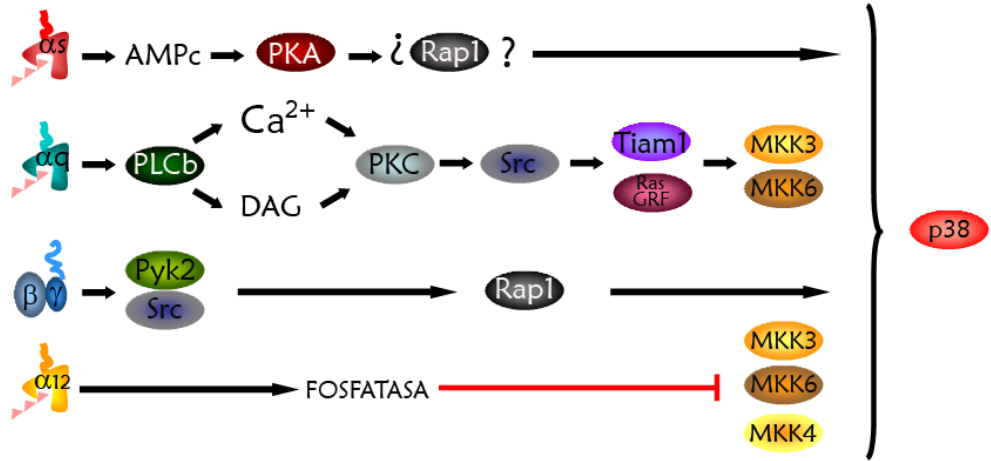


Figura I12. Mecanismos de activación de p38 mediados por GPCR.

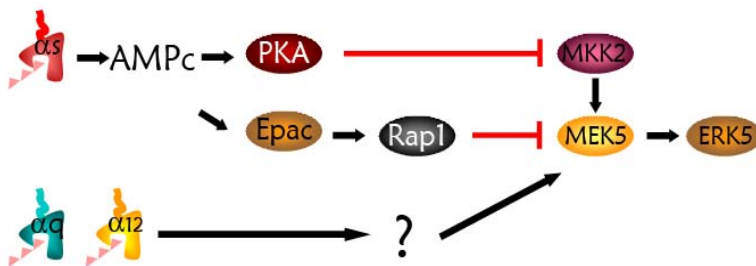
También $G\alpha_q$, a través de la activación de Rac, Rho o Cdc42, se ha visto implicada en la activación de las quinasas MKK3 o MKK6, que fosforilan a la familia p38 (Yamauchi y cols., 2001). En este caso, los mecanismos son parecidos a los que operan en la activación de JNK, donde la señal del Ca^{2+} y la activación de quinasas Src modulan distintas proteínas GEFs que a su vez, activarán a las GTPasas monoméricas correspondientes. De momento, se han identificado dos proteínas GEFs para Rac que son activadas por Src, conocidas como Tiam-1 y Ras-GRF (Buchsbbaum y cols., 2002). Asimismo, subunidades $G\beta\gamma$ asociadas a $G\alpha_q$ pueden activar a p38 de manera independiente de PLC β , probablemente a través de la activación de Rap-1 vía Pyk2/Src/C3G (Goldsmith y Dhanasekaran, 2007).



Por otro lado, las subunidades $G\alpha_{12}$, a través de la inhibición de las quinasas MKK3, MKK4 y MKK6, atenúan la activación de p38 (Dermott y cols., 2004), seguramente a través de fosfatasa que son activadas por $G\alpha_{12}$ (Figura 112).

En el caso de ERK5, se ha descrito una modulación por AMPc que no sólo depende del tipo celular, sino también de las condiciones de crecimiento en las que se encuentran las células (Pearson y Cobb, 2002). En células NIH3T3 o C2C12 que no han llegado a confluencia y por lo tanto están proliferando, la estimulación de receptores acoplados a $G\alpha_s$ induce una activación de ERK5. Por el contrario, en condiciones de ausencia de suero la generación de AMPc impide que ERK5 sea activado por factores de crecimiento como EGF. El mecanismo por el cual altos niveles de AMPc inhiben la activación de ERK5 en células NIH3T3 y HeLa, está basado en la fosforilación de MEKK2 por PKA. Dicha fosforilación impide que MEKK2 conecte con sus activadores, por lo que la vía de ERK5 está bloqueada (Pearson y cols., 2006).

Otro ejemplo en el que el AMPc regula la actividad de ERK5 lo encontramos en cardiomiocitos neonatales de rata. En estas células se expresa la proteína de anclaje para PKA, mAKAP (del inglés A kinase-anchoring protein). mAKAP no sólo interacciona con PKA, sino que forma un complejo donde se puede encontrar una fosfodiesterasa de AMPc (PDE4D3), la fosfatasa PP2A, canales de Rianodina, Epac, calcineurina, ERK5 y su activador MEK5 (Dodge-Kafka y Kapiloff, 2006). Un incremento en los niveles de AMPc inhibe la activación de ERK5 en respuesta a factores de crecimiento o estímulos hipertróficos, como consecuencia de la activación de Epac (proteína GEF sensible a AMPc), que activa a Rap-1, el cual



inhibe a MEK5. En este caso, también ERK5 modula a su vez los niveles de AMPc, al ser capaz de fosforilar a PDE4D3 incrementando, de esta forma, su actividad. Por tanto, mAKAP sirve para integrar las señales que modulan los niveles de AMPc junto con las rutas de activación de MAPK y la señal del Ca^{2+} .

Figura 113. Modulación de ERK5 mediada por GPCRs.

En células Cos-7, la estimulación de receptores acoplados a $G\alpha_s$ o $G\alpha_i$ no tiene efecto sobre ERK5, mientras que receptores acoplados a $G\alpha_q$ o $G\alpha_{12}$, como el receptor m1(Ach)R y el receptor de trombina, inducen una activación de esta quinasa (Fukuhara y cols., 2000). En este caso, no se ha encontrado ninguna GTPasa monomérica que medie en esta ruta de activación, pero mediante experimentos de sobreexpresión de mutantes activos constitutivamente o, por el contrario, sin actividad, se ha podido descartar la implicación de Ras, Rho, Rac y Cdc42. Todo apunta a que los



mecanismos de activación de ERK5 por estos receptores son distintos de aquellos descritos para la activación de ERK1/2 o JNK (Figura I13).

3. Familia de las proteínas quinasas C, PKC.

Proteína quinasa C, o PKC, es una familia de serina/treonina quinasas que se expresan de manera ubicua y juegan un papel clave en numerosas funciones celulares. En ausencia de estimulación, las PKCs se encuentran en el citosol inactivas, y es en la membrana donde tienen lugar los mecanismos necesarios para su activación. Existen, al menos, doce isoformas de PKC que se clasifican dentro de tres subfamilias de acuerdo con la estructura de su dominio regulador N-terminal. La subfamilia de PKC clásicas está compuesta por PKC α , PKC β I, PKC β II y PKC γ que se caracterizan porque su actividad se regula por Ca²⁺ y DAG. En cambio, la subfamilia de PKC nuevas, compuesta por PKC δ , PKC ϵ , PKC θ y PKC η , sólo es regulada por DAG. Por su parte, PKC ζ y PKC ι/λ forman la subfamilia de PKC atípicas, cuya activación no depende ni de DAG ni de Ca²⁺ (Mackay y Twelves 2007).

3.1. Estructura de las isoformas de PKC.

Estas quinasas presentan un alto porcentaje de homología en su dominio catalítico C-terminal, donde se encuentran los motivos C3 y C4, necesarios para la unión al ATP y al sustrato, así como para la actividad catalítica. Es en el dominio regulador N-terminal donde se concentran las diferencias que caracterizan a cada subfamilia (Figura I14).

Las PKC clásicas presentan dos

motivos C1 y C2, que ayudan a su translocación a la membrana citoplasmática. En este sentido, C1 es capaz de unirse a DAG a través de dos dedos de Zn ricos en cisteína, llamados C1a y C1b, mientras que C2 interacciona con fosfolípidos aniónicos de forma dependiente de Ca²⁺. Las PKC nuevas también tienen un motivo C1 capaz de interactuar con DAG, pero su motivo C2, llamado C2-like, carece de los residuos necesarios para unir Ca²⁺, por lo que su regulación es insensible a éste. Curiosamente, las PKC atípicas no presentan motivo C2 y sólo hay un dedo de Zn en C1, por lo que estas quinasas no responden ni a DAG ni a Ca²⁺. Una característica común es que en todas las isoformas se encuentran

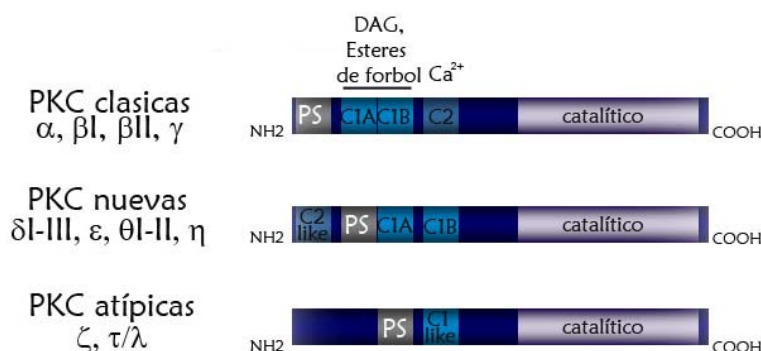


Figura I14. Familia PKC. En la figura se representa la organización estructural en dominios de las tres subfamilias de PKC identificadas en mamíferos. PS, secuencia pseudosustrato, C1, dominio de unión a DAG y esteres de forbol, C2, dominio de unión a Ca²⁺.



secuencias pseudosustrato con una función autoinhibitoria que representa un papel importante en la regulación de su activación (Yamaguchi y cols., 2006).

3.2. Regulación y función de PKC ζ .

PKC ζ junto con PKC ι/λ , forman la subfamilia de las PKC atípicas (Akimoto y cols., 1994; Nishizuka y cols., 1992). Las PKC atípicas están involucradas en importantes funciones celulares. Se ha demostrado la implicación de estas quinasas en el control de la proliferación celular y la supervivencia (Berra y cols., 1995; Kovac y cols., 2007), en el control de la apoptosis (Moscat y cols., 2006), en la diferenciación neuronal (Wooten, 1999) y en la polaridad celular (Wu y cols. 2007). Los mecanismos por los cuales las PKC atípicas controlan todas estas funciones celulares están relacionados con la capacidad que tienen para regular las rutas de señalización que activan a los factores de transcripción API y el factor nuclear κ B (NF- κ B) (Hirai y Chida, 2003; Moscat y cols., 2006).

En ausencia de cofactores, el dominio regulador inhibe la actividad quinasa del dominio catalítico mediante la unión de la secuencia pseudosustrato. Esta región posee la secuencia consenso teórica de la fosforilación de los sustratos de PKC, pero con una alanina en lugar de la serina/treonina fosforilable. Para la completa activación de estas quinasas, no sólo tiene que salir el pseudosustrato del centro activo, sino que también tienen que ser fosforiladas en su dominio catalítico. Distintos componentes lipídicos provocan la salida del pseudosustrato, por lo que PKC ζ puede ser activada por fosfatidilinositol (PI), ácido fosfatídico, ácido araquidónico, ceramidas y fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP $_3$). Existen indicios de que PIP $_3$ interacciona directamente con PKC ζ provocando la salida del pseudosustrato, pero todavía no se han identificado las regiones en las que tiene lugar esta unión. Por otra parte, PIP $_3$ también activa a PKC ζ de manera indirecta, al estimular la actividad de PDK1, quinasa que fosforila a PKC ζ en la treonina 410. Presumiblemente esta fosforilación provoca cambios en el dominio catalítico que exponen una segunda treonina fosforilable, la 560, siendo ambas fosforilaciones necesarias para la activación de PKC ζ . Se ha demostrado que *in vitro*, es la misma PKC ζ la que fosforila su treonina 560, aunque en células todavía no se ha podido comprobar si lo que ocurre son procesos de autofosforilación o si interviene otra quinasa (Hirai y Chida, 2003).

Existen distintos adaptadores específicos que actúan conectando a las PKC atípicas con las diferentes cascadas de señalización en las que participan (Moscat y Díaz-Meco, 2000). Una de las proteínas que interacciona con las PKC atípicas es p62. Se ha descrito que tanto p62 como las PKC atípicas presentan dominios de interacción denominados PB1. La función de p62 es la de actuar como anclaje de las PKC atípicas, conectándolas con los complejos de señalización activados por citoquinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral α (TNF α) y la interleuquina 1 (IL-1). Interesantemente, otra proteína que presenta un dominio PB1 con el que interacciona con las PKC



atípicas es MEK5. En células HeLa, el estímulo con EGF induce un incremento en la interacción entre PKC ζ o PKC ι/λ con MEK5, que es importante para la activación de ERK5 en respuesta a este factor de crecimiento (Diaz-Meco y Moscat, 2001). Por otra parte, existen indicios de que, en neuronas, la internalización del complejo p62/PKC ζ /MEK5 en respuesta a neurotrofinas es necesaria para que tenga lugar la activación de ERK5 (Geetha y Wooten, 2003). También, la asociación entre PKC atípicas y Par-6 conecta a estas quinasas con las rutas de señalización que regulan la polaridad celular (Wu y cols. 2007), y de nuevo en este caso la interacción es a través de dominios PB1.

La proteína Par-4 interacciona también con las PKC atípicas a través del dedo de Zn presente en su dominio N-terminal (Moscat y Diaz-Meco, 2000). En este caso, Par-4 no actúa como proteína adaptadora sino que regula negativamente la actividad de estas quinasas. Se ha demostrado que la sobreexpresión de Par-4 activa la apoptosis debido a su capacidad de bloquear la actividad de las PKC atípicas e inhibir así el complejo IKK y la subsiguiente activación de NF- κ B por TNF α (Moscat y cols. 2006).

4. Hipertrofia cardiaca y rutas de señalización implicadas.

Las enfermedades cardiovasculares abarcan un grupo muy heterogéneo de patologías que incluyen hipertensión, miopatías isquémicas como el infarto de miocardio, enfermedades valvulares o endocrinas, alteraciones en proteínas contráctiles y canales iónicos, miopatías virales, etc. Común a todas ellas es la reducción progresiva de la funcionalidad del corazón, que puede finalmente desencadenar en una insuficiencia cardiaca.

En la insuficiencia cardiaca el daño inicial sobre el corazón activa al Sistema Nervioso Simpático y al Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona. Estos mecanismos endógenos que aumentan la contractilidad, inicialmente beneficiosos, contribuyen a empeorar la hemodinámica cardiaca al establecerse de modo crónico en un contexto de disfunción cardiaca permanente. Esto, a su vez, origina una mayor actividad neurohumoral y las alteraciones neurohumorales y hemodinámicas se refuerzan entre sí, formando un círculo vicioso. La mayor demanda de bombeo del corazón en estas situaciones de disfunción desencadena la hipertrofia del miocardio. Este crecimiento hipertrófico es una respuesta inicialmente adaptativa del corazón, caracterizada por un aumento del tamaño celular de los miocitos, incremento de organización sarcomérica y re-expresión de genes fetales (factor natriurético del atrio, α -actina y la cadena pesada de la β -miosina). A pesar de que puede ser inicialmente beneficioso, el mantenimiento crónico de este fenotipo lleva a descompensación y contribuye al desarrollo de cardiomiopatía dilatada e insuficiencia cardiaca (Chien, 1999; Kim e Iwao, 2000). Los receptores y sistemas de transducción implicados en estos procesos constituyen la diana de múltiples fármacos utilizados en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca congestiva, la angina de pecho, o la



hipertensión. En este sentido, las alteraciones en la señalización de receptores β y α -adrenérgicos y otros receptores como angiotensina II o endotelina I parecen ser fundamentales en el origen y desarrollo de diferentes cardiopatías (Swynghedauw, 1999; Keys y Koch, 2004).

Cabe destacar que no todas las formas de hipertrofia son perjudiciales; por ejemplo, el ejercicio continuado induce un crecimiento adaptativo en el miocardio, necesario para satisfacer la demanda de oxígeno del organismo. También durante el crecimiento, las células del corazón sufren procesos hipertroáficos hasta que éste alcanza su tamaño adulto. Estos tipos de hipertrofia se caracterizan por un crecimiento uniforme de las paredes del ventrículo y del septo, unido a un incremento en el tamaño de las cámaras. En este caso predomina la hipertrofia excéntrica, en la que los cardiomiocitos aumentan su longitud al añadir nuevos sarcómeros en serie. En cambio, en la hipertrofia patológica, o cardiomiopatía hipertrófica (CMH), debido a daños en el miocardio o situaciones de estrés, se activa al Sistema Nervioso Simpático y al Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona, provocando un crecimiento descompensado o remodelado ventricular, en el que se observan alteraciones en la matriz extracelular,

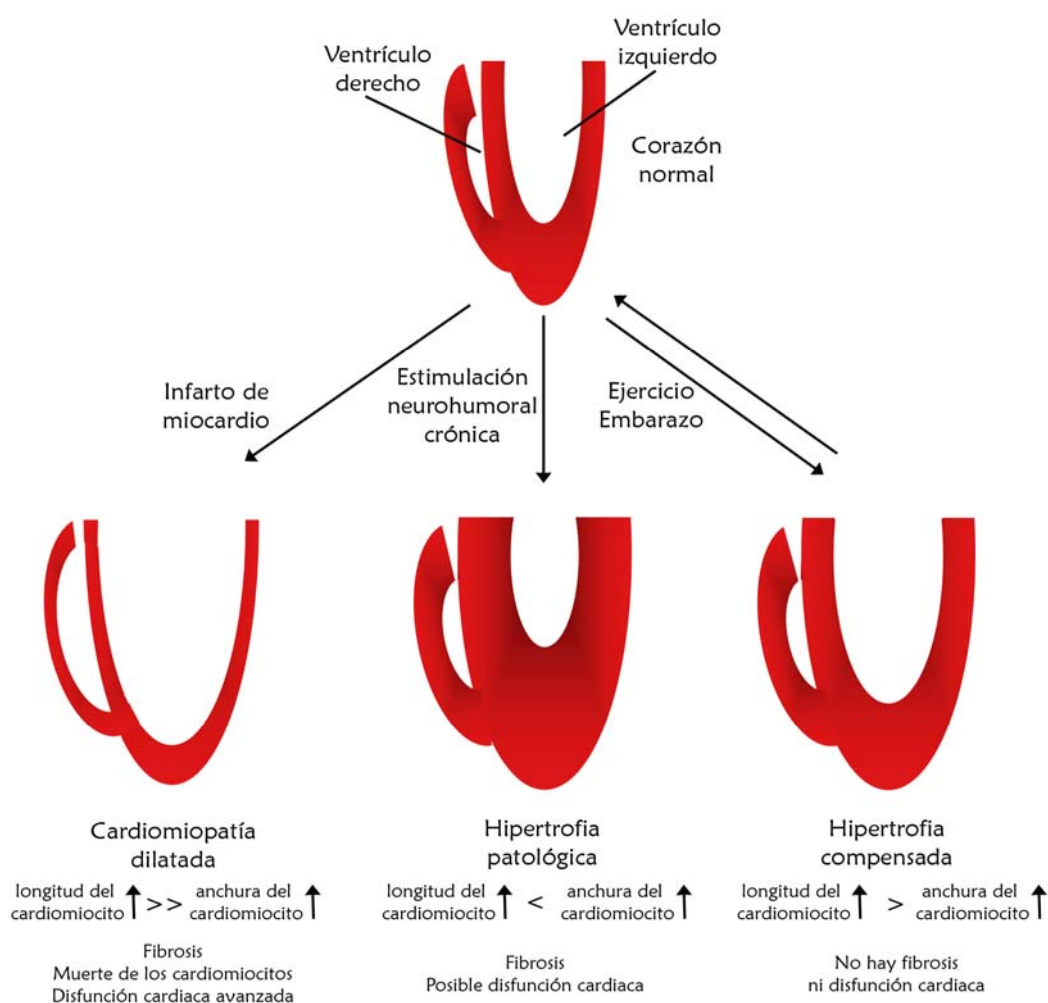


Figura 115. Patrones de remodelado ventricular.



que afectan a la función cardíaca, provocando un mayor índice de muerte celular a través de procesos apoptóticos y necróticos. En este caso predomina la hipertrofia concéntrica, en la que tanto las paredes del ventrículo como del septo se engrosan y se reduce el tamaño de las cámaras, debido a un aumento en el área de los cardiomiocitos causado por el ensamblaje en paralelo de los sarcómeros. Por último, en la cardiomiopatía dilatada tiene lugar un crecimiento excéntrico que provoca un adelgazamiento en las paredes del ventrículo y del septo, acompañado de procesos apoptóticos y de fibrosis, produciéndose un aumento en las cámaras del miocardio, lo que conlleva un mayor riesgo de sufrir insuficiencia cardíaca (Figura I15, Heineke y Molkentin, 2006).

4.1. Papel de $G\alpha_q$ en hipertrofia cardíaca.

Diversos receptores acoplados a subunidades G_q (receptor adrenérgico α_1 -AR, receptor de endotelina I ET-R, receptor de angiotensina II AT_1 -R) son capaces de promover un fenotipo hipertrófico no compensado tanto en células como *in vivo* (McKinsey y Olson, 1999). Consistentemente, ratones transgénicos que sobreexpresan $G\alpha_q$ o formas constitutivamente activas de esta proteína desarrollan cardiomiopatía dilatada y fallo cardíaco (D'Angelo y cols., 1997; Adams y cols., 1998; Jiang y cols., 2006).

$G\alpha_q$, a través del acoplamiento con $PLC\beta$, induce la generación de DAG e IP_3 , con la consiguiente movilización de Ca^{2+} y la activación de PKCs. A su vez, el Ca^{2+} provoca la activación de la fosfatasa calcineurina que defosforila al factor de transcripción NFAT (del inglés, nuclear factor of activated T cells), permitiendo que éste entre en el núcleo y pueda regular genes implicados en la respuesta hipertrófica. Otro proceso importante para la inducción de hipertrofia es la inactivación de la histona deacetilasa HDAC, llevada a cabo por la quinasa dependiente de calmodulina (CaMK), por PDK o también por PKCs (Vega y cols., 2004; Heineke y Molkentin, 2006).

Tanto en hipertrofia compensada como descompensada tiene lugar la activación de Akt, implicada en incrementar la síntesis de proteínas al activar a mTOR (del inglés, mammalian Target Of Rapamycin) e inhibir a GSK3 (del inglés, Glycogen Synthase Kinase). En el caso de la hipertrofia compensada, la activación de Akt es una respuesta ante distintas hormonas de crecimiento (Insulina o IGF-1) que conduce a la activación de la subunidad $p110\alpha$ de la quinasa PI3K. En cambio, en hipertrofia descompensada, es la señal de $G\alpha_q$ la que induce la activación de PI3K, aunque en este caso es la isoforma $p110\gamma$ la que interviene en la activación de Akt. Seguramente diferencias en la intensidad y duración de la señal iniciada por $p110\alpha$ o $p110\gamma$ determinen el tipo de respuesta hipertrófica. En cualquier caso, $G\alpha_q$ es también capaz de activar la síntesis de proteínas de manera independiente de Akt, ya que se ha demostrado que ratones deficientes en esta quinasa pueden desarrollar hipertrofia cardíaca (Dorn y Force, 2005) (Figura I16).

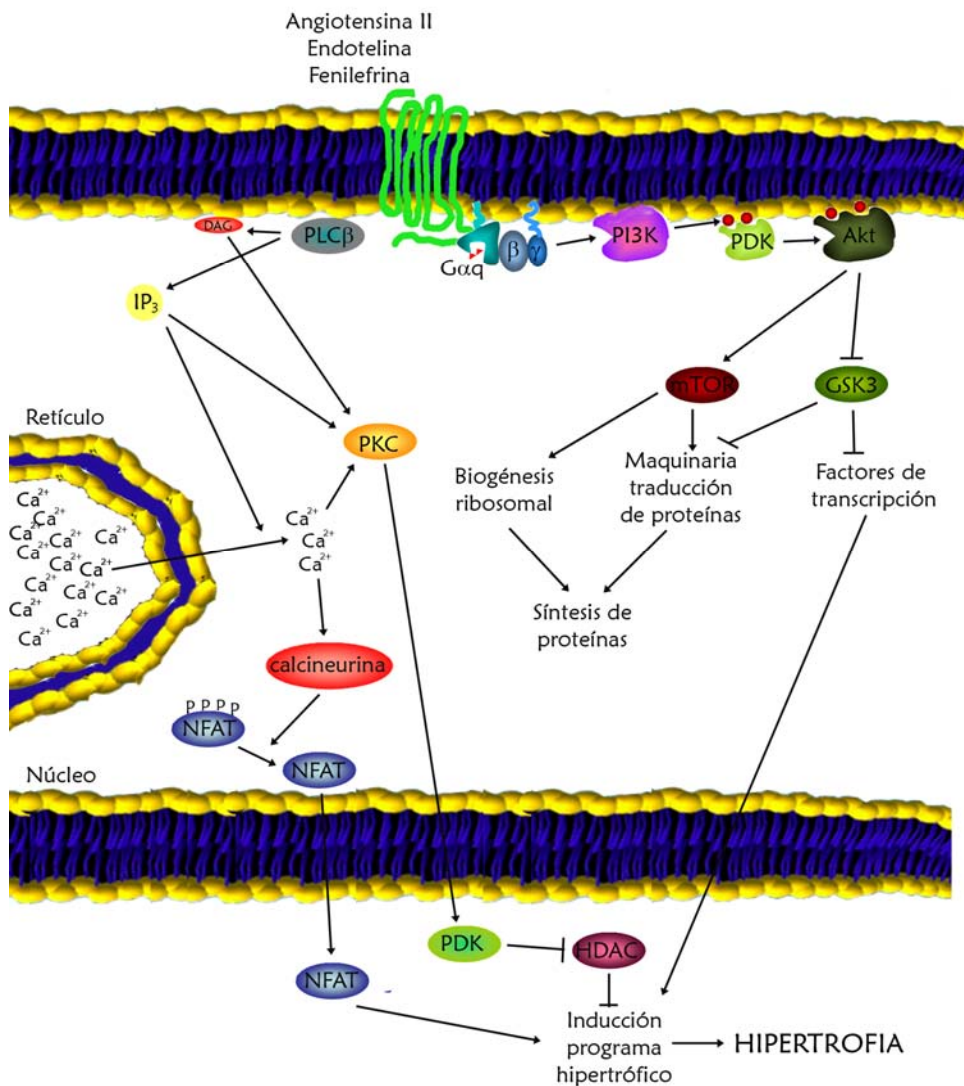


Figura 116. Rutas de señalización iniciadas por receptores acoplados a Gq implicadas en hipertrofia cardíaca.

Múltiples evidencias muestran que, angiotensina II, uno de los efectores centrales del sistema renina-angiotensina, desempeña un papel central en el control de la hipertensión debido a su efecto vasoconstrictor. Pero, independientemente de esta función, también ha sido implicada en los procesos fisiopatológicos que conducen al desarrollo de hipertrofia cardíaca (Kim e Iwao, 2000;

Varagic y Frohlich, 2002). Las células hepáticas secretan la forma inactiva del péptido, llamada angiotensinógeno, que debe ser procesado por el sistema de la renina para dar lugar a angiotensina I, que a su vez es procesada por la enzima convertidora de angiotensina (ECA) a angiotensina II, que es el péptido activo, capaz de unirse a sus receptores AT₁ y AT₂. El receptor AT₁, el cual está acoplado a subunidades Gq en cardiomiocitos, ha sido ampliamente implicado en el desarrollo de hipertrofia cardíaca, mientras que el receptor AT₂, acoplado a subunidades Gi, parece que juega un papel importante en el desarrollo, ya que se expresa de manera ubicua en tejidos fetales y sus niveles se reducen considerablemente tras el nacimiento (Touyz y Berry, 2002). La información de la función de AT₂ en el adulto y su posible papel en hipertrofia cardíaca es escasa.



A través de la activación del receptor AT_1 , angiotensina II es capaz de activar a fosfolipasa $C\beta$ ($PLC\beta$) e iniciar procesos mediados por el Ca^{2+} y las PKCs, como la contracción de las células vasculares y la regulación del pH intracelular, entre otros. Con la activación de fosfolipasa D (PLD) y la generación de DAG y ácido fosfatídico, angiotensina II ha sido implicada en procesos como la hipertrofia cardiaca, la contractilidad y la proliferación vascular. Para la regulación de la presión sanguínea, angiotensina II induce la generación de ácido araquidónico activando a fosfolipasa A_2 (PLA_2). Además, ha sido ampliamente documentada la capacidad del receptor AT_1 de activar MAPKs mediante la iniciación de rutas de señalización, donde podemos encontrar implicados a fosfolipasa $C\gamma$ ($PLC\gamma$), quinasas de la familia Src, JAK, FAK, Pyk2 y otras quinasas sensibles a Ca^{2+} , PI3K y p130Cas. Algunas de estas proteínas, como Src y Pyk2, intervienen en los mecanismos de transactivación de receptores con actividad tirosina quinasa (EGFR, PDGFR e IGFR) (Kim e Iwao, 2000; Shah y cols. 2004a; Shah y cols. 2004b)

Se ha comprobado que la administración crónica de angiotensina II en ratas genera hipertrofia cardiaca, independientemente de su capacidad de regular la presión sanguínea (Dostal y Baker, 1992). En este tipo de situaciones, en las que la estimulación se mantiene en el tiempo, se produce la muerte de cardiomiocitos, mientras que proliferan los fibroblastos, incrementan los niveles de ARNm de α -actina, β -MHC (del inglés, β -Miosin Heavy Chain), ANF (del inglés, Atrial Natriuretic Factor), fibronectina, colágeno tipo I y III y TGF- β 1 (del inglés, Transforming Growth Factor β). Distintos estudios plantean que la activación de MAPKs puede ser responsable de la reprogramación genética y la hipertrofia sufrida en cardiomiocitos, así como de la proliferación de fibroblastos (Force y cols. 1996; Sugden y Clerk, 1998; Wang, 1998). Además de activar distintas rutas de señalización celular, angiotensina II estimula la liberación de norepinefrina por el Sistema Nervioso Simpático, lo que contribuye al desarrollo de cardiomiopatía hipertrófica. Interesantemente, este fenotipo revierte con la administración de antagonistas del receptor AT_1 (Kim e Iwao, 2000). Además, se ha demostrado que distintos modelos animales de cardiomiopatía, como las ratas espontáneamente hipertensas (SHR), modelos de sobrecarga de presión aguda, modelos de infarto de miocardio, modelos de sobrecarga de volumen o modelos de diabetes, revierten su fenotipo hipertrófico al ser tratados con antagonistas del receptor AT_1 o inhibidores de ECA.

4.2. Papel de GRKs en el sistema cardiovascular.

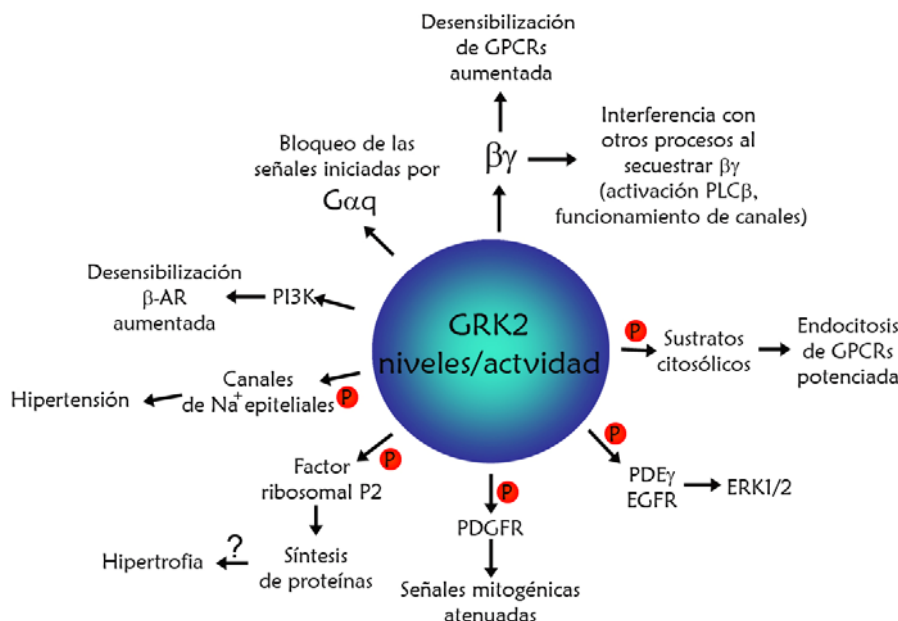
Dado que las GRKs están implicadas en la regulación de GPCRs clave en el sistema cardiovascular, no sorprende la importancia de estas quinasas en la función y disfunción cardiovascular. Las isoformas de GRKs expresadas mayoritariamente en corazón son GRK2, GRK3 y GRK5 (Dzimiri y cols. 2004). Se ha observado que ratones deficientes en GRK2 mueren entre los días 12 y 15 del desarrollo embrionario presentando hipoplasia severa en el miocardio, mientras que los ratones



deficientes en GRK3 o GRK5 son viables (Kohout y Lefkowitz, 2003), sugiriendo que de las tres isoformas expresadas en corazón, sólo GRK2 es crítica en su desarrollo.

Los niveles de expresión y actividad de estas quinasas se encuentran alterados en distintas patologías cardíacas. En concreto, se han observado incrementos en los niveles de GRK2, que preceden al desarrollo de fallo cardíaco, en distintos modelos animales (Ping y cols., 1997; Anderson y cols., 1999). También, los niveles de proteína y actividad GRK2 miocárdica se hallan considerablemente elevados en pacientes con fallo cardíaco congestivo, cardiomiopatía dilatada idiopática, hipertrofia, hipertensión e isquemia miocárdica (Ungerer y cols. 1994; Choi y cols. 1997; Gros y cols. 1997; Gros y cols. 2000; Penn y cols., 2000). Una característica común de estas patologías es que los sistemas de señalización de catecolaminas y renina/angiotensina se encuentran alterados y seguramente las vías iniciadas por estos sistemas sean las encargadas de modular la expresión y actividad de GRK2, aunque todavía no se conocen bien los mecanismos que regulan la transcripción de GRK2 en células cardíacas (Penela y cols., 2006). Nuestro grupo ha mostrado como distintos agentes que promueven vasoconstricción o hipertrofia (ésteres de forbol, transfección de $G\alpha_q$ o estimulación de receptores α_1 -adrenérgicos) inducen un marcado incremento en la actividad del promotor de GRK2, mientras que, citoquinas proinflamatorias como interleuquina-1 β , TNF- α o interferón- γ , provocan el efecto opuesto (Ramos-Ruiz y cols. 2000).

En principio, el aumento en los niveles y actividad de GRK2 podrían considerarse como un efecto compensatorio, para desensibilizar a los receptores adrenérgicos (Lefkowitz y cols., 1998) y a los



de angiotensina II (Violin y cols., 2006), aunque el mantenimiento crónico de esta desensibilización compromete a la función contráctil del corazón llevándolo a un mayor deterioro. En este sentido, la inhibición de GRK2 en distintos modelos animales, mediante la sobreexpresión de su dominio C-terminal,

Figura 117. Efectores de GRK2 potencialmente implicados en hipertrofia cardíaca.



ayuda a disminuir la disfunción cardíaca, aumentando la su-pervivencia (Penela y cols. 2006). El dominio C-terminal de GRK2 interacciona con las subunidades $\beta\gamma$ libres impidiendo que éstas recluten a la GRK2 endógena a la membrana plasmática, por lo que se inhibe la desensibilización de los receptores β -adrenérgicos, principales dianas de GRK2 en el corazón. Por otro lado, también la señalización de los receptores de angiotensina II está siendo inhibida con el secuestro de subunidades $\beta\gamma$, ya que la actividad de PLC β , principal efector de dichos receptores, es dependiente de subunidades $\beta\gamma$. Otra vía que puede ser inhibida por el dominio C-terminal de GRK2, contribuyendo a una mejoría en la función cardíaca, es la activación de PI3K, que ha sido claramente implicada en el desarrollo y mantenimiento de la disfunción cardíaca (Selvetella y cols. 2004). Pero, por otra parte, la ablación de GRK2 específicamente en cardiomiocitos, que ocasiona una ausencia de desensibilización de receptores adrenérgicos, acelera el desarrollo de cardiomiopatías en respuesta a estimulación crónica con catecolaminas (Matkovich y cols. 2006), sugiriendo que el incremento en los niveles de esta quinasa, en un principio, podría tener un efecto beneficioso y compensatorio, aunque posteriormente, cuando la patología se encuentra más avanzada, su inhibición ayuda a mejorar la función cardíaca.

Aparte del papel que GRK2 juega en la desensibilización de GPCRs, esta quinasa modula otros sustratos como fosducinas, sinucleinas, tubulina, el factor ribosomal P2, ezrina, el receptor de PDGF y canales de Na⁺. Aunque todavía no se conoce qué papel pueden estar jugando estos efectores en el sistema cardíaco, es probable que las alteraciones en los niveles y actividad de GRK2 repercutan en estas proteínas, contribuyendo al desarrollo de patologías cardíacas (Figura I17).

Debido a los complejos mecanismos de regulación que actúan sobre GRK2 y a la multitud de efectores que ésta modula todavía estamos lejos de comprender el papel que juega GRK2 en la homeostasis del sistema cardiovascular.

4.3. Papel de MAPKs en el sistema cardiovascular.

Los cardiomiocitos son células ya diferenciadas que han perdido la capacidad de proliferar, pero responden a distintos estímulos extracelulares que los llevan a sufrir un crecimiento adaptativo o hipertrofia. En muchos casos, la transmisión de estas señales hipertróficas, y otras relacionadas con la supervivencia o con la apoptosis de los cardiomiocitos, se lleva a cabo mediante la activación de las MAPKs (Ravingerová y cols, 2003).

La importancia de ERK1/2 en corazón quedó patente en experimentos con ratones que sobreexpresan estas quinasas en corazón de manera específica. Estos ratones desarrollan hipertrofia concéntrica que corresponde con un estado compensado que no culminará en fallo cardíaco (Bueno y cols., 2000).



Por otra parte, la sobreexpresión de los activadores de p38, MKK3 y MKK6, no tiene como consecuencia la hipertrofia cardíaca, aunque estos ratones sufren fibrosis y adelgazamiento de las paredes del miocardio, lo que les lleva a morir por infarto (Liao y cols., 2001). Con respecto a las rutas de JNK, ratones que expresan la forma activada de MKK7 en corazón tienen un fenotipo similar al anterior, es decir, mueren por cardiomiopatía. Existen indicios de que este fenotipo es consecuencia de la inhibición de NFAT, al ser fosforilado por p38 o JNK, por lo que el crecimiento de las células cardíacas se regula negativamente (Molkentin, 2004). Otra posibilidad es que p38 y JNK alteren la respuesta hipertrófica por su capacidad de inducir apoptosis y necrosis de los cardiomiocitos.

La generación de ratones deficientes en ERK5 o MEK5 ha puesto en evidencia el importante papel que juega esta ruta en el desarrollo del corazón. Estos ratones mueren el día 10 del desarrollo embrionario debido a defectos cardiovasculares. La vasculogénesis tiene lugar, pero las células endoteliales se presentan redondeadas y mal organizadas, por lo que el desarrollo del corazón no llega a buen término (Hayashi y Lee, 2004). Este fenotipo parece ser consecuencia del papel que juega ERK5 en la supervivencia del endotelio, ya que ratones deficientes en ERK5 sólo en endotelio, muestran el mismo fenotipo, mientras que ratones deficientes en ERK5 sólo en cardiomiocitos son perfectamente viables y no desarrollan problemas cardíacos.

Por otra parte, se ha demostrado que en el corazón adulto, ERK5 interviene en la respuesta hipertrófica. Este hecho quedó patente al comprobarse que la sobreexpresión de una forma activa constitutivamente de MEK5, en cultivos primarios de cardiomiocitos, induce una elongación de estas células al producirse un ensamblaje en serie de los sarcómeros (Nicol y cols. 2001), fenotipo similar al que se induce en estas células al estimular con factores hipertróficos como LIF (del inglés Leukemia Inhibitor Factor) o cardiotrofina-1 (CT-1). Los resultados de experimentos en cultivos primarios de cardiomiocitos, que expresan un dominante negativo de MEK5, indican que las rutas iniciadas por esta quinasa intervienen en el ensamblaje en serie de los sarcómeros, sin afectar al ensamblaje en paralelo, puesto que dicho dominante negativo bloquea la elongación inducida por LIF en los cardiomiocitos, pero no bloquea el incremento en el área (Nicol y cols. 2001). A su vez, un dominante negativo de ERK5 bloquea la elongación inducida por LIF (Nakaoka y cols., 2003). Tanto LIF como CT-1 son citoquinas pertenecientes a la familia de interleuquina-6 (IL-6), y ejercen su función a través de la activación del receptor gp130, el cual está ampliamente implicado en hipertrofia cardíaca. La activación continua del receptor gp130 en corazón, mediante sobreexpresión de IL-6, provoca hipertrofia del miocardio (Hirota y cols. 1995), mientras que ratones que carecen de este receptor exclusivamente en corazón, son incapaces de desarrollar hipertrofia en respuesta a una sobrecarga de presión (Hirota y cols. 1999). Se ha comprobado que tanto LIF como CT-1 activan a ERK5 induciendo hipertrofia excéntrica en cardiomiocitos, al promover el ensamblaje en serie de los sarcómeros e inhibir el ensamblaje en paralelo (Nicol y cols. 2001; Nakaoka y cols., 2003). Otras rutas de señalización



activadas por estas quimioquinas son la ruta MEK1/2-ERK1/2 (Kodama y cols. 2000) y la ruta JAK-STAT, activando específicamente a las isoformas JAK1, JAK2, STAT1 y STAT3 (Mehta y Griendling, 2007; Ruppert y Meyer, 2007). Sin embargo recientemente se ha mostrado, mediante el empleo de dominantes negativos específicos, cómo la ruta de MEK5-ERK5 es la máxima responsable del fenotipo hipertrófico observado en cardiomiocitos tratados con CT-1 (Takahashi y cols. 2005).

Además, es importante destacar que ratones transgénicos que sobreexpresan una forma activada de MEK5 en corazón mueren por fallo cardíaco a las 8 semanas de edad (Nicol y cols. 2001). En estos animales el área de los cardiomiocitos también se encuentra considerablemente reducida debido a un ensamblaje en serie de los sarcómeros con ausencia de ensamblaje en paralelo, de la misma forma que ocurría en los cultivos primarios de cardiomiocitos.

Otros experimentos *in vivo* muestran como ERK5 se encuentra activado en ventrículos izquierdos hipertróficos de ratas espontáneamente hipertensas (Kacimi y Gerdes, 2003). En estos animales también se encuentran incrementados los niveles de ciertos GPCRs, como el receptor de angiotensina y los receptores β -adrenérgicos. Consecuentemente con estos datos, dos dianas de ERK5 bien establecidas, MEF2A y MEF2C, también promueven hipertrofia cardíaca en ratones transgénicos (Xu y cols., 2006). Es posible que esta respuesta sea consecuencia de la capacidad de MEF2C para regular positivamente al promotor de genes dHAND, los cuales son requeridos durante la morfogénesis del corazón (Hayashi y Lee, 2004).

4.4. Papel de PKCs en el sistema cardiovascular.

El miocardio adulto de mamíferos expresa PKC α , PKC β 1, PKC β 2, PKC δ , PKC ϵ , PKC λ y PKC ζ . Los ratones deficientes en cada una de estas quinasas no muestran fenotipo cardíaco, posiblemente debido a un efecto compensatorio entre las distintas isoformas (Dorn y Force, 2005). Ha sido postulado que PKCs regulan la expresión de distintos genes cardíacos y están implicadas en hipertrofia (Jalili y cols., 1999a; Jalili y cols., 1999b; Dorn y Force, 2005). De momento, existe demasiada controversia entre los resultados obtenidos en modelos animales y los estudios realizados en pacientes como para conocer en detalle las funciones individuales de cada isoforma de PKC en el sistema cardiovascular.

En el caso de PKC α , destaca que es la única isoforma cuya sobreexpresión causa hipertrofia en cultivo primario de cardiomiocitos y su inhibición bloquea la hipertrofia inducida por agonista, aunque ni su sobreexpresión ni su ablación en ratones provoca cambios en la respuesta hipertrófica (Braz y cols. 2002). Por otro lado, la activación crónica de PKC α en ratones mejora la función contráctil e inhibe la respuesta hipertrófica mediada por Gq (Hahn y cols. 2003), lo que sugiere que esta quinasa juega un



papel importante en la función sistólica, posiblemente a través de la desensibilización de receptores β -adrenérgicos, entre otros procesos (Dorn y Force, 2005).

El papel de PKC β es más confuso. Tanto sus niveles como su actividad se ven incrementados en pacientes con fallo cardíaco (He y King, 2004) y su sobreexpresión en ratones adultos provoca hipertrofia y disfunción ventricular (Bowman y cols. 1997). Sin embargo, ratones deficientes en esta quinasa no tienen problemas para desarrollar hipertrofia en respuesta a constricción aórtica o a tratamientos con agonistas como fenilefrina (Roman y cols. 2001). Es posible que PKC β juegue un papel relevante en hipertrofia cardíaca, aunque debido a efectos compensatorios no se aprecie fenotipo en los ratones deficientes.

Otra de las isoformas mayoritariamente expresada en tejido cardíaco es PKC δ , cuyos niveles se ven incrementados tras procesos isquémicos y se ha demostrado que participa en la necrosis sufrida por los cardiomiocitos en esta situación (Inagaki y cols. 2001). Se dispone de poca información sobre su papel en hipertrofia, aunque es posible que juegue un papel relevante ya que la expresión transgénica de un péptido activador en corazón de ratones provoca hipertrofia adaptativa, cuando los niveles de expresión son bajos, y cardiomiopatía miofibrilar, cuando los niveles son altos (Hahn y cols. 2002).

PKC ϵ , desempeña un papel relevante en el desarrollo del sistema cardíaco, ya que la inhibición de esta isoforma provoca letalidad embrionaria presentando hipoplasia cardíaca (Mochly-Rosen y cols. 2000). Distintos estímulos hipertróficos incrementan tanto sus niveles como su actividad, pero su sobreexpresión no altera el funcionamiento del corazón. El incremento en los niveles de esta quinasa parece ser un efecto compensatorio más que inductor de hipertrofia, ya que en ratones que sobreexpresan Gq, la reducción de los niveles de PKC ϵ , mediante sobreexpresión de un péptido inhibidor, provoca fallo cardíaco, mientras que su activación disminuye la hipertrofia y mejora la función contráctil (Wu y cols. 2000).

No existe prácticamente información acerca del papel de PKC ζ en el sistema cardiovascular. Al igual que ocurre con el resto de isoformas de PKC, los ratones deficientes en PKC ζ no muestran un fenotipo cardíaco característico (Leitges y cols. 2001). Estudios realizados en corazón de cobayas muestran que el tratamiento con angiotensina II induce la translocación a membrana de PKC ζ , así como de las isoformas α , β_2 , γ , y ϵ (Takeishi y cols., 1999). Por otro lado, PKC ζ interviene en la inducción de apoptosis en cardiomiocitos durante situaciones de isquemia (Shizukuda y Buttrick, 2002).



OBJETIVOS

Este trabajo pretende contribuir a dilucidar los diferentes componentes de la vía de señalización de GPCRs a ERK5, su papel en el desarrollo de hipertrofia cardíaca y su posible regulación por otras proteínas relacionadas con el sistema de transducción de señales acoplado a GPCRs.

Para ello se han desarrollado los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizar la vía de activación de ERK5 en respuesta a agonistas de receptores acoplados a Gq.
2. Estudiar el papel de la posible interacción funcional $G\alpha_q/PCK\zeta$ en la activación de ERK5 por GPCRs.
3. Caracterizar los mecanismos moleculares implicados en la activación de la vía $PCK\zeta/MEK5\alpha/ERK5$ por GPCRs acoplados a Gq.
4. Analizar el posible papel regulador de GRK2 sobre la nueva vía de señalización identificada.
5. Analizar la respuesta que presentan ratones $PCK\zeta^{-/-}$ ante estímulos hipertróficos relacionados con la activación de $G\alpha_q$ a través del receptor de angiotensina II (AT_1R).

MATERIALES Y MÉTODOS





1. Productos.

Todos los reactivos y productos utilizados son de grado analítico. Cloruros sódico y cálcico, fosfatos sódicos y potásicos, carbonatos sódicos, hidróxido sódico, acetato sódico, sacarosa, Tris, formaldehído, glicina, glutamina, ácido acético glacial, ácido clorhídrico, metanol, etanol, butanol y glicerol fueron suministrados por Merck.

Fluoruro sódico, ácido deoxicólico, ácido etilén diamino tetraacético (EDTA), ácido etilenglicol-bis- β -amino etil eter N, N' tetraacético (EGTA), inhibidor de tripsina (STI), aprotinina, cloruro de carbamilcolina (carbacol), angiotensina II, endotelina, factor de crecimiento epitelial (EGF), esfingosina 1 fosfato (S1P), β -mercaptoetanol, ortovanadato sódico, dimetilsulfóxido (DMSO), DL-Dithiothreitol (DTT), rojo Ponceau, Nonidet P-40, Tritón x-100, Tween-20, azida sódica y Proteína-A Sefarosa fueron suministrados por Sigma.

Fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF), benzamidina, leupeptina y albúmina de suero bovino (BSA) se obtuvieron de Boehringer Mannheim.

N, N, N', N'-tetrametil-etilen-diamina (TEMED), Dodecil sulfato sódico (SDS), persulfato amónico, azul de bromofenol, azul de Coomassie, patrones de peso molecular conocido, papel de nitrocelulosa y reactivo de Bradford fueron proporcionados por Bio-Rad.

El reactivo de Folin-Ciocalteu se obtuvo de Panreac. El tricloroacético de Carlo-Erba, la proteína G sefarosa de Zymed, el péptido pseudosustrato miristoilado de PKC ζ (Myr-SIYRRGARRWRKL) de Biosource y la Lipofectamina/Plus de Invitrogen.

El inhibidor de tirosina quinasas específico para el receptor de EGF (AG1478: 4-(3-Chloroanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline), el inhibidor de tirosina quinasas de la familia Src (PP2: 4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(*t*-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine) y el inhibidor de fosfolipasas (U73122: 1-(6-((17 β -3-Methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)hexyl)-1*H*-pyrrole-2,5-dione) fueron obtenidos de Calbiochem.

Se han utilizado además una serie de productos más específicos cuya procedencia se reseña en el texto.



2. Cultivos celulares.

2.1. Líneas celulares establecidas.

Se han utilizado como líneas celulares establecidas: células Cos-7 (fibroblastos de mono) obtenidas de la ATCC (American Type Culture Collection) y células NIH-3T3-m1 (fibroblastos de ratón) expresando aproximadamente 20.000 receptores muscarínicos m1 por célula (cedidas amablemente por el Dr. Crespo, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Biología Molecular, Unidad de Biomedicina, CSIC-Universidad de Cantabria, Santander, España) (Crespo P y cols. 1994).

Las células Cos-7 y NIH3T3m1 se crecieron en monocapa sobre placas P-100 (Falcon) en medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con glutamina 2mM, una mezcla de antibióticos (50µg/ml gentamicina, 0,01% estreptomina y 0,063% penicilina G) y suero fetal de ternera 10% en el caso de Cos-7 y suero de ternera 10% en el caso de 3T3m1.

Todos estos tipos celulares se incuban a 37°C en una atmósfera humidificada con 7% de CO₂.

2.2. Cultivos primarios.

2.2.1. Fibroblastos embrionarios primarios de ratón (MEFs).

Se prepararon fibroblastos primarios de ratón (Mouse embryonic fibroblast o MEFs) a partir de embriones de día 14,5. El útero con los embriones se mantiene en tampón fosfato salino con antibiótico-antimicótico (de GIBCO-BRL). Cada embrión individual se transfiere a una placa p60 tras la eliminación de la cabeza y las vísceras. El embrión se disgrega con una hoja de bisturí y se mantiene en 1 ml de una solución tripsina-EDTA 2x (0,1% tripsina, 1.06 mM EDTA) durante 20 minutos a 37°C y 5% CO₂. Pasado este tiempo, se disgrega la suspensión celular pipeteando varias veces con pipeta Pasteur y se vuelve a incubar en las mismas condiciones. A continuación, las células se transfieren a un frasco de 75 cm² en 15 ml de DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y antibiótico-antimicótico. Al día siguiente se les cambia el medio y se mantienen en cultivo 1 ó 2 días hasta alcanzar la confluencia. En este punto, las células fueron congeladas y estas alícuotas se consideran pase 1. Los ensayos se llevaron a cabo en pase 2.

2.2.2. Cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de ratón.

Para la preparación de cultivo primario de cardiomiocitos se emplearon corazones de ratones neonatos de 2 a 3 días de edad (cepas C57BL/6 y SV129J). Los cultivos se prepararon con un mínimo



de cinco corazones. Tras la extracción, los corazones se mantuvieron en medio HANKs libre de calcio (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.8 mM MgSO₄, 0.33 mM Na₂HPO₄, 0.44 mM KH₂PO₄, 1.0 mM MgCl₂, 0.15 mM Tris-HCl, y 1.0 mM butirato sódico, pH 7.4) a 4°C y se procedió a trocearlos. Para la disgregación, el tejido se mantuvo en tripsina (0,05%) durante quince minutos a 37°C. Tras este tiempo se añadió medio HANKs más calcio para inhibir a la tripsina y se recogió todo el medio posible dejando los trozos de tejido macroscópicos, a los cuales se les añade nuevamente tripsina. Esta operación se repitió hasta un máximo de cinco veces. El medio recogido, después de cada tripsinización, fue sometido a centrifugación (1500 r.p.m) durante cinco minutos obteniendo la sedimentación de las células disgregadas. El sobrenadante fue desechado y las células sedimentadas se resuspendieron en dos ml de DMEM más 10% suero fetal de ternera y se mantuvieron a 37°C.

Una vez disgregado todo el tejido, las células fueron sembradas en una placa P-100. Tras un periodo de dos horas a 37°C, se recogió el medio de la placa que contiene los cardiomiocitos mientras que los fibroblastos permanecen pegados al plástico. Tras centrifugación los cardiomiocitos (300.000 células por pocillo) se sembraron en pocillos de M12 cubiertos con 0,02% gelatina.

2.3. Transfecciones.

Las transfecciones transitorias de las distintas líneas celulares se llevaron a cabo en placas P-100, P-60 o M12 a una confluencia de entre el 70% y el 80%, utilizando el método de Lipofectamina/Plus. Brevemente, se incuban las células a 37°C en medio OPTIMEM (Tabla 1: cantidades de Optimem, Lipofectamina, Plus y cDNA en función del número de células y las placas empleadas). En cada experimento se añadió la cantidad de vector vacío necesaria para mantener la cantidad total de ADN por placa constante. Tras 3 horas de incubación a 37°C en el medio de transfección, se añadió medio DMEM suplementado con suero al 20% para obtener así una concentración final de suero del 10%. Al día siguiente, se reemplaza el medio con DMEM más 10% suero y se deja que las células se recuperen al menos durante 24 horas antes de procesar el cultivo. La expresión transitoria de las distintas proteínas se confirmó mediante el análisis de los lisados totales mediante inmunodetección tras electroforesis ("western blot") con anticuerpos específicos.

Tabla 1	p100	p60	M12
Optimen(ml)	5	2,5	0,5
Lipofectamina (µl)	20	7	4
Plus (µl)	15	6	5
cDNA (µg)	10	5	1



2.4. Plásmidos y construcciones utilizadas.

Los plásmidos utilizados en los distintos experimentos realizados en este trabajo se describen en la tabla 2.

Tabla 2.

Vector de expresión en eucariotas	Procedencia
pCDNA3.1.	Invitrogen
pcDNA3.1 Gαq	Dra. Anna Aragay (Institut de Biologia Molecular de Barcelona-CSIC, España)
pcDNA3.1 Gαs	UMR cDNA Resource Center (USA).
pcDNA3.1 Gαi1	UMR cDNA Resource Center (USA)
pcDNA3.1 Gα12	UMR cDNA Resource Center (USA)
pcDNA3.1 GαqR183C	Dra. Anna Aragay (Institut de Biologia Molecular de Barcelona-CSIC, España)
pcDNA3.1 GαqQ209L-/R256A/T257A	Dr. Richard Lin (The Institute of Molecular Cardiology, At SUNY Stony Brook, USA)
m1(Ach)R	Dra. Anna Aragay (Institut de Biologia Molecular de Barcelona-CSIC, España)
pcDNA3.1 HA-PKCζ	Dr. Jorge Moscat (University of Cincinnati, USA)
pcDNA3.1 HA-PKCλ	Dr. Jorge Moscat (University of Cincinnati, USA)
pcDNA3.1 HA-ERK5	Dr. Jorge Moscat (University of Cincinnati, USA)
pcDNA3.1 GST	Invitrogen
pcDNA3.1 GST-MEK5α	Dr. Jorge Moscat (University of Cincinnati, USA)
pcDNA3.1 GST-MEK5αΔPB1	Dr. Jorge Moscat (University of Cincinnati, USA)
pcDNA3.1 GRK2	Dr. Jeffrey Benovic (The Kimmel Cancer Center, USA)
pcDNA3.1 GRK2 K220R	Dr. Jeffrey Benovic (The Kimmel Cancer Center, USA)
pcDNA3.1 GRK2 D110A	Dr. John J. G. Tesmer (University of Michigan, USA)
pcDNA3.1 GRK2 K220R/D110A	Dr. John J. G. Tesmer (University of Michigan, USA)
pcDNA3.1 GRK2 N-term	Dr. John J. G. Tesmer (University of Michigan, USA)
pcDNA3.1 GRK2 Y86,98D	Generado en el laboratorio
pcDNA-I CFP-Gαq silvestre	Dra. Catherine Berlot (Yale University School of Medicine, USA)
pcDNA-I CFP-GαqR183C	Dra. Catherine Berlot (Yale University School of Medicine, USA)
pCMV-YFP PLCβ	Dra. Catherine Berlot (Yale University School of Medicine, USA)
pcDNA-I YFP-PKCζ	Dr. Jorge Moscat (University of Cincinnati, USA)



pcDNA-I IQ1	Dra. Catherine Berlot (Yale University School of Medicine, USA)
pcDNA-I IQ23	Dra. Catherine Berlot (Yale University School of Medicine, USA)
pcDNA-I QI4	Dra. Catherine Berlot (Yale University School of Medicine, USA)
pcDNA-I QI8+IQ15	Dra. Catherine Berlot (Yale University School of Medicine, USA)

2.5. Tratamientos celulares.

Los distintos tratamientos de las células transfectadas transitoriamente se llevaron a cabo en todos los casos a las 48 horas de transfección. En el caso de células no transfectadas los tratamientos se realizaron con una confluencia celular del 80%. Tras la estimulación con los distintos agentes o con sus correspondientes solventes (controles) las placas fueron lavadas dos veces con tampón fosfato salino (PBS) frío para su posterior lisis. Los distintos compuestos empleados en este trabajo se detallan en la tabla 3.

Tabla 3.

Compuesto	Función	Concentración final	Tiempo(min)
Carbacol	Agonista de receptores muscarínicos acetilcolinérgicos (m1,m2 y m3)	10 μ M	Curso temporal
Angiotensina II	Agonista de los receptores AT ₁ y AT ₂	100nM	Curso temporal
Factor de crecimiento epitelial (EGF)	Agonista del receptor EGFR	100ng/ml	10
Esfingosina 1 fosfato (S1P)	Agonista de los receptores EDGs.	100nM	Curso temporal
Toxina pertúsica (PTX)	Inhibidor de la subfamilia de proteínas G α i.	100ng/ml	30
PP2	Inhibidor de la familia Src quinasas	10 μ M	30
AG1478	Inhibidor del receptor de EGF	250nM	30
Monodansilcadaverina (MDC)	Inhibidor de la internalización dependiente de clatrina	300 μ M	30
Sacarosa	Inhibidor de la internalización	750mM	60
Pseudosustrato miristoilado de PKC ζ	Inhibidor de la proteína quinasa C atípica ζ	10 μ M	30
U73122	Inhibidor de Fosfolipasas	10 μ M	30



3. Electroforesis.

3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.

Se utilizaron geles de poliacrilamida-SDS según el método descrito por Laemmli en 1970, cuyos porcentajes de acrilamida-bisacrilamida oscilaban entre 6 y 15% en función de la resolución requerida por el experimento. Como patrones de peso molecular se emplearon las proteínas miosina (200 KDa), β -galactosidasa (116,25 KDa), fosforilasa B (97,4 KDa), albúmina de suero bovino (66,2 KDa), ovoalbúmina (45 KDa), anhidrasa carbónica (31 KDa), inhibidor de tripsina de soja (21 KDa) y lisozima (14 KDa) (Bio-Rad).

3.2. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa-TAE.

La separación de fragmentos de ADN se realizó en geles de agarosa de desarrollo horizontal del 1-2%. El tampón de electroforesis utilizado es TAE (Tris-acético 40mM, EDTA 2mM) y el tampón de carga de las muestras es glicerol al 50%, EDTA 1mM, azul de bromofenol al 0,4% y azul de xileno al 0,4%. Los patrones de peso molecular fueron los fragmentos de digestión enzimática con HindIII de los fagos λ y ϕ 29 (suministrados por el servicio de fermentación del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa).

4. Utilización de los anticuerpos.

4.1. Inmunodetección tras electroforesis ("Western blot").

Las muestras para el análisis (proteínas purificadas, lisados o fracciones subcelulares, etc) se resuelven en geles de poliacrilamida-SDS junto con patrones de peso molecular comerciales (Bio-Rad). Las proteínas así separadas se transfieren a un filtro de nitrocelulosa (Tamaño de poro 0,45 μ m, Transblot de Bio-Rad) mediante transferencia líquida en tampón 25 mM Tris, 20 mM glicina y 20% metanol a pH 8,4 durante 90 min. (a 120 V utilizando un Trans-Blot Cell de Bio-Rad). Tras este proceso se tiñe la membrana de nitrocelulosa con rojo Ponceau, para comprobar la transferencia de proteínas a la membrana, y se incuba durante una hora a temperatura ambiente en medio TBS (Tris-HCl 10mM pH7,5, NaCl 150mM) suplementado con leche en polvo desnatada (Molico) al 5% o albúmina de suero bovino (BSA) al 3%, con objeto de bloquear los posibles sitios de unión inespecífica. Tras descartar el medio de bloqueo, la membrana se pone en contacto con el anticuerpo correspondiente, diluido en medio TBS con 3% de BSA, durante toda la noche a 4°C. Antes de incubar con el anticuerpo secundario, durante una hora a temperatura ambiente, se lava la membrana tres veces (3x15min) con



TBS-Tween 20 al 0,15 %. Estos lavados se repiten una vez que ha terminado la incubación con el anticuerpo secundario (anti-inmunoglobulina de conejo unido a peroxidasa, cuando el anticuerpo primario es policlonal, y anti-inmunoglobulina de ratón para los anticuerpos monoclonales; ambos de Nordic Immunology a una dilución 1:50.000). Finalmente, para el revelado se emplea un método quimioluminiscente en el que la peroxidasa acoplada al anticuerpo secundario cataliza la oxidación del sustrato luminol en presencia de H₂O₂ (ECL, Amersham). La cuantificación de la señal se realiza por densitometría láser (GS-710 Calibrated Imaging Densitometer BioRad).

4.2. Inmunoprecipitación.

Esta técnica se ha aplicado esencialmente en el estudio “in situ” de interacciones proteína-proteína. Para el caso de proteínas sobreexpresadas, las células se lisaron (48 horas después de la transfección) en 600 μ l/P-100 de tampón de lisis RIPA (Tris-HCl 50mM, NaCl 150mM, 0.1% SDS, 1% Triton X-100 y 0.5% DOC) junto con un cocktail de inhibidores de proteasas (STI 100 μ g/ml, benzamidina 100 μ g/ml, PMSF 200 μ g/ml y aprotinina 8 μ g/ml) durante 60 min a 4°C con rotación permanente. La mezcla se centrifugó durante 15 min a 14000xg. El sobrenadante obtenido se incubó con 1mg/ml de albúmina de suero bovino y con el anticuerpo correspondiente (tabla 4), con rotación permanente, durante 16 horas a 4 °C. Posteriormente, se recogieron los complejos inmunes por centrifugación (5 min, 3000xg) y, tras descartar el sobrenadante, se hicieron 6 lavados de 10 minutos con 1 ml del tampón de lisis. Las proteínas inmunoprecipitadas se resuspendieron en 20 μ l de tampón de muestra de electroforesis y se cargó toda la muestra en un gel de poliacrilamida-SDS del porcentaje adecuado. Finalmente el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para la detección de las proteínas de interés mediante “western blot”.

Tabla 4: Anticuerpos empleados en inmunoprecipitación	
Anticuerpo	μ g en 600 μ l de lisado
HA (12CA5)	4
G α q (C19)	2
PKC ζ (H1)	0,6
GST (Z5)	2
PF1 (reconoce al dominio N-terminal de GRK2)	Dilucion 1:125

Para la inmunoprecipitación de las proteínas endógenas G α q y PKC ζ , se emplearon dos placas p100 con una confluencia celular del 80%, que fueron lisadas en 1ml de tampón de lisis PD (Tris-HCl 40mM, NaCl 500mM, EDTA 6mM, EGTA 6mM, DTT 1mM y 0.1% NP-40) junto con un cocktail de inhibidores de proteasas (STI y benzamidina 100 μ g/ml, PMSF 200 μ g/ml y aprotinina 8 μ g/ml), obteniendo un mg de proteína total. Tras la centrifugación el sobrenadante se incubó con 1mg/ml de albúmina de suero bovino y el anticuerpo correspondiente. Posteriormente se procedió de la misma



forma que se ha explicado anteriormente, pero en este caso se realizaron cinco lavados con 10 ml de tampón de lisis.

4.3. Anticuerpos utilizados.

Con el fin de analizar la cantidad, actividad o presencia de algunas proteínas concretas en nuestras fracciones de tejido o celulares, se utilizaron los siguientes anticuerpos:

Anticuerpo anti Gαq/11 (C-19), anticuerpo policlonal comercial de Santa Cruz Biotechnology, que reconoce las subunidades Gαq y Gα11 de mamífero. Se utilizó en ensayos de inmunoprecipitación (tabla 4), en el análisis de “western blot” a una dilución final de 1/1000 en 3%BSA TBS-Tween 20 al 0.2%, incubando toda la noche a 4°C, y en ensayos de inmunofluorescencia a una dilución 1:50, incubando una hora a temperatura ambiente.

Anticuerpo anti Gas (K-20), anticuerpo policlonal comercial de Santa Cruz Biotechnology, que reconoce las subunidades Gas de mamífero. Se utilizó en el análisis de “western blot” a una dilución final de 1/1000 en 3%BSA TBS-Tween 20 al 0.2%, incubando toda la noche a 4°C.

Anticuerpo anti Gα12 (S-20), anticuerpo policlonal comercial de Santa Cruz Biotechnology, que reconoce las subunidades Gα12 de mamífero. Se utilizó en el análisis de “western blot” a una dilución final de 1/1000 en 3%BSA TBS-Tween 20 al 0.2%, incubando toda la noche a 4°C.

Anticuerpo anti Gαi1 (I-20), anticuerpo policlonal comercial de Santa Cruz Biotechnology, que reconoce las subunidades Gαi1 de mamífero. Se utilizó en el análisis de “western blot” a una dilución final de 1/1000 en 3%BSA TBS-Tween 20 al 0.2%, incubando toda la noche a 4°C.

Anticuerpo anti PKCζ (C-20), anticuerpo policlonal comercial de Santa Cruz Biotechnology, que reconoce a la quinasa PKCζ. Se utilizó en el análisis de “western blot” a una dilución final de 1/300 en 3%BSA TBS-Tween 20 al 0.2%, incubando toda la noche a 4°C.

Anticuerpo anti PKCζ (H1), anticuerpo monoclonal comercial de Santa Cruz Biotechnology, generado contra el dominio C-terminal de la proteína de rata. Se utilizó en ensayos de inmunoprecipitación incubando toda la noche a 4°C (tabla 4).

Anticuerpo anti GST (Z5), anticuerpo policlonal comercial de Santa Cruz Biotechnology, que reconoce a la proteína Glutation-S-Transferasa. Se utilizó en ensayos de inmunoprecipitación (tabla 4) y



en el análisis de “western blot” a una dilución final de 1/500 en 3%BSA TBS-Tween 20 al 0.2%, incubando toda la noche a 4°C.

Anticuerpo anti HA (Y11), anticuerpo policlonal comercial de Santa Cruz Biotechnology que reconoce un péptido de 11 aminoácidos derivado de la proteína de la hemaglutinina de *Influenza* (YPYDVPDYA). Se utilizó en el análisis de “western blot” a una dilución final de 1:500 en 3%BSA TBS-Tween 20 al 0.2%.

Anticuerpo anti HA (12CA5), anticuerpo monoclonal suministrado por el servicio de microscopía confocal del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, que reconoce un péptido de 11 aminoácidos derivado de la proteína de la hemaglutinina de *Influenza* (YPYDVPDYA). Se utilizó en ensayos de inmunoprecipitación incubando toda la noche a 4°C (tabla 4) y en ensayos de inmunofluorescencia a una dilución 1:200, incubando una hora a temperatura ambiente.

Anticuerpos anti ERK1 y ERK2 (C-16 y C-14), anticuerpos policlonales comerciales de Santa Cruz Biotechnology, que reconocen a las proteínas ERK 1 y ERK2 (también llamadas p42 y p44 MAPK), respectivamente. Se utilizaron en el análisis de “western blot” a una concentración final de 0.75 µg/ml cada uno en 3%BSA TBS-Tween 20 al 0.2%, incubando toda la noche a 4°C.

Anticuerpo anti fosfo ERK1 y ERK2 (Thr202/Tyr204), anticuerpo policlonal comercial, que reconoce la forma fosforilada de ERK1 y ERK2, de New England Biolabs, generado contra un péptido sintético (acoplado a KLH) correspondiente a los residuos de la secuencia aminoacídica que rodea a los residuos Thr202/Tyr204 de la MAPK p44 humana. Este anticuerpo se ha utilizado para análisis de “western blot” de ERK activada, a una dilución 1:500 en 3%BSA TBS-Tween 20 al 0.2%, incubando toda la noche a 4°C.

Anticuerpo anti ERK5, anticuerpo policlonal comercial de Upstate Biotechnology, generado contra la secuencia correspondiente a los aminoácidos 783-806 de la proteína de origen humano. Se utilizó para la detección por “western blot” a una dilución final de 1:500 en 5% leche TBS. Para el análisis del estado de fosforilación de la quinasa ERK5 las células fueron homogeneizadas en el tampón recomendado por la casa comercial del anticuerpo (Tris-HCl 50mM, NaCl 150mM, 1% NP-40, 0.25% DOC, EGTA 1mM, NaF 1mM junto con un cocktail de inhibidores de proteasas). La incubación de la membrana de nitrocelulosa con este anticuerpo se llevó a cabo durante tres horas a temperatura ambiente y sólo se realizó un lavado con agua antes de poner el anticuerpo secundario.

Anticuerpo anti fosfo ERK5 (Thr218/Tyr220), anticuerpo policlonal comercial, que reconoce la forma fosforilada de ERK5, de Abcam. Este anticuerpo se ha utilizado para análisis de “western blot” de



ERK5 activada, a una dilución 1:250 en 35% leche, TBS-Tween 20 al 0.2%, incubando toda la noche a 4°C.

Anticuerpo anti poli-Histidinas (HIS1), anticuerpo monoclonal comercial de Sigma, generado contra una proteína de fusión con una cola de Histidinas. Este anticuerpo se ha utilizado para análisis de “western blot” de la proteína recombinante His-PKC ζ , a una dilución 1:1000 en 3%BSA TBS-Tween 20 al 0.2%, incubando toda la noche a 4°C.

Anticuerpo anti GRK2, anticuerpo policlonal generado en nuestro laboratorio contra el péptido C-terminal de GRK2 denominado AbPF2 (que comprende los aminoácidos 436-689 de GRK2). Este anticuerpo se ha utilizado para el análisis de “western blot”, a una dilución 1:600 en 3%BSA TBS-Tween 20 al 0.2%, incubando toda la noche a 4°C.

Anticuerpo anti GRK2, anticuerpo policlonal generado en nuestro laboratorio contra el péptido N-terminal de GRK2 denominado AbPF1 (que comprende los aminoácidos 50-145 de GRK2). Este anticuerpo se ha utilizado para inmunoprecipitación (tabla 4), así como para detección por “western blot”, a una dilución 1:600 en 3%BSA TBS-Tween 20 al 0.2%, incubando toda la noche a 4°C.

Se utilizaron como anticuerpos secundarios: anti-inmunoglobulina de conejo acoplada a peroxidasa, cuando el anticuerpo primario es policlonal, y anti-inmunoglobulina de ratón acoplada a peroxidasa cuando el anticuerpo primario es monoclonal; ambos de Nordic Immunology, diluidos 1:50.000 en TBS-Tween 20 al 0.2%, incubando una hora a temperatura ambiente.

Para los ensayos de inmunofluorescencia se emplearon como anticuerpos secundarios anti-inmunoglobulina de conejo acoplado a Alexa Fluor 488 y anti-inmunoglobulina de ratón acoplado al colorante Texas Red, ambos diluidos 1:200. La incubación fue durante una hora a temperatura ambiente.

5. Ensayo de interacción de proteínas *in Vitro*.

5.1. Asociación *in vitro* de G α q y PKC ζ .

Para este ensayo se empleó la proteína recombinante G α q purificada de células de insecto Sf9 infectadas con baculovirus, cedida amablemente por el Dr. Elliot Ross (University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, USA) y la proteína recombinante His-PKC ζ purificada, cedida amablemente por el Dr. Jorge Moscat (University of Cincinnati, USA). Ambas proteínas se incubaron a una concentración de 20 nM en un volumen de 100 μ l de tampón de unión (20mM Tris-HCl pH 7.9,



70mM NaCl) junto con un cocktail de inhibidores de proteasas (STI 100 μ g/ml, benzamidina 100 μ g/ml, PMSF 200 μ g/ml y aprotinina 8 μ g/ml) a 4°C, con rotación permanente durante una hora. A continuación se añadió 25 μ l de resina Ni-NTA-agarosa (Invitrogen) diluida en tampón de unión, con afinidad por las histidinas y se incubó dos horas más a 4°C. Después de este tiempo la muestra se sometió a centrifugación (5 minutos 1000xg) y se realizaron cinco lavados de la resina con 500 μ l de tampón de unión al que se le añadió imidazol 10mM. Como control negativo se incubó, paralelamente, la proteína recombinante G α q con la resina en ausencia de His-PKC ζ . La resina, junto con las proteínas allí retenidas, se resolvió por electroforesis en gel de poliacrilamida y las proteínas fueron detectadas por “western blot” empleando los anticuerpos His y G α q descritos en el apartado 4.3.

5.2. Asociación *in vitro* de G α q y GST-MEK5.

Para este ensayo, las proteínas de fusión GST-MEK5 α (Abnova) y GST purificada, a una concentración de 100 nM, se incubaron durante una hora con rotación permanente y a 4°C, con la resina glutation-Sefarosa (12,5 μ l) diluidas en tampón de unión (50mM Tris-HCl pH 7.9, 0,01% lubrol, 0,6 mM EDTA, 70mM NaCl) junto con un cocktail de inhibidores de proteasas (STI y benzamidina 100 μ g/ml, PMSF 200 μ g/ml y aprotinina 8 μ g/ml) en un volumen final de 100 μ l. Pasado este tiempo se añadió la proteína recombinante G α q a una concentración final de 10 nM y la mezcla se incubó durante toda la noche a 4°C con rotación permanente. Después de este tiempo la muestra se sometió a centrifugación (5 minutos 1000xg) y se realizaron seis lavados de la resina con 500 μ l de tampón de unión. La resina junto con las proteínas allí retenidas se resolvió por electroforesis en gel de poliacrilamida. Las proteínas de fusión fueron visualizadas mediante “western blot” empleando los anticuerpos G α q y GST descritos en el apartado 4.3.

6. Microscopía.

6.1. Microscopía confocal (LCSM Laser Scanning Confocal Microscopy).

A diferencia de la microscopía de fluorescencia, donde las muestras son uniformemente iluminadas, en la microscopía confocal (LCSM) las lentes del microscopio enfocan el láser en un único punto de la muestra (punto focal). El láser se mueve rápidamente punto por punto para generar la imagen que es recogida por un detector y mostrada en la pantalla del ordenador.

Las imágenes de confocal han sido realizadas con el sistema de confocal de Leica SP2 AoS (Microscopy Imagen Center, University of Bergen, Norway), equipado con el láser BD (Blue diode), el



láser Ar/ArKr (Ion Argon/Kriptonita Argon) y el láser He/NeI (Helio/NeonI). Cada láser emite un haz de luz a diferente longitud de onda permitiendo la visualización de las muestras fluorescentes.

6.2. Inmunofluorescencia.

Para el análisis de la localización de $G\alpha_q$ y $PKC\zeta$ se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia en células NIH3T3-m1.

Las células fueron sembradas en una placa p60 (10^6 células por placa) para ser transfectadas con el vector de expresión pcDNA3.1-HA-PKC ζ , como se explica en el apartado 2.3 de esta sección. 24 horas después de la transfección las células fueron levantadas con tripsina y sembradas en pocillos de M12 que contenían un cubreobjetos cubierto de polilisina (10^5 células por pocillo). Los cubreobjetos fueron sumergidos en etanol y flameados para su esterilización antes de cubrirlos con polilisina durante 10 minutos. La polilisina fue lavada dos veces con agua y la placa se dejó secando antes de sembrar las células. Pasadas 24 horas se procedió con la estimulación de las células con carbacol $10\mu\text{M}$ durante una hora a 4°C , para permitir que el agonista se uniera a los receptores m1(Ach)R pero evitando la internalización de los mismos. Pasado este tiempo las células se incubaron a 37°C durante distintos tiempos (2, 5 y 15 minutos). Se realizó un lavado con PBS y se añadió formaldehído al 4% durante 15 minutos a 4°C para la fijación de las células. Después de tres lavados con PBS, las células se incubaron durante una hora y a temperatura ambiente en PBS 0,5% BSA, 5% suero de cabra y 0,5% NP-40, consiguiendo así la permeabilización de las células y el bloqueo de sitios inespecíficos. A continuación se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en el mismo tampón de bloqueo (anti- $G\alpha_q$ /11 policlonal diluido 1:50 y anti-HA monoclonal diluido 1:200) durante una hora a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con PBS 0,5% BSA 0,1% tween-20 y se procedió a la incubación de los anticuerpos secundarios durante otra hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios empleados fueron anti-inmunoglobulina de conejo acoplado a Alexa Fluor 488 y anti-inmunoglobulina de ratón acoplado al colorante Texas Red, ambos diluidos 1:200. Finalmente, se realizaron tres lavados con PBS 0,5%BSA 0,1% tween-20 y dos lavados con sólo PBS. Los cubreobjetos fueron colocados en portaobjetos con 7 μl de medio de montaje (vectashield de Vector Laboratories).

Las imágenes de confocal se obtuvieron con el sistema de confocal de Leica SP2 AoS (Microscopy Imagen Center, University of Bergen, Norway). La proteína $G\alpha_q$ marcada con Alexa 488 se visualizó empleando el láser Ar/ArKr a 488 nm y la proteína HA-PKC ζ marcada con Texas Red se visualizó empleando el láser He/NeI a 543 nm.



6.3. Transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET).

Se han llevado a cabo experimentos de imagen utilizando transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET Fluorescence Resonance Energy Transfer), también llamada transferencia lineal, durante una estancia de dos meses en el Molecular Imaging Center (MIC) de la Universidad de Bergen (Noruega).

La transferencia de energía ocurre sólo a muy corta distancia entre dos estados de excitación electrónica de dos moléculas fluorescentes, en la que la longitud de onda de emisión de una de ellas coincide con la de excitación de la otra. Así, la señal FRET es inversamente proporcional a la sexta potencia de la distancia entre los dos fluorocromos, por lo que sólo puede producirse cuando están muy próximos, resultando una técnica altamente sensible para el estudio de la interacción entre proteínas.

Existen diversas técnicas de microscopía empleadas para analizar la cantidad de FRET. Una de las más sencillas es blanquear al aceptor (FRET after photobleaching), excitando con el láser a máxima potencia, de forma que el fluorocromo pierde su capacidad de absorber o emitir más energía. De esta forma se bloquea la transferencia de energía desde el donador hacia el aceptor y por tanto, el donador recupera fluorescencia. Este incremento en la intensidad del donador está directamente relacionado con la eficiencia de FRET:

$$\%FRET = [(postDONADOR - preDONADOR) / postDONADOR] \times 100$$

Pre- y Post- DONADOR se refiere a la intensidad de la fluorescencia del donador antes y después de blanquear al aceptor.

Para llevar a cabo los experimentos de FRET disponemos de las construcciones CFP-Gαq silvestre, CFP-GαqR183C, la cual es activa constitutivamente, y YFP-PKCζ. Para la excitación de CFP-Gαq se empleó el láser BD (Blue Diode), el cual emite a una longitud de onda de 405 nm. Debido a los reducidos niveles de expresión de CFP-Gαq fue necesario emplear el láser a una intensidad del 50%. Para la excitación de YFP-PKCζ se empleó el láser Ar/ArKr, el cual emite a una longitud de onda de 488 nm. En este caso, una intensidad del 15% fue suficiente para visualizar YFP-PKCζ. Para conseguir blanquear al donador YFP-PKCζ se empleó el laser Ar/ArKr a una intensidad del 100%.

Se realizaron dos experimentos independientes transfectando las siguientes parejas de proteínas: CFP-Gαq silvestre/YFP-PKCζ, CFP-GαqR183C/YFP-PKCζ y, como controles negativos, CFP/YFP-PKCζ,



CFP-G α q silvestre/YFP y CFP/YFP. 48 horas después de la transfección se procedió con la fijación de las células con formaldehído al 4%. Se analizaron 12 células en cada condición.

7. Modelo animal de hipertrofia cardiaca.

La generación de ratones deficientes en PKC ζ de la cepa SV129J (a partir de ahora denominados ratones PKC ζ /-) ha sido descrita anteriormente (Leitges y cols. 2001). Los animales fueron mantenidos en condiciones libres de patógenos y todos los experimentos fueron realizados siguiendo la normativa de la Convención Europea para la protección de animales vertebrados utilizados en experimentación u otros propósitos científicos (Directiva 86/609/EEC) y con la autorización del Comité Bioético de la Universidad Autónoma de Madrid.

Se emplearon ratones silvestres y PKC ζ /- de sexo masculino y de 32 semanas de edad. Para la inducción de la hipertrofia cardiaca se les administró de forma crónica angiotensina II (AngII) disuelta en tampón fosfato salino (PBS), durante 14 días, mediante la implantación subcutánea de mini-bombas osmóticas (modelo 2002, Alza Corp., Mountain View, CA) a una dosis de 432 μ g/kg/día. La administración de angiotensina II es un modelo bien establecido para la inducción de hipertrofia cardiaca (Braz *et al.*, 2003; Ikeda *et al.*, 2005). Para la implantación de las minibombas dorsalmente los animales fueron anestesiados con isofluorano como se describe en Braz *et al.*, 2002. Como control negativo el mismo número de animales silvestres y PKC ζ /- fueron tratados con PBS. Se emplearon cuatro animales para cada condición.

Pasados los 14 días de tratamiento se realizó el análisis de distintos marcadores hipertróficos para comprobar la validez de nuestro modelo animal de hipertrofia cardiaca.

7.1. Medida de los niveles en plasma del factor natrurético del atrio (ANP).

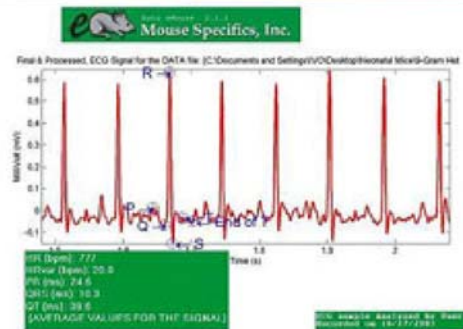
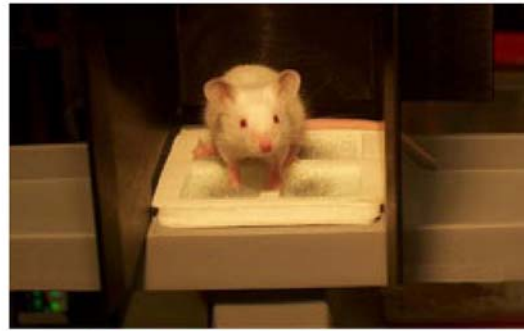
Se extrajeron aproximadamente 50 μ l de sangre de cada animal con el fin de medir los niveles plasmáticos del péptido pro ANP, los cuales correlacionan con los niveles de secreción crónica de ANP. Para ello seguimos el protocolo de un ensayo de ELISA comercial (proANP EIA, Alpco Diagnostics, Windham, NH).

7.2 Electrocardiograma (ECG).

Para el registro del ECG se empleó un sistema no invasivo que permite realizar las medidas con los animales conscientes [ECGenieTM ECG Screening System (Mouse specifics, Inc., Boston MA)] en colaboración con el Dr. Michel Herranz (IBMCC-USAL-CSIC). La actividad eléctrica del corazón es



medida por unos electrodos situados en una plataforma en la que se coloca al ratón. La adquisición de datos y su representación gráfica se llevo a cabo tal como describen Chu y cols. 2001. De esta forma se cuantificaron los distintos componentes del electrocardiograma: onda P, onda T, complejo QRS, segmento QR, segmento ST e intervalo QT.



7.3. Relación masa del corazón/masa del cuerpo.

Para determinar si el tratamiento ha tenido éxito en la inducción de hipertrofia se extrajo el corazón de los animales y se procedió a su pesado.

La relación masa del corazón/masa del cuerpo expresada en mg/g, así como, la relación masa del corazón/longitud de la tibia expresada en mg/mm, se utiliza para establecer si ha tenido lugar un aumento en la masa del miocardio.

7.4. Parámetros morfométricos del corazón.

Tras la extracción de los corazones se procedió a su fijación sumergiéndolos en paraformaldehído al 4% en PBS durante cuatro horas mínimo. Pasado este tiempo se procedió a su inclusión en parafina.

Para llevar a cabo las tinciones con hematoxilina/eosina se elaboraron cortes histológicos de 5 μ m de grosor en un microtomo (Prolab). Posteriormente, y tras el desparafinado, se tiñeron siguiendo el protocolo de la casa comercial (Sigma).

Una vez realizados los cortes, fueron fotografiados (NIKON coolpix 7900) para el posterior análisis y procesamiento de las imágenes con el programa ImageJ (NIH). Este programa permite medir las imágenes teniendo en cuenta la relación de píxeles/cm. De esta forma, se pudo cuantificar el área del ventrículo izquierdo respecto al área total del corazón.



7.5. Microarrays *GeneChip* de Affymetrix.

7.5.1. Purificación de ARN de los corazones.

Se purificó el ARN total de corazones de los ratones wt y PKC ζ ^{-/-}, tratados y no tratados con angiotensina, utilizando el kit RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen). Este kit está dirigido a la purificación de ARN de tejidos ricos en fibra, como es el tejido muscular. Para la homogenización y disrupción del tejido, se utilizó el sistema de MixerMill 301 (Restch), que permite una fácil, reproducible, y óptima extracción de ácidos nucleicos a partir de órganos y tejidos. Tras la purificación, se hizo un perfil de integridad utilizando el sistema de electroforesis microfluídico Bioanalyzer 2100 (Agilent). Todas las muestras analizadas cumplieron los criterios mínimos de integridad, con valores de RIN (RNA Integrity Number) superiores a 7.6, por lo que se decidió continuar con los experimentos de microarrays.

7.5.2. Biochips de expresión génica.

Se decidió utilizar el sistema de microarrays *GeneChip* de Affymetrix (www.affymetrix.com). Un total de 5 μ g de ARN total de cada muestra fue enviado al Servicio de Genómica del Parque Científico de Madrid (Universidad Complutense de Madrid). La preparación de las dianas, hibridación, lavado y tinción se hizo según protocolos estándar de la plataforma de Affymetrix. Brevemente, se sintetiza ADN de doble cadena desde el ARN total. Luego, desde el ADN complementario (ADNc), se hace una transcripción in vitro para producir ARN complementario (ARNc) marcado con biotina. El ARNc se fragmenta antes de la hibridación con el biochip. Para ello, se prepara un cocktail de hibridación, que incluye la diana fragmentada y los controles de sonda del array. La hibridación se realiza durante 16 horas, tiempo tras el cual se hacen los lavados y la tinción. Todo el proceso de hibridación, lavado, y tinción se hace de manera automatizada en la estación fluidica. Finalmente, mediante el software Affymetrix Microarray Suite or GCOS, se realiza el scanning de la tinción, donde se computa una intensidad para cada celda/sonda.

El GeneChip utilizado es el *Mouse Expression MOE 430 2.0*, que contiene un total de 45.101 sondas y que cubre la practica totalidad del genoma murino.



7.5.3. Análisis de los datos de expresión génica.

7.5.3.1 Normalización de los biochips.

Los archivos CEL, generados por el software de scanning GCOS, son utilizados para la normalización de los experimentos de GeneChip. Se utilizó el algoritmo *Robust Multichip Average* (RMA) (rmaexpress.bmbolstad.com), ampliamente utilizado por la comunidad internacional, fácil de usar, y que está implementado en muchos de los programas informáticos de análisis de microarrays. RMA consta de tres etapas de análisis: ajuste de fondo, normalización de cuantiles, y finalmente resúmenes (Bolstad y cols. 2003; Irizarry y cols. 2003). Tras la normalización de los biochips, los valores de expresión de cada sonda de Affymetrix se centró alrededor de la media (media=0, y desviación estándar=1), para poder comparar con los datos de expresión de experimentos externos.

7.5.3.2. Análisis de expresión diferencial.

Se utilizó el software para análisis de microarrays *Multiexperiment Viewer* (MeV4.1) (www.tm4.org/mev.html) (Saeed y cols. 2003). Los datos de expresión normalizada, con los valores centrados alrededor de la media (media=0, desviación estándar=1) de cada uno de los estudios, se juntaron en una única tabla. Se utilizó el test de la T de student (Student T-test), y los valores de probabilidad se calcularon asumiendo una distribución T de los valores de expresión. A partir de los genes seleccionados, se agruparon tanto los genes como las muestras utilizando el método de agrupamiento jerárquico (método de vinculación por medias, y distancia Euclídea). Para asegurar un buen agrupamiento, muestras y genes se remuestrearon 100 veces mediante el método de bootstrapping.

7.5.3.3. Análisis funcional.

El análisis de enriquecimiento de funciones biológicas se realizó utilizando la utilidad web *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) (david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp) (Hosack y cols. 2003; Dennis y cols., 2003). Brevemente, las listas de sondas de Affymetrix sobreexpresados o regulados negativamente en hipertrofia cardíaca se cargaron independientemente en DAVID. Posteriormente las sondas fueron convertidas a genes únicos, y se realizó un análisis de enriquecimiento de procesos biológicos según las anotaciones de la base de datos de Ontología Génica (GO) (www.geneontology.org). Las funciones enriquecidas en los grupos de genes se ordenaron por relevancia estadística, mostrándose los 30 primeros términos.



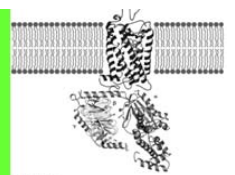
8. Análisis estadístico.

Los experimentos se realizaron, como mínimo, tres veces y en general, cada condición se llevo a cabo por duplicado. Los datos se han expresado como valores medios \pm el error estándar de la media (\pm SEM).

El análisis estadístico de los resultados correspondientes a diversos grupos experimentales se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) seguidos de un test de Fisher, LSD. Las diferencias entre las medias estadísticas se analizaron mediante un test t de Student bilateral.

En ambos casos se consideró como estadísticamente significativo un nivel de probabilidad igual o inferior a 0,05.

RESULTADOS



1. Caracterización de la vía de activación de ERK5 mediada por receptores acoplados a Gq.

Como se ha descrito en el apartado de introducción, agonistas que activan a receptores acoplados a Gq o G12 (receptores muscarínicos y receptor de trombina, respectivamente) inducen una activación de ERK5 en células epiteliales, que es independiente de la activación de GTPasas monoméricas como Ras, Rho, Rac y Cdc42 (Fukuhara y cols. 2000). Sin embargo, se desconocían los mecanismos moleculares implicados y si esta activación también tiene lugar en otros tipos celulares. Este primer bloque de resultados se centra en la caracterización de la ruta de activación de ERK5 iniciada por receptores acoplados a Gq.

1.1. ERK5 es estimulada por receptores acoplados a Gq.

Con el fin de verificar que la estimulación de un receptor acoplado a proteínas Gq induce la activación de ERK5, empleamos la línea celular NIH3T3, transfectada establemente con el subtipo m1 del receptor muscarínico de acetilcolina humano, m1(Ach)R. Estas células (denominadas a partir de ahora NIH3T3-m1) expresan en

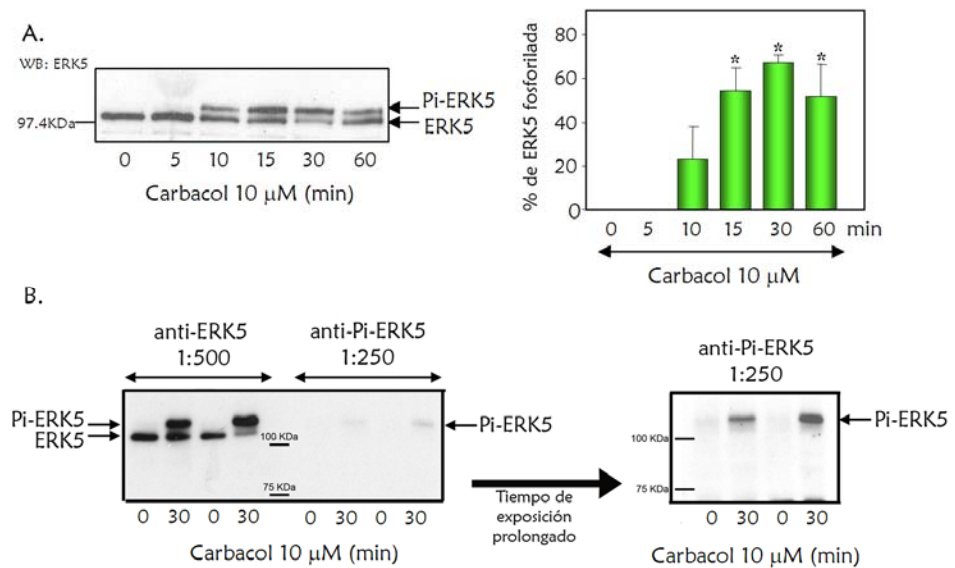


Figura R1. Activación de ERK5 por el receptor muscarínico m1. A. Células NIH-3T3-m1 que expresan el receptor muscarínico humano m1(Ach)R, fueron estimuladas con carbacol (10μM) tras 6 horas de privación de suero, durante distintos tiempos. Los lisados fueron obtenidos mediante homogeneización con el tampón recomendado por la casa comercial del anticuerpo anti-ERK5, como se describe en el apartado 4.3 de Materiales y Métodos. El análisis por “western blot” (apartado 4.1 de Materiales y Métodos) muestra un cambio en la movilidad de ERK5 debido a su hiperfosforilación en respuesta a estímulo. El porcentaje de proteína ERK5 fosforilada frente a la proteína total se cuantificó por densitometría y se ha representado en diagrama de barras. Los datos recogidos en la gráfica son media ±ESM de tres experimentos independientes. *p<0,01 test ABNOVA seguido de test LSD Fisher. B. Lisados celulares obtenidos como en A fueron analizados por “western blot” empleando un anticuerpo que reconoce específicamente la forma fosforilada de ERK5 (anti-Pi-ERK5), así como con el anticuerpo que reconoce tanto la forma fosforilada como no fosforilada (empleado en A). Se muestran dos tiempos de exposición de la parte derecha del gel para una mejor visualización de los resultados obtenidos con anti-Pi-ERK5.



torno a 20.000 moléculas de receptor m1 en su membrana (Crespo y cols. 1994). Aunque también expresan otros subtipos de receptores muscarínicos (m2-m5), los cuales están acoplados a Gi (m2 y m4) o Gq/11 (m3 y m5), sus niveles de expresión son mucho menores que los de m1, por lo que podemos asumir que las señales iniciadas por el tratamiento con carbacol, un agonista específico de los receptores muscarínicos, son fundamentalmente mediadas por la activación del receptor m1 y no por el resto de subtipos. Como muestra la figura R1A, el tratamiento con carbacol (10 μ M) provoca un claro incremento en la fosforilación de ERK5 endógena. El análisis por “western blot” muestra un cambio en la movilidad electroforética de ERK5 debido a la hiperfosforilación de la quinasa, que comienza a los 10 minutos de tratamiento, presentando un máximo a los 30 minutos. Con el fin de confirmar que la

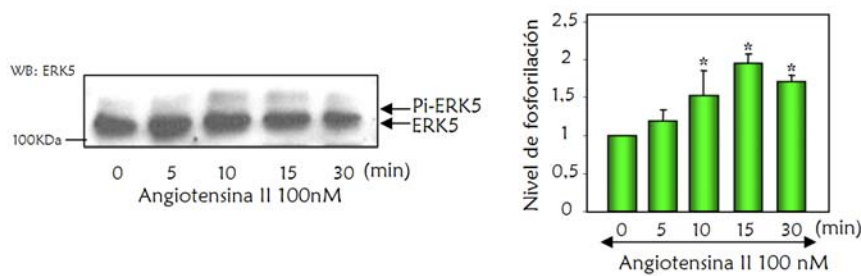


Figura R2. Activación de ERK5 por el receptor de angiotensina II (AT₁R) en cardiomiocitos. Se realizó un cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de ratón (cepa C57BL/6) como se describe en el apartado 2.2.2 de Materiales y Métodos. 48 horas después a la extracción, las células fueron privadas de suero durante 6 horas para su posterior estimulación con angiotensina II (100nM) durante distintos periodos de tiempo. Los lisados fueron obtenidos y analizados por “western blot” de la misma forma que se describe en la figura R1. El diagrama de barras representa el grado de activación referido al nivel de activación en estado basal, cuantificado por densitometría (la cantidad de ERK5 fosforilada está normalizada en función de la cantidad de ERK5 total). Los datos recogidos en la gráfica son media \pm ESM de tres experimentos independientes. * $p < 0,01$ test ABNOVA seguido de test LSD Fisher.

banda superior observada en la figura R1A corresponde con ERK5 fosforilada, se llevó a cabo un análisis alternativo por “western blot” empleando un anticuerpo que reconoce específicamente a ERK5 fosforilada. Dicho anticuerpo no reconoce ninguna banda en los lisados control que no han sido tratados con carbacol, mientras que, tras 30 minutos de

tratamiento con el agonista, se observa una banda cuya movilidad electroforética coincide con la banda superior que reconoce el anticuerpo de ERK5 total (Figura R1B). Puesto que la sensibilidad del anticuerpo específico para ERK5 fosforilada es claramente inferior, en los sucesivos experimentos se ha empleado el anticuerpo que reconoce tanto a ERK5 fosforilada como sin fosforilar, relacionando la actividad de ERK5 con la presencia de esa banda de menor movilidad electroforética. En resumen, podemos concluir, que en fibroblastos ERK5 es activada por receptores acoplados a Gq, con un curso temporal similar al de otras respuestas iniciadas por GPCRs.

Con el objeto de confirmar que la activación de ERK5 por receptores acoplados a Gq tiene lugar en un sistema más fisiológico, se analizó el estado de fosforilación de ERK5 tras la estimulación de receptores endógenos de angiotensina II, en un cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de ratón. Estas células expresan, de manera significativa, el receptor de angiotensina AT₁R, el cual está acoplado a



Gq (McKinsey y Olson, 1999). De nuevo, la estimulación (angiotensina II 100nM) de un receptor acoplado a Gq indujo un incremento en la fosforilación de ERK5 con un pico de activación a los 15 minutos de tratamiento (Figura R2). En este caso, el porcentaje de quinasa activada es menor que el obtenido en las células NIH3T3m1, probablemente debido a que los niveles de receptores endógenos AT₁R en cardiomiocitos no son comparables a los niveles de receptor exógeno m1 en células NIH3T3.

1.2. La activación de ERK5 mediada por m1(Ach)R es independiente de tirosina quinasas de la familia c-Src.

Tal como se ha indicado en la introducción, las tirosina quinasas citosólicas de la familia c-Src juegan un papel importante en la activación de quinasas de la familia MAPKs, tanto a través de proteínas G α , como por subunidades $\beta\gamma$ (Luttrell, 2003). Por otro lado, c-Src también interviene en la activación de ERK5 en respuesta a diversos mitógenos (Sun y Cols. 2001). De este modo, en células HeLa el tratamiento con EGF induce una

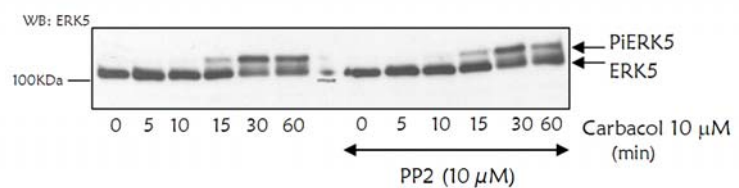


Figura R3. La activación de ERK5 por el receptor muscarínico humano m1(Ach)R es independiente de la actividad de c-Src. Células NIH-3T3-m1 expresando el receptor muscarínico humano m1(Ach)R, tras 6 horas de privación de suero, fueron tratadas durante el tiempo especificado en la sección 2.5 de Materiales y Métodos con el inhibidor PP2 (10mM) y posteriormente fueron estimuladas con carbacol (10 μ M) durante distintos tiempos. Los lisados fueron obtenidos y analizados por “western blot” de la misma forma que se describe en la figura R1. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes.

disociación entre las proteínas Lad y MEKK2, de forma dependiente a c-Src. Esta disociación es necesaria para que MEKK2 pueda activar la vía MEK5/ERK5. Con el objeto de evaluar la posible participación de la familia c-Src en la activación de ERK5 en respuesta a carbacol, empleamos el inhibidor PP2, específico para estas quinasas. Como se muestra en la figura R3, el curso temporal de la activación de ERK5, tras la estimulación de receptores m1 con carbacol, no se encuentra afectado por la presencia del inhibidor PP2, indicando que las quinasas de la familia c-Src no están implicadas en la activación de esta vía.

1.3. La activación de ERK5 por GPCR es independiente de mecanismos de transactivación del receptor de EGF.

Está ampliamente documentado que la transactivación de receptores con actividad tirosina quinasa es un mecanismo que emplean los GPCRs para inducir la activación de MAPKs, participando de esta manera en distintas funciones celulares como proliferación y migración (Luttrell, 2003; Shah y cols. 2004 y 2006.). Se ha descrito que distintos receptores acoplados a Gq (receptor de Angiotensina AT₁R, receptor de la hormona liberadora de gonadotropina GnRH, etc) provocan dicha transactivación en el

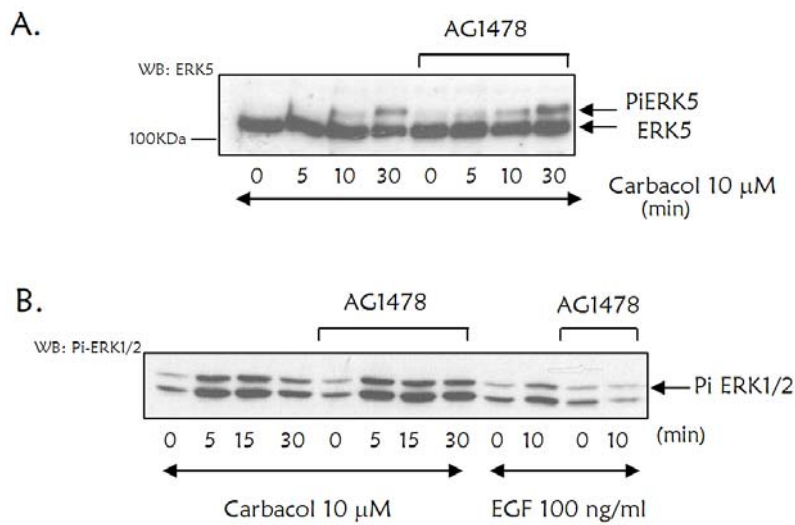


Figura R4. La activación de ERK5 por el receptor muscarínico humano m1(Ach)R es independiente de la actividad del receptor de EGF. Células NIH-3T3-m1 que expresan el receptor muscarínico humano m1(Ach)R, tras 6 horas de privación de suero, fueron tratadas durante el tiempo especificado en la sección 2.5 de Materiales y Métodos con el inhibidor AG1478 (250nM) y posteriormente fueron estimuladas con carbacol (10μM en A) y carbacol o EGF (10mM, 100 ng/ml respectivamente en B) durante distintos tiempos. Los lisados fueron obtenidos y analizados por "western blot" de la misma forma que se describe en la figura R1, empleando un anticuerpo que reconoce específicamente las formas fosforiladas de ERK1/2 (apartado 4.1 de Materiales y Métodos) además del anticuerpo específico para ERK5. Se muestran imágenes representativas de 3 experimentos independientes.

podemos afirmar que la activación de ERK5 es independiente de la actividad del receptor de EGF. Por el contrario, el estado de fosforilación de ERK1/2 en respuesta a EGF se redujo considerablemente en presencia de AG1478 (Figura R4B), mientras que el tratamiento con carbacol activa a ERK1/2 de manera independiente de EGFR o de c-Src quinasas.

Además, el tratamiento con el inhibidor AG1478 tampoco modifica la activación de ERK5 inducida por angiotensina II en un cultivo primario de cardiomiocitos neonatales (Figura R5). De esta forma, nuestros resultados indican que, tanto en fibroblastos como en cardiomiocitos el receptor de EGF no parece estar jugando ningún papel en la activación de ERK5 inducida por receptores acoplados a Gq.

1.4. La activación de ERK5 mediada por m1(Ach)R es dependiente de mecanismos de internalización.

Tras la activación de GPCRs se inician también mecanismos de internalización, que están mediados por la fosforilación del receptor por GRKs y el reclutamiento de β-arrestinas (Pierce y cols., 2000). Además, β-arrestina tiene un papel de proteína adaptadora, pudiendo conectar diferentes

receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR). A su vez, este receptor ha sido implicado en la activación de ERK5 (Kato y cols. 1998; Diaz-Meco y cols. 2001). Con el objeto de determinar si la activación de esta quinasa a través del receptor m1 era consecuencia de este tipo de transactivación, empleamos el inhibidor específico para el receptor de EGF, AG-1478, el cual bloquea la actividad tirosina quinasa de este receptor. Como se observa en la figura R4A, el tratamiento con el inhibidor no afectó la fosforilación de ERK5 inducida por carbacol por lo que

GPCRs con la activación de quinasas de la familia c-Src y facilitando la formación de complejos con componentes de las vías de señalización de ERKs y JNKs, tal como se ha explicado más ampliamente en el apartado de Introducción. Se ha descrito como el tratamiento con carbacol en células MDCK, induce inicialmente una alta tasa de internalización del receptor m1, con un 15% de receptor internalizado a los 2 minutos, un 50% a los 15 minutos y prácticamente el 100% a los 30 minutos (Shmuel y cols. 2007). Con el objeto de determinar si la internalización del receptor era necesaria para la activación, relativamente tardía, de ERK5 inducida por carbacol en células NIH3T3m1, llevamos a cabo

nuestros experimentos utilizando tres métodos distintos para bloquear los mecanismos de internalización, el tratamiento con monodansilcadaverina, que inhibe la vía endocítica dependiente de clatrina, en la que arrestina dirige el secuestro de receptores (Pierce y cols., 2000); la estimulación en presencia de altas concentraciones de sacarosa o la estimulación a 4°C (Park y cols. 1988). En la figura R6 se muestra como todos estos tratamientos bloquean totalmente la activación de ERK5 inducida por un receptor acoplado a Gq.

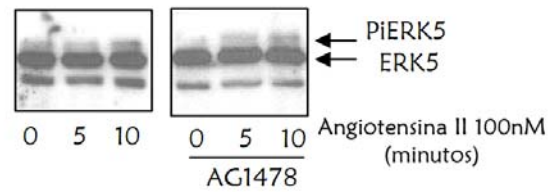


Figura R5. La activación de ERK5 por el receptor de angiotensina AT₁R es independiente de la actividad del receptor de EGF. Se realizó un cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de ratón (cepa C57BL/6) como se describe en el apartado 2.2.2 de Materiales y Métodos. 48 horas después a la extracción, las células fueron privadas de suero durante 6 horas y tratadas durante el tiempo especificado en la sección 2.5 de Materiales y Métodos con el inhibidor AG1478 (250nM), para su posterior estimulación con angiotensina II (100nM) durante distintos periodos de tiempo. Los lisados fueron obtenidos y analizados por “western blot” de la misma forma que se describe en la figura R1.

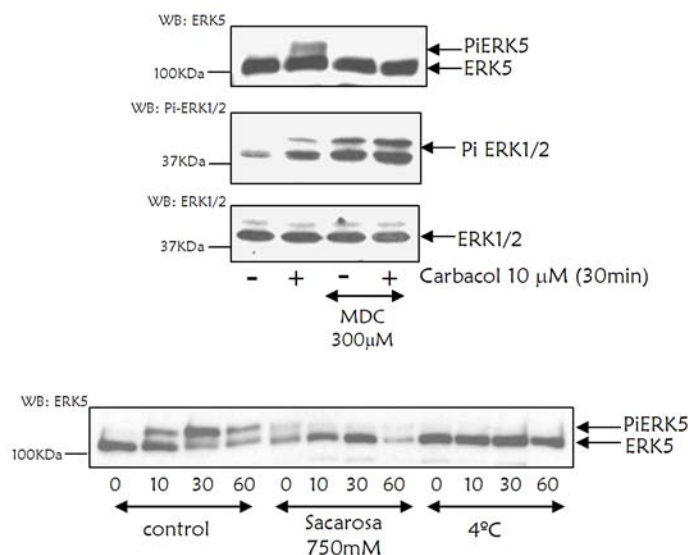


Figura R6. La activación de ERK5 en respuesta a carbacol es dependiente de los mecanismos de internalización. Células NIH-3T3-m1 que expresan el receptor muscarínico humano m1(Ach)R, tras 6 horas de privación de suero, fueron tratadas durante los tiempos especificados en el apartado 2.5 de Materiales y Métodos con monodansilcadaverina (MDC, 300 µM), sacarosa (750 mM) o estimuladas a 4°C con el fin de inhibir los mecanismos de internalización antes de ser estimuladas con carbacol (10 µM) por distintos periodos de tiempo. Los lisados fueron obtenidos y analizados por “western blot” de la misma forma que se describe en la figura R1. Se muestran imágenes representativas de 3 experimentos independientes.

En este sentido, está descrito que la internalización del receptor de NGF, TrkA, mediada por la proteína adaptadora p62 (atypical protein kinase C-interacting protein p62/ZIP), es necesaria para la



activación de ERK5 en células de origen neuronal (Geetha y cols. 2003). Nuestros resultados sugieren que un mecanismo similar podría estar participando en la activación de ERK5 mediada por el receptor m1.

1.5. La sobreexpresión de un mutante de $G\alpha_q$ activo constitutivamente es suficiente para provocar la activación de ERK5.

Con el fin de comprobar que la estimulación de la subunidad $G\alpha_q$, y no subunidades $\beta\gamma$ también liberadas tras la activación de GPCRs, estaba directamente implicada en la estimulación de

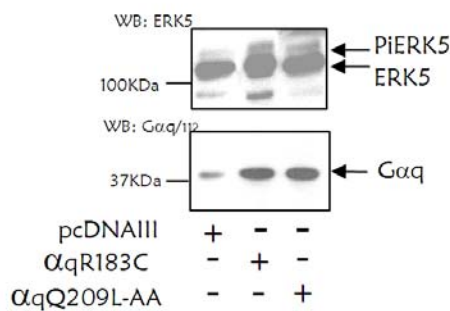


Figura R7. La activación de ERK5 es inducida por mutantes de $G\alpha_q$ activos constitutivamente. A. Células NIH-3T3-m1 fueron transfectadas transitoriamente con los plásmidos de expresión de $G\alpha_qR183C$ y $G\alpha_qQ209L/R256A/T257A$ como se explica en el apartado 2.3 de Materiales y Métodos. $G\alpha_qR183C$ es activo constitutivamente y $G\alpha_qQ209L/R256A/T257A$ además de ser activo constitutivamente ha perdido la capacidad de interactuar con PLC β . Los lisados fueron obtenidos de la misma forma que se describe en la figura R1. El análisis por "western blot" de la cantidad de ERK5 fosforilada y de la expresión de los mutantes $G\alpha_q$ se realizó como se describe en el apartado 4 de Materiales y Métodos. En la figura, representativa de tres experimentos independientes, se muestra como la expresión de estos mutantes induce una activación en ERK5.

ERK5, utilizamos un mutante de $G\alpha_q$ activo constitutivamente, $G\alpha_qR183C$, que ha perdido la capacidad de hidrolizar el GTP, que fue sobreexpresado en las células NIH3T3m1. Nuestros resultados indican que este mutante induce la activación de ERK5 en ausencia de agonista (Figura R7). Por tanto, parece que de algún modo la activación de $G\alpha_q$ es suficiente para iniciar los mecanismos implicados en la estimulación de ERK5.

La fosfolipasa C β (PLC β) es el efector mejor caracterizado de $G\alpha_q$. Tras la activación del receptor y el intercambio de GDP por GTP en la subunidad $G\alpha_q$, ésta se disocia del dímero $\beta\gamma$ siendo capaz de activar a PLC β . Está ampliamente descrito que esta fosfolipasa hidroliza fosfolípidos, generando sn-1,2-diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-trifosfato (IP $_3$). El IP $_3$ es responsable de la liberación del Ca $^{2+}$ almacenado en el retículo, que junto con el DAG inducen la activación de las familias de proteínas quinasas C clásicas y nuevas (PKC α y PKC ϵ). Existen múltiples ejemplos del papel que PLC β juega en la activación de MAPKs inducida por receptores acoplados a Gq (Goldsmith y Dhanasekaran, 2007), por lo que quisimos analizar la posibilidad de que esta fosfolipasa interviniera en la activación de ERK5 vía GPCRs. Para ello utilizamos una construcción de $G\alpha_q$ en el que los aminoácidos implicados en la interacción con PLC β han sido sustituidos por alaninas (R256A/T257A),

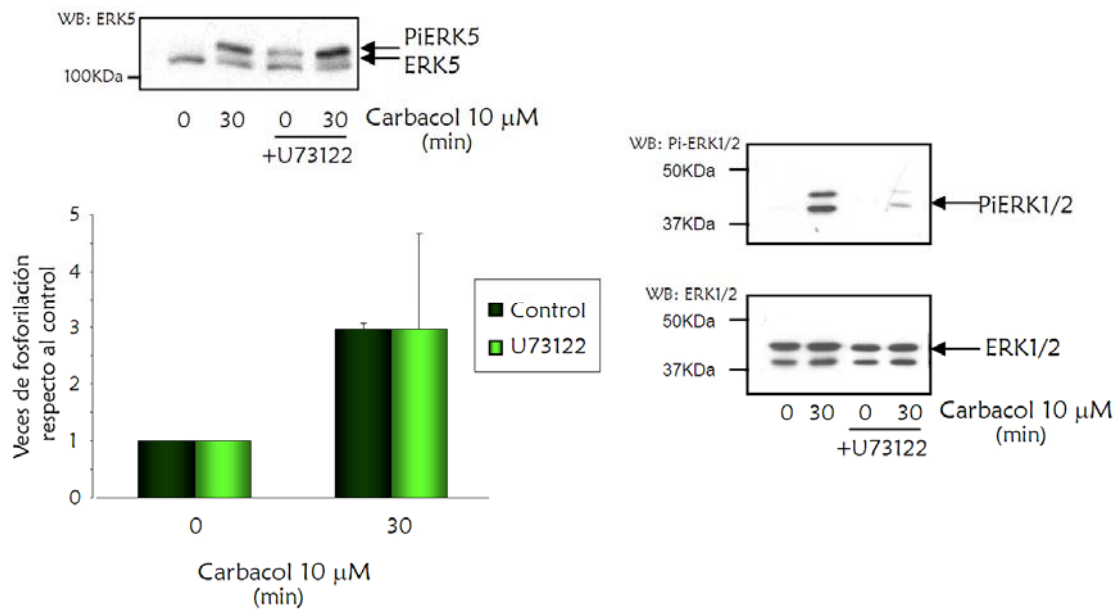


Figura R8. La activación de ERK5 en respuesta a carbacol es independiente de la activación de PLCβ. Células NIH-3T3-m1 que expresan el receptor muscarínico humano m1(Ach)R fueron tratadas con el inhibidor específico para PLCβ, U73122 (apartado 2.5 de Materiales y Métodos) antes de ser estimuladas con carbacol 10 μM durante 30 minutos. En la figura se muestra como dicho tratamiento no afecta al nivel de activación de ERK5 en respuesta a carbacol mientras que la activación de ERK1/2 sí se encuentra bloqueada. El análisis por “western blot” de ERK5 y ERK1/2 fosforilada se realizó como se describe en el apartado 4 de Materiales y Métodos. El diagrama de barras representa el grado de activación de ERK5 referido al nivel de activación en estado basal, cuantificado por densitometría (la cantidad de ERK5 fosforilada está normalizada en función de la cantidad de ERK5 total). Los datos recogidos en la gráfica son media ±ESM de tres experimentos independientes.

lo que impide su unión a PLCβ (Venkatakrishnan y Exton, 1996) y a su vez es activo constitutivamente porque presenta una mutación puntual (Q209L) que le impide hidrolizar el GTP. Pudimos observar que la sobreexpresión de este mutante $G\alpha_qQ209L/R256A/T257A$ provoca la misma activación de ERK5 que $G\alpha_qR183C$ (Figura R7). Para confirmar que PLCβ no participa en la estimulación de ERK5 mediada por $G\alpha_q$, analizamos el efecto de un inhibidor específico de PLCβ, U73122, sobre la activación de ERK5 inducida por carbacol. En la figura R8 se observa como el tratamiento con este inhibidor no bloquea la activación de ERK5 en respuesta al agonista, mientras que, por el contrario, la activación de ERK1/2 sí parece ser dependiente de las señales iniciadas por PLCβ. En resumen, nuestros resultados muestran que la activación de ERK5 a través de $G\alpha_q$ es independiente de la activación de PLCβ y por tanto de las señales que esta proteína inicia.



2. Asociación específica entre la subunidad $G\alpha_q$ y la proteína quinasa C atípica, PKC ζ .

La proteína quinasa C ζ (PKC ζ) forma parte, junto con PKC ι/λ , de la subfamilia de PKCs atípicas. Al contrario que las PKCs clásicas o nuevas, la activación de las PKCs atípicas no depende de Ca^{2+} ni de DAG. Se ha descrito que estas quinasas participan en la vía de activación de ERK5 en respuesta a EGF

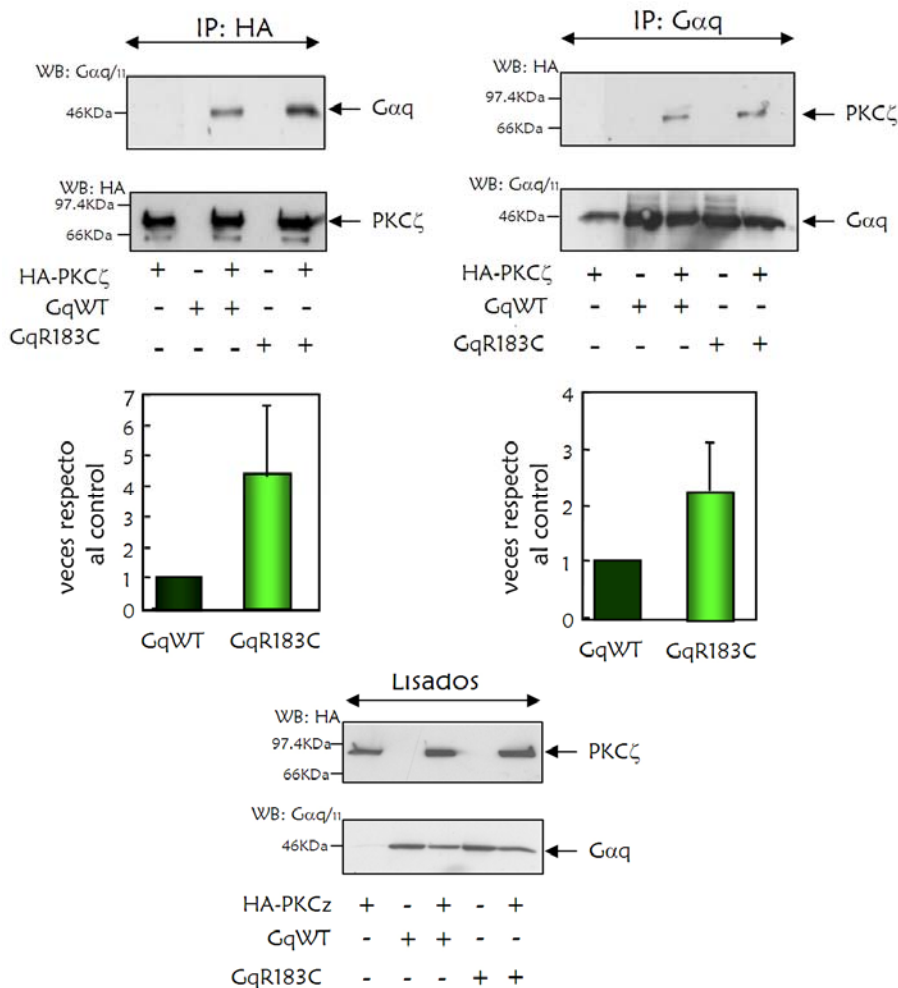


Figura R9. Asociación entre PKC ζ y $G\alpha_q$. PKC ζ se une preferentemente al estado activado de $G\alpha_q$. Células Cos-7 fueron transfectadas transitoriamente con los plásmidos de expresión de $G\alpha_q$ silvestre (GqWT) $G\alpha_q$ activa constitutivamente (GqR183C) y HA-PKC ζ como se describe en el apartado 2.3 de Materiales y Métodos. 48 horas después de la transfección las células fueron homogeneizadas con el tampón de lisis RIPA (apartado 4.2 de Materiales y Métodos). Los lisados fueron inmunoprecipitados con los anticuerpos HA (12CA5) y $G\alpha_q$ (C19) y la presencia de proteínas en los inmunocomplejos, así como los niveles de sobreexpresión en los lisados se analizaron por "western blot" como se describe en el apartado 4 de Materiales y Métodos. Los resultados se normalizaron por la cantidad de HA-PKC ζ o $G\alpha_q$ total inmunoprecipitada en cada caso, y la asociación entre $G\alpha_q$ wt y PKC ζ se tomó como condición basal. Los datos recogidos en las gráficas representan la media \pm ESM de tres experimentos independientes.

(Moscat y cols. 2001) y parece que también en respuesta a NGF (Geetha y cols. 2001).

Existen diversos ejemplos en los que distintos agonistas de receptores acoplados a proteínas Gq inducen una translocación de PKC ζ a la membrana, como es el caso de angiotensina II en cardiomiocitos

(Takeishi y cols. 1999), en células del tiroides (Marsigliante y cols. 2003) y en células de cancer de mama humano MCF-7

(Muscella y cols. 2003), del factor activador de plaquetas (PAF) en eosinófilos (Kato y cols. 2005), así como de tromboxano A₂ (Cogolludo y cols. 2003) y norepinefrina

(Parmentier y cols. 2006) en células vasculares. De este modo, PKC ζ participa en distintas respuestas iniciadas por receptores acoplados a Gq, como es el control de la proliferación celular (Muscella y cols. 2003; Godeny y Sayeski, 2006; Godeny y Sayeski, 2006; Parmentier y cols. 2006), la regulación de la bomba Na⁺/K⁺ (Marsigliante y cols. 2003), de canales de K⁺ (Cogolludo y cols. 2003), de la desgranulación en eosinófilos (Kato y cols. 2005) o de la adhesión celular y la hipertrofia en células vasculares (Parmentier y cols. 2006).

Basándonos en todos estos antecedentes, nos planteamos la posibilidad de que PKC ζ estuviera interviniendo en la activación de ERK5 a través de receptores acoplados a proteínas Gq.

2.1. PKC ζ se asocia preferentemente al estado activado de G α q.

Se ha descrito que G α q es capaz de interactuar directamente con su efector clásico, PLC β (Dowal y cols. 2005 y referencias en este artículo), así como con otros menos establecidos como los factores intercambiadores

de nucleótidos de Rho (Booden y cols. 2002, S Lutz y cols. 2005) o la tirosina quinasa de Bruton, BTK (Bence y cols. 1997). Con el objetivo de determinar si PKC ζ podría ser un nuevo efector de G α q, se analizó la posible asociación entre ambas proteínas. Para ello se realizaron experimentos de coimmunoprecipitación en células Cos-7, sobreexpresando G α q

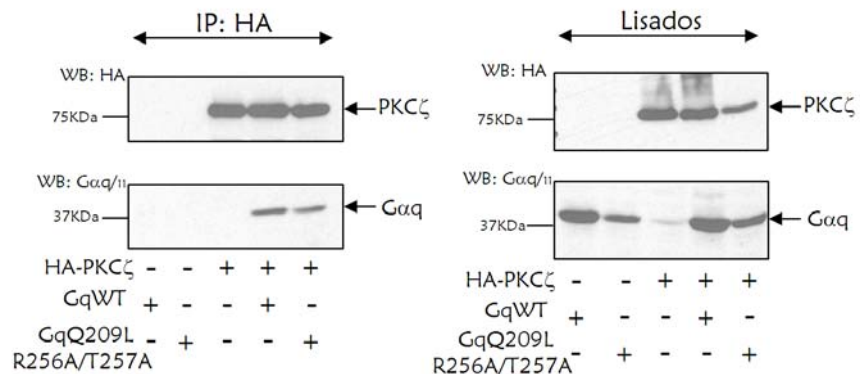


Figura R10. PKC ζ se asocia con el mutante de G α q incapaz de interactuar con PLC β . Células Cos-7 fueron transfectadas transitoriamente con los plásmidos de expresión de G α q silvestre (GqWT), G α q activa constitutivamente y defectiva en su interacción con PLC β (GqQ209L/R256A/T257A) y HA-PKC ζ como se describe en el apartado 2.3 de Materiales y Métodos. 48 horas después de la transfección las células fueron homogeneizadas con el tampón de lisis RIPA (apartado 4.2 de Materiales y Métodos). Los lisados fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo HA (12CA5) y la presencia de proteínas en los inmunocomplejos, así como los niveles de sobreexpresión en los lisados, se analizaron por "western blot" como se describe en el apartado 4 de Materiales y Métodos.

silvestre o el mutante activo constitutivamente, G α qR183C, junto con HA-PKC ζ . Como se muestra en la figura R9, PKC ζ es capaz de asociarse con las dos formas de G α q, y lo hace con mayor intensidad en el caso del mutante activo constitutivamente. Estos resultados concuerdan con la hipótesis de que PKC ζ puede actuar como un efector de G α q y como tal, interactúa preferentemente con la forma activa de G α q.

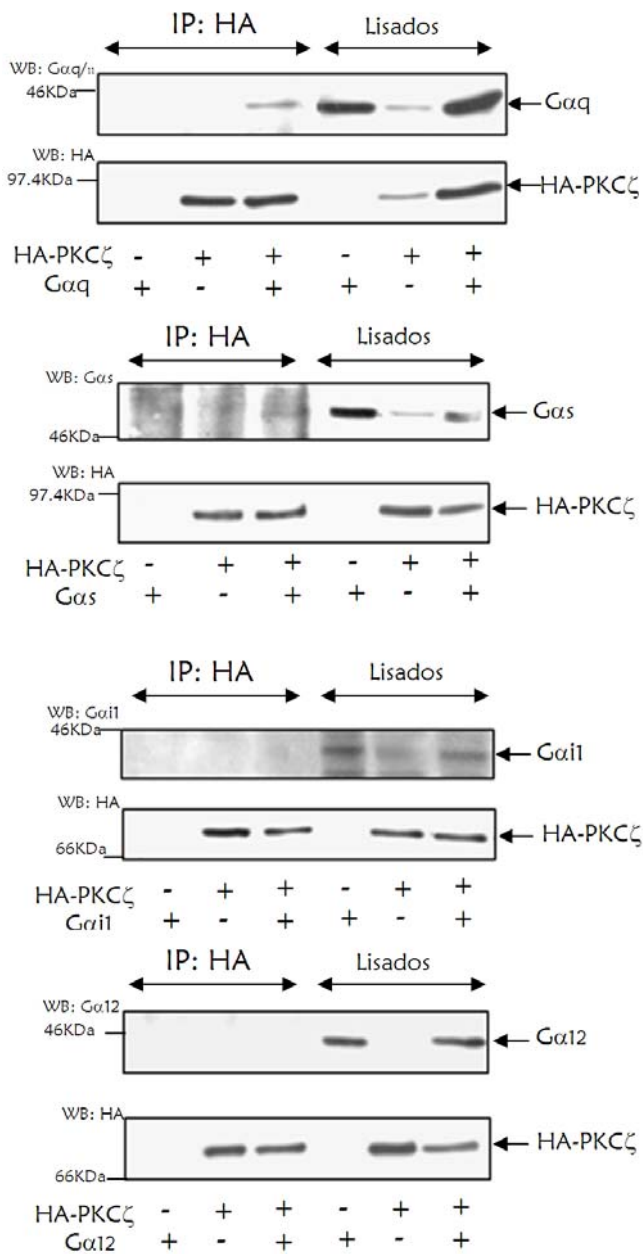


Figura R11. PKCζ no se asocia a otros subtipos de subunidades Gα. Células Cos-7 fueron transfectadas transitoriamente con los plásmidos de expresión de Gαq, Gαs, Gαi1, Gα12 y HA-PKCζ como se explica en el apartado 2.3 de Materiales y Métodos. 48 horas después de la transfección las células fueron homogeneizadas con el tampón de lisis RIPA (apartado 4.2 de Materiales y Métodos). Los lisados fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo HA (12CA5) y la presencia de proteínas en los inmunocomplejos, así como su sobreexpresión en los lisados fue analizada como se describe en el apartado 4 de Materiales y Métodos.

sin que se detecte ninguna asociación en el caso de las subfamilias Gαi, Gαs y Gα12. Por tanto, nuestros resultados sugieren que la asociación entre Gαq y PKCζ es específica.

Además, comprobamos que PKCζ es capaz de asociarse al mutante GαqQ209L/R256A/T257A (Figura R10), incapaz de interactuar con PLCβ pero que, como se ha mostrado en el apartado 1.5, mantiene la capacidad de activar a ERK5. Estos resultados indican que PKCζ y PLCβ se asocian de modo diferente con la proteína Gαq, probablemente uniéndose en distintas regiones de esta proteína.

2.2. Otras familias de subunidades Gα no se asocian con PKCζ.

Existen, al menos, 17 genes de subunidades Gα, que han sido clasificados en cuatro subfamilias basándose en la homología que presentan en su secuencia de aminoácidos. Estas subfamilias son Gαs (Gαs y Gαolf), Gαi (Gαi1, Gαi2, Gαi3, GαoA, GαoB, Gαt-1, Gαt-2 y Gαgust), Gα12 (Gα12 y Gα13) y Gαq (Gαq, Gα11, Gα14, Gα15 y Gα16) (McCudden y cols. 2005). Con el fin de analizar la capacidad de PKCζ para interactuar con distintas subunidades Gα, escogimos un miembro representativo de cada subfamilia y se llevaron a cabo ensayos de coimmunoprecipitación entre las distintas subunidades Gα y HA-PKCζ, en células Cos-7, con ambas proteínas sobreexpresadas. En la figura R11 se muestra cómo PKCζ sólo es capaz de coimmunoprecipitar con la subunidad Gαq,

2.3. $G\alpha_q$ no interacciona con la proteína quinasa C atípica $PKC_{\zeta/\lambda}$.

La subfamilia de las proteínas quinasas C atípicas está compuesta por dos miembros, PKC_{ζ} que se expresa de manera ubicua, y $PKC_{\zeta/\lambda}$, que se expresa en numerosos tejidos. Ambas isoformas presentan un 72% de homología en su secuencia (Diaz-Meco y cols 2000), por lo que muchas veces resulta complicado determinar realmente cuál de las dos está mediando una función celular concreta o determinar si sus funciones son redundantes. Mediante ensayos de coimmunoprecipitación con las proteínas sobreexpresadas en células Cos-7, quisimos comprobar si $G\alpha_q$ es capaz de asociarse a $PKC_{\zeta/\lambda}$. En la figura R12 se puede observar que $G\alpha_q$ sólo se asocia a PKC_{ζ} , confirmando de nuevo la especificidad de la asociación $G\alpha_q/PKC_{\zeta}$.

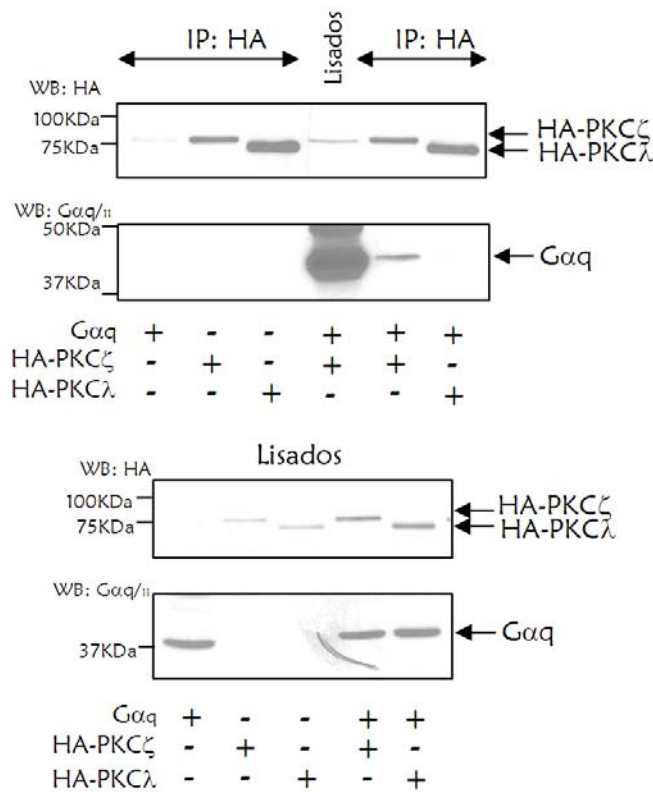


Figura R12. $G\alpha_q$ no se asocia a PKC_{λ} , el otro miembro de la subfamilia de las PKCs atípicas. Células Cos-7 fueron transfectadas transitoriamente con los plásmidos de expresión de $G\alpha_q$, HA-PKC ζ y HA-PKC λ como se explica en el apartado 2.3 de Materiales y Métodos. 48 horas después de la transfección las células fueron homogeneizadas con el tampón de lisis RIPA (apartado 4.2 de Materiales y Métodos). Los lisados fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo HA (12CA5) y la presencia de proteínas en los inmunocomplejos, así como su sobreexpresión en los lisados fue analizada como se describe en el apartado 4 de Materiales y Métodos. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes.



2.4. El tratamiento con un agonista de GPCR incrementa la asociación entre $G\alpha_q$ y $PKC\zeta$.

El incremento de la asociación entre $PKC\zeta$ y el mutante activo constitutivamente $G\alpha_qR183C$, observado en el apartado 2.1, sugiere que la activación de un GPCR acoplado a G_q , que promueve la estimulación de $G\alpha_q$, podría modular su asociación con $PKC\zeta$, de la misma forma que se ha observado para otros efectores de subunidades $G\alpha$. Con el fin de comprobar esta hipótesis, en primer lugar realizamos experimentos de coimmunoprecipitación en células Cos-7 transfectadas con $G\alpha_q$ silvestre,

HA- $PKC\zeta$ y el receptor muscarínico m1. Las células fueron estimuladas con carbacol 10 μM durante distintos periodos de tiempo, antes de realizar el ensayo de coimmunoprecipitación. Nuestros resultados muestran un claro y transitorio incremento en la asociación entre estas proteínas (Figura R13A). Más aún, también observamos un incremento en la asociación de las proteínas $G\alpha_q$ y $PKC\zeta$ endógenas, en células

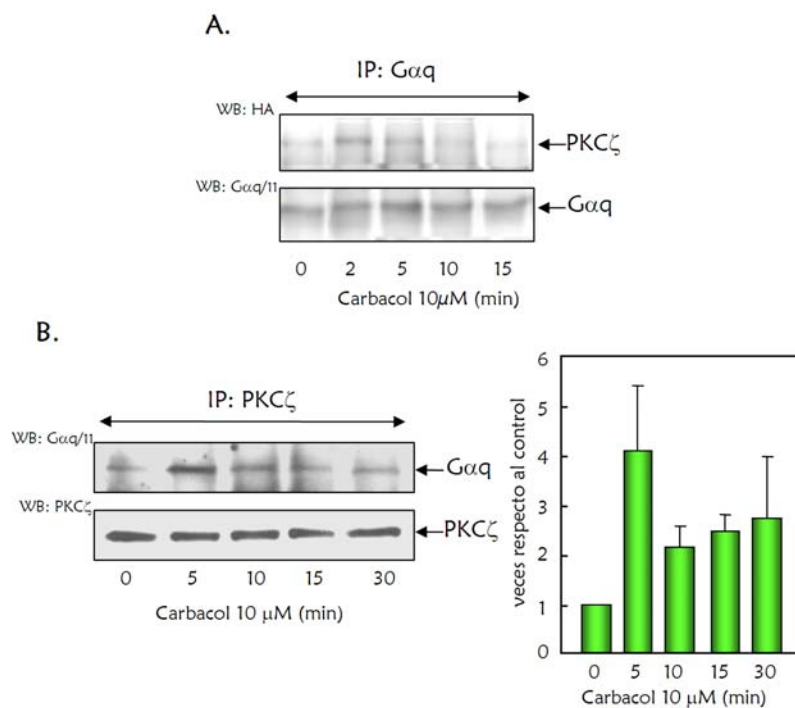


Figura R13. La activación del receptor muscarínico humano m1(Ach)R provoca un incremento en la asociación de las proteínas $G\alpha_q$ y $PKC\zeta$, tanto sobreexpresadas como endógenas. A. Células Cos-7 fueron transfectadas transitoriamente con los plásmidos de expresión m1(Ach)R, HA- $PKC\zeta$ y $G\alpha_q$ silvestre como se describe en el apartado 2.3 de Materiales y Métodos. Tras 48 horas las células fueron privadas de suero por un periodo de 6 horas y tratadas con carbacol (10 μM) durante distintos periodos de tiempo. A continuación se prosiguió con su homogenización en tampón de lisis RIPA para su posterior inmunoprecipitación con el anticuerpo $G\alpha_q/11$ (C19) tal como se describe en el apartado 4.2 de Materiales y Métodos. **B.** Células NIH-3T3-m1, fueron privadas de suero por un periodo de 6 horas y tratadas con carbacol (10 μM) durante distintos periodos de tiempo. A continuación se procedió a la inmunoprecipitación de las proteínas endógenas $G\alpha_q$ y $PKC\zeta$ tal como se describe en el apartado 4.2 de Materiales y Métodos. La cantidad de $G\alpha_q$ inmunoprecipitada se normalizó por la de $PKC\zeta$ presente en el complejo. Los datos recogidos en la gráfica son media \pm ESM de tres experimentos independientes.

NIH3T3-m1, en respuesta a carbacol, con una cinética similar a la observada en células Cos-7 (Figura R13B). Cabe destacar que esta cinética es similar a la de otros procesos regulados por GPCRs. Estos datos apoyan la idea de que la asociación funcional entre ambas proteínas tiene lugar

en condiciones fisiológicas tras la activación de GPCRs.

2.5. $G\alpha_q$ y $PKC\zeta$ colocalizan en membrana tras la activación por agonista.

En la activación de los distintos isotipos de PKCs intervienen dos mecanismos. Por un lado, tiene que ocurrir la fosforilación por PDK1 (del inglés, 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1) de una treonina presente en el bucle de activación. En el caso de $PKC\zeta$, esta treonina está en la posición 410. Por otro lado, debe tener lugar una interacción con lípidos de membrana. Esta interacción provoca cambios conformacionales, con lo que el centro activo de la quinasa deja de interactuar con su secuencia pseudosustrato inhibitoria (Parker y Murray-Rust, 2004). En el caso de la subfamilia de las

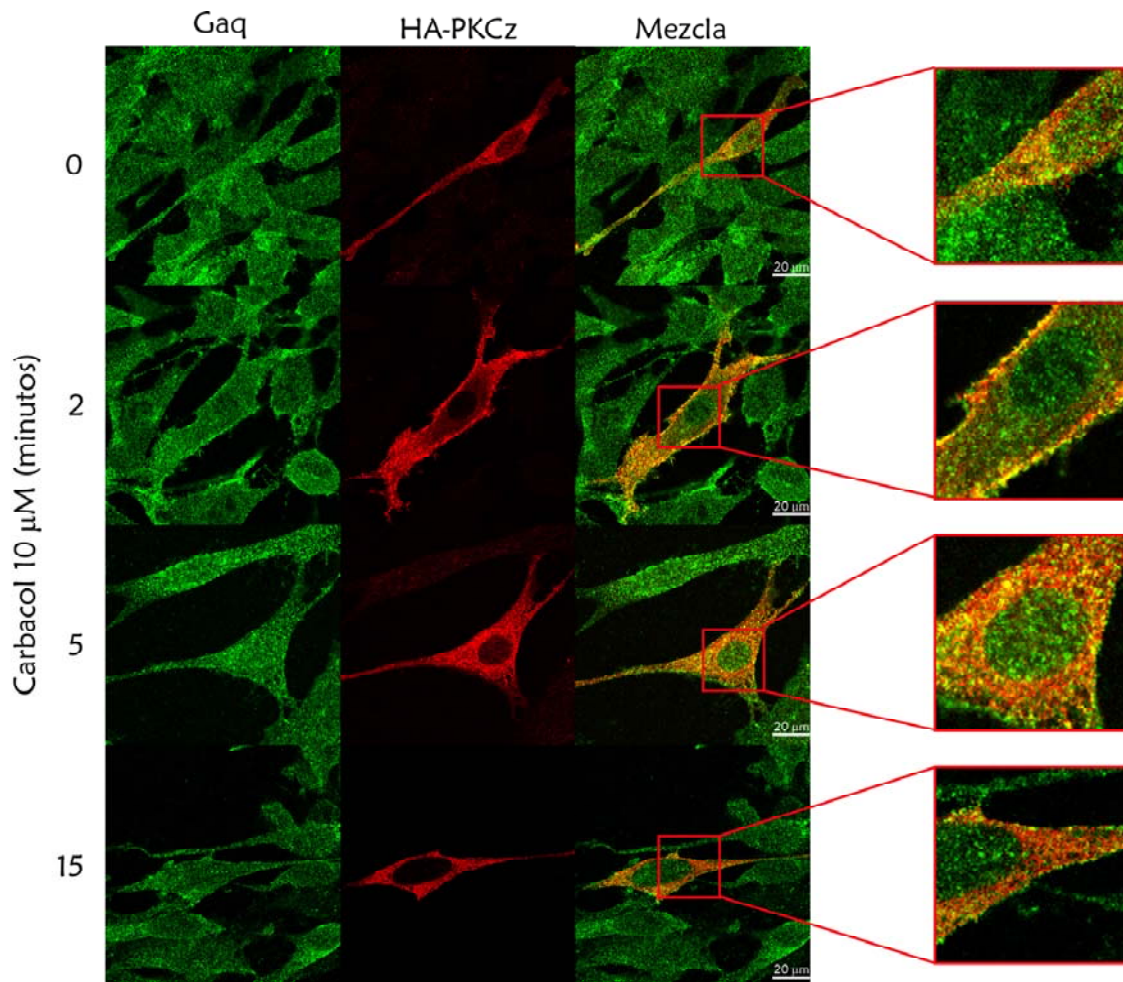


Figura R14. El tratamiento con carbacol promueve la translocación de $PKC\zeta$ y la colocalización entre $G\alpha_q$ y $PKC\zeta$. Células NIH3T3m1 fueron transfectadas transitoriamente con el plásmido de expresión HA- $PKC\zeta$ como se describe en el apartado 2.3 de Materiales y Métodos. 48 horas después de la transfección se llevó a cabo un ensayo de inmunofluorescencia para analizar la distribución de $G\alpha_q$ endógena (verde) o de HA- $PKC\zeta$ (rojo) (apartado 7.2 de Materiales y Métodos). La colocalización de ambas proteínas se detecta por la presencia de color amarillo en las imágenes combinadas. Los paneles de la derecha muestran en mayor detalle las áreas señaladas. La imagen es representativa de tres experimentos independientes.



PKCs clásicas, el reclutamiento a la membrana está mediado a través de la interacción con diacilglicerol (DAG). Las PKCs atípicas carecen del dominio de interacción con DAG, pero pueden interactuar con otros lípidos como fosfatidil inositol, ácido fosfatídico, ácido araquidónico y ceramidas (Hirai y Chida, 2003). Además, cada isotipo de PKC es dirigido a un compartimento celular concreto a través de la interacción con proteínas específicas, llamadas colectivamente RACKs (Receptors for Activated C Kinasas) (Poole y cols. 2004).

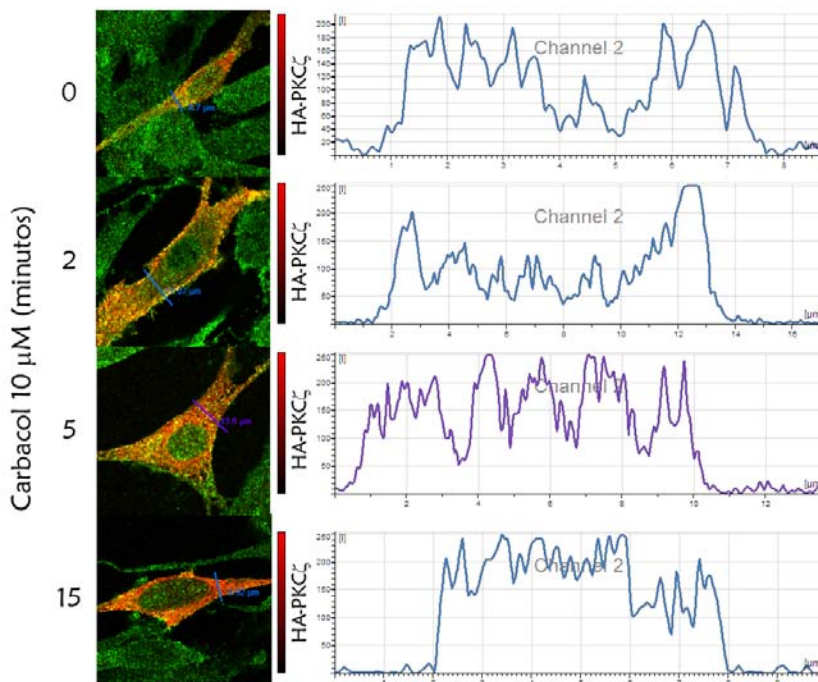


Figura R15. El tratamiento con carbacol estimula la translocación de PKC ζ a la membrana. Las células mostradas en la figura R14 se sometieron a un análisis de la intensidad de fluorescencia en el canal rojo (HA-PKC ζ) en una determinada zona celular, representada por la línea azul. Se puede observar como a dos minutos de tratamiento con carbacol los picos más altos de intensidad se encuentran localizados en los extremos de la línea, los cuales coinciden con la membrana celular, mientras que en el estado basal o a tiempos más largos de tratamiento, la intensidad se distribuye más homogéneamente por toda la línea, lo que coincidiría con la localización en la membrana y en el citoplasma.

con carbacol, la cantidad de PKC ζ en membrana y su colocalización con G α q incrementa de manera considerable (Figuras R14 y R15) mientras que a 15 minutos el nivel de PKC ζ en membrana es similar al del estado basal. Es interesante destacar que este curso temporal correlaciona con el observado en ensayos de coimmunoprecipitación. Estos datos indican que GPCRs acoplados a Gq pueden promover reclutamiento de PKC ζ a la membrana.

Por estas razones, clásicamente se considera que la traslocación a la membrana de las PKCs es equivalente a su activación. Con el fin de determinar si el tratamiento con carbacol provoca una translocación de PKC ζ a la membrana, llevamos a cabo ensayos de inmunofluorescencia en células NIH3T3m1, transfectadas de forma transitoria con el plásmido de expresión de HA-PKC ζ . En estado basal se observa una ligera presencia de PKC ζ en membrana donde colocaliza con G α q. Después de dos minutos de tratamiento



2.6. Análisis de la asociación $G\alpha q$ /PKC ζ mediante transferencia de energía de resonancia (FRET).

En los apartados anteriores hemos determinado la existencia de una asociación entre $G\alpha q$ y PKC ζ , mediante experimentos de coimmunoprecipitación. Con el objeto de determinar si existe una interacción directa *in vivo* entre $G\alpha q$ y PKC ζ empleamos la técnica FRET (del inglés Fluorescence resonance energy transfer). La transferencia de energía ocurre sólo a muy corta distancia entre los estados de excitación electrónica de dos moléculas fluorescentes, cuando la longitud de onda de emisión de una de ellas (donador) coincide con la de excitación de la otra (aceptor). Así, la señal FRET es inversamente proporcional a la sexta potencia de la distancia entre los dos fluorocromos, por lo que sólo puede producirse cuando están muy próximos (entre 1 y 10 nm), resultando una técnica altamente sensible para el estudio de la interacción entre proteínas.

Para llevar a cabo los experimentos de FRET utilizamos las construcciones CFP- $G\alpha q$ silvestre (CFP, del inglés Cyan Fluorescence Protein), CFP- $G\alpha q$ R183C e YFP-PKC ζ (YFP, del inglés Yellow Fluorescence Protein). En primer lugar, mediante ensayos de inmunoprecipitación en células NIH3T3m1, transfectadas con estas construcciones, se confirmó la

existencia de una asociación entre las proteínas YFP-PKC ζ y CFP- $G\alpha q$ silvestre, así como, entre YFP-PKC ζ y CFP- $G\alpha q$ R183C (Figura R16). Al igual que los resultados obtenidos con otras construcciones, YFP-PKC ζ es capaz de asociarse tanto con CFP- $G\alpha q$ silvestre como con CFP- $G\alpha q$ R183C. También en este caso, YFP-PKC ζ se une preferentemente al estado activado de $G\alpha q$ (CFP- $G\alpha q$ R183C). Además, el

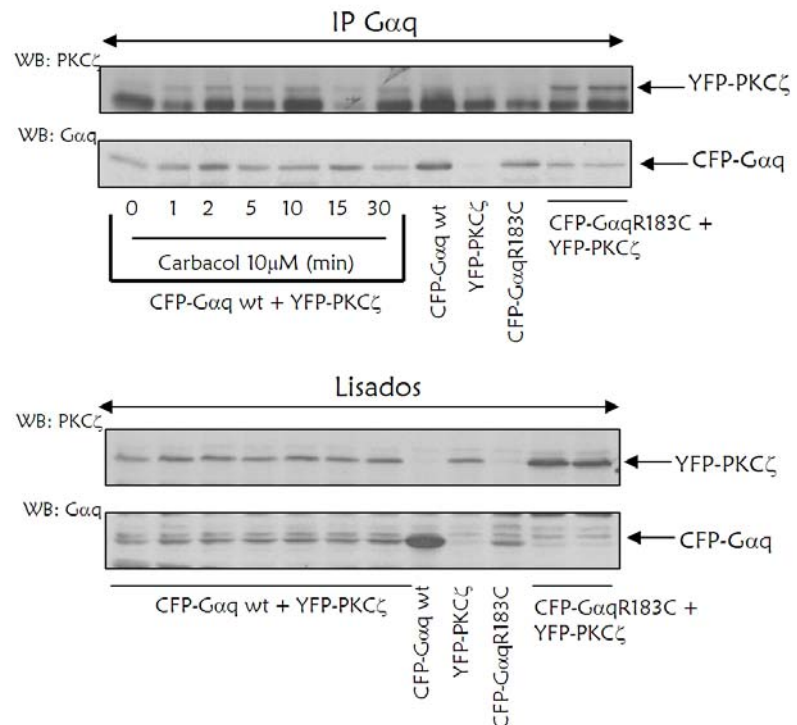


Figura R16. Asociación entre YFP-PKC ζ y CFP- $G\alpha q$. Células NIH3T3-m1 fueron transfectadas transitoriamente con los plásmidos de expresión YFP-PKC ζ , CFP- $G\alpha q$ silvestre y CFP- $G\alpha q$ R183C como se describe en el apartado 2.3 de Materiales y Métodos. Tras 48 horas las células fueron privadas de suero por un periodo de 6 horas y tratadas con carbacol (10 μ M) durante distintos periodos de tiempo. A continuación se prosiguió con su homogenización en tampón de lisis RIPA para su posterior inmunoprecipitación con el anticuerpo $G\alpha q$ /11 (C19) tal como se describe en el apartado 4.2 de Materiales y Métodos.



tratamiento con carbacol (10 μ M) induce un incremento en la asociación entre YFP-PKC ζ y CFP-G α q silvestre similar al observado en el apartado 2.4, confirmando los datos anteriores.

Existen diversas técnicas de microscopía para analizar la eficiencia de la transferencia de energía. Una de las más sencillas es blanquear al aceptor, excitando con el láser a máxima potencia, con lo que el fluorocromo pierde su capacidad de absorber o emitir más energía. De esta forma, se bloquea la transferencia de energía desde el donador hacia el aceptor y el donador recupera fluorescencia. Este incremento en la intensidad del donador está directamente relacionado con la eficiencia de FRET, que viene definida por la siguiente ecuación:

$$\% \text{ FRET} = \frac{\text{post-DONADOR} - \text{pre-DONADOR}}{\text{post-DONADOR}} \times 100$$

Dónde pre- y post- DONADOR se refiere a la intensidad de la fluorescencia del donador antes y después de blanquear al aceptor.

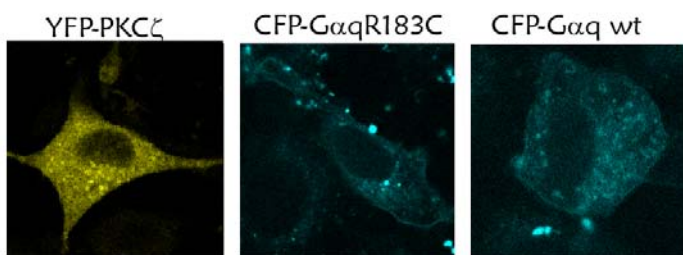


Figura R17. Localización de las proteínas de fusión YFP-PKC ζ , CFP-G α q silvestre y CFP-G α qR183C. Células NIH3T3-m1 fueron transfectadas transitoriamente con los plásmidos de expresión YFP-PKC ζ , CFP-G α q silvestre y CFP-G α qR183C como se describe en el apartado 2.3 de Materiales y Métodos. Se muestran tres células representativas que fueron visualizadas tal y como se describe en el apartado 7.1 de materiales y métodos.

Tras cotransfectar la línea celular NIH3T3-m1 con las construcciones CFP-G α q silvestre y YFP-PKC ζ , se analizó, por microscopía confocal, la expresión de ambas proteínas en la célula. Aunque el marcaje es débil, se confirma la presencia de G α q en la membrana celular, mientras que PKC ζ presenta un marcaje más claro, tanto en el citoplasma como en la membrana (Figura R17). La sobreexpresión de estas proteínas no indujo ningún cambio llamativo en la

morfología celular, lo que sugiere que los niveles de expresión de ambas proteínas son adecuados.

Se llevaron a cabo dos experimentos independientes como se describe en el apartado 7.2 de Materiales y Métodos. En la figura R18 se muestra una célula representativa de cada condición de transfección. Los valores de eficiencia de FRET corresponden a la media \pm ESM de dos experimentos, en cada uno de los cuales se analizaron doce células por condición. Podemos observar que la eficiencia de FRET es del 32% cuando las proteínas implicadas son YFP-PKC ζ y CFP-G α q silvestre y que esta eficiencia se incrementa hasta un 48% cuando la interacción tiene lugar entre YFP-PKC ζ y el mutante activo constitutivamente CFP-G α qR183C. La especificidad de la señal de FRET se determinó llevando a cabo, paralelamente a cada experimento, controles negativos transfectando los vectores de expresión

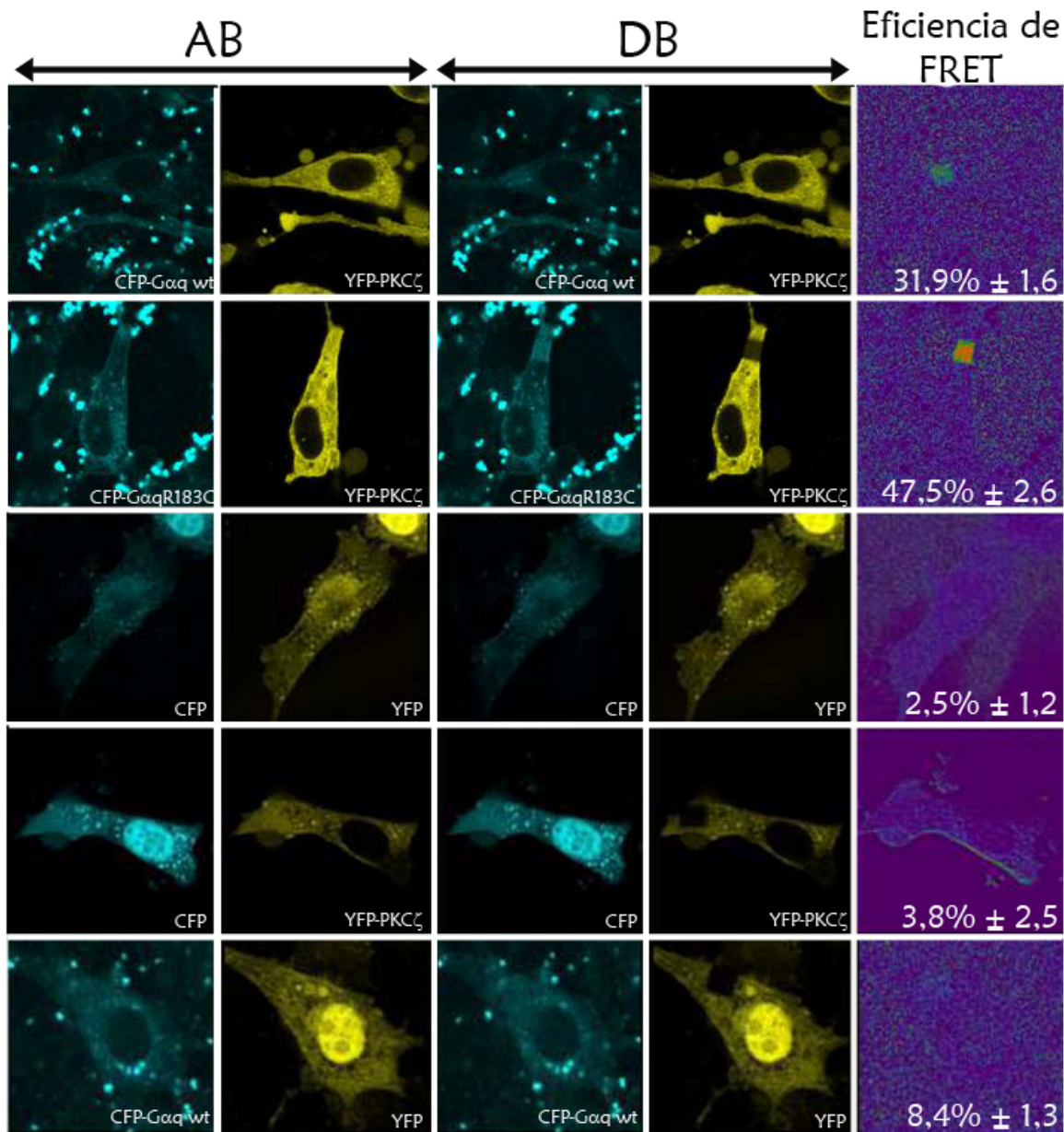


Figura R18. Eficiencia de FRET. Células NIH3T3m1 fueron transfectadas transitoriamente con los plásmidos de expresión de YFP-PKCζ, CFP-Gαq silvestre (CFP-Gαq wt), CFP-Gαq activa constitutivamente (CFP-GαqR183C), CFP o YFP, combinados como se indica en la figura. 48 horas después de la transfección se procedió con el análisis de FRET tal y como se describe en el apartado 7.2 de Materiales y Métodos. AB, antes del blanqueo, DB, después del blanqueo. Los porcentajes aquí mostrados son la media ± ESM de dos experimentos independientes.

de CFP y YFP. Así, al no interactuar entre sí, la eficiencia de FRET entre estas proteínas es menor al 3%. Por lo tanto, los resultados obtenidos mediante esta técnica son coherentes con los obtenidos mediante ensayos de coimmunoprecipitación y apoyan una vez más su relevancia fisiológica.

Sin embargo, en un tercer experimento utilizando las mismas condiciones de transfección, tanto los controles negativos como las parejas YFP-PKCζ/CFP-Gαq rindieron valores de eficiencia de FRET



cercanos al 40%. Se ha descrito que estadísticamente ocurren colisiones al azar entre los fluorocromos en las que la transferencia de energía tiene lugar, y que la probabilidad de estas colisiones aumenta con el número de moléculas presentes. Por tanto, una posible explicación de los resultados obtenidos en este tercer experimento es la dependencia que hay entre la eficiencia de FRET y los niveles de expresión de los fluorocromos. Por este motivo, en el futuro nuestro objetivo es realizar transfecciones estables con las proteínas de fusión fluorescentes, evitando así las variaciones en los niveles de expresión y posibles inespecificidades en la eficiencia de FRET.

Otro factor importante a tener en cuenta a la hora de emplear la técnica de blanqueo del aceptor es el posible artefacto descrito por Valentin y colaboradores (2005). Estos autores muestran que las moléculas de YFP pueden transformarse en especies con un pico de emisión similar al de CFP al ser blanqueadas con el láser, dando lugar a falsos positivos, proceso denominado fotoconversión. La existencia de estas especies, denominadas CFP-like, ha sido cuestionada por otros grupos (Thaler y cols. 2006). Con el fin de comprobar este posible artefacto llevamos a cabo un experimento de FRET en el que únicamente transfectamos YFP-PKC ζ . En la figura R19 se puede observar como tras el blanqueo de YFP-PKC ζ , con el láser a máxima potencia, ocurre un incremento de fluorescencia en el canal de CFP. Cabe destacar, sin embargo, que en nuestros experimentos realizamos los controles necesarios con el par CFP/YFP sin registrar señal de FRET inespecífica, por lo que la aparición de las especies CFP-like debe ser dependiente de los niveles de expresión o de algún otro factor que desconocemos hasta el momento. Recientemente, otros autores han confirmado la existencia del proceso de fotoconversión (Kirber y cols. 2007) por lo que los resultados obtenidos mediante la técnica de blanqueo del aceptor, deberán ser reevaluados. Por tanto, en el futuro planeamos realizar nuevas construcciones fusionando tanto G α q como PKC ζ con fluorocromos distintos a CFP y YFP, con las que realizar nuevos experimentos de FRET, tanto en células vivas (FRET “clásico”) como fijadas (blanqueo del aceptor) y así poder analizar la dinámica y la localización de la interacción G α q/PKC ζ .

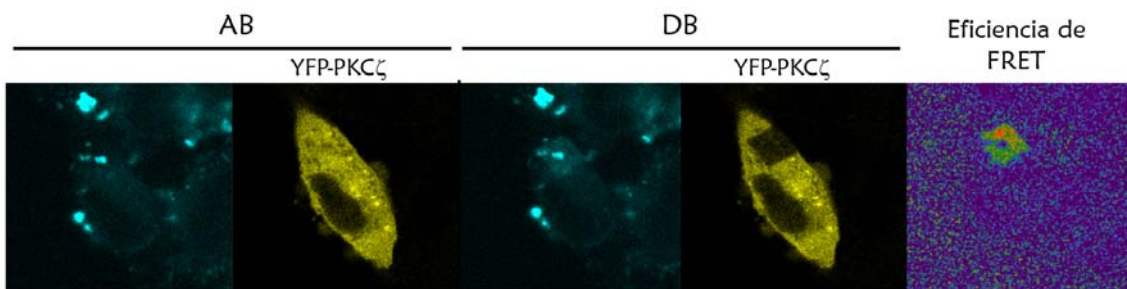


Figura R19. Efecto de la fotoconversión de YFP en especies CFP-like. Células NIH3T3m1 fueron transfectadas transitoriamente con el plásmido de expresión YFP-PKC ζ , junto con el vector vacío pcDNA3. 48 horas después de la transfección se procedió con el análisis de FRET tal y como se describe en el apartado 7.2 de Materiales y Métodos. AB, antes del blanqueo, DB, después del blanqueo.



2.7. La interacción entre $G\alpha_q$ y $PKC\zeta$ es directa.

Mediante ensayos de coimmunoprecipitación no se puede saber si las proteínas de interés están interaccionando directamente o si están formando parte de un complejo macromolecular donde terceras proteínas actuarían de puente. Con las cautelas ya discutidas en el apartado anterior, los ensayos de FRET apuntan a una posible interacción directa entre $G\alpha_q$ y $PKC\zeta$. Por tanto, para analizar si la asociación $PKC\zeta/G\alpha_q$ está mediada por proteínas intermedias, o si por el contrario es una unión directa, realizamos ensayos de interacción *in vitro* con las proteínas recombinantes purificadas His- $PKC\zeta$ y $G\alpha_q$ (Figura R20). Nuestros resultados muestran claramente que la interacción entre $G\alpha_q$ y $PKC\zeta$ puede ser directa y no requiere la presencia de proteínas intermedias.

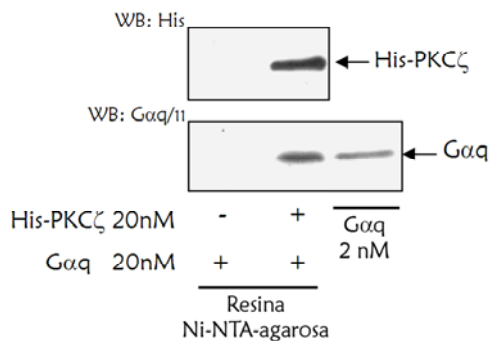


Figura R20. Las proteínas $G\alpha_q$ y $PKC\zeta$ interaccionan de manera directa. Se realizó un ensayo de interacción *in vitro* con las proteínas recombinantes purificadas His- $PKC\zeta$ y $G\alpha_q$ tal y como se detalla en el apartado 6.1 de Materiales y Métodos. La imagen es representativa de dos experimentos independientes.

3. Papel de $PKC\zeta$ en la activación de ERK5 inducida por receptores acoplados a proteínas G_q .

Hemos comprobado que distintos receptores acoplados a $G\alpha_q$ son capaces de activar a la quinasa ERK5 de manera independiente a la activación de $PLC\beta$. Por otro lado hemos mostrado como $PKC\zeta$, componente de la vía de activación de ERK5 en respuesta a EGF (Diaz-Meco y cols. 2001), interacciona directamente con $G\alpha_q$ de manera específica y en respuesta a estímulo. Estos datos inducen a considerar la posibilidad de que $PKC\zeta$ pueda ser un efector directo de $G\alpha_q$ que intervenga en la activación de ERK5 a través de GPCR acoplados a $G\alpha_q$. Así, en el siguiente bloque de resultados se investiga el papel que juega $PKC\zeta$ en la activación de ERK5 por estos receptores.



3.1. La activación de ERK5 a través de receptores acoplados a Gq es bloqueada por un inhibidor específico de PKCζ.

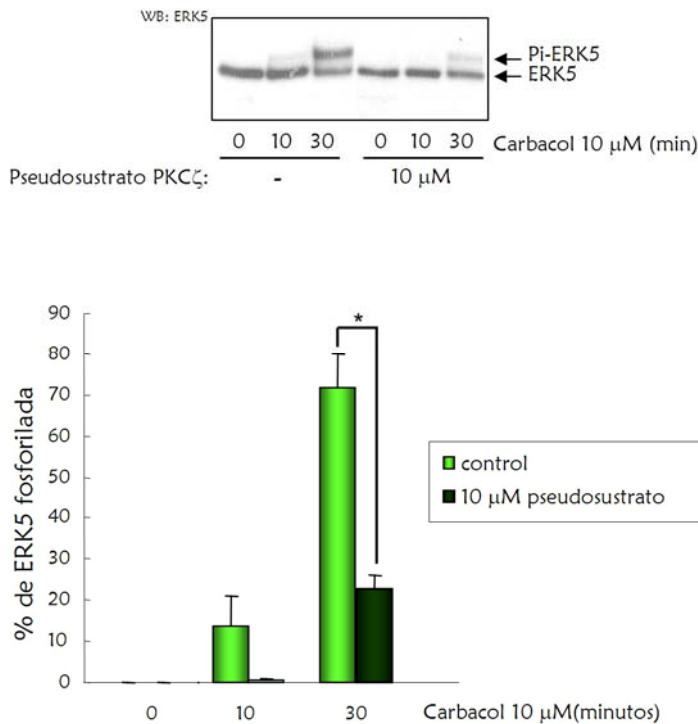


Figura R21. La presencia de un inhibidor específico de PKCζ impide la activación de ERK5 en células NIH-3T3-m1. Células NIH-3T3-m1 que expresan el receptor muscarínico humano m1, tras 6 horas de privación de suero y a una confluencia del 80% fueron tratadas con el inhibidor específico de PKCζ (pseudosustrato miristoilado de PKCζ 10μM) como se describe en el apartado 2.5 de Materiales y Métodos. A continuación fueron estimuladas con carbacol (10μM) a distintos tiempos. Los lisados fueron obtenidos mediante homogeneización con el tampón recomendado por la casa comercial del anticuerpo anti ERK5 como se describe en el apartado 4.3 de Materiales y Métodos. El análisis por “western blot” (apartado 4.1 de Materiales y Métodos) muestra un cambio en la movilidad de ERK5 debido a su hiperfosforilación en respuesta a estímulo. El porcentaje de proteína ERK5 fosforilada frente a la proteína total se cuantificó por densitometría y se ha representado en diagrama de barras. Los datos recogidos en la gráfica son media ±ESM de tres experimentos independientes. * p<0,005 prueba t de student bilateral.

Está descrito que todos los isotipos de PKC presentan un dominio pseudosustrato que puede interactuar con el centro activo de la quinasa manteniéndola en una conformación inactiva. Este dominio pseudosustrato libera al centro activo cuando la PKC interactúa con determinados componentes de la membrana celular (Hirai y Chida, 2003). Los dominios pseudosustrato de cada isotipo de PKC presentan ciertas variaciones en su secuencia, por lo que un péptido sintético con la secuencia del dominio pseudosustrato de PKCζ inhibirá específicamente a esta quinasa (Standaert y cols. 1997).

En la figura R21 se muestra como el tratamiento con el péptido pseudosustrato de PKCζ, en células

NIH3T3m1, induce una clara disminución en la activación de ERK5 en respuesta a carbacol. Así, a los diez minutos de tratamiento con carbacol, prácticamente no se observa la fosforilación de ERK5, mientras que en las células no tratadas con el inhibidor, un 13% de ERK5 se encuentra fosforilada. Tras treinta minutos de tratamiento con carbacol, el porcentaje de ERK5 fosforilada se ve reducido de un 70% a un 20% en presencia del pseudosustrato. Resultados similares fueron obtenidos con el agonista

angiotensina II en cultivo primario de cardiomiocitos (datos no mostrados). Estos resultados confirman que la actividad de PKC ζ es crítica para la activación de ERK5 en respuesta a carbacol.

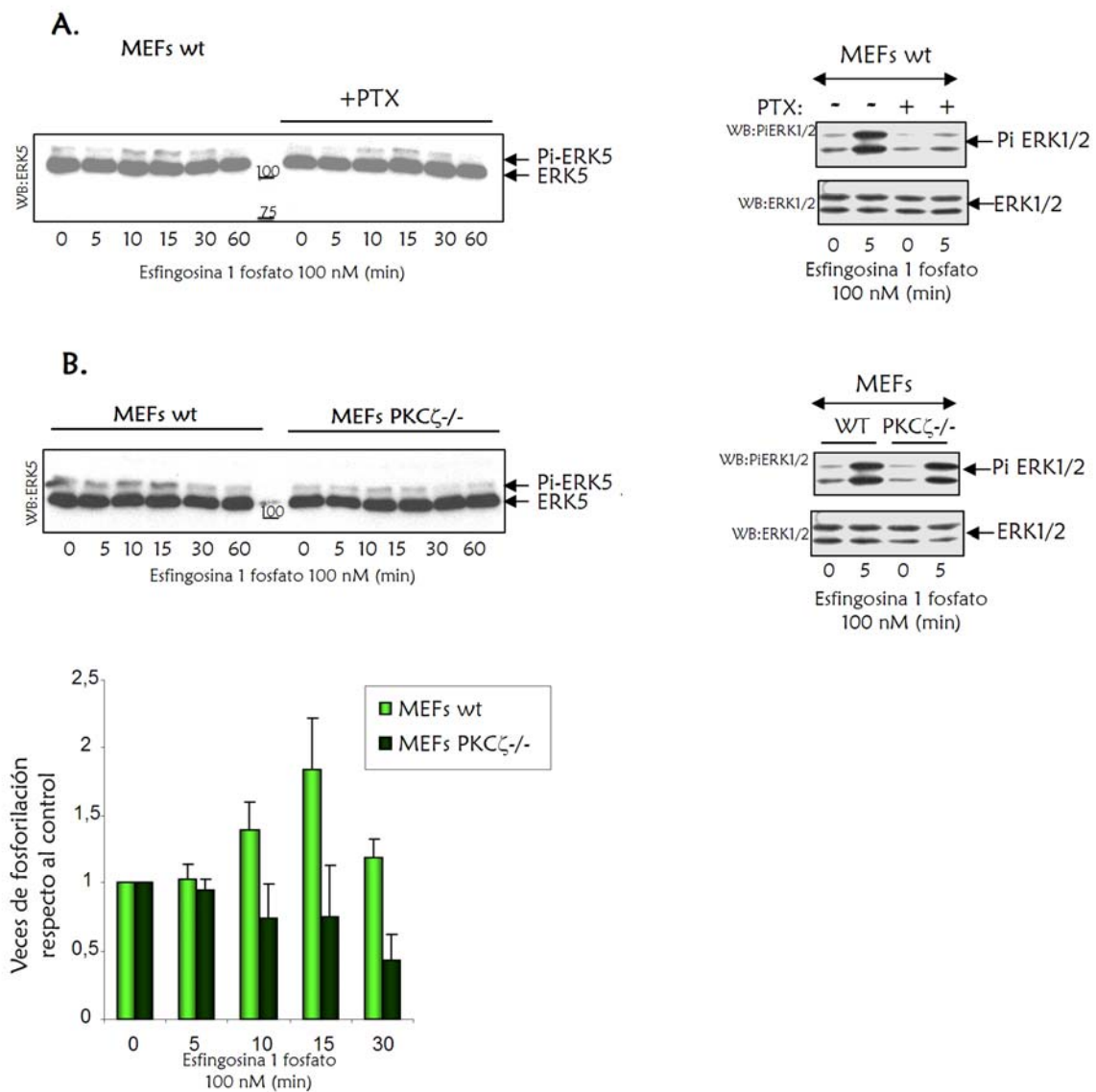


Figura R22. La activación de ERK5 por el receptor de esfingosina 1 fosfato (SP₁₂ y SP₁₃) no tiene lugar en células deficientes en PKC ζ . **A.** Con el fin de comprobar que el tratamiento con esfingosina 1 fosfato induce la activación de ERK5, fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs wt) fueron deprivados de suero durante 24 horas, para su posterior estimulación con esfingosina 1 fosfato. El análisis del estado de fosforilación de la quinasa ERK5 se llevó a cabo como se describe en la figura R1. Paralelamente, para descartar la implicación de proteínas de la subfamilia G α i, las células fueron tratadas con toxina pertúsica (PTX 100ng/ml, apartado 2.5 de Materiales y Métodos) antes de ser estimuladas con esfingosina 1 fosfato. Se analizó también el estado de fosforilación de las quinasas ERK1/2 (apartado 4 de Materiales y Métodos) en las distintas condiciones experimentales. **B.** Fibroblastos embrionarios extraídos de ratones deficientes en PKC ζ (MEFs PKC ζ ^{-/-}) fueron estimulados de la misma forma que se describe en A. El diagrama de barras representa el grado de activación referido en el nivel de activación en estado basal cuantificado por densitometría (la cantidad de ERK5 fosforilada está normalizada en función de la cantidad de ERK5 total). Mientras que la estimulación de ERK5 está ausente en células deficientes en PKC ζ , el análisis del estado de fosforilación de ERK1/2 muestra que la activación de estas quinasa inducida por esfingosina-1-fosfato es independiente de PKC ζ .



3.2. La activación de ERK5 a través de receptores acoplados a Gq se encuentra bloqueada en células deficientes en PKC ζ .

Los resultados anteriores sugieren que la presencia de PKC ζ podría ser determinante para la activación de la ruta de ERK5 a través de GPCRs. Para confirmar este resultado utilizamos fibroblastos embrionarios extraídos de ratones deficientes en PKC ζ (MEFs PKC ζ ^{-/-}). Tanto en fibroblastos silvestres, MEFs wt, como en MEFs PKC ζ ^{-/-} no se observa activación de ERK5 en respuesta a carbacol (resultados no mostrados). Esta ausencia de respuesta puede ser debida a los niveles de expresión de receptores muscarínicos en estas células, por lo que decidimos probar otros agonistas de GPCRs. Se ha descrito que las células MEFs expresan los cinco receptores de esfingosina-1-fosfato (S1P) (Spiegel y Milstien, 2003). Todos estos GPCRs (S1P₁-S1P₅) pueden acoplarse a G α i, mientras que S1P₂, S1P₃, S1P₄ y S1P₅ también pueden acoplarse a G α 12 y tanto S1P₂ como S1P₃ pueden acoplarse a G α q (Hait y cols. 2006). Pudimos comprobar que el tratamiento con S1P en MEFs wt induce una activación de ERK5 evidente a los 10 minutos. Además, la presencia de toxina pertúsica (PTX) no afecta esta activación ni su curso temporal, por lo que podemos descartar la participación de proteínas Gi en esta ruta (Figura R22A). Sin embargo,

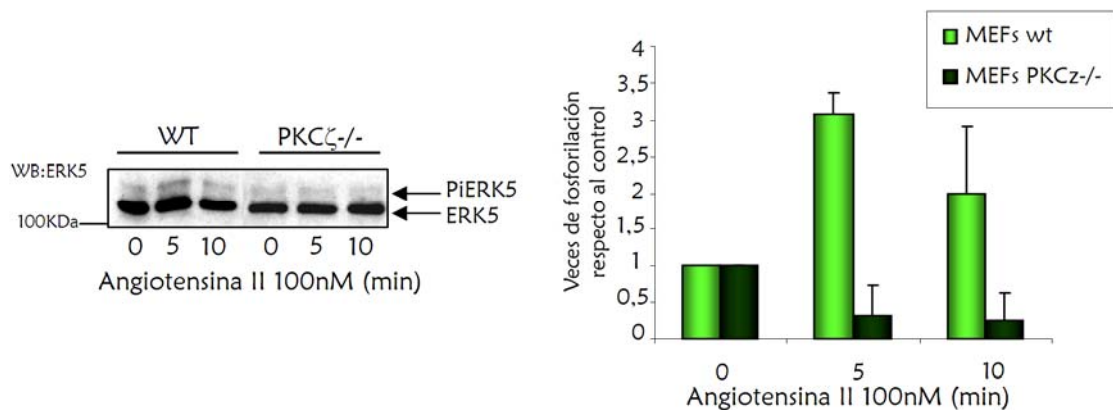


Figura R23. La activación de ERK5 por angiotensina II está bloqueada en cardiomiocitos deficientes en PKC ζ . Con el fin de determinar el papel que juega PKC ζ en la activación de ERK5 mediada por el receptor de Angiotensina II, se llevó a cabo un cultivo primario de cardiomiocitos neonatales (apartado 2.2.2 de Materiales y Métodos) empleando ratones de la cepa SV129J tanto silvestres (wt) como deficientes en PKC ζ (PKC ζ ^{-/-}). 48 horas después a la extracción, las células fueron privadas de suero durante 6 horas para su posterior estimulación con angiotensina II (100nM) durante distintos periodos de tiempo. Los lisados fueron obtenidos de la misma forma que se describe en la figura R1, así como el análisis por “western blot”. El diagrama de barras representa el grado de activación referido al nivel de activación en estado basal cuantificado por densitometría (la cantidad de ERK5 fosforilada está normalizada en función de la cantidad de ERK5 total). Los datos recogidos en la gráfica son media \pm ESM de tres experimentos independientes.

la fosforilación de ERK1/2 en respuesta a S1P parece llevarse a cabo por una ruta de señalización distinta a la de la activación de ERK5, ya que la presencia de toxina pertúsica sí bloquea la activación de ERK1/2. Muy llamativamente, en MEFs PKC ζ ^{-/-} no se observa activación de ERK5 en respuesta a S1P

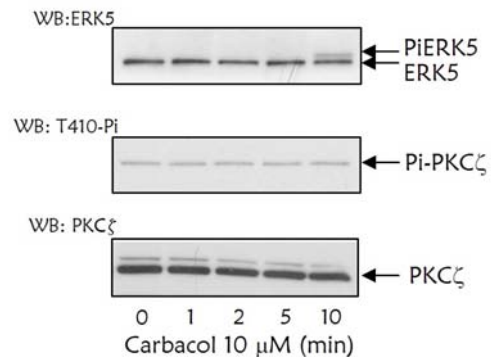


(Figura R22B) mientras que la ausencia de PKC ζ no parece tener ningún efecto en la activación de ERK1/2.

En concordancia con estos datos, la deficiencia en PKC ζ también bloquea la activación de ERK5 en respuesta a angiotensina II. Así, el tratamiento con este agonista no induce fosforilación de ERK5 en un cultivo primario de cardiomiocitos extraídos de ratones deficientes en PKC ζ (Figura R23). Todos estos resultados apuntan de forma clara hacia un papel crítico de PKC ζ en la activación de ERK5 a través de receptores acoplados a G α q en distintos tipos celulares.

4. Estudio de los mecanismos de activación implicados en la vía G α q/PKC ζ /ERK5.

Hasta el momento, hemos comprobado que la actividad de G α q es suficiente para iniciar la vía de activación de ERK5. Además, no parece que haya tirosina quinasa citosólicas, implicadas ni mecanismos de transactivación de receptores con actividad tirosina quinasa. A su vez, el estímulo con carbacol, además de inducir la activación de ERK5, provoca un incremento en la interacción entre G α q y PKC ζ . Por último, comprobamos que es necesaria la presencia de PKC ζ y su actividad para la estimulación de ERK5 por GPCRs acoplados a Gq, ya que en células deficientes en PKC ζ o tratadas con un inhibidor específico de ésta quinasa, la activación de ERK5 se encuentra bloqueada. En este punto, consideramos de interés valorar qué mecanismos podrían estar mediando en la activación de ERK5 estimulada por receptores acoplados a Gq.



4.1. Estado de activación de PKC ζ en respuesta a carbacol.

Como se ha comentado en la Introducción, la activación de PKC ζ depende de varios procesos. Por un lado es necesario el reclutamiento de PKC ζ a la membrana celular, donde puede interactuar con distintos lípidos (fosfatidilinositol (PI), ácido fosfatídico, ácido araquidónico, ceramidas y fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP $_3$)), que provocan

Figura R24. Estado de fosforilación de PKC ζ en su treonina 410 en respuesta a carbacol. Células NIH-3T3-m1 que expresan el receptor muscarínico humano m1(Ach)R, tras 6 horas de privación de suero, fueron estimuladas con carbacol (10 μ M) a distintos tiempos. Los lisados fueron obtenidos y analizados por "western blot" tal y como se describe en el apartado 4 de Materiales y Métodos. En la figura se muestra como a los 10 minutos de tratamiento se observa un cambio en la movilidad de ERK5 debido a su hiperfosforilación en respuesta a estímulo, mientras que la fosforilación de la treonina 410 de PKC ζ no varía. La imagen corresponde a un experimento representativo de tres independientes.



un cambio de conformación en la estructura de PKC ζ , consiguiendo que el dominio pseudosustrato libere al centro activo de la quinasa. Por otro lado, es necesario que PKC ζ sea fosforilada por PDK1 en su treonina 410. Presumiblemente, esta fosforilación provoca cambios en el dominio catalítico que exponen una segunda treonina fosforilable, la treonina 560. De este modo, ambas fosforilaciones son necesarias para la activación de PKC ζ (Hiray y Chida, 2003).

Se ha descrito que cada isotipo de PKC es dirigido a un compartimento celular concreto a través de la interacción con proteínas específicas. Por ejemplo, PKC ζ interacciona con p62, proteína andamio que conecta a PKC ζ con distintos complejos de señalización como el receptor de TNF α o el de IL-1 (Diaz-Meco y cols., 2000). Nuestros resultados indican que G α q interacciona de manera directa con PKC ζ y las dos proteínas colocalizan en membrana, por lo que podríamos considerar que G α q tiene una función similar a la de p62, manteniendo a PKC ζ en un compartimento adecuado para la activación de ERK5. A su vez, G α q podría inducir una activación en PKC ζ a través de la activación de

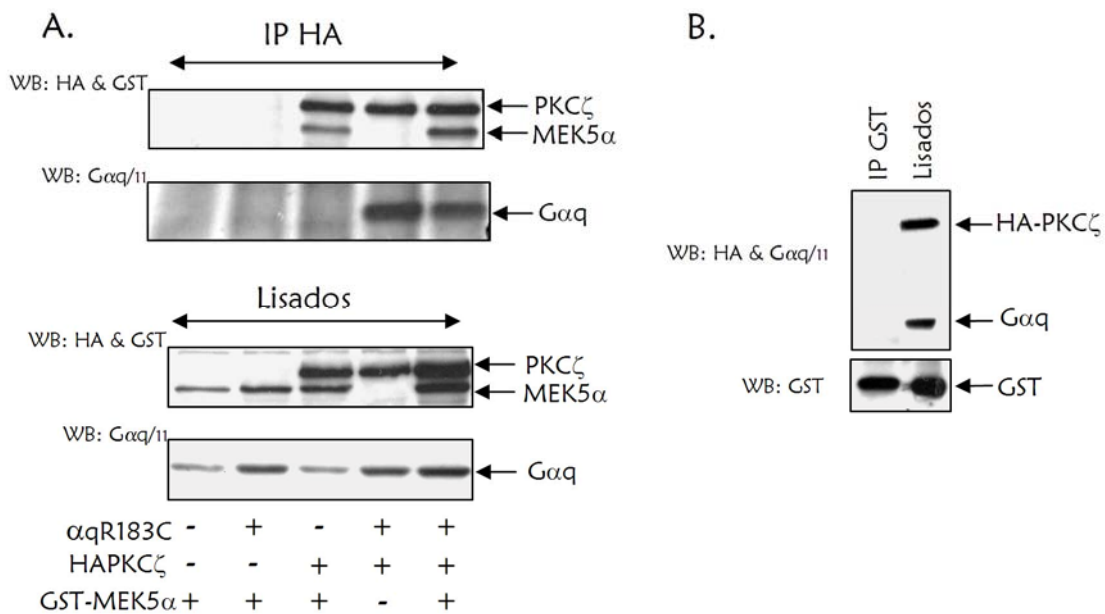


Figura R25. PKC ζ , G α q y MEK5 α pueden estar presentes en el mismo complejo macromolecular. **A.** Células Cos-7 fueron transfectadas transitoriamente con las combinaciones indicadas de plásmidos de expresión de G α qR183C, HA-PKC ζ y GST-MEK5 α . 48 horas después de la transfección las células fueron homogeneizadas con el tampón de lisis RIPA (apartado 4.2 de Materiales y Métodos). Los lisados fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo HA (12CA5) y la presencia de proteínas en los inmunocomplejos, así como su sobreexpresión en lisados fue analizada como se describe en el apartado 4 de Materiales y Métodos. **B.** Células Cos-7 fueron transfectadas con los plásmidos de expresión de G α q, HA-PKC ζ y GST. Con el fin de comprobar que la asociación con GST-MEK5 α no es debida a la presencia de la proteína GST, los lisados fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo GST (Z5) y la presencia de proteínas en los inmunocomplejos, así como su sobreexpresión fue analizada como se describe en el apartado 4 de Materiales y Métodos. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes.

PI3K (Dorn y Force, 2005) provocando la generación de PIP₃, que además de activar a PDK1, también induce la salida del pseudosustrato del centro activo de PKC ζ (Hirai y Chida, 2003). Así, G α q podría estar encargándose de iniciar todos los mecanismos necesarios para activar a PKC ζ .

Con el fin de comprobar si la activación de GPCRs acoplados a Gq modifican el estado de fosforilación de la treonina 410 de PKC ζ , analizamos los niveles de este fosfo-epítipo en respuesta a carbacol en células NIH3T3m1, sin que se observaran variaciones significativas (Figura R24). Una posible explicación de estos resultados podría ser que la fosforilación por PDK1 dependa de otras señales que la mantengan de una manera constitutiva en estas células. Estos resultados sugieren que, más que promover la fosforilación de PKC ζ , la función de G α q sería la de actuar como proteína andamio, conectando PKC ζ con otros factores necesarios para su completa activación, así como, posiblemente con otros componentes de la vía de activación de ERK5.

4.2. PKC ζ , G α q y MEK5 α están presentes en el mismo complejo macromolecular.

PKC ζ forma parte de la vía de activación de ERK5 en respuesta a EGF (Diaz-Meco y cols. 2001). Este estímulo induce una asociación entre PKC ζ y MEK5 α , que es necesaria para la activación de ERK5, en células EBNA293. La inhibición de la interacción PKC ζ /MEK5 α , mediante la expresión independiente del dominio PB1 de PKC ζ , bloquea totalmente la activación de ERK5 en respuesta a EGF. Se ha descrito que PKC ζ y MEK5 α interaccionan a través de sus dominios PB1, por lo que la expresión del dominio PB1 de PKC ζ sirve para “quelar” a MEK5 α y de esta forma bloquear la activación de ERK5.

Puesto que PKC ζ es capaz de interaccionar con G α q y con MEK5 α , y ambas interacciones son importantes para la activación de ERK5, quisimos comprobar si

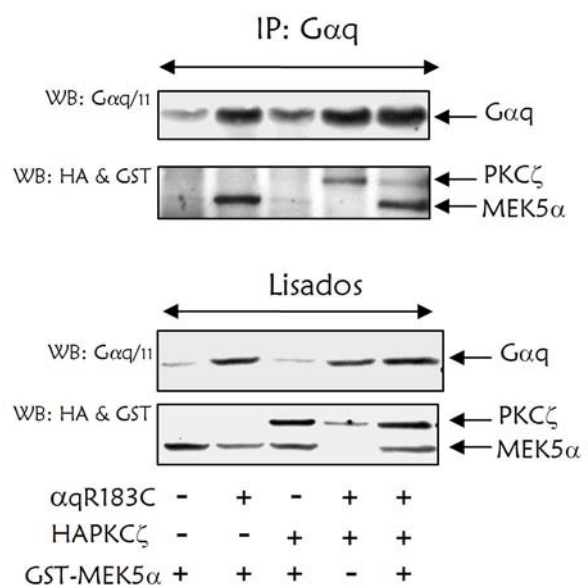


Figura R26. G α q es capaz de asociarse tanto a MEK5 α como a PKC ζ . Células Cos-7 fueron transfectadas transitoriamente con las combinaciones indicadas de plásmidos de expresión de G α qR183C, HA-PKC ζ y GST-MEK5 α . 48 horas después de la transfección las células fueron homogeneizadas con el tampón de lisis RIPA (apartado 4.2 de Materiales y Métodos). Los lisados fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo G α q (C19), y la presencia de proteínas en los inmunocomplejos, así como su sobreexpresión en los lisados fue analizada como se describe en el apartado 4 de Materiales y Métodos. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes.



$G\alpha_q$ y $MEK5\alpha$ compiten por unirse a $PKC\zeta$ o si, por el contrario, estas tres proteínas están presentes en el mismo complejo macromolecular. En la figura R25 mostramos, como era de esperar, que tanto $MEK5\alpha$ como $G\alpha_q$ coimmunoprecipitan con $PKC\zeta$. Además, cuando las tres proteínas están sobreexpresadas conjuntamente, no se aprecia una reducción significativa de la cantidad de $MEK5\alpha$ o de $G\alpha_q$ presente en los inmunocomplejos de $PKC\zeta$, lo cual indicaría que no existe competencia directa por su unión con $PKC\zeta$ y que estas tres proteínas pueden estar presentes en el mismo complejo macromolecular. Por otra parte, llevamos a cabo el mismo experimento pero esta vez utilizando un anticuerpo específico para $G\alpha_q$. Sorprendentemente, pudimos observar que $MEK5\alpha$ era capaz de coimmunoprecipitar con $G\alpha_q$ en ausencia de sobreexpresión de $PKC\zeta$ y, además, cuando las tres proteínas estaban sobreexpresadas, la cantidad de $PKC\zeta$ en los inmunocomplejos de $G\alpha_q$ se veía reducida, mientras que la de $MEK5\alpha$ permanecía constante (Figura R26). Estos datos apuntan a que las tres proteínas pueden interactuar entre sí, apoyando la idea de que $G\alpha_q$ podría actuar como proteína andamio, facilitando la conexión entre $PKC\zeta$ y $MEK5\alpha$ y favoreciendo la activación de la vía.

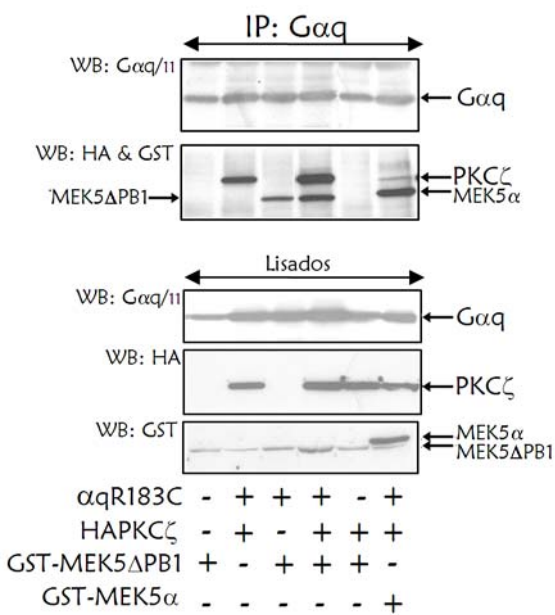


Figura R27. El dominio PB1 de $MEK5\alpha$ no participa en la asociación con $G\alpha_q$. Células Cos-7 fueron transfectadas transitoriamente con las combinaciones indicadas de plásmidos de expresión de $G\alpha_qR183C$, HA- $PKC\zeta$, GST- $MEK5\alpha$ y GST- $MEK5\alpha\Delta$ PB1. 48 horas después de la transfección las células fueron homogeneizadas con el tampón de lisis RIPA. Los lisados fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo $G\alpha_q$ (C19), y la presencia de proteínas en los inmunocomplejos, así como su sobreexpresión en lisados fue analizada como se describe en el apartado 4 de Materiales y Métodos. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes.

4.3. $MEK5\alpha$ y $G\alpha_q$ se asocian de forma independiente de $PKC\zeta$ y del dominio PB1 de $MEK5\alpha$.

El hecho de que $G\alpha_q$ coimmunoprecipite con $MEK5\alpha$ en ausencia de $PKC\zeta$ sobreexpresada sugería que ambas proteínas podrían asociarse de forma directa, pero no descartaba que $PKC\zeta$ endógena pudiera hacer de “puente” entre ambas proteínas. A través de su dominio PB1, $MEK5\alpha$ es capaz de interactuar tanto con sus activadores, $PKC\zeta$ y $MEK2$, como con su sustrato ERK5 (Diaz-Meco y cols. 2001; Seyfried y cols. 2005). Con el fin de comprobar si este dominio también participa en su asociación con $G\alpha_q$, llevamos a cabo ensayos de inmunoprecipitación similares a los del apartado anterior, utilizando un mutante de delección de $MEK5\alpha$, en el que el dominio PB1 ha sido eliminado ($MEK5\alpha\Delta$ PB1), por lo que es incapaz de asociarse con $PKC\zeta$ (Diaz-Meco y cols. 2001).

Nuestros resultados indican claramente que el dominio PB1 de MEK5 α no participa en la interacción con G α q, ya que el mutante de delección MEK5 α - Δ PB1 coimmunoprecipita igualmente con G α q (Figura R27). Este resultado sugiere también que la unión de G α q a MEK5 α podría ser directa y no debida a un efecto puente de PKC ζ endógena. Además, un dato interesante es que, al contrario que lo que sucede con la proteína MEK5 α completa, este mutante no desplaza a PKC ζ de su interacción con G α q. Una posible explicación, que habrá que analizar con más detalle, es que cuando MEK5 α y PKC ζ se encuentran próximas, gracias al papel que ejerce G α q como proteína andamio, interaccionan entre sí, iniciándose los mecanismos necesarios para la activación de ERK5, lo que tiene como consecuencia la ruptura de la interacción G α q/PKC ζ . En cambio, cuando MEK5 α carece del dominio PB1, no puede interaccionar con PKC ζ por lo que no se iniciarán los mecanismos de activación de ERK5, pudiendo permanecer las tres proteínas unidas. En este contexto, con el fin de verificar la posibilidad de que MEK5 α y G α q se asociaban directamente se realizaron experimentos de interacción *in vitro* con proteínas purificadas, confirmándose la existencia de una interacción directa entre ambas moléculas (Figura R28).

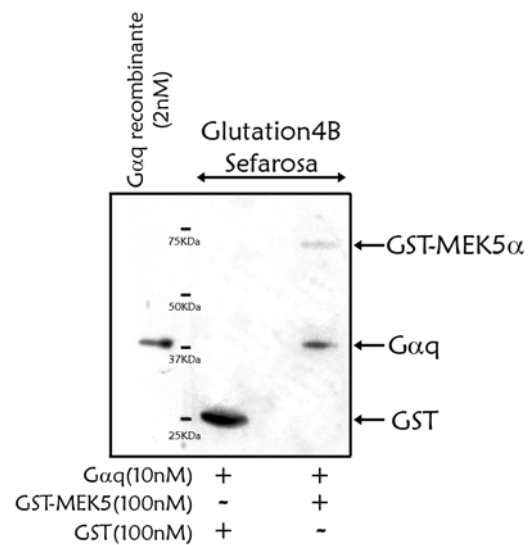


Figura R28. Las proteínas G α q y MEK5 α interaccionan de manera directa *in vitro*. Se realizó un ensayo de interacción *in vitro* con las proteínas recombinantes purificadas GST-MEK5 α y G α q tal y como se detalla en el apartado 6.2 de Materiales y Métodos. G α q se retiene en presencia de GST-MEK5 α y no de GST.

4.4. Caracterización de la interfase de interacción entre G α q y PKC ζ .

Como se ha descrito en la Introducción, la familia de quinasas GRK es la encargada de regular la señalización de los GPCRs. Tras la llegada del agonista, el receptor se vuelve susceptible de ser fosforilado por las GRKs. Como consecuencia de esta fosforilación tiene lugar el desacoplamiento con las proteínas G (desensibilización) y se inician los mecanismos de internalización. Por otro lado, las isoformas GRK2 y GRK3 son capaces de interaccionar con los dímeros $\beta\gamma$. Esta interacción tiene dos objetivos, reclutar a las GRKs a las proximidades del receptor, dónde pueden ejercer su actividad quinasa, y regular la señalización mediada por $\beta\gamma$, ya que la unión con las GRKs impide que dichas subunidades accedan a sus efectores (Koch y cols. 1994; Bunemann y Hosey, 1998; Viard y cols. 1999).

En los últimos diez años, se ha caracterizado la capacidad que tienen tanto GRK2 como GRK3 de interaccionar con subunidades G α q a través de un dominio de homología RGS, que estas quinasas

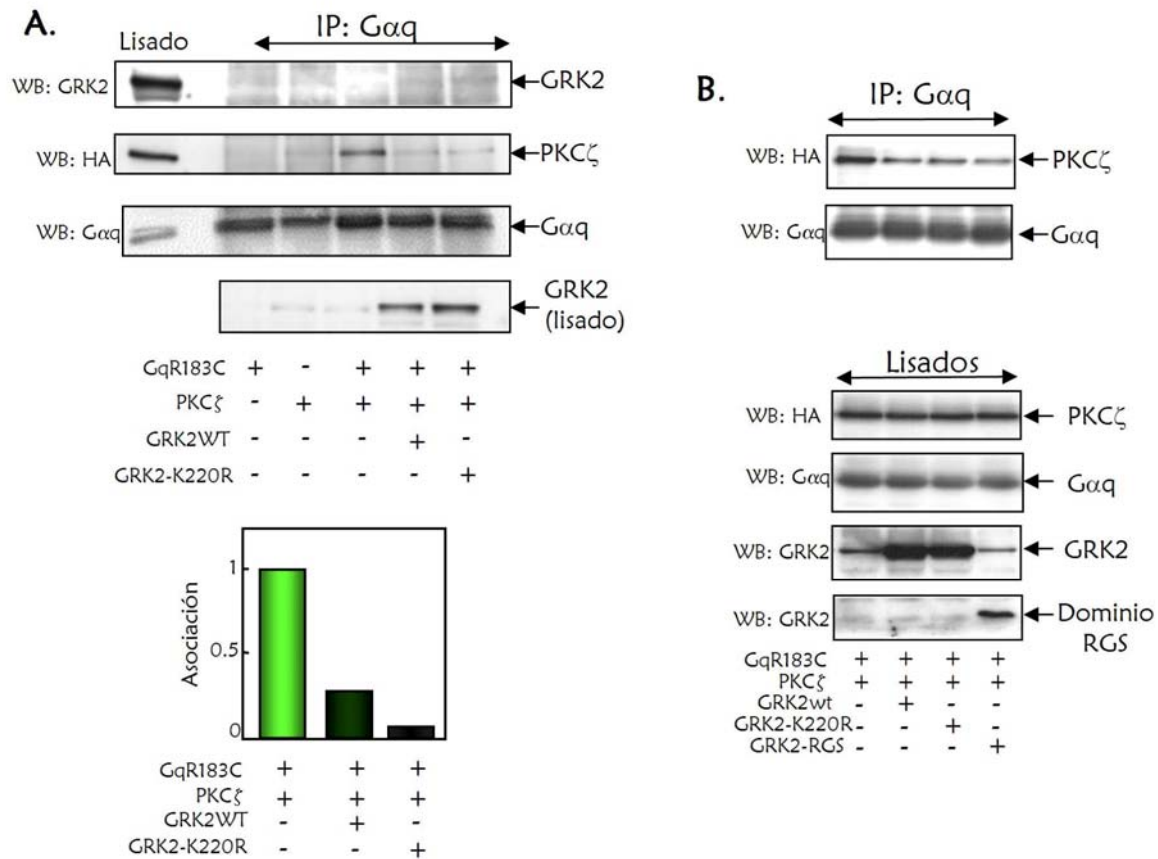


Figura R29. El dominio de homología a RGS de GRK2 es suficiente para interactuar con Gαq y desplazar a PKCζ. A. Células Cos-7 fueron transfectadas transitoriamente con los plásmidos de expresión de GαqR183C y HA-PKCζ junto con GRK2 silvestre o el mutante deficiente en actividad quinasa GRK2-K220. 48 horas después de la transfección las células fueron homogeneizadas con el tampón de lisis RIPA (apartado 4.2 de Materiales y Métodos). Los lisados fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo Gαq/11 (C19) y la presencia de proteínas en los inmunocomplejos, así como su sobreexpresión en lisados fue analizada como se describe en el apartado 4 de Materiales y Métodos. Los resultados se normalizaron por la cantidad de Gαq total inmunoprecipitada en cada caso, y la asociación entre Gαq y PKCζ en ausencia de sobreexpresión de GRK2 se tomó como condición basal. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes. B. Las células fueron manipuladas como en A pero además se transfectó el dominio de homología a RGS de GRK2. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes.

presentan en su mitad N-terminal (Carman y cols. 1999), conocido como dominio RH (Ribas y cols. 2007). Esta interacción tiene como función secuestrar a las subunidades Gαq impidiendo que accedan a sus efectores como PLCβ (Ribas y cols. 2007). A pesar de que dicha interacción se produce a través del dominio RH de las GRKs, no parece que estas quinasas tengan ningún efecto sobre la actividad GTPasa de la subunidad Gαq. Además, se ha descrito que el sitio de Gαq al que se unen las GRKs, que está más próximo al sitio de unión con PLCβ (Tesmer y cols. 2005), es distinto al que se unen las proteínas RGS “clásicas” de Gαq (RGS2 y RGS4). De esta manera, GRK2 se une a Gαq de forma parecida a como lo hacen otros efectores.



Los datos obtenidos hasta el momento presentan a PKC ζ como un posible nuevo efector de G α q. Por tanto, era de interés analizar si GRK2 era capaz de modular la interacción G α q/PKC ζ , como lo hace con la interacción G α q/PLC β . Para ello, realizamos ensayos de coimmunoprecipitación, donde pudimos comprobar que la presencia de GRK2 podía desplazar a PKC ζ de su interacción con G α q (figura R29A). Además, este efecto era independiente de la actividad quinasa de GRK2, ya que un mutante deficiente en dicha actividad (GRK2-K220R) provoca un desplazamiento similar. Por último, comprobamos que el dominio RH de GRK2 era suficiente para inhibir la interacción G α q/PKC ζ (Figura R29B).

Para verificar la especificidad de este efecto, se utilizó un mutante puntual de GRK2 (GRK2-D110A) que ha perdido la capacidad de interactuar con G α q (Sterne-Marr y cols. 2003). Efectivamente, dicho mutante no desplaza a PKC ζ de su interacción con G α q (Figura R30). Estos resultados confirman que el efecto inhibitorio de GRK2 es debido a que esta quinasa es capaz de interactuar con G α q

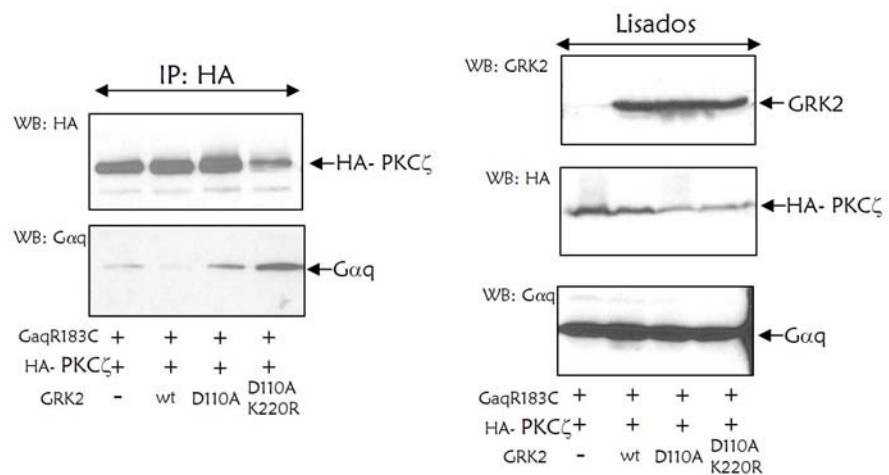


Figura R30. Un mutante de GRK2 deficiente en su interacción con G α q no inhibe la asociación G α q/PKC ζ . Células Cos-7 fueron transfectadas transitoriamente con los plásmidos de expresión de G α qR183C y HA-PKC ζ junto con GRK2 silvestre (wt), un mutante deficiente en su interacción con G α q (GRK2-D110A) o un mutante sin actividad quinasa y deficiente en su interacción con G α q (GRK2-D110AK220R). 48 horas después de la transfección las células fueron homogeneizadas con el tampón de lisis RIPA (apartado 4.2 de Materiales y Métodos). Los lisados fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo HA (12CA5) y la presencia de proteínas en los inmunocomplejos, así como su sobreexpresión en los lisados fue analizada como se describe en el apartado 4 de Materiales y Métodos. Se muestra una imagen representativa de dos experimentos independientes.

y secuestrarla, impidiendo así la interacción entre G α q y PKC ζ .

Como hemos demostrado en los apartados 4.2 y 4.3, G α q también es capaz de interactuar de forma directa con MEK5 α . Por tanto, nos propusimos comprobar si GRK2 ejercía un efecto inhibitorio similar al detectado para la interacción entre G α q y PKC ζ . De nuevo, mediante ensayos de coimmunoprecipitación pudimos comprobar que GRK2 es capaz de desplazar tanto a MEK5 α como al mutante de delección MEK5 α - Δ PB1 de su interacción con G α q (Figura R31). Por tanto, parece que



GRK2 puede también desempeñar un papel regulador sobre la señal de $G\alpha_q$ promovida por esta nueva ruta de señalización mediada por $PKC\zeta$ y $MEK5\alpha$.

Seguidamente investigamos si esta atenuación de la interacción entre $G\alpha_q$ y $PKC\zeta$ por la presencia de GRK2 tenía consecuencias en la señalización desde $G\alpha_q$ hasta ERK5. Sobreexpresamos en células NIH3T3-m1 la subunidad $G\alpha_qR183C$, la cual hemos comprobado que induce activación de ERK5 (Figura R7), junto con distintas formas de GRK2: la forma silvestre (GRK2wt), el mutante que carece de actividad quinasa (GRK2-K220R), el mutante deficiente en su interacción con $G\alpha_q$ (GRK2-D110A) o el doble mutante (GRK2-D110A-K220R). Posteriormente llevamos a cabo la detección de ERK5 fosforilada mediante “western blot” del mismo modo que en experimentos anteriores. En la figura R32 se muestra, de forma coherente con los datos de asociación, que el nivel de fosforilación de ERK5 inducido por $G\alpha_qR183C$ se ve claramente reducido cuando se cotransfecta GRK2wt o GRK2-K220R. Cabe destacar que al utilizar un sistema de transfección transitoria, el efecto inhibitorio de GRK2 varía de un

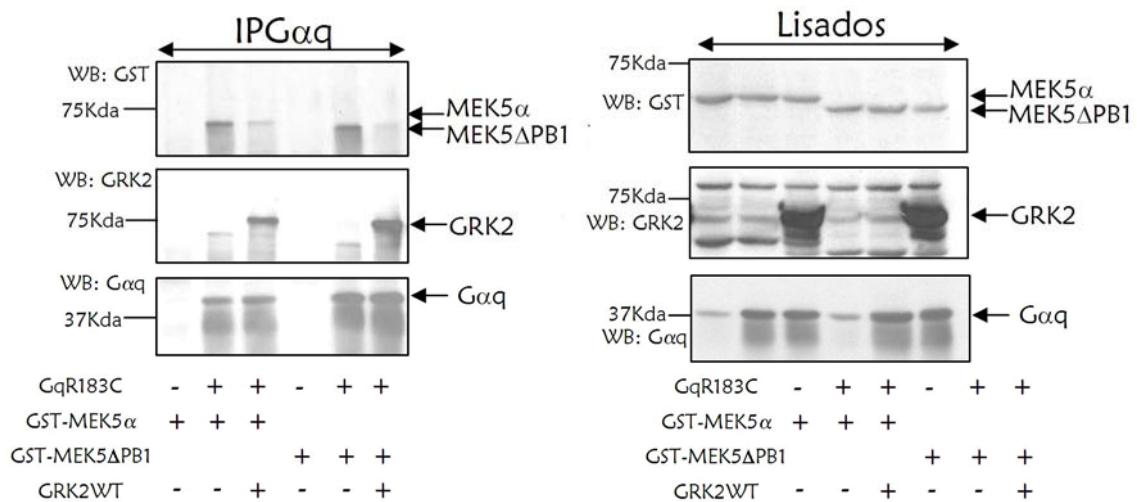


Figura R31. GRK2 interacciona con $G\alpha_q$ y desplaza tanto a $MEK5\alpha$ como a $MEK5\alpha\Delta PB1$. A. Células Cos-7 fueron transfectadas transitoriamente con los plásmidos de expresión de $G\alpha_qR183C$, GST-MEK5 α , GST-MEK5 $\alpha\Delta PB1$ y GRK2 silvestre. 48 horas después de la transfección las células fueron homogeneizadas con el tampón de lisis RIPA (apartado 4.2 de Materiales y Métodos). Los lisados fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo $G\alpha_q/11$ (C19) y la presencia de proteínas en los inmunocomplejos, así como su sobreexpresión en los lisados fue analizada como se describe en el apartado 4 de Materiales y Métodos. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes.

experimento a otro, en función de los niveles de expresión obtenidos, pero el efecto es reproducible, es decir, el nivel de activación de ERK5 en presencia de GRK2 siempre es menor que cuando esta quinasa no está transfectada. La inhibición ejercida por GRK2 es consecuencia de su capacidad de interactuar con $G\alpha_q$, impidiendo que ésta acceda tanto a $PKC\zeta$ como a $MEK5\alpha$, ya que la expresión de los mutantes deficientes en su interacción con $G\alpha_q$ (GRK2-D110A y GRK2-D110A-K220R) no disminuyen los niveles de ERK5 fosforilada. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la interacción de $G\alpha_q$ con

componentes de la ruta de señalización conduce finalmente a la activación de ERK5 en respuesta a agonistas de receptores acoplados a $G\alpha_q$. Por tanto, podemos sugerir que en la célula, GRK2 ejerce un papel fundamental en la regulación de las distintas señales iniciadas por receptores acoplados a proteínas $G\alpha_q$.

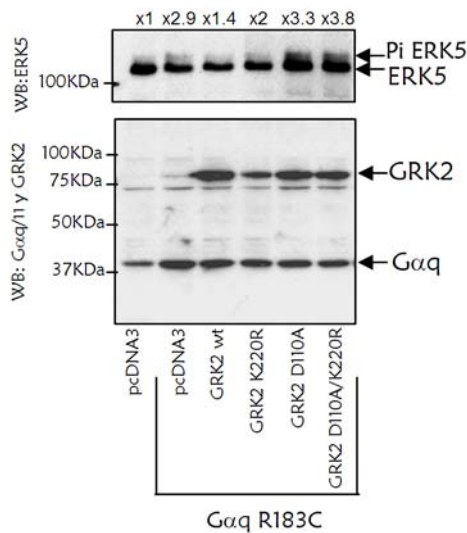


Figura R32. GRK2 inhibe la activación de ERK5 inducida por $G\alpha_qR183C$ de forma independiente a su actividad quinasa y dependiente de su capacidad de interaccionar con $G\alpha_q$. Células NIH-3T3ml fueron transfectadas transitoriamente con los plásmidos de expresión de $G\alpha_qR183C$ junto con GRK2 silvestre, el mutante deficiente en actividad quinasa GRK2-K220R, el mutante incapaz de interaccionar con $G\alpha_q$ GRK2-D110A o el doble mutante GRK2-K220R/D110A. 48 horas después de la transfección, con el fin de analizar la activación de ERK5, las células fueron lisadas de la misma forma que se describe en la figura R1. La activación de ERK5 inducida por $G\alpha_qR183C$ se ve claramente reducida en presencia de GRK2, tanto silvestre como la forma sin actividad quinasa, mientras que formas de GRK2 incapaces de interaccionar con $G\alpha_q$ no ejercen este efecto. La imagen corresponde a un experimento representativo de tres independientes.

Basándonos en el hecho de que PKC ζ se une preferentemente al estado activado de $G\alpha_q$ y que la presencia de GRK2 impide esta unión, nos planteamos la hipótesis de que PKC ζ podría unirse a $G\alpha_q$ de forma similar a otros efectores, probablemente a través de las hélices α_2 y α_3 . La estructura de las subunidades $G\alpha$ consta de dos dominios, uno de ellos formado por varias hélices y otro dominio con actividad GTPasa cuya estructura es muy similar a la de la proteína GTPasa monomérica p21ras (Medina y cols. 1996). La comparación de las estructuras de las subunidades $G\alpha$ unidas a GDP (inactivas) o a GTP (activas), ha permitido identificar tres regiones dentro del dominio GTPasa que cambian totalmente su orientación tras la entrada del GTP. Estas regiones son conocidas como switch I, II y III y están implicadas en la interacción con los efectores específicos de cada subunidad $G\alpha$. En concreto, la región conocida como switch II interacciona con el dímero $\beta\gamma$ permaneciendo inaccesible a los efectores hasta que se produce la entrada del GTP. Tanto GRK2 como PLC β interaccionan con la hélice α_3 de $G\alpha_q$ y con residuos situados en el switch II, que a su vez constituye la hélice α_2 , apoyando el hecho de que la interacción con GRK2 sea dependiente del estado de activación de $G\alpha_q$. Cabe destacar que aunque las regiones de interacción de GRK2 y PLC β con $G\alpha_q$ son similares, los residuos críticos implicados no son exactamente los mismos (Tesmer y cols. 2005). En este contexto, es interesante apuntar que las proteínas RGS interaccionan con $G\alpha_q$ por una región distinta a la de GRK2 (Day y cols. 2004; Tesmer y cols. 2005). En concreto, RGS2 interacciona con $G\alpha_q$ a través de residuos localizados en el switch I (Day y cols. 2004). Nos preguntamos si RGS2 sería capaz de afectar a la asociación $G\alpha_q$ /PKC ζ . Realizamos ensayos de coimmunoprecipitación entre $G\alpha_qR183C$ y HA-PKC ζ , en presencia o ausencia de

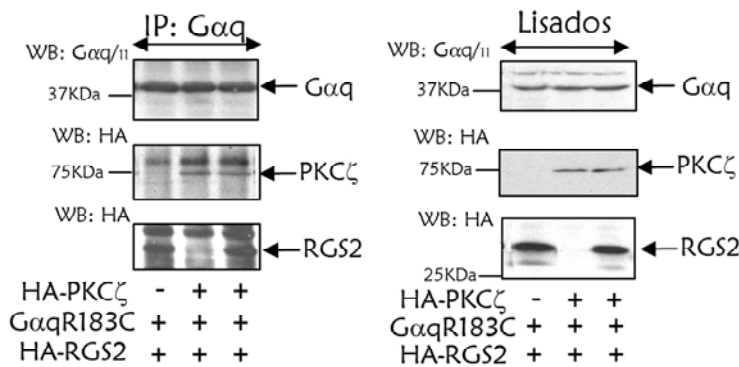


Figura R33. RGS2 no afecta a la interacción de Gαq con PKCζ. Células Cos-7 fueron transfectadas transitoriamente con los plásmidos de expresión de GαqR183C, HA-PKCζ y HA-RGS2. 48 horas después de la transfección las células fueron homogeneizadas con el tampón de lisis RIPA (apartado 4.2 de Materiales y Métodos). Los lisados fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo Gαq/11 (C19) y la presencia de proteínas en los inmunocomplejos, así como su sobreexpresión en los lisados fue analizada como se describe en el apartado 4 de Materiales y Métodos. La imagen corresponde a un experimento representativo de tres independientes.

HA-RGS2, como se muestra en la figura R33, tanto PKCζ como RGS2 coimmunoprecipitan con Gαq y cuando las tres proteínas están sobreexpresadas no se observa una reducción significativa en la cantidad de PKCζ asociada a Gαq. Estos resultados refuerzan la idea de que la unión a PKCζ implica dominios de Gαq solapantes con los que participan en su unión a GRK2 (como las hélices α2 y α3) y no otras zonas de la proteína (como el switch I implicado en la unión con RGS2).

Para avanzar en el conocimiento de la interfase de interacción entre Gαq y PKCζ realizamos ensayos de coimmunoprecipitación entre PKCζ y distintas construcciones quiméricas de Gαq y Gαi (Figura R34). Las construcciones IQ1 e IQ23 están formadas por la mitad N-terminal de Gαi y la mitad C-terminal de Gαq. IQ1 presenta las hélices α2 y α3 de Gαq íntegras, mientras que IQ23 solo tiene la hélice α3. Se ha descrito que estas construcciones son incapaces de interactuar con adenilato ciclasa, ya que los residuos de Gαi implicados en esta interacción no están presentes. Por otro lado, empleamos las construcciones QI4 y QI8+IQ15, cuya secuencia N-terminal corresponde a Gαq incluyendo su hélice α2, mientras que la secuencia C-terminal corresponde a Gαi. En este caso, estas construcciones sí son capaces de interactuar con adenilato ciclasa e inhibir la producción de AMPc (Medina y cols. 1996). En la figura 34 se puede observar como PKCζ es capaz de interactuar solamente con las quimeras IQ1 y QI8-IQ15, aunque la interacción observada es más débil que con la proteína Gαq completa. Este resultado indica que la hélice α3 no es relevante para la interacción Gαq/PKCζ y que la hélice α2 es necesaria pero no suficiente, siendo también importantes los últimos residuos del extremo C-terminal, presentes en las quimeras IQ1 y QI8+IQ15, pero no en la quimera QI4. En la estructura tridimensional de Gαq tanto la hélice α2 como los residuos finales del dominio C-terminal se encuentran en el dominio GTPasa, próximos en el espacio (Medina y cols. 1996); por tanto, es posible que estas dos regiones formen conjuntamente una superficie de interacción necesaria para el anclaje de PKCζ. Por otro lado, el hecho de que las construcciones quiméricas interactúen con PKCζ más débilmente que la proteína Gαq completa indica que aunque no todos los residuos deben ser fundamentales para la interacción, sí que deben serlo para un correcto plegamiento de la subunidad Gαq, que la permita funcionar adecuadamente.

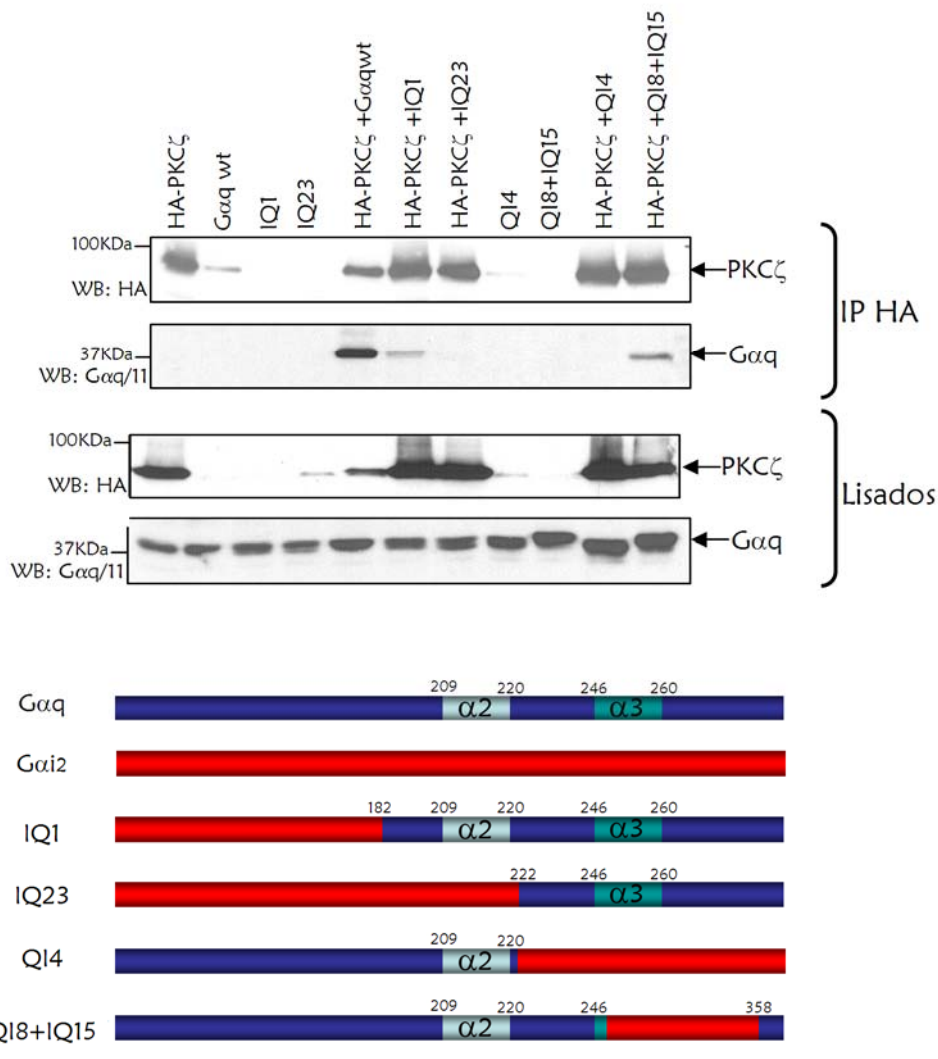


Figura R34. Interacción de PKCζ con diversas quimeras Gαq/Gαi2. Células Cos-7 fueron transfectadas transitoriamente con los plásmidos de expresión de HA-PKCζ, GαqR183C, IQ1, IQ23, Q14 y Q18+IQ15. 48 horas después de la transfección las células fueron homogeneizadas con el tampón de lisis RIPA (apartado 4.2 de Materiales y Métodos). Los lisados fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo HA (12CA5) y la presencia de proteínas en los inmunocomplejos, así como su sobreexpresión en los lisados fue analizada como se describe en el apartado 4 de Materiales y Métodos. La imagen corresponde a un experimento representativo de tres independientes. En la parte de debajo de la figura se muestra una representación esquemática de las construcciones quimeras Gαq/Gαi2. Los números indicados en la figura se refieren a los residuos correspondientes a Gαq.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con estas quimeras, donde el cambio de regiones amplias en Gαq compromete su capacidad de interactuar con efectores como PLCβ y PKCζ, en el futuro planeamos realizar mutaciones puntuales en Gαq, dentro de las regiones candidatas para interactuar con PKCζ descritas anteriormente y de esta forma poder acotar la superficie de interacción entre Gαq y PKCζ.



5. Papel de PKC ζ en el desarrollo de hipertrofia cardiaca inducida por G α_q .

Como se ha comentado en la Introducción, angiotensina II, cuyos receptores están acoplados a G α_q , juega un importante papel en la homeostasis del sistema cardiovascular, estando ampliamente implicada en los procesos fisiopatológicos que conducen al desarrollo de hipertrofia cardiaca (Kim e Iwao, 2000; Varagic y Frohlich, 2002).

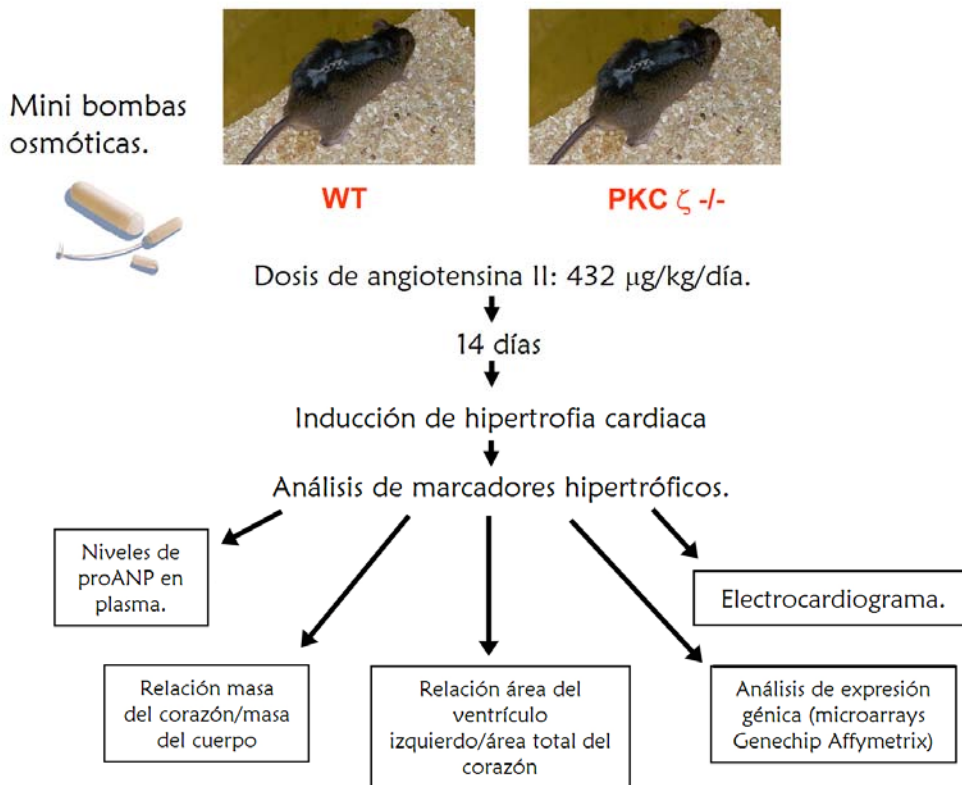


Figura R35. Modelo animal de hipertrofia cardiaca. Los animales fueron tratados, a través de la implantación de mini-bombas osmóticas (apartado 8 de Materiales y Métodos), con angiotensina II de forma crónica durante 14 días (432 μ g/kg/día) o con tampón fosfato salino (PBS) como control negativo. Pasado el tiempo indicado se procedió con el análisis de los distintos marcadores hipertróficos.

La administración crónica de angiotensina II en ratas genera hipertrofia cardiaca, independientemente de su capacidad de regular la presión sanguínea (Dostal y Baker, 1992). De este modo, se produce la muerte de cardiomiocitos, mientras que proliferan los fibroblastos, se incrementan los niveles de ARNm de α -actina, β -MHC (del inglés β -myosin heavy chain), ANF (del inglés Atrial Natriuretic Factor), fibronectina, colágeno tipo I y III y TGF- β 1 (del inglés Transforming Growth Factor β 1). A su vez, angiotensina II, además de activar distintas rutas de señalización celular, estimula la liberación de norepinefrina por el Sistema Nervioso Simpático, lo que contribuye al desarrollo de

cardiomiopatías hipertróficas (CMH). En este sentido, se ha observado que este fenotipo revierte con la administración de antagonistas del receptor AT₁ (Kim e Iwao, 2000).

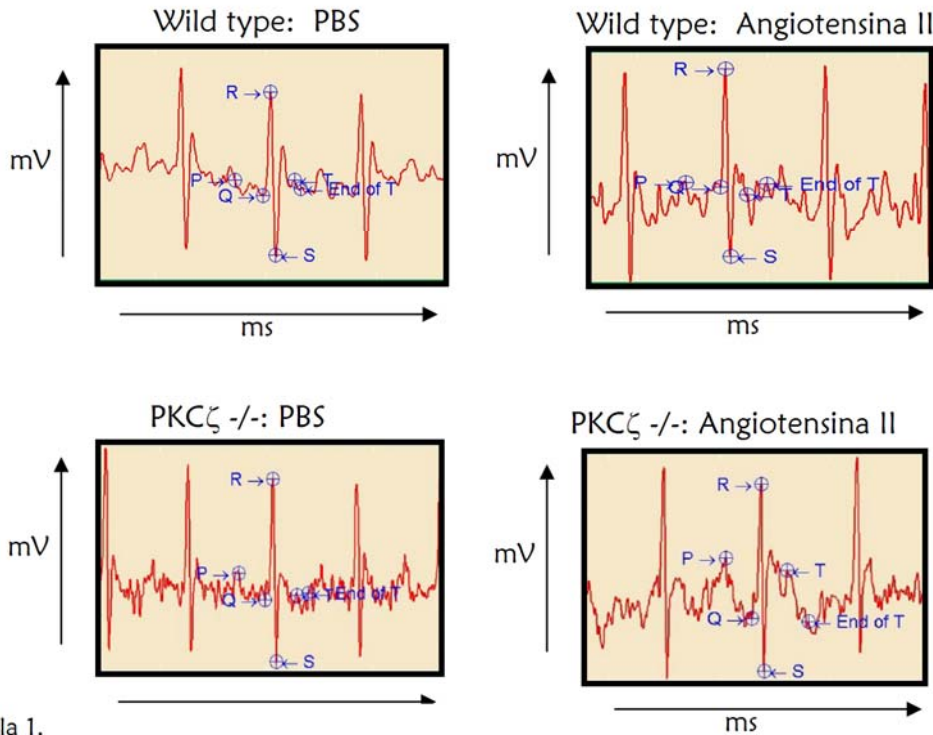


Tabla 1.

Parámetros	PBS		Ang II	
	wt	PKCζ ^{-/-}	wt	PKCζ ^{-/-}
Frecuencia cardiaca	779 ± 16,8	772 ± 9,5	735,9 ± 10,4	689 ± 9,8
QRS (ms)	9,6 ± 0,04	9,2 ± 0,2	12,9 ± 0,2***	9,6 ± 0,1††
QT (ms)	36,6 ± 0,4	39,5 ± 0,2	52,9 ± 0,3***	42,5 ± 0,3††
ST (ms)	25,9 ± 0,3	29,9 ± 0,3	40,0 ± 0,6***	32,9 ± 0,4††

Figura R36. El tratamiento crónico con angiotensina II provoca un incremento en la duración del ciclo contracción/relajación del miocardio de ratones silvestres, pero no lo hace en el de ratones deficientes en PKCζ. Los animales fueron tratados, a través de la implantación de mini-bombas osmóticas con angiotensina II o con tampón salino (PBS) tal como se detalla en la figura R35. Tras el tratamiento se llevo a cabo el registro del electrocardiograma (ECG), en todos los ratones, con un sistema no invasivo, como se describe en el apartado 8.2 de Materiales y Métodos. La despolarización de la aurícula produce la onda P, la despolarización de los ventrículos el complejo QRS y la repolarización de los ventrículos causa la onda T. El segmento ST es una línea isoelectrica (horizontal) sin voltaje, que va desde el final de la onda S al comienzo de la onda T. El intervalo PR se extiende desde el inicio de la onda P hasta el inicio de la despolarización ventricular (QRS). El intervalo QT es la expresión eléctrica de toda la sístole ventricular o lo que es lo mismo, el conjunto de la despolarización y la repolarización ventricular. ***p<0.01 test t de student bilateral comparando animales tratados con angiotensina II, con los correspondientes controles tratados con PBS. ††p<0.01 test t de student bilateral comparando animales PKCζ^{-/-} con los animales silvestres.

Está descrito cómo distintos modelos animales de cardiomiopatías, como las ratas espontáneamente hipertensas (SHR del inglés Spontaneously Hypertensive Rat), modelos de sobrecarga de presión aguda, modelos de infarto de miocardio, modelos de sobrecarga de volumen o modelos de



diabetes, reversionen su fenotipo hipertrófico al ser tratados con antagonistas del receptor AT_1 o inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (Kim e Iwao, 2000).

Dado que el papel de angiotensina II en el desarrollo de hipertrofia cardiaca está bien establecido, quisimos analizar la potencial relevancia de la nueva ruta $G\alpha_q/PKC\zeta$, que hemos descrito, en este proceso fisiopatológico. Con este fin, ratones silvestres (wt) o deficientes en $PKC\zeta$ ($PKC\zeta^{-/-}$) fueron tratados crónicamente con angiotensina II durante 15 días, tal y como se detalla en la figura R35 y en el apartado 7 de Materiales y Métodos. Pasado este tiempo se procedió con el análisis de distintos marcadores hipertróficos.

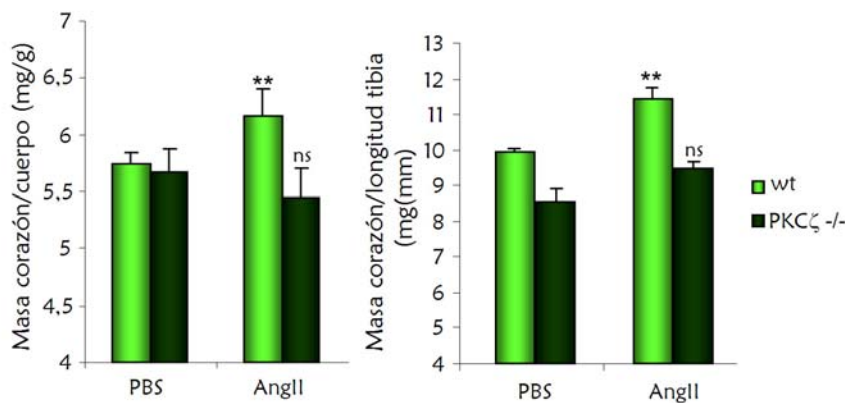


Figura R37. El tratamiento con angiotensina II provoca un incremento en la masa del miocardio en los ratones silvestres pero no lo hace en los ratones deficientes en $PKC\zeta$. Los animales fueron tratados, a través de la implantación de mini bombas osmóticas (apartado 8 de Materiales y Métodos), con angiotensina II de forma crónica durante 14 días ($432 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$) o con tampón salino (PBS) como control negativo. Tras el tratamiento los animales fueron sacrificados y se procedió a la extracción del miocardio, el cual fue pesado en una balanza de precisión. Los animales fueron pesados antes y después del tratamiento, sin que se observaran variaciones significativas en el peso. Las gráficas representan la relación entre la masa del corazón y el peso del animal o la longitud de la tibia, ya que estos valores se mantienen constantes durante el tratamiento. Los datos recogidos en la gráfica son media \pm ESM de los valores obtenidos en cada ratón. Prueba t de student bilateral * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ns no significativo, comparando los animales tratados con angiotensina con aquellos tratados con PBS.

En primer lugar, con la colaboración del Dr. Michel Herranz (CIC, Salamanca), se llevó a cabo el registro del electrocardiograma (ECG), en todos los ratones, con un sistema no invasivo (Figura R36). En la tabla 1 se muestran los valores, en milisegundos, de los distintos segmentos en los que se puede dividir el ECG. Como puede observarse, el tratamiento con angiotensina II provoca un incremento en la duración del segmento QT en los ratones silvestres comparado con

el grupo control que fue tratado con tampón fosfato salino (PBS). Dicho segmento, que corresponde a la suma de los segmentos QRS y ST, representa el tiempo requerido para la despolarización y repolarización del ventrículo izquierdo. El incremento en el segmento QT es una característica presente en hipertrofia cardiaca del ventrículo izquierdo que correlaciona con una disfunción eléctrica en los cardiomiocitos (Dhingra y cols. 2005; Salles y cols. 2005; Carlsson y cols. 2006; Domenighetti y cols. 2007). Por el contrario, los ratones $PKC\zeta^{-/-}$ no muestran diferencias significativas en la longitud del segmento QT, al comparar los ratones que han sido tratados con angiotensina II respecto a aquellos que han sido tratados con PBS.



En coherencia con este resultado, los ratones wt tratados con angiotensina II presentan un incremento significativo en la relación entre la masa total del miocardio respecto a la masa total del cuerpo y respecto a la longitud de la tibia (parámetros que permanecen constantes durante el tratamiento), comparando estos valores con los de los ratones wt tratados con tampón salino. Sin embargo, no se aprecian diferencias significativas entre los ratones PKCζ^{-/-} tratados y sin tratar (Figura R37). En la figura R38 se muestran cortes histológicos del corazón de estos ratones, en los que se puede apreciar un incremento en el área del ventrículo izquierdo respecto al área total del corazón únicamente en los ratones wt tratados con angiotensina II.

Decidimos analizar los niveles de ANP en el plasma de los distintos ratones. El ANP primero es sintetizado como una forma inactiva que presenta un tamaño de 126 aminoácidos

(proANP 1-126). Esta forma inactiva es proteolizada, una vez que es secretada por las células, dando

lugar a la forma activa o αANP (que tiene un tamaño de 28 aminoácidos) y un péptido de 98 aminoácidos (proANP 1-98). La vida media en plasma de αANP es muy corta (2,5 minutos) comparada con la vida media del proANP 1-98, por lo que es más adecuado cuantificar los niveles de esta molécula en plasma, la cual correlaciona con los niveles de ANP secretado. Los ratones wt tratados con angiotensina II presentan un incremento significativo en los niveles de ANP, 3 a 4 veces mayores que los niveles en ratones wt tratados con PBS. Sin embargo, de nuevo no se aprecian diferencias significativas en los niveles de ANP de los ratones PKCζ^{-/-}, tratados o sin tratar (Figura R39).

Para profundizar en los resultados obtenidos hasta este momento, se llevó a cabo un análisis de expresión génica global mediante el estudio de biochips de ADN, con la colaboración del Dr. Ramón

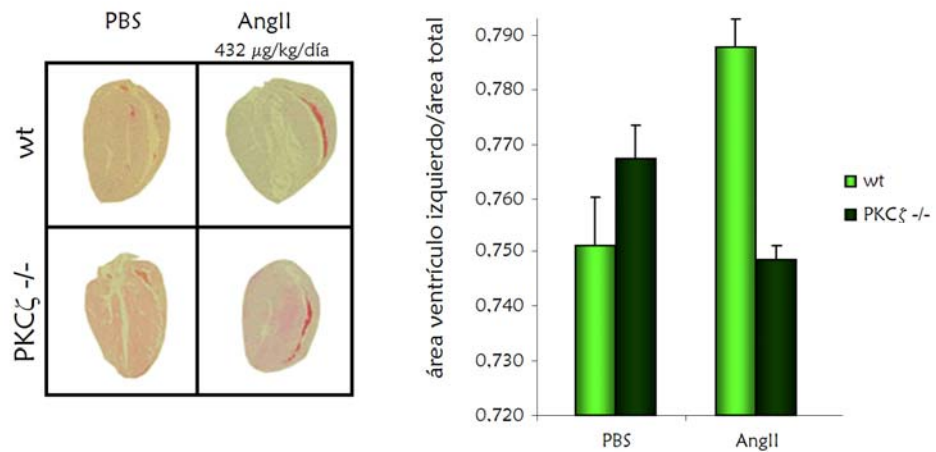


Figura R38. El tratamiento con angiotensina II provoca un incremento en el área del ventrículo izquierdo de los ratones silvestres pero no lo hace en el de los ratones deficientes en PKCζ. Los animales fueron tratados como se describe en la figura anterior. Tras el tratamiento los animales fueron sacrificados y se procedió a la extracción del corazón para su posterior fijación en paraformaldehído al 4% en PBS. Los corazones así fijados fueron incluidos en parafina y se realizaron cortes histológicos de 5µm de grosor. Los cortes se tiñeron con eosina/hematoxilina. El área del ventrículo izquierdo y el área total del corazón se cuantificaron tal como se describe en el apartado 8.4 de Materiales y Métodos. Los datos recogidos en la gráfica son media ±ESM de los valores obtenidos en cuatro cortes por cada corazón.

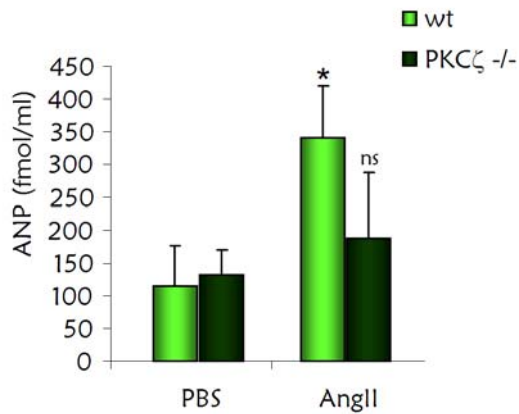


Figura R39. El tratamiento con angiotensina II provoca un incremento en los niveles plasmáticos de proANP en los ratones silvestres pero no lo hace los ratones deficientes en PKC ζ . Los animales fueron tratados como se detalla en la figura anterior. Tras el tratamiento se extrajeron 50 ml de sangre de cada animal y se analizaron los niveles de proANP en plasma tal y como se describe en el apartado 8.1 de Materiales y Métodos. Los datos recogidos en la gráfica son media \pm ESM de los valores obtenidos en cada ratón. * $p < 0.05$, prueba t de student bilateral, comparando los animales wt tratados con angiotensina II con aquellos tratados con PBS, no significativo.

García Escudero (CIEMAT, Madrid), a partir del ARN total extraído del ventrículo izquierdo de corazones procedentes de ambos genotipos (wt y PKC ζ -/-) tras el tratamiento con PBS o con angiotensina II (tres ratones por condición experimental). Los patrones resultantes se compararon con los obtenidos en otros modelos de análisis de hipertrofia cardiaca en ratones. Para ello, se hicieron búsquedas en la base de datos bibliográfica PubMed y en la base de datos de experimentos de expresión génica Gene Expresión Omnibus (GEO) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov). Se eligieron dos estudios que utilizaron la misma tecnología de biochips (Affymetrix) y la misma versión del biochip (MOE430 2.0), con el fin de evitar posibles diferencias artefactuales debidas a protocolos de obtención de dianas o plataformas. El primero de esos estudios analiza el efecto de protocolos de

constricción aórtica transversal (TAC) en hipertrofia (GSE5500, Bisping y cols. 2006), mientras que, el segundo analiza el efecto de la sobreexpresión del receptor I de angiotensina humano (hAT $_1$ R) en ratones transgénicos (GSE8771). Los datos normalizados se descargaron desde la base de datos GEO. Se descartaron algunos de los experimentos realizados en el estudio de Bisping y cols (efecto de mutaciones en GATA4). Los valores de expresión de cada sonda se centraron alrededor de la media, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Finalmente, los tres estudios se juntaron en un único grupo de datos, y se hizo un análisis de expresión diferencial global. Para la búsqueda de genes que muestren diferencias en expresión asociados a presencia o ausencia de hipertrofia cardíaca, se utilizó el test de la T de Student (T-test). Se seleccionaron las sondas/genes que cumplieron los criterios de expresión diferencial con valores de probabilidad $p < 0.0055$ y diferencia de medias $> 1.8x$. En la figura R40 se enseña el agrupamiento de las muestras en función del método de agrupamiento jerárquico. Brevemente, los patrones de expresión de las distintas muestras se segregaron en dos grupos bien diferenciados (hipertróficos y controles) independientemente del estudio realizado (TAC, hAT $_1$ R, y tratamiento con minibombas osmóticas de angiotensina en nuestros experimentos, denominado “activación de G α_q ”). Cabe destacar que nuestros 3 ratones wt tratados con angiotensina segregan con el perfil de expresión global “hipertrófico”, junto con los 6 sometidos a TAC o los 3 transgénicos AT $_1$ R, mientras que 2 de los 3 ratones deficientes en PKC ζ tratados con angiotensina se engloban dentro del patrón de los controles (ratones de nuestro estudio wt o deficientes tratados con PBS, o los controles de

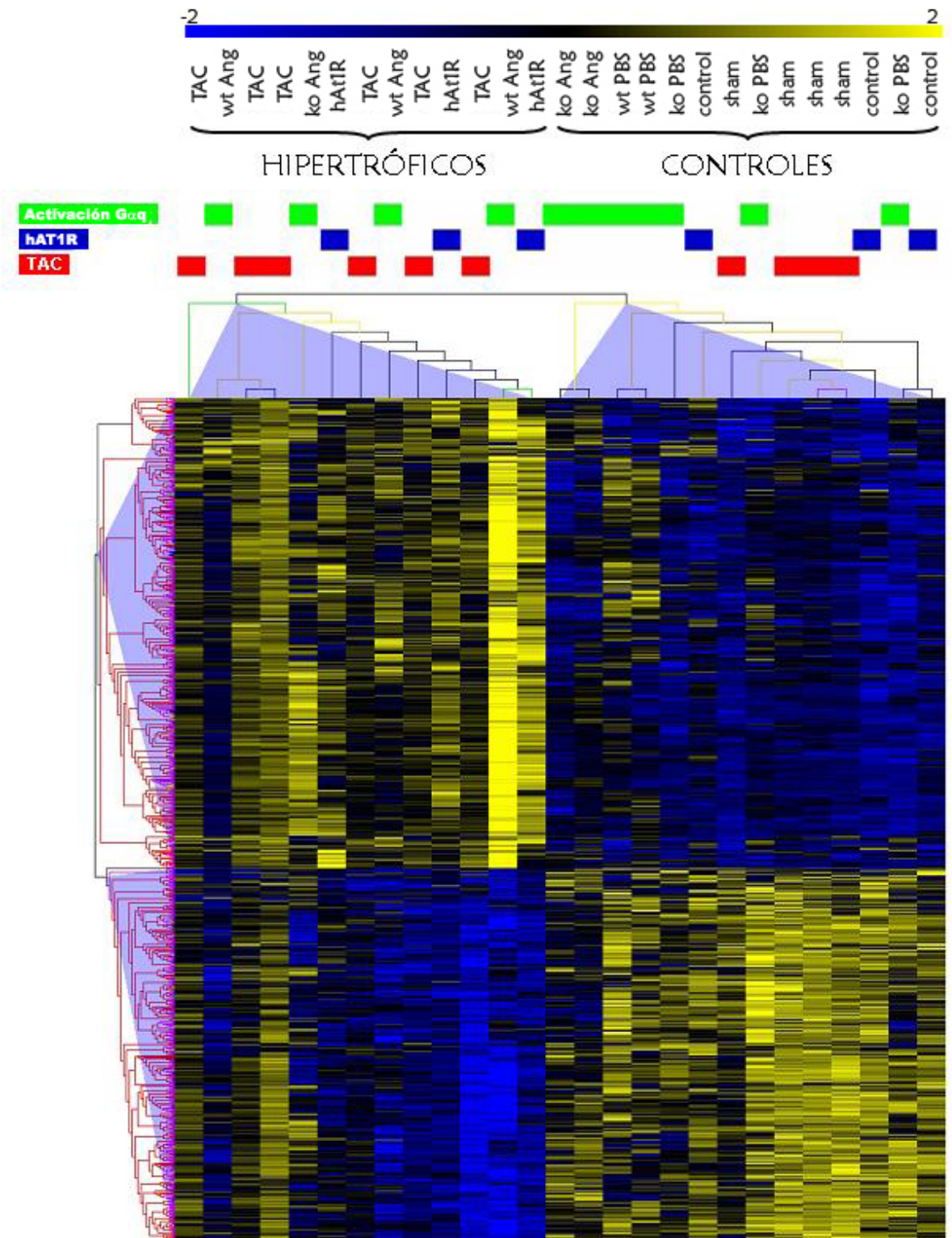


Figura R40. Expresión diferencial de genes relacionados con hipertrofia cardiaca. Mapa gráfico de la expresión y agrupación jerárquica de los genes expresados diferencialmente, asociados a presencia o ausencia de hipertrofia cardiaca. El código de colores utilizado es amarillo para sobreexpresión génica y el azul para regulación negativa, desde -2 a +2 en \log_2 .



los otros 2 estudios). Uno de los ratones deficientes para PKC ζ se encuentra dentro del grupo de aquellos que presentan un patrón de expresión relacionado con hipertrofia. En este mismo ratón ya observamos unos valores de ANP en plasma más elevados que otros ratones KO para PKC ζ . La razón de la mayor sensibilidad de este animal al desarrollo de un cierto grado de hipertrofia (una vez hayamos podido descartar que se hubiera producido un error en el genotipado del animal) no es evidente. En todo caso, nuestros datos apoyan la idea de que la deficiencia en PKC ζ en general evita el desarrollo de hipertrofia en respuesta a Angiotensina, en coherencia con los datos morfométricos, funcionales y plasmáticos.

Comparado con la situación control, se definieron dos grupos de genes: genes sobreexpresados (Grupo I) o genes regulados negativamente (Grupo II) en hipertrofia.

De este modo, en el grupo I se encuentran genes de marcadores hipertróficos como el péptido natriurético atrial (ANP, gen *Nppa*) y el péptido natriurético cerebral (BNP, gen *Nppb*), así como la inducción de procolágeno tipo I $\alpha 2$ (gen *Col1a2*), que se encuentra sobreexpresado durante la fibrosis cardíaca (Mirotsoy y cols., 2006; Fielitz y cols., 2008). Por tanto, esos genes no se encuentran sobreexpresados en los ratones deficientes en PKC ζ tratados con angiotensina II. Estos resultados apoyan el hecho de que la presencia de PKC ζ resulta esencial para el desarrollo de hipertrofia cardíaca en respuesta a la activación de GPCRs acoplados a Gq.

Con el objetivo de buscar grupos de genes con funciones similares desregulados en hipertrofia, se hicieron análisis de enriquecimiento de procesos biológicos de la base de datos de anotaciones génicas GO BP (Ontología Génica de los Procesos Biológicos). Entre los genes cuya expresión aumentaba en los ratones con fenotipo hipertrófico respecto a los ratones control (Grupo I), se encontraban grupos relacionados con procesos de ciclo celular y división celular, adhesión celular, transporte de fosfato, y desarrollo (Fig R41A). Esto podría estar relacionado con los cambios celulares, de síntesis y acumulación de proteínas, que se requerirían para dar lugar al fenotipo hipertrófico.

Cuando se estudió enriquecimiento de GO BP de los genes del Grupo II (disminuyen su expresión en hipertrofia), se encontraron funciones implicadas en metabolismo, fosforilación oxidativa, transporte de electrones (Fig R41B), que ya habían sido descritas por otros grupos (Larkin y cols., 2004. Mirotsoy y cols., 2006).

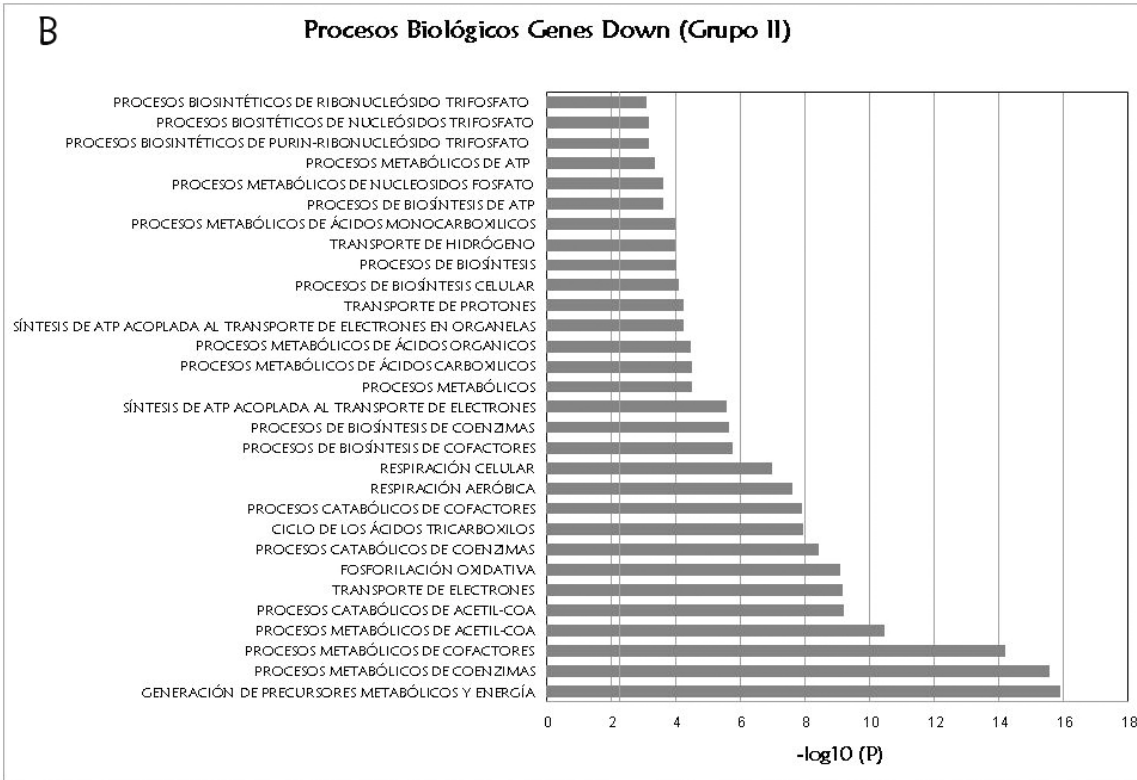
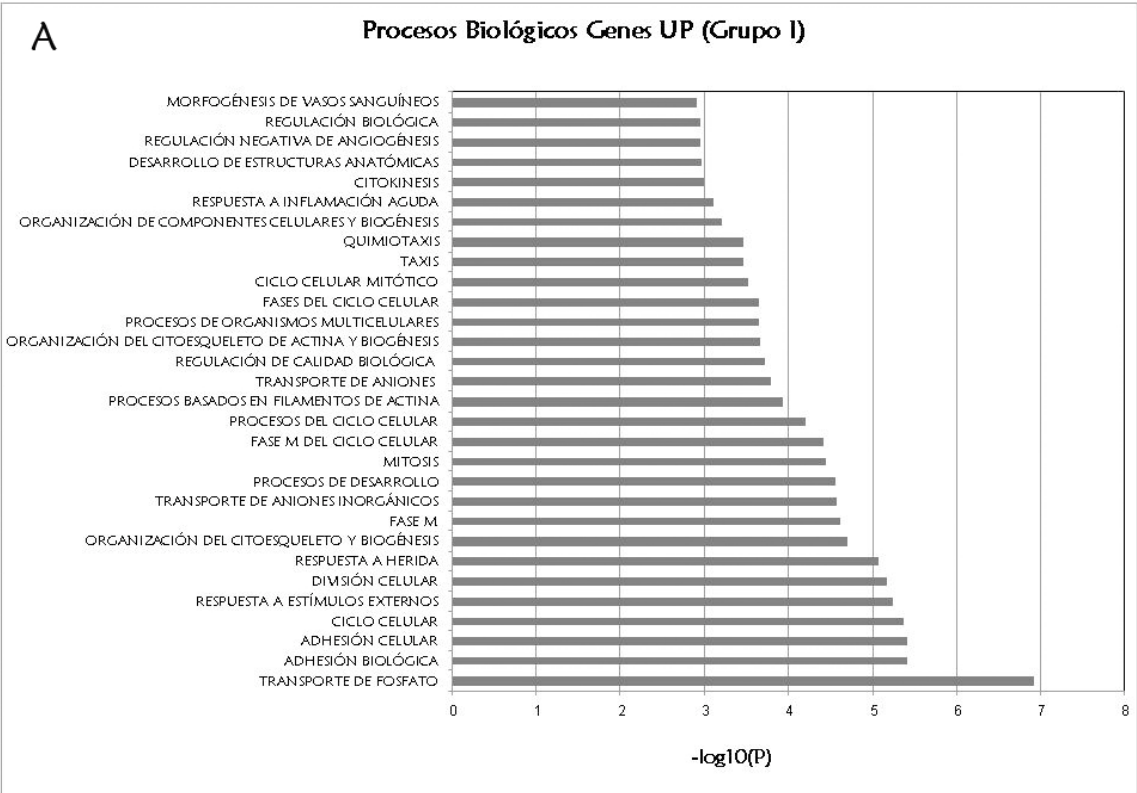


Figura R41. Análisis de las funciones biológicas moduladas en presencia de hipertrofia cardiaca. Representación gráfica de las funciones biológicas enriquecidas en los genes que aumentan su expresión (A) o que la disminuyen (B) en los modelos de inducción de hipertrofia respecto a los controles. Se muestran las 30 funciones más relevantes estadísticamente, ordenadas en función del valor P de probabilidad según $-\log_{10}P$ (número mayor significa mayor relevancia).



Por otra parte, los datos obtenidos por análisis global de la expresión de ARN aportaron una idea sobre el posible grado de activación de la vía de señalización de ERK5 en ambos grupos. Se llevó a cabo un análisis de redes de interacción de proteínas mediante el programa Pathway Studio (Ariadne Genomics), mediante el cual pudo detectarse en corazones hipertróficos la sobreexpresión de la diana de ERK5, ETS-1 (Hayashi y Lee, 2004), así como de los genes que codifican para algunas proteínas reguladas por este factor de transcripción (*Vegf*, *Vcam1*). Además, también se observa la sobreexpresión de genes que se regulan por otras dianas de ERK5 como c-Myc (*Vcam1*, *Ccna2*), c-jun (*Nppa*, *Colla2*) y CREB (*Bcl2*, *Ccna2*) (Wang y Tournier, 2005) (ver Anexo I).

En conjunto los datos obtenidos con los biochips tienden a confirmar la ausencia de alteraciones en los patrones de expresión génicas relacionadas con hipertrofia en los ratones deficientes en PKC ζ en respuesta a angiotensina, y apoyan el posible papel de la activación de la vía de ERK5 en este proceso. Sin embargo, aún quedan por hacer futuros análisis que nos ayudarán a caracterizar la implicación de esta vía de señalización G α q/PKC ζ /ERK5 en esta patología.

DISCUSIÓN



En este trabajo de investigación se identifica a PKC ζ como un componente esencial en la activación de la ruta de ERK5 a través de receptores acoplados a proteínas Gq en distintos tipos celulares, y se desvela la participación de la nueva vía de señalización G α q/PKC ζ en la inducción de hipertrofia cardíaca en respuesta a angiotensina II.

Estudios previos han mostrado que distintos receptores acoplados a proteínas Gq, como el receptor muscarínico m1 o el receptor de trombina, son capaces de promover la activación de ERK5 en células epiteliales, Cos-7, y en fibroblastos, NIH3T3 (Fukuhara y cols. 2000; Marinissen y cols 2003), aunque los mecanismos implicados no se identificaron. Fukuhara y colaboradores demostraron que dicha activación puede ser mimetizada tras la sobreexpresión de formas activas de la subunidad G α q, pero no de G α s ni G α i. Por otro lado, estos mismos autores descartaron la posibilidad de que subunidades $\beta\gamma$ estén implicadas en este proceso, ya que su sobreexpresión no altera la actividad de ERK5. Además, una forma activa constitutivamente de Ras, capaz de activar a ERK1 y 2, tampoco afecta a la actividad de ERK5, y en el mismo sentido, la expresión del dominante negativo RasN17 no reduce la activación de ERK5, inducida por el receptor m1 o por el receptor de trombina. Tampoco parece ser que estén implicadas otras GTPasas monoméricas, como Rac y Cdc42, ya que su sobreexpresión no modula a ERK5, aunque sí que activa a las quinasas de la familia JNK. Consistentemente, la inhibición de estas GTPasas, mediante la expresión del dominio CRIB de PAK, que interacciona específicamente con las formas activas de Rac y Cdc42, no afecta al nivel de activación de ERK5 en respuesta a carbacol o trombina. Puesto que G α q es capaz de activar a la GTPasa monomérica Rho, la activación de ERK5 podría estar mediada por esta proteína, pero de nuevo, la expresión de formas activas de Rho o su inhibición mediada por la exoenzima C3 de *Clostridium botulinum* no influye sobre el estado de activación de ERK5. En este contexto, nos planteamos caracterizar los mecanismos y las proteínas transductoras implicadas. La activación de ERK5 detectada por Fukuhara y colaboradores en células epiteliales Cos-7 se llevó a cabo en condiciones de sobreexpresión de ERK5. En esa línea celular, nosotros no hemos podido detectar activación de ERK5 endógena en respuesta a carbacol. Sin embargo en la línea celular NIH-3T3-m1, donde el receptor muscarínico m1 está sobreexpresado de forma estable, sí hemos comprobado que la estimulación de estos receptores promueve la activación de ERK5 endógena. Además, nuestros resultados muestran como otros receptores endógenos acoplados a Gq, como el receptor de angiotensina II (AT $_1$ R) en cardiomiocitos y los receptores de esfingosina-1-fosfato (S1P $_2$ y S1P $_3$) en MEFs, también promueven activación endógena de ERK5.

Si bien se ha demostrado que las quinasas citosólicas de la familia Src son cruciales en la activación de ERK5 mediada por factores de crecimiento (Sun y cols. 2003), éstas no parecen tener un papel importante en la activación de ERK5 a través del receptor muscarínico m1 en fibroblastos de ratón NIH3T3. Tampoco parece que la activación de ERK5 mediada tanto por el receptor m1 como por el receptor de angiotensina II, sea consecuencia de la transactivación del receptor de EGF, el cuál había sido descrito previamente como activador de esta vía (Díaz-Meco y cols. 2001). De este modo,

podemos afirmar que los mecanismos empleados por los GPCRs acoplados a Gq para activar a ERK5, son distintos de aquellos iniciados por los receptores de factores de crecimiento.

El hecho de que la sobreexpresión de formas activas de $G\alpha_q$ sea suficiente para provocar la activación de ERK5 indica que estas subunidades, y no los dímeros $\beta\gamma$ liberados también tras la estimulación de GPCRs, eran las implicadas en la activación de la vía.

Está bien establecido que los receptores acoplados a Gq, a través de la activación de PLC β , inducen la generación de DAG e IP $_3$ con la consiguiente movilización de Ca $^{2+}$ y la activación de PKCs (Neves y cols. 2002). En el presente estudio quisimos determinar el papel que la activación de este efector clásico de $G\alpha_q$ tenía sobre la activación de ERK5. Mediante la utilización de un inhibidor específico de PLC β pudimos descartar su participación en la activación de esta vía. Además, otro hecho importante que demuestra que PLC β no participa en la activación de ERK5, es que una forma de $G\alpha_q$ deficiente en su interacción con PLC β , pero activa constitutivamente (Venkatakrishnan y Exton, 1996), mantiene la capacidad de estimular la vía de ERK5. Existen otros ejemplos de efectores de $G\alpha_q$ cuya activación es independiente de PLC β , como la quinasa Btk, que es estimulada al interactuar directamente con $G\alpha_q$ (Ma y Huang, 1998), la quinasa Csk, a través de la cual $G\alpha_q$ puede modular la actividad de GSK3 β (Fan y cols 2003) o el intercambiador de nucleótidos p63RhoGEF (Lutz y cols. 2005).

En la búsqueda de proteínas transductoras moduladas por $G\alpha_q$ que pudieran explicar la activación de ERK5 por GPCRs, nos llamaron la atención diversos ejemplos en los que la estimulación de receptores acoplados a proteínas Gq provocaba una translocación de PKC ζ a la membrana, ya que esta quinasa había sido implicada en la activación de ERK5 en respuesta a factores de crecimiento (Diaz-Meco y cols. 2001; Geetha y Wooten, 2003). Así, en células de músculo de arterias pulmonares, la vasoconstricción ejercida por el receptor de tromboxano A $_2$ (TP-R) parece ser dependiente de PKC ζ e independiente de otras PKCs, tirosina quinasas citosólicas y de la quinasa de Rho (Cogolludo y cols. 2003). En cardiomiocitos, el tratamiento con agonistas de TP-R induce translocación de PKC ζ a la membrana, mecanismo que parece ser relevante para la inducción de apoptosis en situaciones de isquemia (Shizukuda y Buttrick, 2002). También la infusión de angiotensina II en corazones perfundidos de cobayas, provoca la translocación de PKC ζ (Takeishi y cols. 1999). En la línea celular de cáncer de mama, MCF-7, la estimulación con angiotensina II provoca translocación de PKC ζ a la membrana, activación de ERK1/2 y expresión de c-Fos, de forma independiente a la señal de Ca $^{2+}$ (Muscella y cols 2003). La activación de ERK1/2 que observan estos autores es dependiente de la actividad de PI3K, pero no lo es la translocación de PKC ζ , ni la expresión de c-Fos. Otro ejemplo en el que un receptor acoplado a Gq induce translocación de PKC ζ lo encontramos en eosinófilos, donde la producción de

anión superóxido, la adhesión y la desgranulación, inducidas por el Factor Activador de Plaquetas (PAF) son inhibidas por el pseudosustrato de PKC ζ (Kato y cols 2005).

En el presente estudio diversas evidencias indican que la interacción entre G α q y PKC ζ es relevante para la activación de ERK5. En primer lugar, G α q y PKC ζ coinmunoprecipitan con alta especificidad respecto de otras subunidades G α y de la otra PKC atípica (PKC λ), siendo mayor la asociación con la forma activa de G α q. Además, el estímulo con carbacol promueve un incremento en la asociación entre estas proteínas y la translocación de PKC ζ a la membrana celular. Más aún, nuestros datos indican que estas proteínas son capaces de interactuar de forma directa sin que participen proteínas intermediarias. En segundo lugar, G α q, PKC ζ y la quinasa que activa a ERK5, MEK5 son capaces de interactuar unas con otras de manera directa lo que posiblemente posibilite una serie de interacciones secuenciales que resulten en la activación de ERK5. En tercer lugar, inhibidores específicos de PKC ζ , así como la deficiencia en esta quinasa, bloquean la activación de ERK5 en respuesta a agonistas de receptores acoplados a proteínas G α q (carbacol, angiotensina II y esfingosina-1-fosfato) en diversos tipos celulares. En las MEFs silvestres, la activación promovida por esfingosina-1-fosfato es debida a la activación de subunidades G α q y no a la de subunidades G α i y G α o, sensibles a toxina pertúsica. Por el contrario, la activación de ERK1/2 está claramente mediada por estas últimas subunidades. En coherencia con estos resultados, la deficiencia de PKC ζ en estas células bloquea la activación de ERK5, sin afectar a la de ERK1/2, lo que descarta un silenciamiento inespecífico de la señalización en las MEFs deficientes en PKC ζ . Otros autores han descrito que en otros tipos celulares, como MCF-7, el tratamiento con el pseudosustrato de PKC ζ bloquea la activación de ERK1/2 en respuesta a carbacol, mientras que esta activación es insensible a inhibidores de PLC β o de la señal de Ca²⁺ (Jiménez y cols. 2005). Existen otros ejemplos en los que PKC ζ participa en la activación de ERK1/2 (Hirai y Chida, 2003). Sin embargo, nuestros resultados muestran que, al contrario de lo que ocurre con la actividad de ERK5, parece que PKC ζ no es la encargada de activar a ERK1/2, en este tipo celular y en respuesta a este estímulo. El papel que juega PKC ζ en la activación de MAPKs mediada por G α q, dependerá del tipo celular y del estímulo utilizado.

Así, en este estudio se establece por primera vez a PKC ζ como un efector de G α q implicado en la estimulación de ERK5 por GPCRs.

La arquitectura y localización subcelular de los complejos multimoleculares en los que participa G α q, PKC ζ y MEK5 α , los mecanismos que conducen a la activación de ERK5 y los dominios de las proteínas implicadas deben aún terminar de precisarse. Es interesante destacar que la activación de ERK5, además de ser independiente de las rutas clásicamente activadas por G α q, se presenta relativamente tardía y sostenida en el tiempo (máximo de activación en general en torno a los 30 minutos). Una posible explicación para este curso temporal de activación radica en el hecho de que los

mecanismos de internalización son necesarios para una correcta activación de ERK5 en respuesta a carbacol. En este sentido, es importante destacar que la dinámica de internalización del receptor m1, observada por Shmuel y colaboradores, correlaciona en buena medida con el curso temporal de la activación de ERK5 que nosotros hemos observado en células NIH3T3m1 (Shmuel y cols. 2007). Tras la llegada del agonista, los GPCRs son fosforilados por las GRKs, y este proceso recluta a las proteínas arrestinas, produciéndose el desacoplamiento con las proteínas G e iniciándose los procesos de internalización. Además, arrestina funciona también como proteína adaptadora que conecta componentes de las rutas de MAPKs con los GPCRs, así la estimulación de estos receptores tiene como consecuencia la activación de rutas de MAPKs (Lefkowitz y Shenoy, 2005). En este sentido, en el caso de la activación de ERK1/2 por el receptor de angiotensina II, se ha descrito la existencia de una vía dependiente de $G\alpha_q$ y otra dependiente de β -arrestina, la primera bloqueada por inhibidores de PKC y más rápida en el tiempo, mientras que en la segunda, la activación de ERK1/2 es más persistente y se favorece la fosforilación de sustratos citosólicos frente a los nucleares (Lefkowitz y Shenoy, 2005), debido a que ERK1/2 permanece en los endosomas, unida a β -arrestina, sin poder translocarse al núcleo. Aunque la posibilidad de que la internalización de GPCRs y β -arrestina estén implicados en la vía $G\alpha_q$ /PKC ζ /ERK5 es atractiva, otros datos experimentales no apoyan necesariamente esta hipótesis. Así, la sobreexpresión de formas activas constitutivamente de $G\alpha_q$, que en principio no implican activación de receptores ni reclutamiento de β -arrestinas, también promueve la estimulación de ERK5. Por otra parte, el agonista carbacol parece promover la translocación de PKC ζ a la membrana plasmática y su colocalización en la misma con $G\alpha_q$, por lo que la internalización del receptor no parece ser un requisito para la asociación $G\alpha_q$ /PKC ζ . Es posible que la internalización de esos complejos, y otros relacionados ($G\alpha_q$ /MEK5 α , PKC ζ /MEK5 α , etc) sea el paso crítico para conducir a la activación de ERK5. Existen ejemplos en los que las formas activas de $G\alpha_q$ son suficientes para inducir la internalización del receptor de forma independiente a β -arrestinas, PLC β y PKC (Rochdi y cols. 2003), por lo que es posible que $G\alpha_q$ reclute a otras proteínas necesarias para este proceso. El estudio del efecto de inhibidores de la internalización sobre estas diversas asociaciones permitirá desvelar esta incógnita en el futuro. Igualmente, será interesante estudiar si la localización de ERK5 activada por GPCRs (y, por tanto, sus sustratos preferentes) es igual o no a la promovida por factores de crecimiento que la activan a través de otras vías de señalización.

En cuanto a los dominios implicados en las diversas interacciones, se ha comprobado la alta especificidad de la asociación $G\alpha_q$ /PKC ζ . Así, hemos demostrado que PKC ζ no interacciona con otros tipos de subunidades $G\alpha$ y, además, que $G\alpha_q$ no interacciona con PKC λ , quinasa que comparte un alto porcentaje de homología con PKC ζ (Nishizuka, 1995). Aunque está descrito que tanto PKC ζ como PKC λ son capaces de interaccionar con MEK5 y activar a ERK5 en respuesta a EGF (Diaz-Meco y cols 2001), parece que sólo PKC ζ está participando en la activación de esta vía iniciada por GPCRs. Así, en

un futuro, mediante la comparación de secuencia entre las dos PKCs atípicas planeamos identificar las regiones de PKCζ implicadas en su interacción con Gαq.

Los residuos implicados en la interacción PKCζ/MEK5α están bien caracterizados (Hirano y cols. 2004) y los análisis de estas secuencias han permitido identificarlas como dominios de interacción PB1 (Moscat y Diaz-Meco, 2000). Los dominios PB1 se clasifican en tipo I, donde predominan residuos ácidos, y tipo II, donde se encuentra una lisina altamente conservada. Por tanto, la unión entre dominios PB1 es mediada a través de fuerzas electrostáticas, siendo la especificidad de la interacción determinada por aminoácidos próximos. Un ejemplo de ésta especificidad lo encontramos en la interacción de MEK5α con su sustrato, ERK5, y con uno de sus activadores, MEKK2. En ambos casos, la mutación de los residuos EDED del dominio PB1 de MEK5α (aminoácidos 63 al 66) rompe la interacción. La sustitución del residuo E61 afecta a la unión con ERK5, pero no con MEKK2, mientras que la sustitución del residuo D68 rompe la unión con MEKK2, pero no la unión con ERK5 (Seyfried y cols. 2005). De este modo, activador y sustrato compiten por unirse a la misma región en MEK5α, aunque los residuos críticos no son exactamente los mismos.

En lo que respecta a PKCζ y MEK5α, la lisina 19 de PKCζ (PB1 tipo II) interacciona con una región ácida de MEK5α (PB1 tipo I, residuos 61-78). Por otro lado, PKCζ también presenta un dominio adicional PB1 tipo I, a través del cual interacciona con la proteína adaptadora p62 (Hirano y cols. 2004)

En lo que se refiere a Gαq, el conjunto de nuestros datos indica que esta proteína es capaz de asociarse directamente tanto a MEK5α como a PKCζ, siendo su interacción con ambas proteínas bloqueada por el dominio RH de GRK2 (como sucede con otros efectores de Gαq), pero no por la proteína RGS2. Recientemente, se ha



Figura D1. Región en Gαq candidata a interaccionar con PKCζ, en base a su homología con el dominio PB1 de MEK5α. Los puntos verdes señalan los residuos conservados en dominios PB1 tipo I de distintas proteínas como Cdc24p, Scd1, p40phox y MEK5α (Hirano y cols. 2004). Los aminoácidos en rojo presentan un alto consenso de homología.

postulado que la subunidad Gαq activada adopta una orientación en la membrana mostrando regiones de contacto que sirven como sitios de unión para efectores estructuralmente distintos (Lutz y cols. 2007). El dominio PB1 de MEK5α no participa en la asociación con Gαq, puesto que un mutante que carece de esa región aún coinmunoprecipita con esta subunidad de las proteínas G. Por otra parte, distintas evidencias sugieren que la zona delimitada por las hélices α2- α3 de Gαq desempeñan un papel importante en la interacción con PKCζ. Es muy interesante resaltar que esa región incluye unos residuos (aminoácidos 229-250) que muestran homología con el dominio PB1 de MEK5α (perteneciente al tipo

I, de carácter ácido), lo que la convierte en un candidato muy atractivo para participar en la asociación con PKC ζ (Figura D1).

Estos aminoácidos se encuentran en la región que forma el switch III y están próximos a las regiones de interacción con otros posibles efectores/moduladores de G α q como PLC β , GRK2 o p63RhoGEF (Tesmer y cols. 2005; Lutz y cols. 2007). Además, la comparación de las secuencias de las distintas subunidades G α indica que la mayoría de residuos conservados entre G α q y el dominio PB1 de MEK5 α -y en particular el bloque ácido VESDNE- no se encuentran en otros subtipos de G α (Figura D2), lo cual es coherente con el hecho de que PKC ζ sólo interactúe con G α q y no con otros isotipos de subunidades G α . Los resultados obtenidos con los ensayos de coimmunoprecipitación entre PKC ζ y

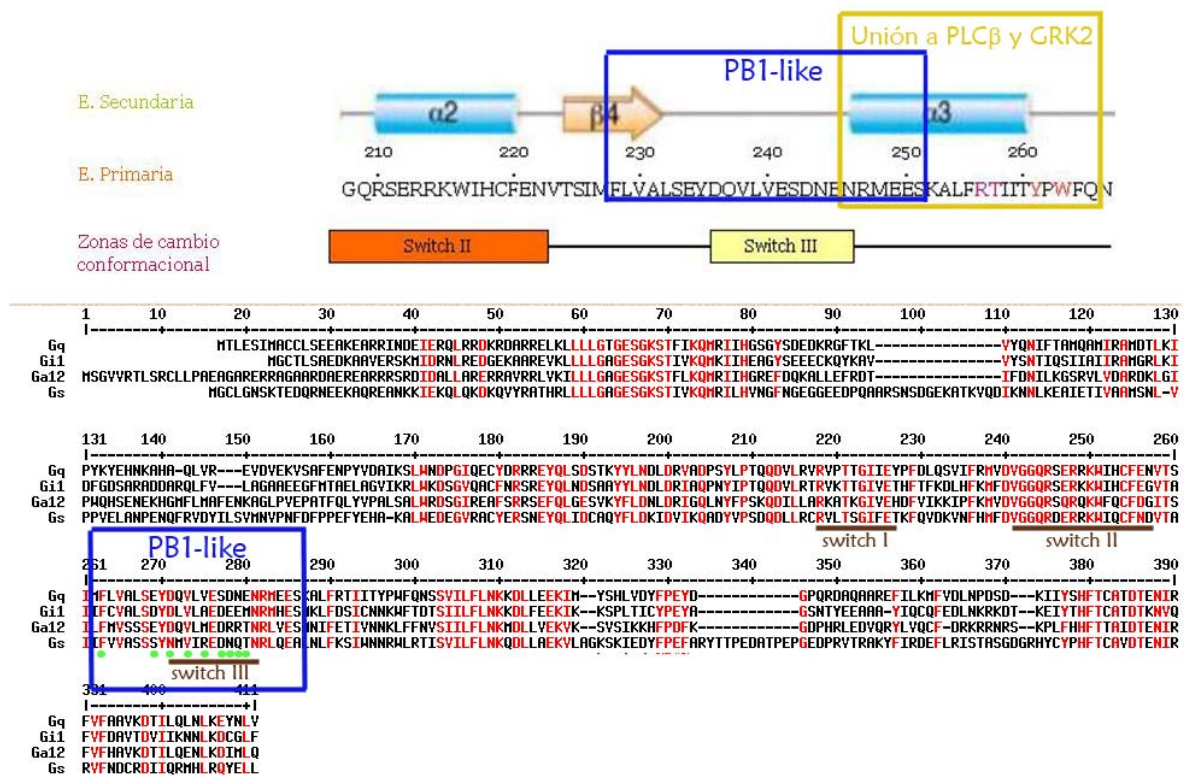


Figura D2. Estructura secundaria de G α q. En la figura se indican los residuos que forman el posible dominio PB1 así como los implicados en la interacción con GRK2 y PLC β . En la parte inferior se muestra un alineamiento de la secuencia primaria de subunidades G α . Los puntos verdes señalan los residuos conservados entre G α q y el dominio PB1 de MEK5 α . Los aminoácidos en rojo presentan un alto consenso de homología. Las zonas de cambio conformacional (switch I, II y III) se encuentran subrayadas.

distintas construcciones quiméricas G α q/G α i también apoyan la posibilidad de que los residuos 229-250 sean importantes en la interacción con PKC ζ . Únicamente las quimeras que presentan estos residuos junto con la hélice α 2 de G α q son capaces de coimmunoprecipitar con PKC ζ (quimeras IQ1 y QI8+IQ15), mientras que la ausencia de la hélice α 2 (en la quimera IQ23) o de los aminoácidos 229-250 (en la quimera IQ4) provoca la falta de coimmunoprecipitación. El hecho de que los residuos 229-

250 formen parte del switch III y la hélice $\alpha 2$ forme parte del switch II, zonas que sufren cambios conformacionales tras la entrada del GTP, explicaría que la entrada del GTP en la subunidad $G\alpha q$, tras la activación del receptor, incrementa la interacción $G\alpha q/PKC\zeta$, como hemos observado. Con la colaboración de David Abia, del servicio de Bioinformática del CBMSO, hemos llevado a cabo un modelo de la estructura tridimensional de $G\alpha q$. Los residuos 229-250 del posible dominio “PB1-like” forman parte del bucle que conecta la lámina $\beta 4$ con la hélice $\alpha 3$ y se encuentran en la superficie de $G\alpha q$, lo que es compatible con su implicación en la interacción con $PKC\zeta$ (Figura D3). Por último, puesto que esta región está próxima a la zona de unión con GRK2, también se explicaría la capacidad de esta quinasa para desplazar a $PKC\zeta$ de su interacción con $G\alpha q$.

En este escenario, es tentador sugerir que, como sucede en el caso de otras proteínas con dominios PB1, el dominio PB1 (tipo II) de $PKC\zeta$ participe en la interacción con $G\alpha q$. De hecho, nuestros datos experimentales muestran que la presencia de $MEK5\alpha$ reduce la cantidad de $PKC\zeta$ unida a $G\alpha q$, mientras que el mutante de $MEK5\alpha$, que carece de dominio PB1 ($MEK5\Delta PB1$) no provoca dicha reducción. Estos resultados estarían indicando que $G\alpha q$ y $MEK5\alpha$ compiten por unirse al dominio PB1 de $PKC\zeta$. De forma interesante, los dominios PB1 tipo II de $PKC\zeta$ y $PKC\lambda$ no son exactamente iguales (Hirano y cols. 2004). Es posible especular que estas diferencias

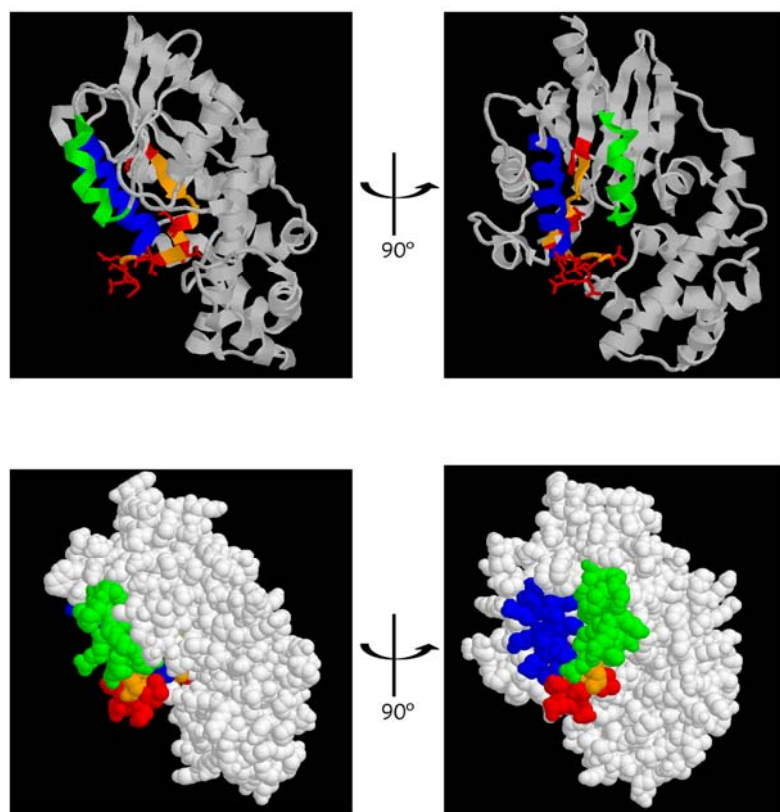


Figura D3. Estructura tridimensional de $G\alpha q$ (PDB 2BCJ, Tesmer y cols.2005). En la figura se señala, en naranja, la región que comparte homología con el dominio PB1 de $MEK5\alpha$ (229-250). Dentro de esta región se ha marcado en rojo los residuos conservados entre $G\alpha q$ y $MEK5\alpha$. En verde se ha señalado la hélice $\alpha 2$ y en azul la hélice $\alpha 3$.

son las que determinan que sólo $PKC\zeta$ sea capaz de interactuar con $G\alpha q$. Mutaciones puntuales en la lisina 19, así como en los aminoácidos del dominio PB1 de $PKC\zeta$, que no estén conservados en $PKC\lambda$, ayudarán a establecer si este dominio está implicado en la interacción con $G\alpha q$.

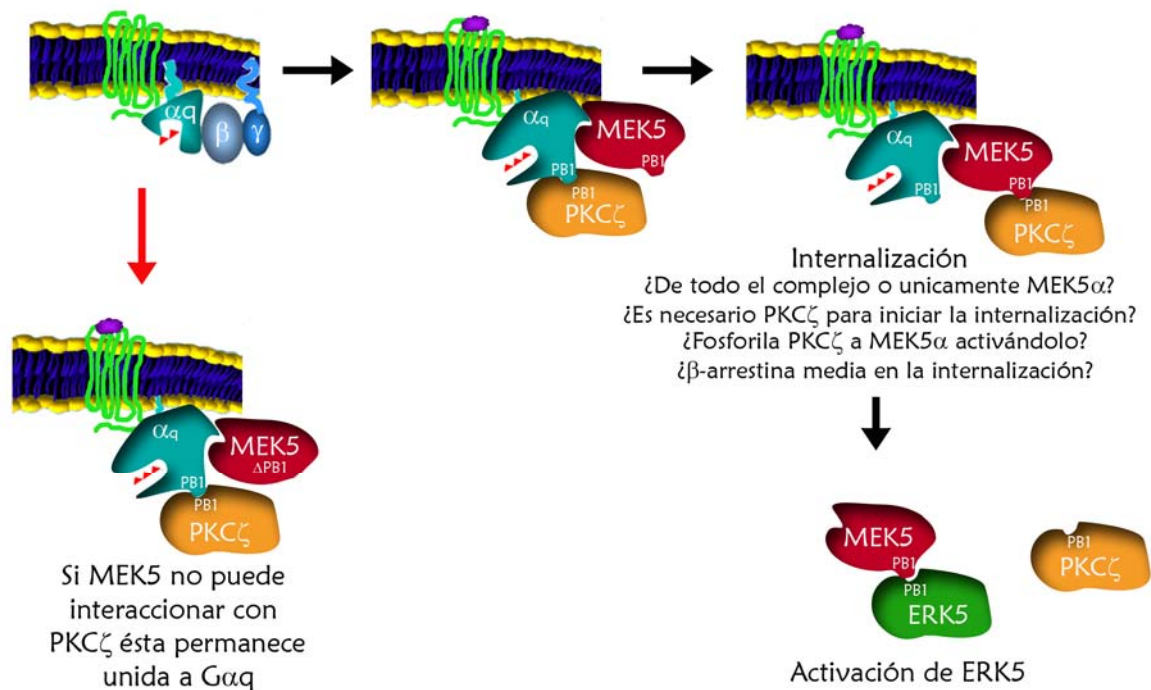


Figura D4. Posible mecanismo de activación de la ruta $G\alpha_q/PKC\zeta/MEK5/ERK5$.

Todo ello permite plantear un modelo de la participación de $G\alpha_q$ en la activación de la vía MEK5/ERK5 a través de PKC ζ , basado en un papel de proteína andamio que facilitaría la conexión secuencial y ordenada entre distintos componentes de esa cascada de señalización (figura D4). En primer lugar, $G\alpha_q$ activada por GPCR reclutaría a PKC ζ (vía sus respectivos dominios PB1) y/o a MEK5 α . Al ser la asociación entre $G\alpha_q$ y MEK5 α por una región distinta al dominio PB1 de MEK5 α (MEK5 Δ PB1 sigue interactuando con $G\alpha_q$), este dominio de MEK5 α estaría disponible para interactuar con PKC ζ . Por tanto, seguidamente el dominio PB1 de PKC ζ podría dejar de interactuar con $G\alpha_q$ y unirse al dominio PB1 de MEK5 α . Posteriormente, MEK5 α dejaría de interactuar con PKC ζ para hacerlo con ERK5 (al igual que otro activador de MEK5, MEKK2, compite con ERK5 por unirse al dominio PB1 de MEK5 α). Esto permitiría que PKC ζ volviese a estar libre para ser reclutada por otras subunidades $G\alpha_q$ que estuvieran siendo activadas (Figura D4). En algún momento de este proceso, alguno de los complejos multimoleculares implicados deberá sufrir internalización, ya que la estimulación de ERK5 por GPCR acoplados a G_q se inhibe si se bloquea ese proceso.

De forma coherente con este modelo, hemos observado que $G\alpha_q$ puede interactuar simultáneamente con MEK5 α y PKC ζ , y que la sobreexpresión de MEK5 α reduce considerablemente la cantidad de PKC ζ unida a $G\alpha_q$, lo que indica que $G\alpha_q$ y MEK5 α estarían compitiendo por unirse al dominio PB1 de PKC ζ . En cambio, si MEK5 α carece del dominio PB1 (MEK5 $\alpha\Delta$ PB1) no se observan esta competición y la cantidad de PKC ζ unida a $G\alpha_q$ es la misma que cuando no está MEK5 $\alpha\Delta$ PB1

sobreexpresado. Estos resultados sugieren que la interacción entre MEK5 α y PKC ζ es necesaria para que PKC ζ deje de interactuar con G α q y se inicien los mecanismos de activación de la vía (Figura D4). Aunque este modelo en el que G α q actuaría como proteína andamio resulte muy atractivo, el mecanismo molecular que dispara la activación de ERK5 a través de GPCRs todavía presenta muchas cuestiones por resolver. Así, ¿qué es lo que favorece que PKC ζ “se suelte” de G α q y pueda unirse a MEK5 α ? ¿Es debido a cambios estructurales inducidos por las correspondientes interacciones o son necesarias modificaciones postraduccionales, como fosforilaciones, para que tenga lugar la interacción PKC ζ /MEK5 α ? ¿Interacciona alguno de los componentes con β -arrestina o con otros componentes de la maquinaria endocítica para así ser internalizado? ¿En qué momento/localización subcelular PKC ζ se libera de MEK5 α permitiendo que ésta se una a ERK5? ¿Qué complejos se internalizan? ¿Es en los endosomas donde tiene lugar la activación de ERK5? Esta y otras preguntas deberán abordarse en el futuro.

Nuestros datos indican también que la vía de señalización G α q/PKC ζ puede ser modulada por los niveles de expresión de GRK2. El papel de GRK2 en la regulación de G α q está bien establecido. Esta quinasa, además de provocar el desacoplamiento entre el receptor y las proteínas G α al promover el reclutamiento de β -arrestinas al receptor fosforilado, es capaz de interactuar directamente con G α q, evitando que ésta active a sus efectores, como PLC β (Carman y cols. 1999). Hemos mostrado que la presencia de GRK2 o de su dominio RH, bloquea la asociación G α q/PKC ζ y la interacción con MEK5. Por otra parte, la activación de ERK5, inducida por la forma activa constitutivamente de G α q, es eficientemente inhibida por la sobreexpresión de GRK2, mientras que un mutante de GRK2 incapaz de interactuar con G α q no ejerce ningún efecto. Todo ello pone de manifiesto que GRK2 es también capaz de modular este nuevo efector de G α q. Dado que los niveles de GRK2 se encuentran alterados en diversas patologías (Ungerer y cols. 1994; Choi y cols. 1997; Gros y cols. 1997; Gros y cols. 2000; Penn y cols., 2000), será interesante evaluar cómo puede verse afectada en esas situaciones la nueva vía de transducción identificada en este estudio.

Como se ha discutido, en este estudio hemos demostrado que PKC ζ también participa en la activación de ERK5 inducida por angiotensina II en cardiomiocitos, y que la deficiencia en esta quinasa provoca que ERK5 no se active en respuesta a ese importante estímulo fisiológico. Este hecho nos llevó a pensar que la ruta G α q/PKC ζ /ERK5 podría estar regulando procesos importantes en la fisiología del sistema cardiovascular. Para confirmar esta hipótesis, analizamos el efecto que tiene la deficiencia de PKC ζ sobre la inducción de hipertrofia cardíaca en respuesta a angiotensina II. Nos interesamos en este proceso fisiopatológico debido a que existen múltiples ejemplos en la literatura del papel que juegan tanto G α q como ERK5 en el desarrollo de hipertrofia cardíaca (D'Angelo y cols., 1997; Adams y cols., 1998; McKinsey y Olson, 1999; Nicol y cols. 2001; Nakaoka y cols., 2003; Kacimi y Gerdes, 2003; Hayashi y Lee, 2004; Takahashi y cols. 2005, Jiang y cols., 2006;)

Ante distintas situaciones que implican la necesidad de una mayor actividad cardiaca, el corazón responde con un crecimiento hipertrófico de la pared del ventrículo. De esta forma se reduce el estrés en la pared ejercido por un aumento de la presión. Sin embargo, a veces este crecimiento no ayuda a recuperar la función cardiaca y desemboca en dilatación cardiaca. Las paredes del ventrículo se estrechan y las cámaras aumentan su tamaño, con lo que la función contráctil queda comprometida y puede llegar a darse fallo cardiaco. Por tanto, podemos hablar de hipertrofia compensada o adaptativa cuando el engrosamiento en la pared del ventrículo ayuda a incrementar el bombeo de sangre, como ocurre en la hipertrofia inducida por el ejercicio o durante el embarazo (Dorn, 2007), mientras que hablamos de hipertrofia descompensada o maladaptativa cuando las señales hipertróficas se mantienen de una forma crónica, predominando entonces la apoptosis frente a la supervivencia y provocando la dilatación cardiaca (Opie y cols. 2006).

Distintos agonistas que actúan a través de receptores acoplados a proteínas Gq (fenilefrina, endotelina, angiotensina, etc) han sido relacionados con el crecimiento hipertrófico de los cardiomiocitos. Entre estas moléculas señalizadoras nos interesamos en angiotensina II porque ejerce sus funciones a través del receptor AT₁R, el cual está acoplado preferentemente a subunidades G α q. En situación normal, angiotensina se encarga de regular el flujo sanguíneo y sus niveles están finamente regulados por el sistema renina-angiotensina. Cuando el corazón sufre un aumento de presión agudo, los cardiomiocitos secretan angiotensina regulando su propia contracción de manera autocrina. Pero cuando la señal de angiotensina es sostenida en el tiempo, debido a un desequilibrio en el sistema renina-angiotensina, se perciben sus efectos en el crecimiento de los cardiomiocitos y la remodelación cardiaca (Mehta y Griendling, 2007). Este crecimiento es principalmente concéntrico, los cardiomiocitos se engrosan, lo que se correlaciona con una hipertrofia descompensada (pared del ventrículo más ancha, y reducción de las cámaras) que puede terminar en dilatación cardiaca. Por el contrario, en la hipertrofia compensada, predomina la señalización de factores de crecimiento, como IGF-1, frente a la señalización de angiotensina y otras neurohormonas. En este caso el crecimiento de los cardiomiocitos es a lo largo, en vez de a lo ancho, lo que se conoce como hipertrofia excéntrica (Dorn y Force, 2005) y el resultado es un aumento en el grosor de la pared así como en el tamaño de las cámaras.

Numerosos estudios han demostrado el desarrollo de hipertrofia cardiaca en ratones mediante el tratamiento crónico con angiotensina II durante 14 días (Bueno y cols. 2002). Así, en el presente estudio, se ha mostrado como la administración de angiotensina II (432 μ g/Kg/día durante 14 días) en ratones silvestres de la cepa 129/SV provoca un incremento significativo en el tamaño del corazón sin variar el número de latidos por minuto, acompañado de un incremento en los niveles del marcador ANP. De forma similar, otros estudios han mostrado que un tratamiento similar con angiotensina II en ratones de la cepa C57BL6/CBA (más frecuentemente utilizada) aumenta la presión sanguínea, provocando un incremento del tamaño del corazón (4,51 mg/g al inicio del tratamiento, 5,84 mg/g al

final) a consecuencia de una mayor área de los cardiomiocitos, sin que se altere el número de latidos por minuto, ni se observe fibrosis en el miocardio. Además, también se detecta una subida considerable en la expresión de ANP, así como de otros marcadores de hipertrofia cardíaca (Ikeda y cols. 2005).

Nuestros datos muestran además que la función contráctil se encuentra en cierta medida comprometida, hecho que se refleja en un incremento en el tiempo requerido por el ventrículo para su ciclo de polarización/despolarización (incremento en el segmento QT del electrocardiograma). Se ha demostrado que pacientes con hipertrofia cardíaca y/o fallo cardíaco muestran este tipo de incremento en el segmento QT, mientras que el tratamiento con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina II revierte este síntoma (Domenighetti y cols. 2007). Llamativamente, los ratones de la misma cepa, pero deficientes en PKC ζ , no desarrollan un cambio significativo en ninguno de estos parámetros característicos de un fenotipo hipertrófico en respuesta a angiotensina II, poniendo de manifiesto la importancia de la vía de señalización G α q/PKC ζ en este proceso fisiopatológico. Aunque se ha demostrado que la infusión de angiotensina II en corazón provoca activación de ERK5 (Ikeda y cols. 2005) y se han observado incrementos en la activación de ERK5 en hipertrofia del ventrículo izquierdo (Takeishi y cols. 2001; Kacimi y Gerdes, 2003), no fuimos capaces de observar fosforilación de ERK5 en nuestras muestras, probablemente debido a que la sensibilidad de la técnica de detección no fue suficiente. Sin embargo, sí que hemos observado la ausencia de activación de ERK5 en cardiomiocitos de ratón obtenidos a partir de ratones deficientes en PKC ζ , permitiéndonos sugerir que probablemente la actividad de ERK5 en respuesta a receptores acoplados a Gq sea necesaria para desencadenar el fenotipo hipertrófico. En este sentido, se ha demostrado que la sobreexpresión de MEK5 (Nicol y cols, 2001), así como de algunas dianas de ERK5 (MEF2A, C y D) (Xu y cols. 2006) a través de los cuales ERK5 incrementa la expresión de c-Jun (Wang y Tournier, 2006), inducen la aparición de hipertrofia. La importancia de c-Jun en el desarrollo de hipertrofia es crítica, ya que ratas que sobreexpresan una forma dominante negativa de c-Jun en corazón, no desarrollan hipertrofia tras un tratamiento con angiotensina II, y en ratas espontáneamente hipertensas la expresión de este dominante negativo reduce considerablemente la hipertrofia cardíaca (Kim-Mitsuyama y cols. 2006).

Se ha descrito que PKC ζ se transloca a la membrana en respuesta a agonistas de receptores acoplados a Gq en células cardíacas (Takeishi y cols. 1999), aunque, hasta el momento, no se había observado ningún fenotipo cardíaco en los ratones deficientes en PKC ζ (Leitges y cols. 2001). Tampoco la deficiencia en otras PKCs provoca fenotipo hipertrófico, por lo que podrían darse procesos de compensación entre las distintas isoformas (Dorn II y Force, 2005). Sin embargo, la ausencia de PKC ζ no altera los niveles de otras isoformas en diferentes tejidos (Leitges y cols. 2001), por lo que no parece que cambios en otras isoformas puedan contribuir a los defectos observados en la señalización de G α q.

No puede descartarse que la ausencia de PKC ζ pudiese estar afectando también a la señalización de otros receptores y vías de transducción promovidas por angiotensina, que pueden estar siendo activados en el proceso de hipertrofia cardiaca. Los receptores de factores de crecimiento (EGFR, PDGF y el receptor de insulina) son transactivados por angiotensina II (Mehta y Griendling, 2006), por lo que sus rutas de señalización podrían estar bloqueadas, si PKC ζ participa en ellas, y de esta forma frenar el proceso hipertrófico en los ratones PKC ζ ^{-/-}. Angiotensina II también provoca la expresión de las citoquinas cardiotrofina-1 (CT-1) y el factor inhibidor de la leucemia (LIF) en fibroblastos cardiacos (Sano y cols. 2000). Estas citoquinas, además de activar a ERK5 induciendo hipertrofia excéntrica en cardiomiocitos (Nicol y cols. 2001; Nakaoka y cols., 2003), también modulan el proceso hipertrófico a través de la ruta JAK/STAT, activando específicamente a las isoformas JAK1, JAK2, STAT1 y STAT3 (Mehta y Griendling, 2006; Ruppert y Meyer, 2007). En este contexto, sería de interés analizar la posibilidad de que PKC ζ esté participando en la inducción de la expresión de citoquinas mediada por angiotensina II o en la ruta de activación de ERK5 iniciada por estos mensajeros, así como la posibilidad de que PKC ζ intervenga directamente en la ruta de JAK/STAT en respuesta a GPCRs acoplados a Gq. Se ha observado que en células hepáticas PKC ζ participa en la activación de JAK1/STAT6 inducida por el receptor de interleuquina 4 (Moscato y cols. 2006). Aunque en hipertrofia cardiaca parecen intervenir otras isoformas de JAK y STAT, resultaría interesante analizar la posibilidad de que en células cardiacas PKC ζ esté modulando a esta vía.

Otra cuestión interesante sería analizar el efecto que produce la falta de PKC ζ en la activación del factor de transcripción NF- κ B en corazón. PKC ζ participa en la ruta de activación de NF- κ B en respuesta a TNF α , linfotoxina β e interleuquina-1, y por tanto ratones deficientes en esta quinasa presentan deficiencias en la expresión de los genes diana de NF- κ B en células inmunes (Moscato y cols. 2006). Existen varios indicios de que NF- κ B interviene en el desarrollo de hipertrofia y en la progresión a fallo cardiaco. Por ejemplo, pacientes con fallo cardiaco presentan altos niveles de citoquinas proinflamatorias (Levine y cols. 1990), por lo que en los últimos años ha crecido el interés por el papel que pueden jugar estas citoquinas en la progresión de esta patología. Sin duda, parte de los efectos de estas citoquinas estarán mediados por NF- κ B y se podrían presentar en menor grado en los ratones deficientes en PKC ζ . Además, se ha demostrado que, tras un aumento de presión en el corazón, éste produce TNF α (Torre-amione y cols. 1999), que estimula la producción de citoquinas de la familia IL-6 (IL-6, CT-1 y LIF), a través de la activación de NF- κ B (Terrel y cols. 2006). Esta ruta de señalización podría encontrarse bloqueada en células que carezcan de PKC ζ por lo que se frenarían los efectos de TNF α y de las citoquinas sobre el desarrollo de hipertrofia. Por otro lado, en células cardiacas, PKC ζ puede promover apoptosis al inhibir a Akt, en respuesta a tromboxano A₂ durante procesos isquémicos (Shizukuda y Buttrick, 2002). Angiotensina II también promueve apoptosis, siendo responsable de la transición del estado compensado al descompensado (Opie y cols. 2006), por lo que en el futuro será interesante analizar el efecto de PKC ζ sobre Akt en respuesta a angiotensina II y la posibilidad de que

PKC ζ esté inhibiendo a Akt y de esta forma promueva la apoptosis y la transición a cardiomiopatía dilatada.

Otra ruta importante en el desarrollo de hipertrofia iniciada por angiotensina II, es la señal de Ca²⁺, que depende de la activación de PLC β por G α q. El Ca²⁺ provoca, entre otras cosas, la activación de la fosfatasa calcineurina y de sus dianas, los factores de transcripción NFAT (del inglés Nuclear Factor of Activated T cells), que son mediadores críticos de la respuesta hipertrófica (Wilkins y Molkentin, 2002; Dorn y Force, 2005). En principio, las rutas de señalización iniciadas por PLC β no deberían estar alteradas en los ratones deficientes en PKC ζ . La ausencia de fenotipo hipertrófico en estos ratones plantea la posibilidad de que la ruta de PLC β no sea la única determinante de su desencadenamiento. De hecho, resultados obtenidos por Mende y colaboradores (2001) apoyan esta idea. En este estudio, analizaron el fenotipo hipertrófico de dos líneas de ratones que sobreexpresaban en corazón una forma activa constitutivamente de G α q. Sólo la línea α q*52, la cual expresa cinco veces más G α q que la línea α q*44, desarrolló hipertrofia cardíaca. Curiosamente, en la línea α q*44 se observa un incremento en la actividad de PLC β , que no viene acompañado del desarrollo de hipertrofia cardíaca. Por tanto, aunque se ha descrito que las señales iniciadas por PLC β son importantes en el desarrollo de hipertrofia, parece que no son suficientes para iniciar este proceso, necesitando el concurso de otras vías de señalización en las que PKC ζ está críticamente implicada.

Como una primera aproximación al conjunto de cambios que supone la ausencia de PKC ζ en respuesta a angiotensina, hemos estudiado el patrón global de la expresión génica en corazones de ratones silvestres y deficientes en respuesta a este estímulo mediante la tecnología de “arrays”. El estudio de la expresión génica global de ratones de ambos genotipos (wt y PKC ζ -/-) tratados o no con angiotensina, y su comparación con los resultados provenientes de otros estudios similares en diversos modelos de análisis de hipertrofia cardíaca en ratones, ha permitido apoyar la idea de que la deficiencia en PKC ζ en general evita el desarrollo de hipertrofia en respuesta a Angiotensina, en coherencia con los datos morfométricos, funcionales y plasmáticos. Así, hemos podido comprobar que el tratamiento con angiotensina II en los ratones deficientes en PKC ζ (a diferencia de los wt), no da lugar a un patrón de expresión génica similar al que se promueve en otros modelos de inducción de hipertrofia. De modo particular, este tratamiento no induce el aumento en la expresión de algunos marcadores clásicos de hipertrofia (ANP, BNP) o fibrosis (procolágeno tipo I), como ocurre en los otros modelos experimentales.

El estudio de enriquecimiento de funciones de los genes modulados en hipertrofia (Grupo I), revela que en los modelos estudiados se incrementa la expresión de un número elevado de genes implicados en ciclo y división celular, adhesión celular, transporte de fosfato y desarrollo, entre otros. Esto podría estar relacionado con los cambios celulares, de síntesis y acumulación de proteínas que se

requiere para que tenga lugar el proceso hipertrófico. Otros autores han observado también la sobreexpresión de genes relacionados con ciclo y adhesión celular tras la inducción de hipertrofia (Larkin y cols., 2004; Mirotsoy y cols., 2006). En cuanto a los genes que disminuyen su expresión en esta patología, se encontraron funciones biológicas relacionadas con metabolismo, fosforilación oxidativa, transporte de electrones y ciclo de Krebs. Estos datos moleculares están de acuerdo con lo publicado por otros autores que también han observado la disminución de genes con funciones similares tras el tratamiento con angiotensina II o tras constricción aórtica transversal (Larkin y cols., 2004; Mirotsoy y cols., 2006). Buena parte de estos cambios no parecen darse en los ratones deficientes en PKC ζ estimulados crónicamente con angiotensina.

Por otra parte, el análisis preliminar de los datos de biochips pone de manifiesto que ciertas vías de activación dependientes de la activación de ERK5 estarían sobreexpresadas en los animales que presentan hipertrofia cardíaca. Por tanto, estos genes no estarían regulados de forma positiva en los ratones deficientes en PKC ζ y que han sido tratados con angiotensina II, sugiriendo que en estos ratones la activación de ERK5 y, en consecuencia, de sus dianas, estarían mitigadas, apoyando la hipótesis de que la actividad de ERK5 en hipertrofia esté mediada por PKC ζ , a través de GPCRs acoplados a Gq. Estos genes no estarían regulados de forma positiva en los ratones deficientes en PKC ζ y que han sido tratados con angiotensina II, sugiriendo que en estos ratones la activación de ERK5 y, en consecuencia, de sus dianas, estarían mitigadas apoyando la hipótesis de que la actividad de ERK5 en hipertrofia esté mediada por PKC ζ , a través de GPCRs acoplados a Gq. De entre los genes relacionados con ERK5 sobreexpresados en hipertrofia destacan genes relacionados con procesos de angiogenesis (*Ets-1*, *Igfbp7*, *Vegfa*, *Bcl2* y *Ccna2*). Se han encontrado altos niveles de la proteína antiapoptótica bcl2 en estadios tempranos de hipertrofia (Ecartot-Laubriet y cols., 2002). Además, es interesante destacar el hecho de que el engrosamiento de la pared arterial, la fibrosis perivasculare y la hipertrofia cardíaca inducida por angiotensina II están significativamente reducidos en ratones deficientes en Ets-1 (Zhan y cols., 2005). Aunque algunas de estas dianas de ERK5 pueden ser compartidas también con ERK1/2, se ha observado que la inhibición de PKC ζ en fibroblastos cardíacos adultos no tiene efecto sobre la activación de ERK1/2 por angiotensina II (Olson y cols., 2008). Estos resultados, junto con los obtenidos en este estudio, apoyan el que la deficiencia de PKC ζ sea importante para la activación de ERK5, y que esta activación sea importante para el desarrollo de hipertrofia. Sin embargo, la posibilidad de que otras vías moduladas por el eje Gq/PKC ζ distintas a ERK5 pero relevantes para hipertrofia estén también alteradas en la deficiencia en esta quinasa no puede descartarse.

En definitiva, los datos de expresión génica global aportan datos preliminares que requieren un análisis más detallado de los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de hipertrofia cardíaca mediante la activación de la vía de señalización G α q/PKC ζ /ERK5.

La hipertrofia cardíaca es un proceso complejo, que se encuentra modulado por múltiples factores, y todavía estamos lejos de comprender cuáles de estos factores contribuyen en la transición al estado descompensado y fallo cardíaco. En este trabajo de investigación ponemos de manifiesto, por primera vez, el papel que juega PKC ζ en el proceso hipertrófico, al formar parte de las rutas de señalización iniciadas por Angiotensina II. De este modo, PKC ζ se presenta como nuevo efector de G α_q , lo que abre la posibilidad de que pueda participar en multitud de procesos fisiológicos, dependientes de la activación de GPCRs acoplados a estas subunidades, que deberían estudiarse en el futuro.



1. La estimulación de distintos receptores acoplados a Gq (receptor muscarínico m1, receptor de angiotensina II, AT₁R, y receptores de esfingosina 1 fosfato, SIP₂ y SIP₃) conduce a la activación de la ruta de ERK5 en distintos tipos celulares.

2. La activación de ERK5 inducida por receptores acoplados a Gq es dependiente de mecanismos de internalización e independiente de la activación de PLC β , de tirosina quinasas citosólicas de la familia c-Src y del receptor de EGF.

3. La sobreexpresión de formas activas de G α q es suficiente para inducir la activación de ERK5.

4. G α q y PKC ζ se asocian en la célula y pueden interactuar directamente. Esta interacción es específica (puesto que no se da con otras familias de subunidades G α , ni con el otro isotipo de PKCs atípicas, PKC λ). PKC ζ interactúa preferentemente con la forma activa de G α q y la estimulación de receptores acoplados a G α q induce un incremento en la asociación tanto entre las proteínas endógenas como sobreexpresadas. La estimulación de GPCRs acoplados a Gq promueve la translocación de PKC ζ a la membrana.

5. PKC ζ juega un papel crítico en la activación de ERK5 inducida por receptores acoplados a Gq, puesto que el tratamiento con un inhibidor específico de PKC ζ , así como la deficiencia en esta quinasa, bloquea totalmente la activación de ERK5 en respuesta a agonista en MEFs y en cardiomiocitos.

6. G α q, PKC ζ y MEK5 α están presentes en el mismo complejo macromolecular. MEK5 α puede asociarse directamente con G α q de forma independiente a su dominio PB1, lo que sugiere una función “andamio” de G α q para orquestar las distintas interacciones responsables de promover la completa activación de la ruta de ERK5.

7. GRK2 inhibe la interacción de G α q con PKC ζ y con MEK5 α , impidiendo que tenga lugar la activación de ERK5. Estos resultados indican que GRK2 regula las diversas rutas de señalización iniciadas por G α q al interactuar con sus efectores y apuntan a que PKC ζ y MEK5 interactúan con G α q por una región que solapa con la que lo hace GRK2 (hélices α 2 y α 3 de G α q).

8. La deficiencia de PKC ζ en ratones provoca una ausencia de fenotipo hipertrófico tras el tratamiento crónico con angiotensina II, lo que indica que la nueva vía de señalización G α q/PKC ζ desempeña un papel fundamental en el desarrollo de hipertrofia cardíaca.

BIBLIOGRAFÍA



- A**dams JW, Sakata Y, Davis MG, Sah VP, Wang Y, Liggett SB, Chien KR, Brown JH and Dorn GW, 2nd (1998) Enhanced G α q signaling: a common pathway mediates cardiac hypertrophy and apoptotic heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**(17):10140-10145.
- Ahn YH, Han JH and Hong SH (2006) Rap1 and p38 MAPK mediate 8-chloro-cAMP-induced growth inhibition in mouse fibroblast DT cells. *Journal of cellular physiology* **209**(3):1039-1045.
- Akimoto K, Mizuno K, Osada S, Hirai S, Tanuma S, Suzuki K and Ohno S (1994) A new member of the third class in the protein kinase C family, PKC lambda, expressed dominantly in an undifferentiated mouse embryonal carcinoma cell line and also in many tissues and cells. *J Biol Chem* **269**(17):12677-12683.
- Anderson KM, Eckhart AD, Willette RN and Koch WJ (1999) The myocardial beta-adrenergic system in spontaneously hypertensive heart failure (SHHF) rats. *Hypertension* **33**(1 Pt 2):402-407.
- B**aldwin JM (1994) Structure and function of receptors coupled to G proteins. *Current opinion in cell biology* **6**(2):180-190.
- Bence K, Ma W, Kozasa T and Huang XY (1997) Direct stimulation of Bruton's tyrosine kinase by G(q)-protein alpha-subunit. *Nature* **389**(6648):296-299.
- Berra E, Diaz-Meco MT, Lozano J, Frutos S, Municio MM, Sanchez P, Sanz L and Moscat J (1995) Evidence for a role of MEK and MAPK during signal transduction by protein kinase C zeta. *Embo J* **14**(24):6157-6163.
- Birnbaumer L (2007) Expansion of signal transduction by G proteins. The second 15 years or so: from 3 to 16 alpha subunits plus betagamma dimers. *Biochimica et biophysica acta* **1768**(4):772-793.
- Bisping E, Ikeda S, Kong SW, Tarnavski O, Bodyak N, McMullen JR, Rajagopal S, Son JK, Ma Q, Springer Z, Kang PM, Izumo S and Pu WT (2006) Gata4 is required for maintenance of postnatal cardiac function and protection from pressure overload-induced heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(39):14471-14476.
- Blumer JB, Smrcka AV and Lanier SM (2007) Mechanistic pathways and biological roles for receptor-independent activators of G-protein signaling. *Pharmacology & therapeutics* **113**(3):488-506.
- Bockaert J and Pin JP (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *Embo J* **18**(7):1723-1729.
- Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M and Speed TP (2003) A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* **19**(2):185-193.
- Booden MA, Siderovski DP and Der CJ (2002) Leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor promotes G alpha q-coupled activation of RhoA. *Molecular and cellular biology* **22**(12):4053-4061.
- Bowman JC, Steinberg SF, Jiang T, Geenen DL, Fishman GI and Buttrick PM (1997) Expression of protein kinase C beta in the heart causes hypertrophy in adult mice and sudden death in neonates. *The Journal of clinical investigation* **100**(9):2189-2195.
- Braz JC, Bueno OF, De Windt LJ and Molkenin JD (2002) PKC alpha regulates the hypertrophic growth of cardiomyocytes through extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2). *The Journal of cell biology* **156**(5):905-919.
- Buchsbaum RJ, Connolly BA and Feig LA (2002) Interaction of Rac exchange factors Tiam1 and Ras-GRF1 with a scaffold for the p38 mitogen-activated protein kinase cascade. *Molecular and cellular biology* **22**(12):4073-4085.
- Bueno OF, De Windt LJ, Tymitz KM, Witt SA, Kimball TR, Klevitsky R, Hewett TE, Jones SP, Lefer DJ, Peng CF, Kitsis RN and Molkenin JD (2000) The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *Embo J* **19**(23):6341-6350.
- Bueno OF, Wilkins BJ, Tymitz KM, Glascock BJ, Kimball TF, Lorenz JN and Molkenin JD (2002) Impaired cardiac hypertrophic response in Calcineurin Abeta -deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(7):4586-4591.
- Bunemann M and Hosey MM (1998) Regulators of G protein signaling (RGS) proteins constitutively activate Gbeta gamma-gated potassium channels. *J Biol Chem* **273**(47):31186-31190.



- C**abrera-Vera TM, Vanhauwe J, Thomas TO, Medkova M, Preininger A, Mazzoni MR and Hamm HE (2003) Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocrine reviews* **24**(6):765-781.
- Cao TT, Deacon HW, Reczek D, Bretscher A and von Zastrow M (1999) A kinase-regulated PDZ-domain interaction controls endocytic sorting of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* **401**(6750):286-290.
- Carlsson MB, Tragardh E, Engblom H, Hedstrom E, Wagner G, Pahlm O and Arheden H (2006) Left ventricular mass by 12-lead electrocardiogram in healthy subjects: comparison to cardiac magnetic resonance imaging. *Journal of electrocardiology* **39**(1):67-72.
- Carman CV, Parent JL, Day PW, Pronin AN, Sternweis PM, Wedegaertner PB, Gilman AG, Benovic JL and Kozasa T (1999) Selective regulation of Galpha(q/11) by an RGS domain in the G protein-coupled receptor kinase, GRK2. *J Biol Chem* **274**(48):34483-34492.
- Chien KR (1999) Stress pathways and heart failure. *Cell* **98**(5):555-558.
- Choi DJ, Koch WJ, Hunter JJ and Rockman HA (1997) Mechanism of beta-adrenergic receptor desensitization in cardiac hypertrophy is increased beta-adrenergic receptor kinase. *J Biol Chem* **272**(27):17223-17229.
- Chuang TT, Iacovelli L, Sallèse M and De Blasi A (1996) G protein-coupled receptors: heterologous regulation of homologous desensitization and its implications. *Trends Pharmacol Sci* **17**(11):416-421.
- Cogolludo A, Moreno L, Bosca L, Tamargo J and Perez-Vizcaino F (2003) Thromboxane A2-induced inhibition of voltage-gated K⁺ channels and pulmonary vasoconstriction: role of protein kinase C ζ . *Circulation research* **93**(7):656-663.
- Collins LR, Minden A, Karin M and Brown JH (1996) Galpha12 stimulates c-Jun NH2-terminal kinase through the small G proteins Ras and Rac. *J Biol Chem* **271**(29):17349-17353.
- Coso OA, Teramoto H, Simonds WF and Gutkind JS (1996) Signaling from G protein-coupled receptors to c-Jun kinase involves beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins acting on a Ras and Rac1-dependent pathway. *J Biol Chem* **271**(8):3963-3966.
- Crespo P, Xu N, Daniotti JL, Troppmair J, Rapp UR and Gutkind JS (1994) Signaling through transforming G protein-coupled receptors in NIH 3T3 cells involves c-Raf activation. Evidence for a protein kinase C- independent pathway. *J Biol Chem* **269**(33):21103-21109.
- D**'Angelo DD, Sakata Y, Lorenz JN, Boivin GP, Walsh RA, Liggett SB and Dorn GW, 2nd (1997) Transgenic Galphaq overexpression induces cardiac contractile failure in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**(15):8121-8126.
- Day PW, Tesmer JJ, Sterne-Marr R, Freeman LC, Benovic JL and Wedegaertner PB (2004) Characterization of the GRK2 binding site of Galphaq. *J Biol Chem* **279**(51):53643-53652.
- Della Rocca GJ, van Biesen T, Daaka Y, Luttrell DK, Luttrell LM and Lefkowitz RJ (1997) Ras-dependent mitogen-activated protein kinase activation by G protein-coupled receptors. Convergence of Gi- and Gq-mediated pathways on calcium/calmodulin, Pyk2, and Src kinase. *J Biol Chem* **272**(31):19125-19132.
- Deng J, Kawakami Y, Hartman SE, Satoh T and Kawakami T (1998) Involvement of Ras in Bruton's tyrosine kinase-mediated JNK activation. *J Biol Chem* **273**(27):16787-16791.
- Deng Y, Yang J, McCarty M and Su B (2007) MEKK3 is required for endothelium function but is not essential for tumor growth and angiogenesis. *American journal of physiology* **293**(4):C1404-1411.
- Dennis G, Jr., Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC and Lempicki RA (2003) DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol* **4**(5):P3.
- Dermott JM, Ha JH, Lee CH and Dhanasekaran N (2004) Differential regulation of Jun N-terminal kinase and p38MAP kinase by Galpha12. *Oncogene* **23**(1):226-232.
- Dhillon AS, Pollock C, Steen H, Shaw PE, Mischak H and Kolch W (2002) Cyclic AMP-dependent kinase regulates Raf-1 kinase mainly by phosphorylation of serine 259. *Molecular and cellular biology* **22**(10):3237-3246.
- Dhingra R, Ho Nam B, Benjamin EJ, Wang TJ, Larson MG, D'Agostino RB, Sr., Levy D and Vasan RS (2005) Cross-sectional relations of electrocardiographic QRS duration to left ventricular dimensions: the Framingham Heart Study. *Journal of the American College of Cardiology* **45**(5):685-689.

- Diaz-Meco MT and Moscat J (2001) MEK5, a new target of the atypical protein kinase C isoforms in mitogenic signaling. *Molecular and cellular biology* **21**(4):1218-1227.
- Dixon RA, Kobilka BK, Strader DJ, Benovic JL, Dohman HG, Frielle T, Bolanowski MA, Bennett CD, Rands E, Diehl RE and al. e (1986) Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* **321**(6065):75-79.
- Dodge-Kafka KL and Kapiloff MS (2006) The mAKAP signaling complex: integration of cAMP, calcium, and MAP kinase signaling pathways. *European journal of cell biology* **85**(7):593-602.
- Domenighetti AA, Boixel C, Cefai D, Abriel H and Pedrazzini T (2007) Chronic angiotensin II stimulation in the heart produces an acquired long QT syndrome associated with IK1 potassium current downregulation. *Journal of molecular and cellular cardiology* **42**(1):63-70.
- Dorn GW, 2nd (2007) The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy. *Hypertension* **49**(5):962-970.
- Dorn GW, 2nd and Force T (2005) Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *The Journal of clinical investigation* **115**(3):527-537.
- Dostal DE and Baker KM (1992) Angiotensin II stimulation of left ventricular hypertrophy in adult rat heart. Mediation by the AT1 receptor. *Am J Hypertens* **5**(5 Pt 1):276-280.
- Dowal L, Provitera P and Scarlata S (2006) Stable association between G alpha(q) and phospholipase C beta 1 in living cells. *J Biol Chem* **281**(33):23999-24014.
- Dzimiri N, Muiya P, Andres E and Al-Halees Z (2004) Differential functional expression of human myocardial G protein receptor kinases in left ventricular cardiac diseases. *Eur J Pharmacol* **489**(3):167-177.
- E**carnot-Laubriet A, Assem M, Poirson-Bichat F, Moisant M, Bernard C, Lecour S, Solary E, Rochette L and Teyssier JR (2002) Stage-dependent activation of cell cycle and apoptosis mechanisms in the right ventricle by pressure overload. *Biochimica et biophysica acta* **1586**(3):233-242.
- Eglen RM, Bosse R and Reisine T (2007) Emerging concepts of guanine nucleotide-binding protein-coupled receptor (GPCR) function and implications for high throughput screening. *Assay and drug development technologies* **5**(3):425-451.
- F**an G, Ballou LM and Lin RZ (2003) Phospholipase C-independent activation of glycogen synthase kinase-3beta and C-terminal Src kinase by Galphaq. *J Biol Chem* **278**(52):52432-52436.
- Ferguson SS (2007) Phosphorylation-independent attenuation of GPCR signalling. *Trends Pharmacol Sci* **28**(4):173-179.
- Fielitz J, Kim MS, Shelton JM, Qi X, Hill JA, Richardson JA, Bassel-Duby R and Olson EN (2008) Requirement of protein kinase D1 for pathological cardiac remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**(8):3059-3063.
- Force T, Pombo CM, Avruch JA, Bonventre JV and Kyriakis JM (1996) Stress-activated protein kinases in cardiovascular disease. *Circulation research* **78**(6):947-953.
- Fukuhara S, Marinissen MJ, Chiariello M and Gutkind JS (2000) Signaling from G protein-coupled receptors to ERK5/Big MAPK 1 involves Galpha q and Galpha 12/13 families of heterotrimeric G proteins. Evidence for the existence of a novel Ras AND Rho-independent pathway. *J Biol Chem* **275**(28):21730-21736.
- G**eetha T and Wooten MW (2003) Association of the atypical protein kinase C-interacting protein p62/ZIP with nerve growth factor receptor TrkA regulates receptor trafficking and Erk5 signaling. *J Biol Chem* **278**(7):4730-4739.
- Godeny MD and Sayeski PP (2006) ANG II-induced cell proliferation is dually mediated by c-Src/Yes/Fyn-regulated ERK1/2 activation in the cytoplasm and PKCzeta-controlled ERK1/2 activity within the nucleus. *American journal of physiology* **291**(6):C1297-1307.
- Goldsmith ZG and Dhanasekaran DN (2007) G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene* **26**(22):3122-3142.
- Gros R, Benovic JL, Tan CM and Feldman RD (1997) G-protein-coupled receptor kinase activity is increased in hypertension. *The Journal of clinical investigation* **99**(9):2087-2093.



- Gros R, Chorazyczewski J, Meek MD, Benovic JL, Ferguson SS and Feldman RD (2000) G-Protein-coupled receptor kinase activity in hypertension : increased vascular and lymphocyte G-protein receptor kinase-2 protein expression. *Hypertension* **35**(1 Pt 1):38-42.
- Gudermann T, Kalkbrenner F, Dippel E, Laugwitz KL and Schultz G (1997a) Specificity and complexity of receptor-G-protein interaction. *Advances in second messenger and phosphoprotein research* **31**:253-262.
- Gudermann T, Schoneberg T and Schultz G (1997b) Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors. *Annual review of neuroscience* **20**:399-427.
- Guo FF, Kumahara E and Saffen D (2001) A CalDAG-GEF1/Rap1/B-Raf cassette couples M(1) muscarinic acetylcholine receptors to the activation of ERK1/2. *J Biol Chem* **276**(27):25568-25581.

- H**ahn HS, Marreez Y, Odley A, Sterbling A, Yussman MG, Hilty KC, Bodi I, Liggett SB, Schwartz A and Dorn GW, 2nd (2003) Protein kinase Calpha negatively regulates systolic and diastolic function in pathological hypertrophy. *Circulation research* **93**(11):1111-1119.
- Hahn HS, Yussman MG, Toyokawa T, Marreez Y, Barrett TJ, Hilty KC, Osinska H, Robbins J and Dorn GW, 2nd (2002) Ischemic protection and myofibrillar cardiomyopathy: dose-dependent effects of in vivo deltaPKC inhibition. *Circulation research* **91**(8):741-748.
- Hait NC, Oskeritzian CA, Paugh SW, Milstien S and Spiegel S (2006) Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases. *Biochimica et biophysica acta* **1758**(12):2016-2026.
- Hall RA, Premont RT and Lefkowitz RJ (1999) Heptahelical receptor signaling: beyond the G protein paradigm. *The Journal of cell biology* **145**(5):927-932.
- Hart MJ, Jiang X, Kozasa T, Roscoe W, Singer WD, Gilman AG, Sternweis PC and Bollag G (1998) Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Galpha13. *Science* **280**(5372):2112-2114.
- Hayashi M and Lee JD (2004) Role of the BMK1/ERK5 signaling pathway: lessons from knockout mice. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* **82**(12):800-808.
- He Z and King GL (2004) Protein kinase Cbeta isoform inhibitors: a new treatment for diabetic cardiovascular diseases. *Circulation* **110**(1):7-9.
- Heineke J and Molkentin JD (2006) Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(8):589-600.
- Hirai T and Chida K (2003) Protein kinase Czeta (PKCzeta): activation mechanisms and cellular functions. *Journal of biochemistry* **133**(1):1-7.
- Hirano Y, Yoshinaga S, Ogura K, Yokochi M, Noda Y, Sumimoto H and Inagaki F (2004) Solution structure of atypical protein kinase C PB1 domain and its mode of interaction with ZIP/p62 and MEK5. *J Biol Chem* **279**(30):31883-31890.
- Hirota H, Chen J, Betz UA, Rajewsky K, Gu Y, Ross J, Jr., Muller W and Chien KR (1999) Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress. *Cell* **97**(2):189-198.
- Hirota H, Yoshida K, Kishimoto T and Taga T (1995) Continuous activation of gp130, a signal-transducing receptor component for interleukin 6-related cytokines, causes myocardial hypertrophy in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**(11):4862-4866.
- Hosack DA, Dennis G, Jr., Sherman BT, Lane HC and Lempicki RA (2003) Identifying biological themes within lists of genes with EASE. *Genome Biol* **4**(10):R70.

- I**keda Y, Aihara K, Sato T, Akaike M, Yoshizumi M, Suzaki Y, Izawa Y, Fujimura M, Hashizume S, Kato M, Yagi S, Tamaki T, Kawano H, Matsumoto T, Azuma H, Kato S and Matsumoto T (2005) Androgen receptor gene knockout male mice exhibit impaired cardiac growth and exacerbation of angiotensin II-induced cardiac fibrosis. *J Biol Chem* **280**(33):29661-29666.
- Inagaki K, Chen L, Ikeno F, Lee FH, Imahashi K, Bouley DM, Rezaee M, Yock PG, Murphy E and Mochly-Rosen D (2003) Inhibition of delta-protein kinase C protects against reperfusion injury of the ischemic heart in vivo. *Circulation* **108**(19):2304-2307.
- Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U and Speed TP (2003) Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* **4**(2):249-264.

- Jacoby E, Bouhelal R, Gerspacher M and Seuwen K (2006) The 7 TM G-protein-coupled receptor target family. *ChemMedChem* **1**(8):761-782.
- Jalili T, Takeishi Y, Song G, Ball NA, Howles G and Walsh RA (1999a) PKC translocation without changes in G α q and PLC- β protein abundance in cardiac hypertrophy and failure. *Am J Physiol* **277**(6 Pt 2):H2298-2304.
- Jalili T, Takeishi Y and Walsh RA (1999b) Signal transduction during cardiac hypertrophy: the role of G α q, PLC β 1, and PKC. *Cardiovasc Res* **44**(1):5-9.
- Jiang Y, Ma W, Wan Y, Kozasa T, Hattori S and Huang XY (1998) The G protein G α 12 stimulates Bruton's tyrosine kinase and a rasGAP through a conserved PH/BM domain. *Nature* **395**(6704):808-813.
- Jiang YP, Ballou LM, Lu Z, Li W, Kelly DJ, Cohen IS and Lin RZ (2006) Reversible heart failure in G α q transgenic mice. *J Biol Chem* **281**(40):29988-29992.
- Jimenez E and Montiel M (2005) Activation of MAP kinase by muscarinic cholinergic receptors induces cell proliferation and protein synthesis in human breast cancer cells. *Journal of cellular physiology* **204**(2):678-686.
- Kacimi R and Gerdes AM (2003) Alterations in G protein and MAP kinase signaling pathways during cardiac remodeling in hypertension and heart failure. *Hypertension* **41**(4):968-977.
- Kato M, Yamaguchi T, Tachibana A, Suzuki M, Izumi T, Maruyama K, Hayashi Y and Kimura H (2005) An atypical protein kinase C, PKC zeta, regulates human eosinophil effector functions. *Immunology* **116**(2):193-202.
- Kato Y, Tapping RI, Huang S, Watson MH, Ulevitch RJ and Lee JD (1998) Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor. *Nature* **395**(6703):713-716.
- Keys JR and Koch WJ (2004) The adrenergic pathway and heart failure. *Recent Prog Horm Res* **59**:13-30.
- Kim-Mitsuyama S, Izumi Y, Izumiya Y, Namba M, Yoshida K, Wake R, Yoshiyama M and Iwao H (2006) Dominant-negative c-Jun inhibits rat cardiac hypertrophy induced by angiotensin II and hypertension. *Gene therapy* **13**(4):348-355.
- Kim S and Iwao H (2000) Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacological reviews* **52**(1):11-34.
- Kim Y, Phan D, van Rooij E, Wang DZ, McAnally J, Qi X, Richardson JA, Hill JA, Bassel-Duby R and Olson EN (2008) The MEF2D transcription factor mediates stress-dependent cardiac remodeling in mice. *The Journal of clinical investigation* **118**(1):124-132.
- Kirber MT, Chen K and Keaney JF, Jr. (2007) YFP photoconversion revisited: confirmation of the CFP-like species. *Nature methods* **4**(10):767-768.
- Koch WJ, Hawes BE, Inglese J, Luttrell LM and Lefkowitz RJ (1994) Cellular expression of the carboxyl terminus of a G protein-coupled receptor kinase attenuates G β gamma-mediated signaling. *J Biol Chem* **269**(8):6193-6197.
- Kodama H, Fukuda K, Pan J, Sano M, Takahashi T, Kato T, Makino S, Manabe T, Murata M and Ogawa S (2000) Significance of ERK cascade compared with JAK/STAT and PI3-K pathway in gp130-mediated cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **279**(4):H1635-1644.
- Kohout TA and Lefkowitz RJ (2003) Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. *Mol Pharmacol* **63**(1):9-18.
- Kolch W, Heidecker G, Kochs G, Hummel R, Vahidi H, Mischak H, Finkenzeller G, Marme D and Rapp UR (1993) Protein kinase C α activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature* **364**(6434):249-252.
- Kovac J, Oster H and Leitges M (2007) Expression of the atypical protein kinase C (aPKC) isoforms iota/lambda and zeta during mouse embryogenesis. *Gene Expr Patterns* **7**(1-2):187-196.
- Lagerstrom MC and Schiöth HB (2008) Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **7**(4):339-357.
- Larkin JE, Frank BC, Gaspard RM, Duka I, Gavras H and Quackenbush J (2004) Cardiac transcriptional response to acute and chronic angiotensin II treatments. *Physiological genomics* **18**(2):152-166.
- Lefkowitz RJ (1998) G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J Biol Chem* **273**(30):18677-18680.



- Lefkowitz RJ, Pitcher J, Krueger K and Daaka Y (1998) Mechanisms of beta-adrenergic receptor desensitization and resensitization. *Adv Pharmacol* **42**:416-420.
- Lefkowitz RJ and Shenoy SK (2005) Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* **308**(5721):512-517.
- Leitges M, Sanz L, Martin P, Duran A, Braun U, Garcia JF, Camacho F, Diaz-Meco MT, Rennert PD and Moscat J (2001) Targeted disruption of the zetaPKC gene results in the impairment of the NF-kappaB pathway. *Molecular cell* **8**(4):771-780.
- Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM and Packer M (1990) Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *The New England journal of medicine* **323**(4):236-241.
- Liao P, Georgakopoulos D, Kovacs A, Zheng M, Lerner D, Pu H, Saffitz J, Chien K, Xiao RP, Kass DA and Wang Y (2001) The in vivo role of p38 MAP kinases in cardiac remodeling and restrictive cardiomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**(21):12283-12288.
- Lisnock J, Griffin P, Calaycay J, Frantz B, Parsons J, O'Keefe SJ and LoGrasso P (2000) Activation of JNK3 alpha 1 requires both MKK4 and MKK7: kinetic characterization of in vitro phosphorylated JNK3 alpha 1. *Biochemistry* **39**(11):3141-3148.
- Luttrell LM (2003) 'Location, location, location': activation and targeting of MAP kinases by G protein-coupled receptors. *J Mol Endocrinol* **30**(2):117-126.
- Lutz S, Freichel-Blomquist A, Yang Y, Rumenapp U, Jakobs KH, Schmidt M and Wieland T (2005) The guanine nucleotide exchange factor p63RhoGEF, a specific link between Gq/11-coupled receptor signaling and RhoA. *J Biol Chem* **280**(12):11134-11139.
- Lutz S, Shankaranarayanan A, Coco C, Ridilla M, Nance MR, Vettel C, Baltus D, Evelyn CR, Neubig RR, Wieland T and Tesmer JJ (2007) Structure of Galphaq-p63RhoGEF-RhoA complex reveals a pathway for the activation of RhoA by GPCRs. *Science* **318**(5858):1923-1927.
- M**a YC and Huang XY (1998) Identification of the binding site for Gqalpha on its effector Bruton's tyrosine kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**(21):12197-12201.
- Mackay HJ and Twelves CJ (2007) Targeting the protein kinase C family: are we there yet? *Nature reviews* **7**(7):554-562.
- Marinissen MJ and Gutkind JS (2001) G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci* **22**(7):368-376.
- Marinissen MJ, Servitja JM, Offermanns S, Simon MI and Gutkind JS (2003) Thrombin protease-activated receptor-1 signals through Gq- and G13-initiated MAPK cascades regulating c-Jun expression to induce cell transformation. *J Biol Chem* **278**(47):46814-46825.
- Marsigliante S, Muscella A, Elia MG, Greco S and Storelli C (2003) Angiotensin II AT1 receptor stimulates Na⁺-K⁺-ATPase activity through a pathway involving PKC-zeta in rat thyroid cells. *The Journal of physiology* **546**(Pt 2):461-470.
- Matkovich SJ, Diwan A, Klanke JL, Hammer DJ, Marreez Y, Odley AM, Brunskill EW, Koch WJ, Schwartz RJ and Dorn GW, 2nd (2006) Cardiac-specific ablation of G-protein receptor kinase 2 redefines its roles in heart development and beta-adrenergic signaling. *Circulation research* **99**(9):996-1003.
- McCudden CR, Hains MD, Kimple RJ, Siderovski DP and Willard FS (2005) G-protein signaling: back to the future. *Cell Mol Life Sci* **62**(5):551-577.
- McKinsey TA and Olson EN (1999) Cardiac hypertrophy: sorting out the circuitry. *Curr Opin Genet Dev* **9**(3):267-274.
- Medina R, Grishina G, Meloni EG, Muth TR and Berlot CH (1996) Localization of the effector-specifying regions of Gi2alpha and Gqalpha. *J Biol Chem* **271**(40):24720-24727.
- Mehta PK and Griendling KK (2007) Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *American journal of physiology* **292**(1):C82-97.
- Mende U, Semsarian C, Martins DC, Kagen A, Duffy C, Schoen FJ and Neer EJ (2001) Dilated cardiomyopathy in two transgenic mouse lines expressing activated G protein alpha(q): lack of correlation between phospholipase C activation and the phenotype. *Journal of molecular and cellular cardiology* **33**(8):1477-1491.

- Minamino T, Yujiri T, Terada N, Taffet GE, Michael LH, Johnson GL and Schneider MD (2002) MEKK1 is essential for cardiac hypertrophy and dysfunction induced by Gq. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(6):3866-3871.
- Mirotsov M, Dzau VJ, Pratt RE and Weinberg EO (2006) Physiological genomics of cardiac disease: quantitative relationships between gene expression and left ventricular hypertrophy. *Physiological genomics* **27**(1):86-94.
- Mochizuki N, Ohba Y, Kiyokawa E, Kurata T, Murakami T, Ozaki T, Kitabatake A, Nagashima K and Matsuda M (1999) Activation of the ERK/MAPK pathway by an isoform of rap1GAP associated with G alpha(i). *Nature* **400**(6747):891-894.
- Mochly-Rosen D, Wu G, Hahn H, Osinska H, Liron T, Lorenz JN, Yatani A, Robbins J and Dorn GW, 2nd (2000) Cardioprotective effects of protein kinase C epsilon: analysis by in vivo modulation of PKCepsilon translocation. *Circulation research* **86**(11):1173-1179.
- Molkentin JD (2004) Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovasc Res* **63**(3):467-475.
- Moore CA, Milano SK and Benovic JL (2007) Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annual review of physiology* **69**:451-482.
- Moscat J and Diaz-Meco MT (2000) The atypical protein kinase Cs. Functional specificity mediated by specific protein adapters. *EMBO reports* **1**(5):399-403.
- Moscat J, Rennert P and Diaz-Meco MT (2006) PKCzeta at the crossroad of NF-kappaB and Jak1/Stat6 signaling pathways. *Cell death and differentiation* **13**(5):702-711.
- Murray KT, Hu NN, Daw JR, Shin HG, Watson MT, Mashburn AB and George AL, Jr. (1997) Functional effects of protein kinase C activation on the human cardiac Na⁺ channel. *Circulation research* **80**(3):370-376.
- Muscella A, Greco S, Elia MG, Storelli C and Marsigliante S (2003) PKC-zeta is required for angiotensin II-induced activation of ERK and synthesis of C-FOS in MCF-7 cells. *Journal of cellular physiology* **197**(1):61-68.
- N**akaoka Y, Nishida K, Fujio Y, Izumi M, Terai K, Oshima Y, Sugiyama S, Matsuda S, Koyasu S, Yamauchi-Takahara K, Hirano T, Kawase I and Hirota H (2003) Activation of gp130 transduces hypertrophic signal through interaction of scaffolding/docking protein Gab1 with tyrosine phosphatase SHP2 in cardiomyocytes. *Circulation research* **93**(3):221-229.
- Natochin M, Campbell TN, Barren B, Miller LC, Hameed S, Artemyev NO and Braun JE (2005) Characterization of the G alpha(s) regulator cysteine string protein. *J Biol Chem* **280**(34):30236-30241.
- Neves SR, Ram PT and Iyengar R (2002) G protein pathways. *Science* **296**(5573):1636-1639.
- Nicol RL, Frey N, Pearson G, Cobb M, Richardson J and Olson EN (2001) Activated MEK5 induces serial assembly of sarcomeres and eccentric cardiac hypertrophy. *Embo J* **20**(11):2757-2767.
- Nishimoto S and Nishida E (2006) MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2. *EMBO reports* **7**(8):782-786.
- Nishizuka Y (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* **258**(5082):607-614.
- Nishizuka Y (1995) Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *Faseb J* **9**(7):484-496.
- O**lson ER, Shamhart PE, Naugle JE and Meszaros JG (2008) Angiotensin II-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation is mediated by protein kinase Cdelta and intracellular calcium in adult rat cardiac fibroblasts. *Hypertension* **51**(3):704-711.
- Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ and Pfeffer MA (2006) Controversies in ventricular remodeling. *Lancet* **367**(9507):356-367.
- P**alczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M and Miyano M (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289**(5480):739-745.
- Park RD, Sullivan PC and Storrie B (1988) Hypertonic sucrose inhibition of endocytic transport suggests multiple early endocytic compartments. *Journal of cellular physiology* **135**(3):443-450.
- Parker PJ and Murray-Rust J (2004) PKC at a glance. *Journal of cell science* **117**(Pt 2):131-132.



- Parmentier JH, Pavicevic Z and Malik KU (2006) ANG II stimulates phospholipase D through PKCzeta activation in VSMC: implications in adhesion, spreading, and hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**(1):H46-54.
- Pearson GW and Cobb MH (2002) Cell condition-dependent regulation of ERK5 by cAMP. *J Biol Chem* **277**(50):48094-48098.
- Pearson GW, Earnest S and Cobb MH (2006) Cyclic AMP selectively uncouples mitogen-activated protein kinase cascades from activating signals. *Molecular and cellular biology* **26**(8):3039-3047.
- Penela P, Murga C, Ribas C, Tutor AS, Peregrin S and Mayor F, Jr. (2006) Mechanisms of regulation of G protein-coupled receptor kinases (GRKs) and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* **69**(1):46-56.
- Penela P, Ribas C and Mayor F, Jr. (2003) Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled receptor kinases. *Cell Signal* **15**(11):973-981.
- Penn RB, Pronin AN and Benovic JL (2000) Regulation of G protein-coupled receptor kinases. *Trends Cardiovasc Med* **10**(2):81-89.
- Pierce KL, Maudsley S, Daaka Y, Luttrell LM and Lefkowitz RJ (2000) Role of endocytosis in the activation of the extracellular signal-regulated kinase cascade by sequestering and nonsequestering G protein-coupled receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**(4):1489-1494.
- Pierce KL, Premont RT and Lefkowitz RJ (2002) Signalling: Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(9):639-650.
- Ping P, Anzai T, Gao M and Hammond HK (1997) Adenylyl cyclase and G protein receptor kinase expression during development of heart failure. *Am J Physiol* **273**(2 Pt 2):H707-717.
- Pitcher JA, Freedman NJ and Lefkowitz RJ (1998) G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem* **67**:653-692.
- Poole AW, Pula G, Hers I, Crosby D and Jones ML (2004) PKC-interacting proteins: from function to pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* **25**(10):528-535.

- R**amos-Ruiz R, Penela P, Penn RB and Mayor F, Jr. (2000) Analysis of the human G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) gene promoter: regulation by signal transduction systems in aortic smooth muscle cells. *Circulation* **101**(17):2083-2089.
- Ravingerova T, Barancik M and Strniskova M (2003) Mitogen-activated protein kinases: a new therapeutic target in cardiac pathology. *Molecular and cellular biochemistry* **247**(1-2):127-138.
- Ribas C, Penela P, Murga C, Salcedo A, Garcia-Hoz C, Jurado-Pueyo M, Aymerich I and Mayor F, Jr. (2007) The G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: role of GRKs in GPCR regulation and signaling. *Biochimica et biophysica acta* **1768**(4):913-922.
- Rochdi MD and Parent JL (2003) Galphaq-coupled receptor internalization specifically induced by Galphaq signaling. Regulation by EBP50. *J Biol Chem* **278**(20):17827-17837.
- Roman BB, Geenen DL, Leitges M and Buttrick PM (2001) PKC-beta is not necessary for cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**(5):H2264-2270.
- Roy S, Wyse B and Hancock JF (2002) H-Ras signaling and K-Ras signaling are differentially dependent on endocytosis. *Molecular and cellular biology* **22**(14):5128-5140.
- Ruppert V and Meyer T (2007) JAK-STAT signaling circuits in myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Herz* **32**(6):474-481.

- S**aeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, Sturn A, Snuffin M, Rezantsev A, Popov D, Ryltsov A, Kostukovich E, Borisovsky I, Liu Z, Vinsavich A, Trush V and Quackenbush J (2003) TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* **34**(2):374-378.
- Salles G, Leocadio S, Bloch K, Nogueira AR and Muxfeldt E (2005) Combined QT interval and voltage criteria improve left ventricular hypertrophy detection in resistant hypertension. *Hypertension* **46**(5):1207-1212.
- Sano M, Fukuda K, Kodama H, Pan J, Saito M, Matsuzaki J, Takahashi T, Makino S, Kato T and Ogawa S (2000) Interleukin-6 family of cytokines mediate angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in rodent cardiomyocytes. *J Biol Chem* **275**(38):29717-29723.



- Schmitt JM and Stork PJ (2001) Cyclic AMP-mediated inhibition of cell growth requires the small G protein Rap1. *Molecular and cellular biology* **21**(11):3671-3683.
- Selvetella G, Hirsch E, Notte A, Tarone G and Lembo G (2004) Adaptive and maladaptive hypertrophic pathways: points of convergence and divergence. *Cardiovasc Res* **63**(3):373-380.
- Seyfried J, Wang X, Kharebava G and Tournier C (2005) A novel mitogen-activated protein kinase docking site in the N terminus of MEK5alpha organizes the components of the extracellular signal-regulated kinase 5 signaling pathway. *Molecular and cellular biology* **25**(22):9820-9828.
- Shah BH and Catt KJ (2004) GPCR-mediated transactivation of RTKs in the CNS: mechanisms and consequences. *Trends in neurosciences* **27**(1):48-53.
- Shah BH, Neithardt A, Chu DB, Shah FB and Catt KJ (2006) Role of EGF receptor transactivation in phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of MAP kinase by GPCRs. *Journal of cellular physiology* **206**(1):47-57.
- Shah BH, Yesilkaya A, Olivares-Reyes JA, Chen HD, Hunyady L and Catt KJ (2004) Differential pathways of angiotensin II-induced extracellularly regulated kinase 1/2 phosphorylation in specific cell types: role of heparin-binding epidermal growth factor. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* **18**(8):2035-2048.
- Shenoy SK and Lefkowitz RJ (2003) Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochem J* **375**(Pt 3):503-515.
- Shizukuda Y and Buttrick PM (2002) Protein kinase C-zeta modulates thromboxane A(2)-mediated apoptosis in adult ventricular myocytes via Akt. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **282**(1):H320-327.
- Shmuel M, Nodel-Berner E, Hyman T, Rouvinski A and Altschuler Y (2007) Caveolin 2 regulates endocytosis and trafficking of the M1 muscarinic receptor in MDCK epithelial cells. *Molecular biology of the cell* **18**(5):1570-1585.
- Spiegel S and Milstien S (2003) Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(5):397-407.
- Standaert ML, Galloway L, Karnam P, Bandyopadhyay G, Moscat J and Farese RV (1997) Protein kinase C-zeta as a downstream effector of phosphatidylinositol 3-kinase during insulin stimulation in rat adipocytes. Potential role in glucose transport. *J Biol Chem* **272**(48):30075-30082.
- Sterne-Marr R, Tesmer JJ, Day PW, Stracquatano RP, Cilente JA, O'Connor KE, Pronin AN, Benovic JL and Wedegaertner PB (2003) G protein-coupled receptor Kinase 2/G alpha q/11 interaction. A novel surface on a regulator of G protein signaling homology domain for binding G alpha subunits. *J Biol Chem* **278**(8):6050-6058.
- Sugden PH and Clerk A (1998) Regulation of mitogen-activated protein kinase cascades in the heart. *Advances in enzyme regulation* **38**:87-98.
- Sun W, Wei X, Kesavan K, Garrington TP, Fan R, Mei J, Anderson SM, Gelfand EW and Johnson GL (2003) MEK kinase 2 and the adaptor protein Lad regulate extracellular signal-regulated kinase 5 activation by epidermal growth factor via Src. *Molecular and cellular biology* **23**(7):2298-2308.
- Suzuki N, Nakamura S, Mano H and Kozasa T (2003) Galpha 12 activates Rho GTPase through tyrosine-phosphorylated leukemia-associated RhoGEF. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**(2):733-738.
- Swynghedauw B (1999) Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev* **79**(1):215-262.
- T**akahashi N, Saito Y, Kuwahara K, Harada M, Tanimoto K, Nakagawa Y, Kawakami R, Nakanishi M, Yasuno S, Usami S, Yoshimura A and Nakao K (2005) Hypertrophic responses to cardiotrophin-1 are not mediated by STAT3, but via a MEK5-ERK5 pathway in cultured cardiomyocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology* **38**(1):185-192.
- Takeishi Y, Jalili T, Ball NA and Walsh RA (1999) Responses of cardiac protein kinase C isoforms to distinct pathological stimuli are differentially regulated. *Circulation research* **85**(3):264-271.
- Terrell AM, Crisostomo PR, Wairiuko GM, Wang M, Morrell ED and Meldrum DR (2006) Jak/STAT/SOCS signaling circuits and associated cytokine-mediated inflammation and hypertrophy in the heart. *Shock (Augusta, Ga)* **26**(3):226-234.
- Tesmer VM, Kawano T, Shankaranarayanan A, Kozasa T and Tesmer JJ (2005) Snapshot of activated G proteins at the membrane: the Galphaq-GRK2-Gbetagamma complex. *Science* **310**(5754):1686-1690.



- Thaler C, Vogel SS, Ikeda SR and Chen H (2006) Photobleaching of YFP does not produce a CFP-like species that affects FRET measurements. *Nature methods* **3**(7):491; author reply 492-493.
- Torre-Amione G, Stetson SJ, Youker KA, Durand JB, Radovancevic B, Delgado RM, Frazier OH, Entman ML and Noon GP (1999) Decreased expression of tumor necrosis factor-alpha in failing human myocardium after mechanical circulatory support : A potential mechanism for cardiac recovery. *Circulation* **100**(11):1189-1193.
- Touyz RM and Berry C (2002) Recent advances in angiotensin II signaling. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]* **35**(9):1001-1015.
- Turjanski AG, Vaque JP and Gutkind JS (2007) MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene* **26**(22):3240-3253.

- U**llrich A and Schlessinger J (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **61**(2):203-212.
- Ungerer M, Parruti G, Bohm M, Puzicha M, DeBlasi A, Erdmann E and Lohse MJ (1994) Expression of beta-arrestins and beta-adrenergic receptor kinases in the failing human heart. *Circulation research* **74**(2):206-213.

- V**alentin G, Verheggen C, Piolot T, Neel H, Coppey-Moisan M and Bertrand E (2005) Photoconversion of YFP into a CFP-like species during acceptor photobleaching FRET experiments. *Nature methods* **2**(11):801.
- Varagic J and Frohlich ED (2002) Local cardiac renin-angiotensin system: hypertension and cardiac failure. *Journal of molecular and cellular cardiology* **34**(11):1435-1442.
- Vega RB, Harrison BC, Meadows E, Roberts CR, Papst PJ, Olson EN and McKinsey TA (2004) Protein kinases C and D mediate agonist-dependent cardiac hypertrophy through nuclear export of histone deacetylase 5. *Molecular and cellular biology* **24**(19):8374-8385.
- Venkatakrishnan G and Exton JH (1996) Identification of determinants in the alpha-subunit of Gq required for phospholipase C activation. *J Biol Chem* **271**(9):5066-5072.
- Viard P, Exner T, Maier U, Mironneau J, Nurnberg B and Macrez N (1999) Gbetagamma dimers stimulate vascular L-type Ca²⁺ channels via phosphoinositide 3-kinase. *Faseb J* **13**(6):685-694.
- Violin JD, Ren XR and Lefkowitz RJ (2006) G-protein-coupled receptor kinase specificity for beta-arrestin recruitment to the beta2-adrenergic receptor revealed by fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* **281**(29):20577-20588.
- Vossler MR, Yao H, York RD, Pan MG, Rim CS and Stork PJ (1997) cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Cell* **89**(1):73-82.
- Voyno-Yasenetskaya TA, Faure MP, Ahn NG and Bourne HR (1996) Galpha12 and Galpha13 regulate extracellular signal-regulated kinase and c-Jun kinase pathways by different mechanisms in COS-7 cells. *J Biol Chem* **271**(35):21081-21087.

- W**ang X and Tournier C (2006) Regulation of cellular functions by the ERK5 signalling pathway. *Cell Signal* **18**(6):753-760.
- Wang Y, Huang S, Sah VP, Ross J, Jr., Brown JH, Han J and Chien KR (1998) Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *J Biol Chem* **273**(4):2161-2168.
- Wieland T, Lutz S and Chidiac P (2007) Regulators of G protein signalling: a spotlight on emerging functions in the cardiovascular system. *Current opinion in pharmacology* **7**(2):201-207.
- Wilkins BJ and Molkenin JD (2002) Calcineurin and cardiac hypertrophy: where have we been? Where are we going? *The Journal of physiology* **541**(Pt 1):1-8.
- Wooten MW (1999) Function for NF-kB in neuronal survival: regulation by atypical protein kinase C. *Journal of neuroscience research* **58**(5):607-611.
- Wu G, Toyokawa T, Hahn H and Dorn GW, 2nd (2000) Epsilon protein kinase C in pathological myocardial hypertrophy. Analysis by combined transgenic expression of translocation modifiers and Galphaq. *J Biol Chem* **275**(39):29927-29930.



- Wu J, Dent P, Jelinek T, Wolfman A, Weber MJ and Sturgill TW (1993) Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate. *Science* **262**(5136):1065-1069.
- Wu X, Li S, Chrostek-Grashoff A, Czuchra A, Meyer H, Yurchenco PD and Brakebusch C (2007) Cdc42 is crucial for the establishment of epithelial polarity during early mammalian development. *Dev Dyn* **236**(10):2767-2778.
- X**u J, Gong NL, Bodi I, Aronow BJ, Backx PH and Molkenkin JD (2006) Myocyte enhancer factors 2A and 2C induce dilated cardiomyopathy in transgenic mice. *J Biol Chem* **281**(14):9152-9162.
- Y**amaguchi T, Suzuki M, Kimura H and Kato M (2006) Role of protein kinase C in eosinophil function. *Allergol Int* **55**(3):245-252.
- Yamaguchi Y, Katoh H, Mori K and Negishi M (2002) Galpha(12) and Galpha(13) interact with Ser/Thr protein phosphatase type 5 and stimulate its phosphatase activity. *Curr Biol* **12**(15):1353-1358.
- Yamauchi J, Kawano T, Nagao M, Kaziro Y and Itoh H (2000) G(i)-dependent activation of c-Jun N-terminal kinase in human embryonal kidney 293 cells. *J Biol Chem* **275**(11):7633-7640.
- Yamauchi J, Tsujimoto G, Kaziro Y and Itoh H (2001) Parallel regulation of mitogen-activated protein kinase kinase 3 (MKK3) and MKK6 in Gq-signaling cascade. *J Biol Chem* **276**(26):23362-23372.
- Z**han Y, Brown C, Maynard E, Anshelevich A, Ni W, Ho IC and Oettgen P (2005) Ets-1 is a critical regulator of Ang II-mediated vascular inflammation and remodeling. *The Journal of clinical investigation* **115**(9):2508-2516.
- Zhang J, Ferguson SS, Barak LS, Menard L and Caron MG (1996) Dynamin and beta-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. *J Biol Chem* **271**(31):18302-18305.
- Zheng M, Zhang SJ, Zhu WZ, Ziman B, Kobilka BK and Xiao RP (2000) beta 2-adrenergic receptor-induced p38 MAPK activation is mediated by protein kinase A rather than by Gi or Gbeta gamma in adult mouse cardiomyocytes. *J Biol Chem* **275**(51):40635-40640.

ANEXO I

Grupo I (genes aumentados en situación de hipertrofia)

Sonda	p-val	Aumento de expresión	Símbolo Gen
1448314_at	1.01E-05	2.68	Cdc2a
1434748_at	6.65E-06	2.66	Ckap2
1436346_at	8.67E-05	2.55	Cd109
1437463_x_at	2.12E-05	2.51	Tgfbi
1448635_at	9.12E-05	2.50	Smc2
1435853_at	4.83E-04	2.49	Cyp2d12
1452190_at	3.96E-05	2.46	Prcp
1417910_at	1.36E-04	2.45	Ccna2
1427275_at	4.54E-06	2.44	Smc4
1415871_at	2.10E-04	2.43	Tgfbi
1450920_at	1.38E-04	2.42	Ccnb2
1437726_x_at	9.02E-06	2.42	C1qb
1435564_at	9.69E-05	2.42	C230078M08Rik
1438852_x_at	1.56E-04	2.41	Mcm6
1425681_a_at	3.57E-04	2.40	Prnd
1424613_at	3.41E-05	2.40	Gprc5b
1434366_x_at	5.56E-05	2.40	C1qb
1417458_s_at	2.88E-04	2.38	Cks2
1452016_at	2.49E-04	2.38	Alox5ap
1448553_at	3.35E-05	2.36	Myh7
1419873_s_at	2.89E-04	2.35	Csf1r
1448123_s_at	3.22E-04	2.34	Tgfbi
1417063_at	3.70E-04	2.34	C1qb
1455736_at	3.45E-04	2.34	Mybpc2
1439695_a_at	5.63E-05	2.34	Mphosph1
1426025_s_at	4.43E-04	2.33	Laptm5
1449164_at	3.22E-04	2.33	Cd68
1449401_at	3.73E-04	2.33	C1qc
1452242_at	3.53E-04	2.32	Cep55
1448748_at	2.33E-04	2.32	Plek
1433862_at	1.05E-04	2.32	Esp11
1419872_at	1.46E-04	2.31	Csf1r
1456062_at	3.12E-05	2.31	Nppa
1438118_x_at	7.41E-05	2.30	Vim
1452655_at	1.22E-03	2.30	Zdhhc2
1437889_x_at	2.40E-04	2.30	Bgn
1419853_a_at	4.64E-04	2.30	P2rx7
1416030_a_at	1.36E-04	2.29	Mcm7
1427239_at	9.13E-04	2.29	Ift122
1451064_a_at	3.56E-04	2.29	Psat1
1450430_at	1.92E-04	2.28	Mrc1
1425658_at	4.93E-04	2.28	Cd109
1423224_at	1.50E-03	2.27	Tctn2
1449127_at	3.88E-03	2.26	Selplg
1417381_at	6.49E-04	2.26	C1qa
1416529_at	8.37E-05	2.26	Emp1
1419599_s_at	7.26E-04	2.25	Ms4a6d
1422430_at	5.57E-04	2.24	Figl1
1448627_s_at	1.01E-03	2.23	Pbk
1416405_at	2.41E-04	2.23	Bgn
1417346_at	6.39E-04	2.23	Pycard
1456250_x_at	2.52E-04	2.22	Tgfbi

Grupo I

Sonda	p-val	Aumento de expresión	Símbolo Gen
1450199_a_at	1.41E-04	2.22	Stab1
1442076_at	1.50E-03	2.22	Cobl
1433759_at	2.44E-04	2.22	Dpy19l1
1448591_at	1.10E-03	2.22	Ctss
1417868_a_at	5.66E-04	2.21	Ctsz
1416221_at	1.47E-04	2.21	Fstl1
1417870_x_at	4.99E-04	2.21	Ctsz
1429700_at	7.55E-04	2.21	3110040M04Rik
1450641_at	4.96E-04	2.20	Vim
1427320_at	4.24E-04	2.20	Copg2as2
1456292_a_at	2.58E-04	2.20	Vim
1448816_at	5.11E-04	2.20	Ptgis
1425603_at	7.99E-04	2.20	Tmem176a
1415877_at	3.36E-04	2.19	Dpysl3
1416118_at	2.11E-03	2.19	Trim59
1419153_at	1.24E-03	2.19	2810417H13Rik
1428242_at	1.40E-03	2.19	Hmha1
1416515_at	2.05E-03	2.19	Fscn1
1448259_at	1.85E-04	2.19	Fstl1
1424118_a_at	1.38E-03	2.19	Spc25
1420464_s_at	2.66E-03	2.18	Lilrb3, Pira1-6
1434089_at	3.89E-04	2.18	Synpo
1435415_x_at	2.88E-04	2.18	Marcks11
1417282_at	1.20E-03	2.18	Mmp23
1435410_at	2.11E-03	2.18	Tcam1
1452246_at	3.24E-04	2.18	Ostf1
1419027_s_at	1.21E-03	2.18	Gltf
1420992_at	7.82E-04	2.17	Ankrd1
1421551_s_at	1.24E-03	2.17	Ifi202b
1433719_at	3.09E-03	2.17	Slc9a9
1434442_at	5.32E-03	2.17	Stbd1
1426245_s_at	7.91E-04	2.17	Mapre2
1437621_x_at	8.83E-04	2.16	Phgdh
1416318_at	4.82E-03	2.16	Serpinb1a
1415810_at	9.46E-04	2.16	Uhrf1
1449207_a_at	1.82E-03	2.16	Kif20a
1435964_a_at	3.14E-04	2.16	Taok3
1455627_at	3.38E-04	2.16	Col8a1
1460437_at	2.93E-03	2.16	Pscd4
1417343_at	4.98E-04	2.16	Fxyd6
1450637_a_at	1.56E-03	2.16	Aebp1
1421814_at	4.15E-04	2.16	Msn
1423909_at	1.68E-03	2.16	Tmem176a
1420991_at	1.19E-03	2.15	Ankrd1
1454822_x_at	4.85E-04	2.15	Apcdd1
1416028_a_at	1.35E-04	2.15	Hn1
1417697_at	2.89E-03	2.15	Soat1
1417457_at	2.31E-03	2.15	Cks2
1416004_at	1.56E-04	2.14	Ywhah
1417219_s_at	1.09E-03	2.14	Tmsb10
1454613_at	2.27E-04	2.14	Dpysl3
1441660_at	2.08E-03	2.14	Actr2

Grupo I

Sonda	p-val	Aumento de expresión	Símbolo Gen
1452514_a_at	1.76E-03	2.13	Kit
1417869_s_at	8.16E-04	2.13	Ctsz
1460188_at	3.85E-03	2.13	Ptpn6
1423593_a_at	8.81E-04	2.13	Csflr
1418340_at	2.17E-03	2.13	Fcer1g
1450792_at	1.75E-03	2.13	Tyrobp
1418440_at	5.76E-04	2.13	Col8a1
1457119_at	1.74E-03	2.13	1110003F02Rik
1424246_a_at	1.59E-03	2.13	Tes
1427735_a_at	6.93E-04	2.13	Acta1
1427919_at	1.09E-03	2.13	Srpx2
1418296_at	5.77E-04	2.13	Fxyd5
1448113_at	1.26E-03	2.13	Stmn1
1460351_at	1.01E-03	2.12	S100a11
1415983_at	1.80E-03	2.12	Lcp1
1423110_at	7.69E-04	2.12	Col1a2
1437185_s_at	1.00E-03	2.12	Tmsb10
1423407_a_at	6.30E-04	2.12	Fbln2
1453107_s_at	5.47E-04	2.12	Foxm1, Pebp1
1424278_a_at	1.42E-03	2.12	Birc5
1417821_at	2.17E-03	2.11	D17H6S56E-5
1452040_a_at	2.18E-03	2.11	Cdca3
1418004_a_at	1.48E-03	2.11	Tmem176b
1417392_a_at	1.41E-03	2.11	Slc7a7
1449002_at	7.16E-04	2.10	Phlda3
1450355_a_at	4.72E-04	2.10	Capg
1460180_at	3.41E-03	2.10	Hexb
1419442_at	8.42E-04	2.10	Matn2
1448656_at	3.42E-03	2.10	Cacnb3
1426244_at	1.40E-03	2.10	Mapre2
1436905_x_at	1.86E-03	2.10	Laptm5
1436902_x_at	1.64E-03	2.10	Tmsb10
1428600_at	5.83E-04	2.10	Nin
1421408_at	3.35E-03	2.10	Igsf6
1425214_at	1.82E-03	2.09	P2ry6
1452357_at	1.05E-03	2.09	Gp1bb, Sept5
1418733_at	3.92E-03	2.09	Twist1
1456307_s_at	3.76E-04	2.09	Adcy7
1416226_at	5.67E-04	2.09	Arpc1b
1422190_at	3.97E-03	2.09	C5ar1
1448475_at	4.13E-04	2.09	Olfml3
1425532_a_at	1.46E-03	2.09	Bin1
1449126_at	7.14E-04	2.09	Zfp90
1417828_at	3.69E-03	2.09	Aqp8
1427884_at	4.37E-04	2.09	Col3a1
1418293_at	1.28E-03	2.09	Ifit2
1423606_at	9.65E-04	2.08	Postn
1427385_s_at	3.27E-03	2.08	Actn1
1436319_at	8.58E-04	2.08	Sulfl
1416757_at	4.50E-03	2.08	Zwilch
1455978_a_at	7.04E-04	2.08	Matn2
1449839_at	4.33E-03	2.08	Casp3

Grupo I

Sonda	p-val	Aumento de expresión	Símbolo Gen
1419598_at	3.00E-03	2.08	Ms4a6d
1440250_at	2.30E-03	2.08	Col4a4
1445707_at	9.73E-04	2.08	Zdhhc6
1439255_s_at	6.04E-04	2.08	Gpr137b, Gpr137b-ps
1448967_at	8.59E-04	2.07	Nipsnap3a
1455494_at	5.09E-04	2.07	Col1a1
1445328_at	8.64E-04	2.07	Col4a4
1451911_a_at	5.01E-03	2.07	Ace
1436512_at	1.70E-03	2.07	Arl4c
1429752_x_at	2.52E-03	2.07	Clip4
1421045_at	2.09E-03	2.07	Mrc2
1416821_at	5.95E-04	2.07	Es2el
1450251_a_at	4.63E-03	2.07	Ln timer
1437874_s_at	6.83E-04	2.06	Hexb
1448201_at	4.29E-03	2.06	Sfrp2
1425598_a_at	7.60E-04	2.06	Lyn
1417911_at	2.26E-03	2.06	Ccna2
1433543_at	3.71E-03	2.06	Anln
1460187_at	1.91E-03	2.06	Sfrp1
1439902_at	8.20E-04	2.06	C5ar1
1437417_s_at	1.60E-03	2.06	Gpc6
1437744_at	9.02E-04	2.06	Slitrk4
1427567_a_at	1.04E-03	2.05	Tpm3
1441259_s_at	3.63E-03	2.05	Ift122
1416109_at	1.07E-03	2.05	Fuca1
1433685_a_at	4.32E-03	2.05	6430706D22Rik
1422514_at	4.00E-03	2.05	Aebp1
1433696_at	1.18E-03	2.05	Hn1l
1448124_at	1.67E-03	2.05	Gusb
1450191_a_at	1.98E-03	2.05	Sox13
1460173_at	9.59E-04	2.05	Lasp1
1426436_at	3.17E-04	2.05	Tmem159
1455346_at	1.60E-03	2.05	Masp1
1448620_at	2.33E-03	2.05	Fcgr3
1428319_at	2.65E-03	2.04	Pdlim7
1448424_at	2.02E-03	2.04	Frzb
1439426_x_at	8.47E-04	2.04	Lyz
1418061_at	1.22E-03	2.04	Ltbp2
1427168_a_at	2.10E-03	2.04	Col14a1
1450857_a_at	1.69E-03	2.03	Col1a2
1455980_a_at	2.73E-03	2.03	Gas2l3
1455679_at	6.71E-04	2.03	Obfc2a
1455269_a_at	3.87E-03	2.03	Coro1a
1435195_at	2.37E-03	2.03	Vash1
1423946_at	1.03E-03	2.03	Pdlim2
1448162_at	3.98E-03	2.03	Vcam1
1449660_s_at	1.97E-03	2.03	Coro1c
1454898_s_at	5.13E-04	2.03	Iah1
1439787_at	3.25E-03	2.03	P2rx7
1427413_a_at	2.05E-03	2.03	Cugbp1
1431057_a_at	8.95E-04	2.03	Prss23
1448392_at	1.55E-03	2.03	LOC100046740

Grupo I

Sonda	p-val	Aumento de expresión	Símbolo Gen
1435828_at	1.60E-03	2.02	Maf
1416072_at	1.49E-03	2.02	Cd34
1423584_at	1.73E-03	2.02	Igfbp7
1426812_a_at	1.20E-03	2.02	9130404D14Rik
1426529_a_at	3.28E-03	2.02	Tagln2
1447849_s_at	2.76E-03	2.02	Maf
1419943_s_at	1.90E-03	2.02	Ccnb1
1418237_s_at	3.61E-03	2.02	Col18a1
1424780_a_at	3.05E-04	2.02	Reep3
1435477_s_at	3.58E-03	2.02	Fcgr2b
1421044_at	1.96E-03	2.02	Mrc2
1440085_at	2.19E-03	2.02	Eda2r
1430332_a_at	4.26E-03	2.02	Gusb
1420394_s_at	8.71E-04	2.02	Gp49a, Lilrb4
1416165_at	1.86E-03	2.02	Rab31
1419483_at	2.82E-03	2.02	C3ar1
1425359_at	3.49E-03	2.01	Mall
1426750_at	4.54E-03	2.01	Flnb
1455786_at	3.32E-03	2.01	Zfp820
1416658_at	7.50E-04	2.01	Frzb
1452295_at	3.73E-03	2.01	Tmepai
1428712_at	1.32E-03	2.01	Mon1b
1448558_a_at	1.52E-03	2.01	Pla2g4a
1450967_at	3.02E-03	2.01	Ptplad2
1423669_at	2.07E-03	2.01	Col1a1
1432538_a_at	1.39E-03	2.01	Rfc3
1417695_a_at	5.23E-03	2.01	Soat1
1438633_x_at	1.19E-03	2.01	Lasp1
1440975_at	1.67E-03	2.00	Mxra7
1418533_s_at	3.25E-03	2.00	Fzd2
1423753_at	1.04E-03	2.00	Bambi
1448433_a_at	1.15E-03	2.00	Pcolce
1451411_at	6.09E-04	2.00	Gprc5b
1424010_at	2.27E-03	2.00	Mfap4
1452649_at	1.04E-03	2.00	Rtn4
1419666_x_at	5.77E-04	2.00	Nupr1
1434540_a_at	4.83E-04	2.00	Clta
1438634_x_at	5.91E-04	2.00	Lasp1
1418451_at	2.09E-03	2.00	Gng2
1419091_a_at	1.63E-03	2.00	Anxa2
1453572_a_at	2.58E-03	1.99	Plp2
1451987_at	3.19E-03	1.99	Arrb2
1434130_at	2.67E-03	1.99	Lhfpl2
1421223_a_at	1.02E-03	1.99	Anxa4
1415906_at	2.69E-03	1.99	Tmsb4x
1448613_at	2.22E-03	1.99	Ecm1
1457322_at	2.41E-03	1.99	---
1437122_at	1.82E-03	1.99	Bcl2
1436847_s_at	2.98E-03	1.99	Cdca8
1438559_x_at	4.46E-03	1.99	Slc44a2
1424133_at	5.40E-03	1.99	Tmem98
1416406_at	3.04E-03	1.99	Pea15a

Grupo I

Sonda	p-val	Aumento de expresión	Símbolo Gen
1437226_x_at	4.91E-03	1.99	Marcks11
1423274_at	4.03E-03	1.98	Ints6
1436520_at	1.74E-03	1.98	Ahnak2
1423547_at	2.53E-03	1.98	Lyzs
1423376_a_at	3.84E-03	1.98	Dok4
1424328_s_at	4.17E-03	1.98	3200002M19Rik
1457058_at	2.51E-03	1.98	Adamts2
1452762_at	2.27E-03	1.98	8430436O14Rik
1424754_at	4.44E-03	1.98	Ms4a7
1435987_x_at	4.36E-03	1.98	1110059G02Rik
1417756_a_at	4.00E-03	1.98	Lsp1
1451941_a_at	2.48E-03	1.98	Fcgr2b
1438200_at	2.92E-03	1.98	Sulf1
1439256_x_at	2.91E-03	1.98	Gpr137b-ps
1422628_at	2.52E-03	1.98	4632417K18Rik
1436838_x_at	2.95E-03	1.98	Cotl1
1423805_at	1.20E-03	1.98	Dab2
1435990_at	4.57E-03	1.97	Adamts2
1417432_a_at	1.73E-03	1.97	Gnb1
1425896_a_at	1.76E-03	1.97	Fbn1
1435057_x_at	1.52E-03	1.97	Polr1e
1457658_x_at	1.76E-03	1.97	Anxa4
1437279_x_at	2.19E-03	1.97	Sdc1
1450919_at	3.27E-03	1.97	Mpp1
1436063_at	4.37E-03	1.97	Loxl1
1418029_at	1.83E-03	1.97	Faim
1433963_a_at	3.46E-03	1.97	Fermt3
1436530_at	3.25E-04	1.97	OTTMUSG00000000971
1437811_x_at	4.92E-03	1.97	---
1417380_at	2.19E-03	1.97	Iqgap1
1460208_at	1.23E-03	1.96	Fbn1
1447819_x_at	2.20E-03	1.96	Col8a1
1429190_at	1.97E-03	1.96	Arsb
1442590_at	7.99E-04	1.96	Tnfrsf23
1435390_at	4.91E-03	1.96	Exod1
1452679_at	3.00E-03	1.96	Tubb2b
1437165_a_at	1.32E-03	1.96	Pcolce
1437234_x_at	1.94E-03	1.96	Prmt2
1448316_at	3.92E-03	1.96	Cmtm3
1419279_at	4.80E-03	1.96	Pip4k2a
1427318_s_at	3.53E-03	1.96	Dysf, Fer1l3
1431339_a_at	2.28E-03	1.96	Efhd2
1424727_at	2.76E-03	1.96	Ccr5
1433954_at	1.76E-03	1.96	4632419I22Rik
1423726_at	2.83E-03	1.96	Vat1
1455825_s_at	4.80E-03	1.95	Lnx1
1455030_at	2.93E-03	1.95	Ptprj
1439264_x_at	2.29E-03	1.95	Lasp1
1418099_at	5.15E-03	1.95	Tnfrsf1b
1436953_at	3.70E-03	1.95	Wipf1
1434291_a_at	3.06E-03	1.95	Serf1
1455470_x_at	2.06E-03	1.95	Lasp1

Grupo I (genes aumentados en situación de hipertrofia)

Sonda	p-val	Aumento de expresión	Símbolo Gen
1416516_at	2.70E-03	1.95	Fscn1
1422615_at	8.33E-04	1.95	Map4k4
1420498_a_at	4.22E-03	1.95	Dab2
1450852_s_at	1.75E-03	1.95	F2r
1428183_at	2.60E-03	1.95	Ankrd23
1422286_a_at	4.39E-03	1.95	Tgif1
1454783_at	1.07E-03	1.95	Il13ra1
1456251_x_at	2.83E-03	1.94	Tspo
1422803_at	3.37E-03	1.94	Fstl3
1431004_at	2.12E-03	1.94	LOC100047339
1427256_at	1.18E-03	1.94	Vcan
1448180_a_at	1.77E-03	1.94	Hn1
1436996_x_at	2.21E-03	1.94	Lyz
1416740_at	4.34E-03	1.94	Col5a1
1449380_at	2.07E-03	1.94	Pacsin1
1416295_a_at	4.34E-03	1.94	Il2rg
1426528_at	1.95E-03	1.94	Nrp2
1417786_a_at	3.50E-03	1.94	Rgs19
1438948_x_at	3.21E-03	1.94	Tspo
1430030_at	7.12E-04	1.94	5330426P16Rik
1416066_at	6.05E-04	1.93	Cd9
1425039_at	3.39E-03	1.93	Itgbl1
1433893_s_at	4.33E-03	1.93	Spag5
1416953_at	2.83E-03	1.93	Ctgf
1422437_at	2.65E-03	1.93	Col5a2
1448213_at	1.73E-03	1.93	Anxa1
1433859_at	2.03E-03	1.93	D030070L09Rik
1436900_x_at	1.05E-03	1.93	Leprot
1444232_at	4.35E-03	1.93	Prkg1
1451527_at	2.70E-03	1.93	Pcolce2
1424176_a_at	2.43E-03	1.93	Anxa4
1423757_x_at	2.41E-03	1.93	Igfbp4
1433964_s_at	5.07E-03	1.93	Fermt3
1450065_at	3.71E-03	1.93	Adcy7
1429214_at	1.91E-03	1.92	Adamtsl2
1430127_a_at	3.31E-03	1.92	Ccnd2
1456125_a_at	1.71E-03	1.92	Dynll1
1417595_at	4.95E-03	1.92	Meox1
1455478_at	1.30E-03	1.92	Ppfia1
1417618_at	1.82E-03	1.92	Itih2
1419280_at	5.25E-03	1.92	Pip4k2a
1450625_at	2.86E-03	1.92	Col5a2
1448995_at	2.45E-03	1.92	Cxcl4
1452717_at	2.84E-03	1.92	Slc25a24
1452163_at	1.68E-03	1.92	Ets1
1427276_at	3.61E-03	1.92	Smc4
1416053_at	2.36E-03	1.92	Lrrn1
1421811_at	3.72E-03	1.92	Thbs1
1422671_s_at	4.92E-03	1.92	Naalad2
1417040_a_at	4.78E-03	1.91	Bok
1417752_at	3.45E-03	1.91	Coro1c
1438779_at	3.22E-03	1.91	Col4a3

Grupo I (genes aumentados en situación de hipertrofia)

Sonda	p-val	Aumento de expresión	Símbolo Gen
1420170_at	2.96E-03	1.91	Myh9
1423725_at	1.76E-03	1.91	Pls3
1452656_at	3.91E-03	1.91	Zdhhc2
1437689_x_at	2.08E-03	1.91	Clu
1417143_at	2.50E-03	1.91	Edg2
1416122_at	2.62E-03	1.91	Ccnd2
1416326_at	3.12E-03	1.91	Crip1
1429159_at	3.45E-03	1.91	Itih5
1422510_at	2.47E-03	1.91	Ctdspl
1448755_at	4.71E-03	1.91	Col15a1
1426973_at	4.17E-03	1.91	Gpr153
1438556_a_at	2.44E-03	1.91	Tmod3
1417662_at	2.18E-03	1.91	Elk3
1429119_at	4.10E-03	1.90	lah1
1419251_at	4.38E-03	1.90	Eps15
1447903_x_at	4.12E-03	1.90	Ap1s2
1437671_x_at	1.43E-03	1.90	Prss23
1422593_at	3.14E-03	1.90	Ap3s1
1428057_a_at	3.74E-03	1.90	Ahnak
1434413_at	3.65E-03	1.90	---
1416514_a_at	5.21E-03	1.90	Fscn1
1417104_at	3.67E-03	1.90	Emp3
1424113_at	4.22E-03	1.90	Lamb1-1
1440315_at	5.03E-03	1.90	Mbnl1
1454849_x_at	3.74E-03	1.89	Clu
1428585_at	5.02E-03	1.89	Actn1
1449297_at	5.23E-03	1.89	Casp12
1456380_x_at	5.25E-03	1.89	Cnn3
1442917_at	3.03E-03	1.89	LOC100040792
1433908_a_at	4.39E-03	1.89	Cttn
1416762_at	3.71E-03	1.89	S100a10
1434891_at	4.28E-03	1.89	Ptgfrn
1448712_at	3.19E-03	1.89	Chm
1435661_at	5.08E-03	1.89	Als2cr4
1418673_at	2.40E-03	1.89	Snai2
1417460_at	3.81E-03	1.89	Ifitm2
1423678_at	5.22E-03	1.89	BC017643
1417400_at	5.18E-03	1.89	Rai14
1438531_at	2.54E-03	1.89	A730054J21Rik
1416598_at	5.43E-03	1.89	Glis2
1449330_at	5.08E-03	1.89	Pdzd3
1429028_at	2.80E-03	1.88	Dock11
1421375_a_at	1.80E-03	1.88	S100a6
1417133_at	2.98E-03	1.88	Pmp22
1451218_at	3.44E-03	1.88	Edem1
1449345_at	1.76E-03	1.88	Ccdc34
1435616_at	4.54E-03	1.88	Cyp20a1
1417339_a_at	2.06E-03	1.88	Dynl1l
1415973_at	4.61E-03	1.88	Marcks
1438376_s_at	2.82E-03	1.88	Trim27
1415850_at	3.50E-03	1.88	Rasa3
1427123_s_at	5.43E-03	1.88	Copg2as2

Grupo I (genes aumentados en situación de hipertrofia)

Sonda	p-val	Aumento de expresión	Símbolo Gen
1448754_at	4.57E-03	1.88	Rbp1
1426937_at	1.27E-03	1.88	6330406I15Rik
1436181_at	2.57E-03	1.88	Ddef2
1426541_a_at	3.59E-03	1.87	Endod1
1425546_a_at	4.08E-03	1.87	Trf
1437458_x_at	3.61E-03	1.87	Clu
1457687_at	2.50E-03	1.87	Bcl2
1452359_at	3.96E-03	1.87	Rell1
1417145_at	4.92E-03	1.87	Nfxl1
1455396_at	5.17E-03	1.87	Atp8b1
1436997_x_at	2.59E-03	1.87	Sh3bgrl
1460285_at	3.22E-03	1.87	Itga9
1448233_at	4.31E-03	1.87	Prnp
1456700_x_at	2.47E-03	1.87	Marcks
1423607_at	3.97E-03	1.86	Lum
1427883_a_at	5.23E-03	1.86	Col3a1
1428527_at	4.16E-03	1.86	Snx7
1433812_at	4.18E-03	1.86	Lix1l
1418441_at	4.77E-03	1.86	Col8a1
1416108_a_at	5.33E-03	1.86	Tmed3
1448202_x_at	4.47E-03	1.86	Preld1
1437628_s_at	5.11E-03	1.86	Rhoa
1419665_a_at	2.38E-03	1.86	Nupr1
1437216_at	4.97E-03	1.86	Ccdc88a
1437092_at	3.64E-03	1.86	LOC100048376
1437406_x_at	4.52E-03	1.86	Igfbp4
1417090_at	4.31E-03	1.86	Rcn1
1460186_at	4.13E-03	1.86	Tm9sf3
1415935_at	4.08E-03	1.85	Smoc2
1452244_at	1.54E-03	1.85	6330406I15Rik
1415778_at	3.55E-03	1.85	Morf4l2
1434396_a_at	3.67E-03	1.85	Myl6
1426754_x_at	3.00E-03	1.85	Ckap4
1415972_at	3.66E-03	1.85	Marcks
1416168_at	4.93E-03	1.85	Serpinf1
1459666_at	2.37E-03	1.84	Trak1
1451978_at	4.07E-03	1.84	Loxl1
1452761_a_at	3.95E-03	1.84	8430436O14Rik
1437148_at	5.38E-03	1.84	Arpc2
1454927_at	3.82E-03	1.84	Zfp41
1435777_at	2.88E-03	1.84	E030018N11Rik
1425567_a_at	3.57E-03	1.84	Anxa5
1419329_at	2.81E-03	1.84	Sorbs3
1450791_at	5.43E-03	1.84	Nppb
1451112_s_at	5.14E-03	1.84	Dap
1423455_at	3.76E-03	1.84	Ptma
1450632_at	4.00E-03	1.83	LOC433749
1418454_at	3.48E-03	1.83	Mfap5
1424987_at	2.55E-03	1.83	5430435G22Rik
1435803_a_at	4.67E-03	1.83	Eif4e2
1437331_a_at	3.43E-03	1.83	Arf3
1418355_at	4.63E-03	1.83	Nucb2

Grupo I (genes aumentados en situación de hipertrofia)

Sonda	p-val	Aumento de expresión	Símbolo Gen
1417366_s_at	5.01E-03	1.83	Calm1
1424781_at	3.27E-03	1.83	Reep3
1418530_at	5.12E-03	1.83	Nup160
1437197_at	3.97E-03	1.83	Sorbs2
1424234_s_at	4.50E-03	1.83	Meox2
1448219_a_at	3.53E-03	1.83	Ywhaz
1415971_at	3.92E-03	1.83	Marcks
1450629_at	3.57E-03	1.82	Lima1
1448843_at	3.29E-03	1.82	LOC636537
1434745_at	4.56E-03	1.82	Ccnd2
1454920_at	4.24E-03	1.82	Uhrf2
1433623_at	3.65E-03	1.81	Zfp367
1452181_at	4.91E-03	1.81	Ckap4
1425814_a_at	3.70E-03	1.81	Calcr1
1456028_x_at	2.70E-03	1.80	Marcks
1456060_at	4.23E-03	1.80	Maf
1429637_at	3.86E-03	1.80	2210419I08Rik
1426442_at	4.79E-03	1.80	Gpm6a
1426799_at	5.24E-03	1.80	Rab8b
1415746_at	4.62E-03	1.79	Cic
1439766_x_at	3.79E-03	1.79	Vegfc
1453898_at	4.89E-03	1.78	Itgb1bp3
1456540_s_at	5.13E-03	1.78	Mtmr6
1435324_x_at	5.08E-03	1.78	Hmg1l1, Hmgbl
1434149_at	3.85E-03	1.77	Tcf4

Grupo II (genes disminuidos en hipertrofia)

Sonda	p-val	Disminución en la expresión	Símbolo Gen
1455506_at	4.19E-05	-2.71	Slc25a34
1428899_at	5.95E-05	-2.67	Tmem182
1415910_s_at	2.50E-04	-2.65	Ciapi1
1428810_at	1.04E-04	-2.64	2700097O09Rik
1439143_at	2.46E-05	-2.62	A930018M24Rik
1431302_a_at	2.12E-04	-2.62	Nudt7
1444318_at	1.43E-04	-2.59	Chchd7
1451606_at	2.68E-04	-2.57	A530016L24Rik
1449714_at	6.42E-04	-2.56	5730472N09Rik
1448491_at	2.68E-04	-2.56	Ech1
1450395_at	1.07E-04	-2.55	Slc22a5
1452823_at	2.45E-04	-2.54	Gstk1
1426672_at	1.54E-05	-2.54	Tmem16k
1451307_at	5.48E-04	-2.54	Mrpl14
1443044_at	3.31E-04	-2.54	A830091E24
1456981_at	1.68E-04	-2.54	Tmc7
1416665_at	5.04E-04	-2.52	Coq7
1424715_at	8.86E-04	-2.52	Retsat
1418148_at	5.94E-05	-2.52	Abhd1
1448112_at	4.62E-04	-2.51	Cox7c
1420890_at	1.09E-04	-2.50	Hccs
1429966_at	2.75E-05	-2.50	3110057O12Rik
1417841_at	5.91E-04	-2.49	Pxmp2
1418706_at	4.81E-04	-2.45	Slc38a3
1439662_at	3.10E-04	-2.45	Homer1
1421097_at	8.77E-04	-2.44	Endog
1423482_at	1.01E-03	-2.44	Uros
1430896_s_at	1.44E-03	-2.44	Nudt7
1422948_s_at	4.04E-04	-2.44	Hist1h4a, b, c, h, i, j, k, m
1451467_s_at	1.89E-03	-2.43	Gtpbp5
1454935_at	7.59E-04	-2.43	D930001I22Rik
1417212_at	2.58E-04	-2.42	9530058B02Rik
1455214_at	7.11E-04	-2.41	Mitf
1448322_a_at	1.09E-03	-2.41	Cox4i1
1424716_at	1.56E-04	-2.40	Retsat
1435701_at	1.00E-04	-2.39	---
1452913_at	1.02E-03	-2.38	Pcp4l1
1428290_at	7.20E-04	-2.38	Mipep
1422500_at	1.95E-03	-2.38	ldh3a
1423908_at	6.76E-04	-2.38	Ndufs8
1433101_at	5.66E-04	-2.38	9030419F21Rik
1434647_at	1.59E-04	-2.38	Egflam
1418782_at	1.13E-03	-2.38	Rxrg
1449118_at	3.39E-04	-2.38	Dbt
1416604_at	6.21E-04	-2.37	Cycl
1422525_at	9.96E-04	-2.37	Atp5k
1454964_at	9.34E-04	-2.37	BC021395
1457894_at	3.04E-03	-2.37	---
1424937_at	1.90E-03	-2.37	2310076L09Rik
1436173_at	4.59E-04	-2.36	Dlc1
1451084_at	2.00E-03	-2.36	Etfhdh
1456587_x_at	2.03E-03	-2.36	2010005J08Rik

Grupo II (genes disminuidos en hipertrofia)

Sonda	p-val	Disminución en la expresión	Símbolo Gen
1416772_at	6.53E-04	-2.35	Cpt2
1438790_x_at	2.70E-03	-2.35	Tmem41b
1433817_at	5.56E-04	-2.35	Agpat3
1441915_s_at	9.89E-04	-2.35	2310076L09Rik
1423104_at	4.35E-04	-2.34	Irs1
1448499_a_at	8.97E-04	-2.34	Ephx2
1438338_at	1.07E-03	-2.34	Mdh1
1427250_at	6.64E-04	-2.33	Atp2a2
1424184_at	2.07E-03	-2.33	Acadvl
1424226_at	9.29E-04	-2.33	9030617O03Rik
1418715_at	5.74E-04	-2.33	Pank1
1460184_at	1.00E-03	-2.33	Hadh
1427964_at	4.59E-04	-2.32	Cmtm8
1435294_at	6.45E-04	-2.32	Mtmr11
1423960_at	6.26E-04	-2.32	Mboat5
1440537_at	3.53E-04	-2.32	Kcnv2
1460652_at	2.20E-03	-2.32	Esrra
1416933_at	2.22E-03	-2.32	Por
1427213_at	3.26E-04	-2.32	Pfkfb1
1428134_at	2.58E-03	-2.31	Coq9
1442537_at	1.42E-03	-2.31	---
1416057_at	6.10E-04	-2.31	Ndufb11
1422501_s_at	2.11E-03	-2.30	ldh3a
1419499_at	1.90E-04	-2.30	Gpam
1417683_at	2.31E-03	-2.30	Diablo
1416300_a_at	3.37E-03	-2.30	Slc25a3
1426522_at	2.71E-03	-2.30	Hadhb
1415970_at	2.94E-03	-2.30	Cox6c
1435280_at	1.21E-03	-2.30	AI452195
1450187_a_at	1.16E-03	-2.29	Galt
1453355_at	3.73E-04	-2.29	Wnk2
1427312_at	3.07E-03	-2.29	Cmya5
1423785_at	1.13E-03	-2.29	Egln1
1456176_x_at	1.86E-03	-2.29	Slc25a39
1438317_a_at	5.12E-04	-2.29	Endog
1416058_s_at	2.57E-03	-2.29	Atp5c1
1418584_at	1.60E-03	-2.28	Ccnh
1447961_s_at	1.77E-03	-2.28	Mrpl38
1429260_at	5.12E-04	-2.27	1810014B01Rik
1453687_at	1.34E-03	-2.27	Slc4a3
1419247_at	2.34E-04	-2.27	Rgs2
1419286_s_at	9.78E-04	-2.27	Ift81
1436169_at	2.50E-04	-2.27	C730029A08Rik
1451336_at	2.59E-04	-2.27	Lgals4
1416478_a_at	1.68E-03	-2.27	Mdh2
1423692_at	3.97E-03	-2.26	Ndufa8
1456580_s_at	2.16E-03	-2.26	Atp5d
1454992_at	2.30E-03	-2.26	Slc7a1
1449218_at	1.26E-03	-2.26	Cox8b
1416056_a_at	1.90E-03	-2.26	Ndufb11
1448934_at	1.13E-03	-2.26	Ndufa10
1417661_at	2.78E-03	-2.25	Rdm1

Grupo II (genes disminuidos en hipertrofia)

Sonda	p-val	Disminución en la expresión	Símbolo Gen
1460506_s_at	1.32E-03	-2.25	Ndufc2
1436351_at	4.75E-03	-2.25	Coq3
1423492_at	1.51E-03	-2.25	Mrpl45
1450640_x_at	3.43E-03	-2.25	Atp5k
1424392_at	1.59E-03	-2.24	Adhfe1
1423981_x_at	2.41E-03	-2.24	Slc25a29
1416938_at	3.98E-04	-2.24	Chchd1
1454991_at	1.52E-03	-2.24	Slc7a1
1449964_a_at	1.47E-03	-2.24	Mlycd
1449442_at	8.80E-04	-2.24	Pex11a
1451176_at	1.20E-03	-2.24	D430028G21Rik
1460198_a_at	1.04E-03	-2.24	Psmb3
1427513_at	1.85E-03	-2.24	BC024137
1415948_at	7.61E-04	-2.24	Creg1
1428181_at	4.77E-03	-2.23	Etfb
1423071_x_at	3.58E-03	-2.23	EG622782
1423072_at	1.58E-03	-2.23	6720475J19Rik
1418117_at	2.90E-03	-2.23	Ndufs4
1417402_at	5.00E-03	-2.23	1190017O12Rik
1428076_s_at	5.46E-04	-2.23	Ndufb4
1424313_a_at	2.83E-03	-2.22	Ndufs7
1419248_at	4.15E-04	-2.22	Rgs2
1416793_at	1.29E-03	-2.22	Arl6ip2
1431220_at	3.06E-03	-2.22	LOC100040353
1449710_s_at	4.44E-03	-2.22	Atp5a1
1416416_x_at	2.52E-03	-2.22	Gstm1
1436070_at	1.36E-03	-2.22	Glo1
1420950_at	1.89E-03	-2.22	Znrf1
1437364_at	1.32E-03	-2.21	Coq3
1455958_s_at	4.88E-03	-2.21	Pptc7
1450968_at	2.47E-03	-2.21	Uqcrfs1
1450268_at	8.26E-04	-2.21	Fign
1450884_at	3.47E-03	-2.21	Cd36
1454708_at	2.64E-03	-2.21	Ablim1
1448198_a_at	2.21E-03	-2.21	Ndufb8
1455972_x_at	1.84E-03	-2.21	Hadh
1434212_at	1.22E-03	-2.21	Ndufs8
1437832_x_at	4.75E-03	-2.21	Wars
1458425_at	2.90E-03	-2.21	A430046D13Rik
1423044_at	4.38E-03	-2.21	Prosc
1431028_a_at	7.92E-04	-2.20	Pank1
1419103_a_at	2.28E-03	-2.20	Abhd6
1425164_a_at	2.93E-04	-2.20	Phkg1
1418505_at	3.17E-04	-2.20	Nudt4
1430326_s_at	4.72E-03	-2.20	Uqcrq
1456871_a_at	1.08E-03	-2.20	Phf2011
1416616_s_at	2.13E-03	-2.20	Clpp
1429539_at	9.53E-04	-2.20	Bcl2l13
1424670_s_at	1.24E-03	-2.20	Zfyve21
1420513_at	4.42E-03	-2.20	Efcab2
1448563_at	1.64E-03	-2.19	Phb
1420493_a_at	5.00E-03	-2.19	Pcyt2

Grupo II (genes disminuidos en hipertrofia)

Sonda	p-val	Disminución en la expresión	Símbolo Gen
1418586_at	2.80E-03	-2.19	Adcy9
1423136_at	2.19E-03	-2.19	Fgf1
1436926_at	2.60E-03	-2.19	Esrrb
1453065_at	1.86E-03	-2.19	Aldh5a1
1428926_at	1.91E-03	-2.19	1110003O08Rik
1418005_at	4.70E-03	-2.19	Sdhb
1448330_at	2.87E-03	-2.19	Gstm1
1426689_s_at	2.97E-03	-2.19	Sdha
1416366_at	3.29E-03	-2.19	Ndufc2
1428014_at	1.20E-03	-2.18	Hist1h4h
1451312_at	3.77E-03	-2.18	Ndufs7
1448811_at	1.93E-03	-2.18	Mrpl2
1452653_at	2.86E-03	-2.18	Slc25a22
1424393_s_at	1.91E-03	-2.18	Adhfe1
1418886_s_at	2.74E-03	-2.18	ldh3b
1450880_at	8.54E-04	-2.18	Mrpl16
1439493_at	1.52E-03	-2.18	D630040G17Rik
1435150_at	1.00E-03	-2.18	---
1448959_at	4.66E-03	-2.18	Ndufs4
1427202_at	5.79E-04	-2.18	4833442J19Rik
1416485_at	2.38E-03	-2.18	Timm23
1428130_at	1.71E-03	-2.17	Lman1
1448292_at	1.05E-03	-2.17	Uqcr
1450492_at	1.57E-03	-2.17	Cngb3
1448319_at	4.31E-03	-2.17	Akr1b3
1422678_at	1.94E-03	-2.17	Dgat2
1449108_at	3.90E-03	-2.17	Fdx1
1423893_x_at	3.39E-03	-2.17	Apbb1
1427052_at	2.52E-03	-2.16	Acacb
1452433_at	3.16E-03	-2.16	---
1457199_at	3.61E-03	-2.16	---
1431980_a_at	2.66E-03	-2.16	As3mt
1425143_a_at	2.33E-03	-2.16	Ndufs1
1450627_at	3.25E-03	-2.16	Ank
1448140_at	4.00E-03	-2.16	Ciapi1
1459089_at	2.41E-03	-2.16	RP23-292J1.2
1434579_x_at	3.26E-03	-2.16	Ndufs8
1449935_a_at	4.13E-03	-2.16	Dnaja3
1432511_s_at	1.38E-03	-2.16	Cep27
1418238_at	2.33E-03	-2.16	lvd
1435751_at	3.47E-03	-2.15	Abcc9
1433545_s_at	1.90E-03	-2.15	Acad11
1435127_a_at	1.11E-03	-2.15	Osgepl1
1418873_at	3.76E-03	-2.15	Sfxn4
1449407_at	2.34E-03	-2.15	Ift81
1455911_x_at	3.60E-03	-2.15	Ndufb11
1448645_at	1.43E-03	-2.15	Msl31
1428519_at	4.27E-03	-2.15	2610528E23Rik
1417103_at	3.40E-03	-2.15	Ddt
1447830_s_at	8.35E-04	-2.15	Rgs2
1434718_at	1.16E-03	-2.15	Cul3
1439675_at	1.40E-03	-2.14	4933429D07Rik

Grupo II (genes disminuidos en hipertrofia)

Sonda	p-val	Disminución en la expresión	Símbolo Gen
1419815_at	1.52E-03	-2.14	Mett11d1
1456716_s_at	1.60E-03	-2.14	3110002H16Rik
1437866_at	9.52E-04	-2.14	Dusp18
1445037_at	1.41E-03	-2.14	6430510B20Rik
1428589_at	2.43E-03	-2.14	Mrpl41
1449081_at	9.42E-04	-2.14	Ces3
1435232_x_at	3.56E-03	-2.13	---
1439488_at	1.45E-03	-2.13	Dot11
1418521_a_at	3.10E-03	-2.13	Mtx1
1416275_at	3.34E-03	-2.13	Slc26a6
1424669_at	3.03E-03	-2.12	Zfyve21
1425745_a_at	1.51E-03	-2.12	Tacc2
1435967_s_at	5.15E-03	-2.12	Hibadh
1448034_at	2.88E-03	-2.12	AI842396
1443306_at	5.87E-04	-2.12	---
1441306_at	2.22E-03	-2.12	6820408C15Rik
1448681_at	1.58E-03	-2.12	Il15ra
1428146_s_at	2.83E-03	-2.12	Acaa2
1448786_at	3.56E-03	-2.12	1100001H23Rik
1416522_a_at	4.17E-03	-2.11	Grccl0
1434072_at	1.36E-03	-2.11	Smcr7
1449443_at	3.18E-03	-2.11	Decr1
1451270_at	1.65E-03	-2.11	Dusp18
1418314_a_at	1.04E-03	-2.11	A2bp1
1424364_a_at	5.47E-03	-2.11	1110020P15Rik
1425628_a_at	1.49E-03	-2.11	Gtf2i
1423109_s_at	4.87E-03	-2.11	Slc25a20
1440545_at	4.45E-03	-2.11	ENSMUSG00000075319
1435995_at	3.01E-03	-2.11	Mrpl22
1422578_at	5.02E-03	-2.11	Cs
1426407_at	1.85E-03	-2.11	Cugbp1
1427997_at	3.65E-03	-2.10	1110007M04Rik
1430787_at	1.60E-03	-2.10	2310050B05Rik
1417580_s_at	2.40E-03	-2.10	Selenbp1
1454621_s_at	2.69E-03	-2.10	5730472N09Rik
1426856_at	4.30E-03	-2.10	Hsd12
1431012_a_at	4.63E-03	-2.10	Peci
1423980_at	4.12E-03	-2.10	Slc25a29
1456824_at	1.00E-03	-2.10	Zfp612
1422315_x_at	1.01E-03	-2.10	LOC100047682
1459980_x_at	4.35E-03	-2.09	Rab3a
1428520_at	5.18E-03	-2.09	1110032A13Rik
1455424_at	4.34E-03	-2.09	Wnk2
1423086_at	1.89E-03	-2.09	Npc1
1416341_at	5.49E-03	-2.09	Polr2c
1451558_at	2.63E-03	-2.09	Fbxw7
1457355_at	2.82E-03	-2.09	Pnpla8
1436791_at	3.88E-04	-2.09	Wnt5a
1416679_at	2.63E-03	-2.09	Abcd3
1429229_s_at	1.90E-03	-2.09	4930534B04Rik
1416175_a_at	4.38E-03	-2.09	Vdac3
1420387_at	3.22E-03	-2.09	Mpv17

Grupo II (genes disminuidos en hipertrofia)

Sonda	p-val	Disminución en la expresión	Símbolo Gen
1425115_at	1.59E-03	-2.09	Rbbp6
1421456_at	4.90E-03	-2.09	P2ry1
1429516_at	3.05E-03	-2.09	Ubr2
1416020_a_at	5.40E-03	-2.09	Atp5g1
1422677_at	3.48E-03	-2.08	Dgat2
1437077_at	5.02E-03	-2.08	Dcun1d2
1421590_at	4.60E-03	-2.08	Mrgprh
1422820_at	2.17E-03	-2.08	Lipe
1436358_at	4.63E-03	-2.08	Atpaf1
1443632_at	4.90E-03	-2.08	Obscn
1448203_at	5.00E-03	-2.07	Atp5l
1424045_at	3.64E-03	-2.07	5730437N04Rik
1416878_at	5.06E-03	-2.07	Mrpl5l
1416393_at	5.25E-03	-2.07	Emg1
1439128_at	3.09E-03	-2.07	Zbtb20
1435551_at	4.24E-03	-2.07	Fhod3
1435333_at	2.11E-03	-2.07	1110007M04Rik
1431833_a_at	1.71E-03	-2.07	Hmgcs2
1447783_x_at	5.36E-03	-2.07	Slc25a39
1435004_at	2.90E-03	-2.07	Pank4
1452015_at	2.68E-03	-2.07	6330416G13Rik
1451245_at	2.75E-03	-2.07	Lrrc3b
1423642_at	3.25E-03	-2.07	Tubb2c
1435371_x_at	2.65E-03	-2.06	Ces3
1449398_at	5.10E-03	-2.06	Rpl3l
1433293_at	1.07E-03	-2.06	1500032O14Rik
1418968_at	1.82E-03	-2.06	Rb1cc1
1455227_at	3.01E-03	-2.06	Aadacl1
1438010_at	1.55E-03	-2.06	Tmem20l
1436521_at	2.99E-03	-2.06	Slc36a2
1448484_at	9.47E-04	-2.06	Amd1
1448038_at	3.92E-03	-2.05	1810021B22Rik
1454921_at	3.82E-03	-2.05	Gm56l
1453957_a_at	1.74E-03	-2.05	Igf2bp3
1449088_at	2.96E-03	-2.05	Fbp2
1449544_a_at	5.17E-03	-2.05	Kcnh2
1416269_at	2.72E-03	-2.05	Atp5j2
1435716_x_at	3.92E-03	-2.05	Snrpn, Snurf
1435227_at	4.32E-03	-2.05	Bcl1b
1437363_at	2.66E-03	-2.05	Homer1
1423907_a_at	1.99E-03	-2.05	Ndufs8
1428657_at	3.55E-03	-2.05	Rreb1
1416349_at	4.97E-03	-2.04	Mrpl34
1437742_at	4.25E-03	-2.04	Rab2l
1434354_at	1.88E-03	-2.04	Maob
1429723_at	3.51E-03	-2.04	6330409N04Rik
1433493_at	5.06E-03	-2.04	5730472N09Rik
1452887_at	2.58E-03	-2.04	Traf3ip1
1439362_at	2.72E-03	-2.04	---
1451213_at	2.22E-03	-2.04	Pex11b
1435750_at	4.72E-03	-2.04	Gchfr
1457176_at	3.79E-03	-2.04	---

Grupo II (genes disminuidos en hipertrofia)

Sonda	p-val	Disminución en la expresión	Símbolo Gen
1435399_at	3.15E-03	-2.04	2310068J10Rik
1427958_at	2.73E-03	-2.04	Abhd10
1416789_at	4.80E-03	-2.04	Idh3g
1444064_at	3.15E-03	-2.03	Samhd1
1425768_at	4.18E-03	-2.03	Diablo
1450699_at	4.63E-03	-2.03	Selenbp1
1448963_at	2.94E-03	-2.03	Nfyc
1418624_at	4.36E-03	-2.03	Ybx1
1436168_at	2.88E-03	-2.03	C730029A08Rik
1434155_a_at	4.85E-03	-2.02	2310061I04Rik
1437398_a_at	2.56E-03	-2.02	Aldh9a1
1454698_at	3.90E-03	-2.02	Ptplad1
1434717_at	5.26E-03	-2.02	Cul3
1452919_a_at	1.63E-03	-2.02	1700012G19Rik
1425695_at	1.98E-03	-2.02	Tbx5
1438537_at	4.18E-03	-2.02	---
1444498_at	4.91E-03	-2.01	---
1422153_a_at	4.84E-03	-2.01	Asb11
1439029_at	5.43E-03	-2.01	Gpt2
1449944_a_at	5.43E-03	-2.01	Sec61a2
1425455_a_at	4.84E-03	-2.01	Churc1
1436756_x_at	4.52E-03	-2.01	Hadh
1441285_at	3.18E-03	-2.01	4833426J09Rik
1417765_a_at	3.70E-03	-2.00	Amy1
1448667_x_at	2.01E-03	-2.00	Tob2
1427342_at	2.57E-03	-2.00	Fastkd1
1440343_at	3.31E-03	-2.00	Rps6ka5
1460453_at	2.35E-03	-2.00	Tagap, Tagap1
1452282_at	2.25E-03	-2.00	Med26
1434672_at	4.23E-03	-2.00	Gpr22
1449813_at	3.01E-03	-2.00	Zfp30
1439836_at	5.36E-03	-2.00	Asb15
1416285_at	3.67E-03	-1.99	Ndufc1
1458262_at	3.75E-03	-1.99	---
1457915_at	1.54E-03	-1.99	4833442J19Rik
1425978_at	2.90E-03	-1.98	Myocd
1436590_at	2.07E-03	-1.98	Ppp1r3b
1451217_a_at	4.09E-03	-1.98	Immp1l
1453728_a_at	3.87E-03	-1.98	Mrps17
1420408_a_at	4.18E-03	-1.98	Abcc9
1423512_at	5.41E-03	-1.98	AW209491
1426153_a_at	3.55E-03	-1.98	Dsg2
1452646_at	4.57E-03	-1.98	Trp53inp2
1417789_at	3.52E-03	-1.97	Ccl11
1440346_at	4.79E-03	-1.97	Jmjd3
1417046_at	4.17E-03	-1.97	Tusc4
1448666_s_at	1.04E-03	-1.97	Tob2
1444153_at	3.45E-03	-1.97	---
1434213_x_at	4.68E-03	-1.96	Ndufs8
1418302_at	4.96E-03	-1.96	Ppt2
1441857_x_at	3.00E-04	-1.96	Seh1l
1437599_at	4.82E-03	-1.96	---

Grupo II (genes disminuidos en hipertrofia)

Sonda	p-val	Disminución en la expresión	Símbolo Gen
1425968_s_at	4.01E-03	-1.96	Speg
1452477_at	2.90E-03	-1.96	3110057O12Rik
1447585_s_at	2.14E-03	-1.96	Mrps6
1416835_s_at	1.99E-03	-1.95	Amd1-2
1435370_a_at	4.28E-03	-1.95	Ces3
1434053_x_at	5.39E-03	-1.94	Atp5k
1415734_at	5.36E-03	-1.94	Rab7
1440302_at	5.42E-03	-1.93	Slc25a3
1420056_s_at	2.64E-03	-1.93	Jmjd6
1418594_a_at	2.92E-03	-1.93	Ncoa1
1428360_x_at	2.76E-03	-1.93	Ndufa7
1440267_at	3.18E-03	-1.93	Pex1
1436689_a_at	4.43E-03	-1.93	Aldh9a1
1428812_at	5.45E-03	-1.93	1700040L02Rik
1443513_at	2.44E-03	-1.92	---
1430292_a_at	5.17E-03	-1.92	1810030N24Rik
1429144_at	4.13E-03	-1.91	Prei4
1440787_s_at	5.20E-03	-1.91	Bbs10
1457178_at	2.49E-03	-1.91	---
1436362_x_at	1.44E-03	-1.91	Ccrn4l
1434898_at	5.07E-03	-1.89	Tnrc6a
1434918_at	4.23E-03	-1.88	Sox6
1455336_at	5.10E-03	-1.86	Thap2
1433068_at	3.88E-03	-1.86	6330582A15Rik
1430485_at	1.91E-03	-1.84	Trpc2
1440826_s_at	4.23E-03	-1.84	Tmem103
1419017_at	4.79E-03	-1.81	Corin
1441927_at	5.13E-03	-1.79	Syt7