



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

Regulación de las GTPasas de la familia Ras y la viabilidad de neuronas dopaminérgicas en respuesta a la señalización purinérgica

*Memoria presentada por la Lda.
Bakarne Urzelai López de Aberásturi
para la obtención del grado de
Doctora en Biología Molecular y Biomedicina
Leioa, 2015*

El presente trabajo ha sido realizado gracias a la concesión de una beca predoctoral del Departamento de Educación, Universidades e Investigación del Gobierno Vasco (BFI-2010-184).

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

He pensado muchas veces en todas aquellas personas a las que tengo que agradecerles su granito de arena. La lista es larga pero no puedo mencionarlos a todos, y me quedo con aquellas personas a las que lo mínimo que puedo hacer es dedicarles las siguientes palabras.

Como no podía ser de otra manera, la primera persona que he de mencionar es mi director, José Luis Zugaza. Porque aunque suene a frase hecha, esto no hubiera sido posible sin ti. Desde el minuto uno me diste un voto de confianza y apostaste por mí como nadie más lo hizo, olvidándote del qué dirán. Y a partir de ahí, me quito el sombrero ante tu labor como director. Un director que sigue todos los pasos de tu proyecto aunque sin ahogarte, dispuesto siempre a escuchar nuevas ideas y a dejarte hacer lo que habías pensado, porque esté bien o esté mal, intentarlo es la mejor manera de aprender. Gracias por toda la ayuda y dedicación en la parte más experimental y sin duda también en esta última fase de escritura. Gracias también a la persona que ha estado conmigo codo con codo en la poyata, a ti Llaveró, que me has sacado más de una sonrisa con ese arte que tú tienes y también has sabido ponerte serio cuando hacía falta. Gracias por todos los consejos y por “protegerme”. Y gracias también al resto de personas del laboratorio: grupos JAR, AZ, Abereak y MHR.

En la parte más personal, gracias a mis hermanos Arri, Urko y Berrbiz y en especial a mi madre, porque a ellos les debo todo lo que hoy soy. Gracias a ti ama por ser el mejor ejemplo de superación, por enseñarnos que a pesar de todo hay que tirar para adelante, y por darlo absolutamente todo por tus hijos. También por ser mi mayor confesora en esta última etapa y por estar siempre dispuesta a escucharme, aunque fuera hablándote de esos “bichitos a los que hay que darles de comer”. Gracias por tu infinita paciencia.

Xabi, a ti tengo tantas cosas que agradecerte que no sé ni por dónde empezar. Eres la persona con la que comparto todas mis alegrías y mis penas, en la que siempre me apoyo y la que me ayuda a levantarme cuanto tropiezo. Gracias por enseñarme que todo es relativo, lo bueno y sobre todo lo malo, y por

mostrarme el lado más racional de las cosas cuando las emociones me pueden. Por hacerme desconectar y conseguir como nadie que disfrute con las cosas más sencillas de la vida. Cuando uno se adentra en este mundillo sabe y elige dónde se mete, pero los que nos rodean no, y no es fácil saber llevar desde la barrera todos los altibajos que se viven. Tú has sido probablemente el que más ha sufrido mis subidas y bajadas y a ti tengo que agradecerle el haber sabido aguantarlo, escuchándome y apoyándome, animándome y ayudándome. Simplemente gracias por todo.

Naiara, Izargi, a vosotras qué deciros... Sois como hermanas para mí. Hace ya 10 añazos que se cruzaron nuestras vidas y desde entonces no hago más que quererlos cada día un poquito más. Habéis estado a mi lado en los momentos más duros, tanto profesionales como personales, pero también me vienen a la cabeza muchísimos momentos geniales e inolvidables con vosotras. Esos interminables cafés que tanto nos costaba encajar en nuestras agendas y que un día se convirtieron en sobremesas de una bonita convivencia, en las que arreglábamos el mundo y en las que alguna siempre acababa haciendo de abogado del diablo, jejeje. Y esos viajes... Praga (kirikiñoakin), Finlandia (viaje Willy Fog), y quizás el más especial, el que aún nos queda por hacer. Ya no queda nada campeonas, ánimo!!

Gracias también a la gente de micro y acoplados (como yo): Naiara (de nuevo), Ainhoa, Olatz, Aize, Andoni, Aitziber, Xabi, Idoia, Aitor, Imanol y María. Por acogerme como a una más y porque esos cafés de media mañana (habitualmente con algún sólido) y esas comidas eran la excusa perfecta para cambiar de aires y volver al labo con fuerzas renovadas.

Por último, no me puedo olvidar de mis eternas compis de labo: Onin, Sara, Analía, Encarni y Almudena. Sois sin duda lo mejor que me llevé de allí. Gracias por enseñarme casi todo lo que sé hacer en una poyata y por brindarme una amistad más allá de aquellas cuatro paredes que perdura a día de hoy.

A todos vosotros, gracias de corazón.

ÍNDICE

ÍNDICE

I. ABREVIATURAS.....	1
II. RESUMEN	5
III. INTRODUCCIÓN	9
1. Neuronas dopaminérgicas y Enfermedad de Parkison	11
2. Señalización purinérgica: ATP y receptores purinérgicos	13
2.1. Introducción a la señalización purinérgica	13
2.2. Acumulación y liberación de ATP	14
2.3. Metabolismo del ATP extracelular	15
2.4. Receptores purinérgicos	16
2.4.1. Receptores P2Y.....	17
2.4.2. Receptores P2X.....	19
2.4.2.1. Receptor P2X ₇	23
2.4.2.1.1. PTPRβ: una fosfatasa del SNC asociada al receptor P2X ₇	25
2.5. Señalización purinérgica y GTPasas de la superfamilia Ras.....	29
3. GTPasas de la superfamilia Ras.....	29
3.1. Introducción a las pequeñas GTPasas	29
3.2. Estructura y regulación	31
3.3. Familia Ras.....	34
3.3.1. RasGEFs: proteínas activadoras de GTPasas Ras.....	37
3.3.1.1. RasGRF: un RasGEF neuronal.....	39
3.3.1.1.1. Regulación de RasGRF1 mediada por calcio/calmodulina	42
3.3.1.1.2. Regulación de RasGRF1 por fosforilación.....	43
3.3.2. PKCs como reguladoras de GTPasas Ras.....	44
IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	47
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
1. MATERIALES	53
1.1. Reactivos	53
1.2. Anticuerpos.....	55
2. MÉTODOS	56
2.1. Técnicas de ADN recombinante	56

2.1.1. Clonación de ADN	56
2.1.1.1. Reacción en cadena de la Polimerasa (Polimerase Chain Reaction, PCR) y mutagénesis dirigida.....	56
2.1.2. Transformación bacteriana	58
2.1.2.1. Obtención de bacterias competentes.....	58
2.1.2.2. Transformación	59
2.1.3. Extracción de ADN de cultivos bacterianos	59
2.2. Expresión de proteínas recombinantes en bacterias.	60
2.2.1. Expresión de dominios de unión a GTPasas de las moléculas efectoras.....	60
2.3. Cultivos celulares y transfecciones transitorias	62
2.3.1. Cultivos celulares.....	62
2.3.1.1. Siembra.....	62
2.3.2. Transfecciones	63
2.3.2.1. Transfección celular con el reactivo de transfección Xfect....	63
2.3.2.2. Transfección celular por electroporación	64
2.3.3. Tratamientos.....	64
2.4. Extracción total de proteínas	65
2.5. Ensayo de precipitación por afinidad (<i>Pull Down</i>).....	65
2.6.1. Análisis mediante Western blot.....	67
2.6.2. Immunodetección	68
2.6.3. “Stripping” o decapado	68
2.7. Análisis de viabilidad celular: ensayo MTT	68
2.8. Análisis estadístico	69
2.9. Soluciones	70
VI. RESULTADOS.....	73
1. SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR RECEPTORES PURINÉRGICOS EN PRESENCIA DE CALCIO EXTRACELULAR.....	76
2. SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR RECEPTORES PURINÉRGICOS EN AUSENCIA DE CALCIO EXTRACELULAR	95
VII. DISCUSIÓN.....	115
VIII. CONCLUSIONES	131
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	135

I. ABREVIATURAS

I. ABREVIATURAS

6-OHDA	6-hydroxydropamine
Aa	Aminoácido
AC	Adenylate cyclase
ADNc	ADN complementario
ALK	Anaplastic lymphoma kinase
ATP	Adenosine triphosphate
BzATP	3'-O-(4-benzoyl) benzoyl ATP
CAM	Cell Adhesion Molecule
CaM	Calmodulin
CaMK	Ca ²⁺ /Calmodulin-dependent protein Kinase
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
CRIB	Cdc42/Rac Interactive Binding domain
CRAC	Calcium Release-Activated Channel
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DUSP	Dual-Specificity Phosphatase
dNTPs	Deoxynucleotide triphosphates
EGF	Epidermal Growth Factor
EGTA	Ethylene Glycol Tetraacetic Acid
EP	Enfermedad de Parkinson
ERK	Extracellular signal Regulated Kinase
FAK	Focal Adhesion Kinase
FBS	Fetal Bovine Serum
GAP	GTPase Activating Protein
GDP/GTP	Guanosine Diphosphate/ Triphosphate
GEF	Guanine nucleotide Exchange Factor
GPCRs	G Protein-Coupled Receptor
GST	Gluthatione S Transferase
Hsc	Heat Sock Cognate protein
Hsp	Heat Sock Protein

IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
MAGUK	Membrane-Associated Guanilate Kinase
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MEK	MAP/ERK Kinase
MK	Midkine
MKP	Mitogen-activated protein Kinase Phosphatase
MPP+	1-methyl-4-phenylpyridinium
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
NGF	Nerve Growth Factor
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PS	Phosphatidilserine
PI3K	Phosphatidylinositol 3-hydroxy kinase
PI4K	Phosphatidylinositol 4-hydroxy kinase
PKA/C	Protein Kinase A/C
PLA/C/D	Phospholipase A/C/D
PIP ₂	Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate
PIP ₃	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PTN	Pleiotrophin
PTP	Protein Tyrosine Phosphatase
PTPR β	Protein Tyrosine Phosphatase Receptor β
RBD	Ras Binding Domain
SN	<i>Substantia Nigra</i>
SNc	<i>Substantia Nigra pars compacta</i>
SOS	Son Of Sevenless protein
SOCE	Store-Operated Calcium Entry
STEP	Striatal Enriched tyrosine Phosphatase
STIM	Stromal Interaction Molecule
TNF	Tumor Necrosis Factor
VGCC	Voltage-Gated Calcium Channel
VTA	Ventral Tegmental Area

II. RESUMEN

II.RESUMEN

El ATP es una molécula natural cuya liberación descontrolada puede elevar su concentración extracelular a rango mM y promover la estimulación de receptores purinérgicos. Se sabe que esta estimulación tiene efectos citotóxicos sobre las neuronas dopaminérgicas, aunque se desconocen los eventos moleculares a los que implica. La muerte de estas neuronas está íntimamente relacionada con la Enfermedad de Parkinson, ya que conlleva una disminución de la síntesis de dopamina y consecuente aparición de los síntomas típicos de esta enfermedad. Además de la función citotóxica, el ATP puede a través de los receptores purinérgicos inducir la activación de pequeñas GTPasas. Éstas, funcionan a modo de interruptores moleculares constituyendo un punto de encuentro en las complejas vías que controlan prácticamente la totalidad de procesos celulares, tanto fisiológicos como patológicos.

Debido al papel de los receptores purinérgicos en la viabilidad de las neuronas dopaminérgicas, este proyecto se ha centrado en el estudio de los acontecimientos intracelulares que acompañan a la estimulación purinérgica en este tipo de neuronas, centrándose en la señalización y regulación de las pequeñas GTPasas de la superfamilia Ras.

Este trabajo revela algunos de los protagonistas de la señalización celular mediada por receptores purinérgicos en neuronas dopaminérgicas, como son las GTPasas Ras y Rap1, el GEF regulador RasGRF, las cinasas PKC, PI3K y ERK1/2, y la tirosina fosfatasa PTPR β . Además, muestra que el calcio internalizado a través de dichos receptores, juega un importante papel como regulador de la actividad de Ras y ERK1/2 y la viabilidad neuronal.

El estudio de las bases moleculares de estas neuronas es esencial para comprender los efectos funcionales de distintos estímulos, más aún, considerando la importancia de estas células en el desarrollo de la EP. En este sentido, nuestro trabajo aporta nuevas ideas entorno a dichas respuestas, identificando nuevas moléculas y vías de señalización intracelulares.

III. INTRODUCCIÓN

III. INTRODUCCIÓN

1. Neuronas dopaminérgicas y Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es, después del Alzheimer, el segundo trastorno neurodegenerativo más frecuente en las personas de la tercera edad (Wirdefeldt et al., 2011). Se trata de una enfermedad crónica y progresiva que afecta a la capacidad motora, provoca temblor en reposo, bradicinesia, rigidez y alteraciones en la marcha (Bain, 2007; Edwards M., 2008a, 2008b; Jankovic, 2008; Rodriguez-Oroz et al., 2009; Massano and Bhatia, 2012). Además de estos síntomas motores, los enfermos pueden padecer también otros efectos como perturbaciones cognitivas, sensitivas, del humor, del habla y del sueño (Poewe, 2008; Chaudhuri and Schapira, 2009; Gallagher et al., 2010; Massano and Bhatia, 2012). Descrita por primera vez por James Parkinson en 1817, la EP implica una muerte progresiva de las neuronas dopaminérgicas localizadas en la *substantia nigra pars compacta* (SNc) del mesencéfalo ventral (VTA).

Las neuronas dopaminérgicas son un conjunto de neuronas independientes que comparten solamente la capacidad de sintetizar el neurotransmisor dopamina. Anatómica y funcionalmente distintas, estas células se localizan en el sistema nervioso central. Las neuronas dopaminérgicas, fueron por primera vez identificadas y localizadas en el encéfalo, utilizando el método de histofluorescencia Falck-Hillarp, consistente en la visualización de monoaminas fluorescentes tras un tratamiento con formaldehído (Falck et al., 1982). Podemos encontrar neuronas dopaminérgicas en el diencefalo y bulbo olfatorio, aunque el 90 % de ellas se encuentran localizadas en el mesencéfalo (Björklund, 1984). Esta estructura encefálica contiene varias vías neurales como se muestra en la Figura 1.

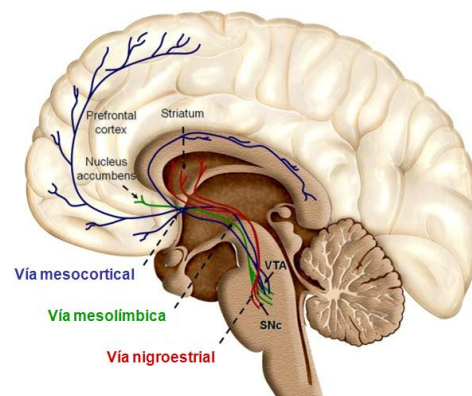


Figura 1. Representación de las vías dopaminérgicas en cerebro humano. Figura adaptada de Chinta y Andersen, 2005.

La vía neural probablemente más estudiada es probablemente la que se identifica con el sistema nigroestriatal. El sistema nigroestriatal se origina en la zona compacta de la *substantia nigra* (SNc) y extiende sus fibras hasta el caudado-putamen (también llamado estriado dorsal). Este sistema se encarga de controlar los movimientos motores voluntarios. Los sistemas mesolímbico y mesocorticales se encuentran igualmente en el mesencéfalo, y son responsables de los comportamientos emocionales. Debido al gran solapamiento de las neuronas dopaminérgicas de estos dos sistemas, habitualmente se refiere a ellos como sistema mesocorticolímbico (Wise, 2004). Estos dos sistemas tienen como punto de inicio común el área tegmental ventral (VTA), aunque difieren en la dirección de sus prolongaciones. Mientras que las células proyectadas hacia el núcleo accumbens y tubérculo olfatorio, y en menor medida hacia el septum, amígdala e hipocampo, pertenecen al sistema mesolímbico, las proyecciones al cortex prefrontal, cíngulo y perirrinal corresponden al sistema dopaminérgico mesocortical. En cuanto a su origen, la mayoría de las neuronas dopaminérgicas se desarrollan a partir de un único grupo de células embrionarias provenientes de la unión mesencéfalo-diencefalo, y se proyectan después a las diferentes secciones del lóbulo frontal.

La sintomatología típica de la EP comienza a ser patente cuando se produce la muerte de más del 50 % de las neuronas dopaminérgicas (Marsden, 1990; Ross et al., 2004) y consecuentemente una reducción superior al 80% de los niveles de dopamina en el estriado (Marsden, 1990; Dauer and Przedborski,

2003). El tratamiento prescrito con mayor frecuencia para la EP es L-Dopa, un precursor natural del metabolismo de la dopamina. Al contrario que la dopamina, la L-Dopa es capaz de traspasar la barrera hematoencefálica, y una vez presente en el encéfalo, será transformada en dopamina para reemplazar la pérdida de dicho neurotransmisor en el mesencéfalo (Cotzias et al., 1967). No obstante, este tratamiento tiene varios efectos secundarios (náuseas, vómitos y alteración de la presión arterial) y a pesar de controlar los síntomas, no acaba con la muerte celular en curso, por lo que finalmente resulta ineficaz una vez se ha producido la pérdida de una parte extensa de las neuronas dopaminérgicas.

Conocer las causas etiológicas de la EP es importante para el diseño de nuevos tratamientos, por lo que muchos grupos de investigación han centrado sus estudios en el origen de esta enfermedad. Se han propuesto varios factores como causantes de la degeneración neuronal en la EP: las toxinas medioambientales, el estrés oxidativo, los factores genéticos y las disfunciones mitocondriales y del proteasoma (Dawson and Dawson, 2003). No obstante, también se postula un posible principio neuro-inflamatorio como origen de la muerte neuronal (Morale et al., 2006). Se ha descrito que una inflamación sistémica provoca la liberación de grandes cantidades de ATP al medio extracelular (Gourine et al., 2007), lo que apunta hacia una posible implicación del ATP y sus receptores purinérgicos como precursores de la neurodegeneración.

2. Señalización purinérgica: ATP y receptores purinérgicos

2.1. Introducción a la señalización purinérgica

Las células, mediante mecanismos complejos, son capaces de sintetizar ATP, un derivado de la base púrica adenosina, muy importante en la biología celular. El ATP se ha considerado la principal molécula del metabolismo energético. Sin embargo, el papel del ATP no se restringe al interior celular, ya que puede también ser liberado al medio extracelular y a través de la estimulación de

receptores específicos participar en procesos biológicos como la contracción muscular, neurotransmisión, secreción exocrina y endocrina, respuesta inmune, inflamación, agregación plaquetaria, dolor y modulación de la función cardíaca (Bodin and Burnstock, 2001).

Las primeras evidencias que indicaban la participación de las purinas como precursores de la señalización celular se remontan al año 1929, cuando Drury y Szent-Gyorgyi mostraron que los compuestos de adenina extraídos de músculo cardíaco de mamíferos producían diversos efectos biológicos como la dilatación arterial o la disminución de la presión sanguínea (Drury and Szent-Gyorgyi, 1929). No fue hasta los años 50 cuando se asociaron los compuestos de adenina con el sistema nervioso. Así, el grupo de Holton describió que el ATP era el responsable de la actividad vasodilatadora tras la estimulación de los nervios sensoriales en el conejo (Holton and Holton, 1953, 1954; Holton, 1959). Una década más tarde, se observaron en el sistema nervioso autónomo, respuestas postsinápticas en presencia de antagonistas colinérgicos y adrenérgicos, lo que sugería la presencia de nervios distintos a los colinérgicos y adrenérgicos (Burnstock et al., 1963, 1964). Burnstock sugirió que dicha respuesta estaba mediada por ATP, y propuso el término “purinérgico” para referirse a esos nervios que sin ser colinérgicos ni adrenérgicos, utilizaban ATP para transmitir una señal (Burnstock, 1972). Aunque inicialmente dichos términos no fueron aceptados fácilmente, la comunidad científica terminó incorporándolos tras las múltiples evidencias que apoyaban esta hipótesis dilucidada en años posteriores.

2.2. Acumulación y liberación de ATP

En células de mamífero en reposo, la concentración de ATP en el citosol oscila entre 3 y 10 mM, mientras que su concentración extracelular es submicromolar (20-100 nM) (Falzoni et al., 2013). Esta diferencia de concentración se mantiene gracias a la escasa permeabilidad de la bicapa lipídica al ATP, y a la presencia en el exterior celular de ectonucleotidasas capaces de hidrolizarlo (Zimmermann, 2000). No obstante, la liberación de escasamente el 0.1 % del

total del ATP intracelular es suficiente para activar los receptores extracelulares, con lo que una mínima liberación del ATP intracelular puede iniciar una señal celular (Gordon, 1986; Ralevic and Burnstock, 1998; Taylor et al., 1998; Schwiebert, 1999; Schwiebert and Kishore, 2001).

En células neuronales y plaquetas, el ATP se libera mediante la exocitosis de gránulos que almacenan este nucleótido en el interior celular. Otros tipos celulares como las células endoteliales, musculares o gliales son igualmente capaces de liberar ATP en respuesta a un estrés mecánico, hipoxia, inflamación o ciertos agonistas como bradicinina, acetilcolina, serotonina, ADP, UTP, carbacol u oxotremorina (Yang et al., 1994; Bodin and Burnstock, 2001; Sui et al., 2014). Sin embargo, el mecanismo utilizado por estas células parece ser independiente de la exocitosis. Existe una gran controversia en cuanto a los detalles de este mecanismo. Mientras unos grupos defienden una liberación de ATP mediada por proteínas transportadoras de la familia ABC (ATP-Binding Cassette) (Abraham et al., 1993; Reisin et al., 1994; Schwiebert et al., 1995), otros proponen la participación de canales iónicos dependientes de voltaje o moléculas como las conexinas (Buettner et al., 2000; Coco et al., 2003; Zhao et al., 2005; Bahima et al., 2006; Eltzschig et al., 2006). Una tercera hipótesis, implica a las panexinas, moléculas que al igual que las conexinas son capaces de formar hemicanales mediante los cuales se facilitaría la externalización del ATP (Barbe et al., 2006; Dahl and Locovei, 2006; Locovei et al., 2006) (Figura 2).

2.3. Metabolismo del ATP extracelular

El mecanismo para la inactivación o disminución de una señal mediada por un estímulo externo, incluye la desensitización o reducción del número de receptores, o la eliminación de dicho estímulo. El ATP liberado al medio extracelular se metaboliza rápidamente mediante la actividad de las ectonucleotidasas, convirtiéndose en ADP, AMP y finalmente en adenosina (Figura 2). Las ectonucleotidasas, son enzimas unidas a la membrana cuyo centro catalítico está orientado hacia el exterior celular. No obstante, existe

también la forma soluble llamada exonucleotidasa. Para su correcta actividad, estas enzimas requieren la presencia de cationes divalentes como Ca^{+2} y Mg^{+2} así como un pH alcalino. Las ectonucleotidasas presentan una gran distribución tisular, y suelen actuar de manera secuencial, lo que permite la formación de moléculas intermediarias capaces de unir otros receptores (Zimmermann, 2000).

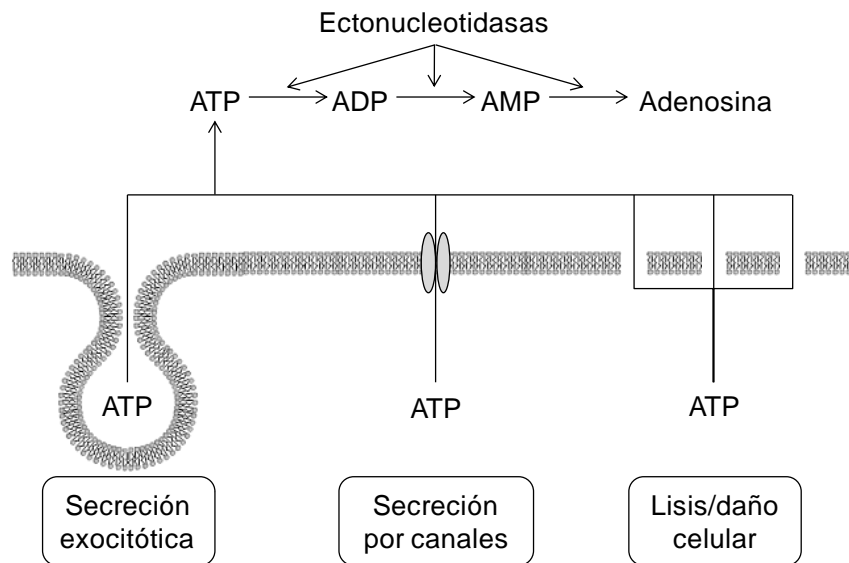


Figura 2. Liberación y metabolismo del ATP.

2.4. Receptores purinérgicos

Las purinas pueden funcionar como iniciadores de una señalización celular en diferentes tejidos y modelos celulares. En cualquier caso, esta señalización estaría mediada por receptores específicos de membrana conocidos como receptores purinérgicos o purinoceptores. En 1978, Burnstock estableció las bases para clasificar estos receptores en dos grandes grupos: receptores P1 y receptores P2.

Los P1 son receptores con siete dominios transmembrana específicos para la unión de adenosina (Figura 3). A este tipo de receptores se les denomina receptores metabotrópicos o receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas (GPCRs), y son capaces de modular la actividad adenilato

ciclasa (AC). Se han clonado cuatro subtipos de receptores P1 (A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3) (Ralevic and Burnstock, 1998).

Los receptores P2 por el contrario, son receptores específicos para nucleótidos di- y trifosfato, cuya estimulación está ligada a la síntesis de prostaglandinas. Estos receptores se dividieron en un principio en los subtipos P2Y y P2X siguiendo sus propiedades farmacológicas (Burnstock and Kennedy, 1985). Posteriormente, aparecieron otros subtipos de receptores P2 (P2T, P2Z, P2U y P2D), cuya respuesta a nucleótidos y agonistas era diferente a la de los P2Y y P2X (Gordon, 1986; O'Connor et al., 1991; Murgia et al., 1993; Pintor and Miras-Portugal, 1995). Sin embargo, en la actualidad, y según recoge el Comité Internacional para la Nomenclatura de los Receptores NC-IUPHAR (International Union of Basic and Clinical Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification), la clasificación de los receptores P2 se realiza en base a sus propiedades moleculares, distinguiendo así la familia de los P2Y como purinoceptores acoplados a proteínas G, y la de los P2X como canales iónicos activados por ligando (Figura 3).

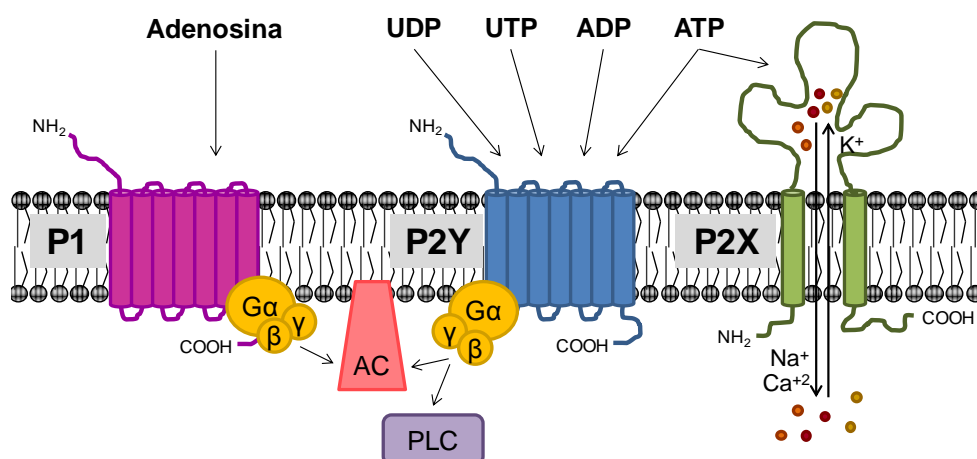


Figura 3. Clases de receptores purinérgicos (P1, P2Y y P2X).

2.4.1. Receptores P2Y

Estos receptores pertenecen a la familia de los receptores asociados a proteínas G (GPCRs), habiéndose clonado y caracterizado hasta el momento ocho subtipos de P2Y: P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ y P2Y₁₄

(Burnstock and Knight, 2004). En un primer momento, se clasificaron otros receptores en este grupo, que después resultaron tener otros ligandos principales, y de ahí los saltos en la numeración de subtipos. En base a su estructura, los P2Y se pueden clasificar en dos subgrupos, uno de los cuales incluye los receptores P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, y el otro los P2Y₁₂, P2Y₁₃ y P2Y₁₄. Similares en tamaño, los receptores P2Y contienen entre 328 (P2Y₆) y 377 (P2Y₄) amino ácidos, con una masa molecular de 41-53 KDa. Siguiendo la estructura típica de los receptores GPCRs, presentan siete dominios transmembrana unidos por tres bucles extracelulares y tres intracelulares. El extremo N-terminal localizado en la región extracelular incluye secuencias de N-glicosilación, esenciales para la transducción de la señal, aunque no para la unión del ligando (Zhong et al., 2004). Las regiones extracelulares también poseen cuatro residuos de cisteína formando dos puentes disulfuro, lo que les da estabilidad a las proteínas (Hoffmann et al., 1999; Ding et al., 2003). Por otro lado, el extremo C-terminal está orientado al citosol, y contiene varios sitios de fosforilación para proteína cinasas C (PKCs).

Durante mucho tiempo se ha creído que los receptores GPCRs actuaban como monómeros. Sin embargo, investigaciones llevadas a cabo en la pasada década mostraron la capacidad de este tipo de receptores para formar homo- o heterodímeros (Bouvier, 2001; Devi, 2001; Javitch, 2004). Dependiendo del tipo de receptor, la unión del ligando puede promover la asociación o la disociación de los monómeros. Este cambio conformacional modifica las propiedades farmacológicas, la señalización y la internalización de receptor (Rocheville et al., 2000).

Desde un punto de vista farmacológico, los receptores P2Y se pueden clasificar en tres grupos: 1) receptores activados por nucleótidos de adenina, los cuales responden principalmente a ADP y ATP (P2Y₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ de roedores y humano y P2Y₁₄ humano); 2) receptores activados por nucleótidos de uracilo, que responden a UDP y UTP (P2Y₄ y P2Y₆); y 3) receptores de especificidad mixta (P2Y₂, de roedores y humanos y P2Y₄ de roedores). Los únicos ligandos capaces de activar el receptor P2Y₁₄ tanto de roedores como humanos son

azúcares activados como el UDP-glucosa, UDP-galactosa, ácido UDP-glucurónico o UDP-N-acetilglucosamina, no pudiéndose activar por ningún otro nucleótido, nucleósido o dinucleótido (Chambers et al., 2000; Freeman et al., 2001).

La estimulación de los receptores P2Y induce la activación de proteínas G heterotriméricas, disociando la subunidad G_{α} del dímero $G_{\beta\gamma}$. Consecuentemente, una fosfolipasa C (PLC) localizada en la membrana podrá activarse provocando un incremento de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y la liberación de Ca^{+2} de los depósitos intracelulares iniciando así la señalización celular que puede tener consecuencias diferentes dependiendo del tipo celular donde se exprese el receptor. Algunos de los subtipos de P2Y regulan también la adenilato ciclasa (Figura 3).

2.4.2. Receptores P2X

Los receptores ionotrópicos P2X son canales iónicos con permeabilidad selectiva para cationes pequeños (Ca^{2+} , Na^{+} y K^{+}), activados por la unión directa del ATP extracelular (North, 2002). Este tipo de receptores presenta una amplia distribución tisular. Además, algunos tejidos expresan varios subtipos de receptores P2X. A pesar de haberse encontrado expresados en el sistema endocrino, plaquetas y células del sistema inmune, los P2X se expresan principalmente en células excitables como las células gliales y neuronas del tejido nervioso o células de músculo liso (Ralevic and Burnstock, 1998; Rubio and Soto, 2001; North, 2002).

Hasta el momento se han clonado siete subtipos de receptores P2X ($P2X_{1-7}$) y se encuentran codificados por siete genes diferentes (Burnstock and Knight, 2004). Sus tamaños oscilan entre los 388 aminoácidos del $P2X_4$ y los 595 aminoácidos del $P2X_7$. Los P2X presentan una homología de secuencia del 30-50%, siendo el $P2X_4$ el más parecido al resto de miembros P2X y el $P2X_7$ el menos. Todos los miembros de esta familia contienen los extremos N- y C-terminales orientados al citosol con dos regiones transmembrana unidas por un

gran bucle extracelular. Este bucle contiene 10 residuos de cisteínas altamente conservadas que, al igual que ocurre en los receptores P2Y, forman puentes disulfuro para darle estabilidad a la proteína. Asimismo, presenta varias secuencias consenso de glicosilación (Asn-X-Ser/Thr), esenciales para la localización de la proteína en la superficie celular. El bucle extracelular, junto con ambas regiones transmembranales media la unión del ligando. Mientras que el extremo N-terminal está bastante conservado, el C-terminal es la región más variable de los receptores, pudiendo ser el responsable de las propiedades específicas de cada P2X (North, 2002; Burnstock and Knight, 2004).

Para actuar como paso de los iones, los receptores P2X han de formar multímeros, necesitándose un mínimo de tres subunidades (Egan and Khakh, 2004). Dependiendo de las subunidades se formarán homó- o heterómeros. Se han establecido heterómeros para los receptores P2X_{1/2}, P2X_{1/3}, P2X_{1/4}, P2X_{1/5}, P2X_{1/6}, P2X_{2/3}, P2X_{2/5}, P2X_{2/6}, P2X_{3/5}, P2X_{4/5}, P2X_{4/6}, P2X_{4/7}, y P2X_{5/6}, y homómeros funcionales para todos los P2X a excepción del P2X₆ (Saul et al., 2013).

Como agonistas de los receptores P2X se utilizan comúnmente análogos de nucleótidos tales como 2-MeSATP, polifosfatos de diadenosina y trifosfatos de otros nucleótidos. No obstante, los agonistas ATPγS y αβ-meATP son más útiles para experimentos con tejidos nativos ya que son metabólicamente más estables (Saul et al., 2013) (Figura 4).

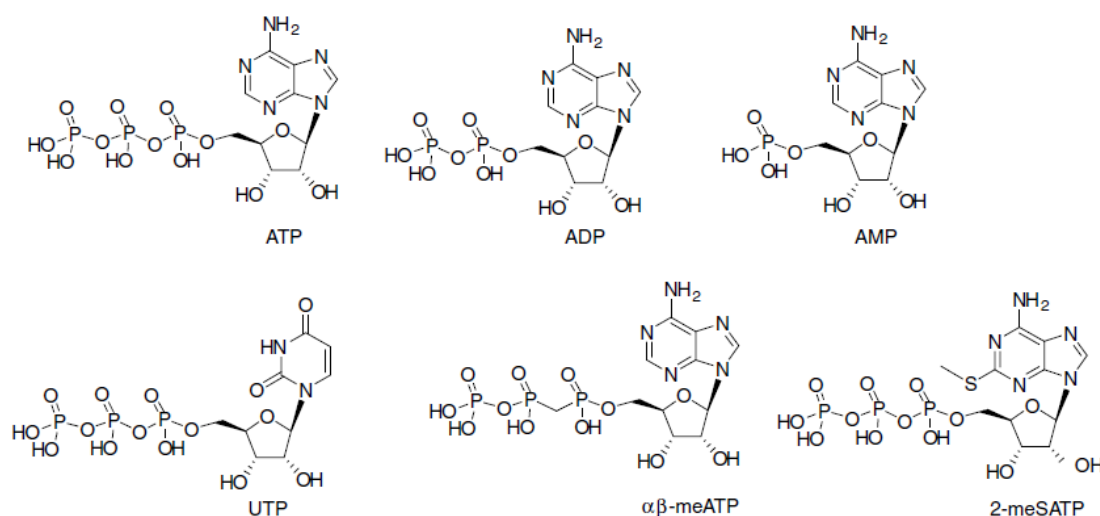


Figura 4. Estructura de los agonistas más comunes para los receptores P2X. Figura adaptada de Donnelly-Roberts y Jarvis, 2007.

El compuesto de naftilurea suramina y el derivado de piridoxalfosfato PPADS (Figura 5), son los primeros antagonistas conocidos para los P2X y aún los más utilizados. Debido a la inespecificidad de la suramina, capaz de inhibir también otros receptores purinérgicos y proteínas G, se han desarrollado unos derivados de suramina con funciones más específicas conocidos como compuestos NF. Así, el compuesto NF449 por ejemplo es selectivo para el receptor P2X₁, mientras que el NF770 lo es para el P2X₂. El PPADS es también un compuesto más específico para los receptores P2X que la suramina, pero actúa de manera no-competitiva. Para solventar ese problema se han desarrollado compuestos derivados del piridoxalfosfato denominados MRS. El MRS2220 es selectivo para el P2X₁, el MRS2257 para el P2X₁ y P2X₃ y el MRS2159 lo es para el P2X₁, P2X₃ y P2X₇. En los últimos 20 años se han hecho grandes esfuerzos para lograr antagonistas no nucleotídicos y específicos, sobre todo para los receptores P2X₃ y P2X₇, ya que entre los receptores P2X, estos dos han surgido como las dianas farmacológicas más relevantes. Actualmente, se dispone en el mercado de antagonistas como el RO-51, RO-3, TC-P262, AF353 (RO-4) y A-317491, selectivos para el P2X₃ y P2X_{2/3} y el A-438079, A-740003, A-804598, A-839977, AZ 11645373 y AZ 10606120 (Figura 5), específicos para el receptor P2X₇ (Saul et al., 2013). No obstante, no han de olvidarse las especificidades de especie, sobre todo en el

caso del P2X₇. El KN62 y BBG por ejemplo (Figura 5), son antagonistas ampliamente utilizados, que sin embargo presentan una especificidad única para el P2X₇ humano y rata respectivamente (Donnelly-Roberts et al., 2009).

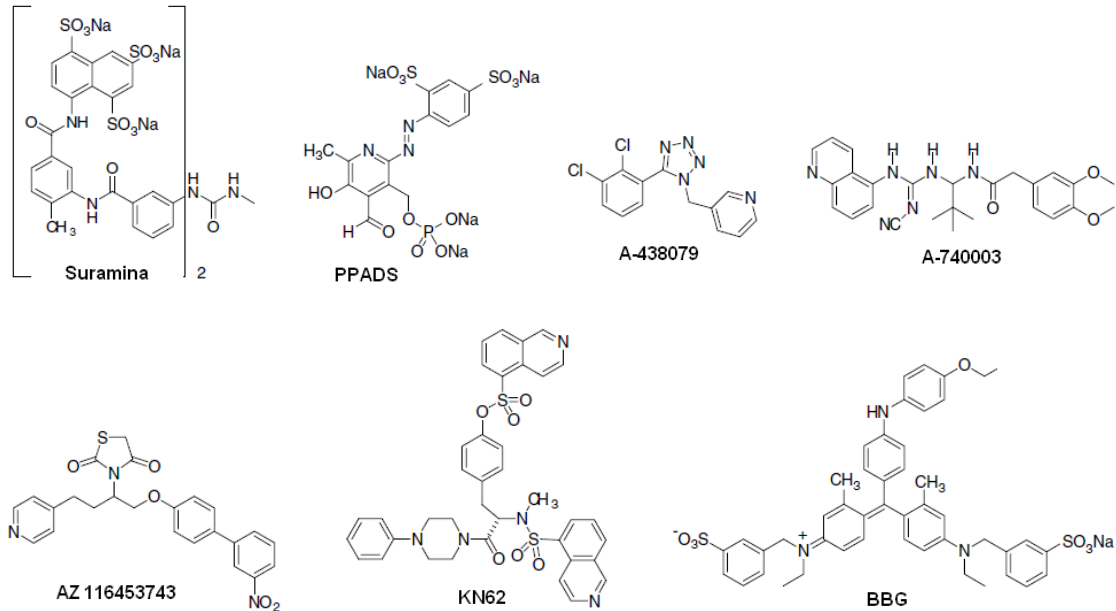


Figura 5. Estructura de los antagonistas más comunes para los receptores P2X. Figura adaptada de Donnelly-Roberts y Jarvis, 2007.

Gracias a su función como canales iónicos, la estimulación de los receptores P2X promueve un incremento de los niveles de calcio intracelulares, así como la despolarización de la membrana plasmática. Esta despolarización puede a su vez regular otros conductos dependientes de voltaje como los canales de calcio dependientes de voltaje (VGCCs). Debido a su función como segundo mensajero, la entrada de calcio a través de los P2X y/o VGCCs puede activar otras vías en el citosol, amplificando así la señal procedente del exterior celular. La estimulación de estos receptores provoca una respuesta más rápida que la de los P2Y, pudiendo actuar en milisegundos, ya que no requiere la producción ni difusión de mensajeros secundarios. Esta rapidez de respuesta les confiere un papel importante en la transmisión neuronal y contracción muscular (North, 2002).

2.4.2.1. Receptor P2X₇

El receptor P2X₇ es uno de los siete subtipos de receptores P2X, con características únicas en su grupo. Este receptor se expresa en una gran variedad de linajes celulares como neuronas, glía, macrófagos, linfocitos, células dendríticas, fibroblastos y células endoteliales (Adinolfi et al., 2005). Estudios realizados en 1979 ya indicaban que el ATP extracelular era capaz de inducir cambios morfológicos en células del sistema inmune (Cockcroft and Gomperts, 1979). Un año más tarde, los mismos autores sugerían que dichos efectos estaban mediados por la activación de un receptor al que entonces lo denominaron “receptor de ATP” (Cockcroft and Gomperts, 1980). Ese mismo receptor, que posteriormente se demostró que causaba una permeabilización reversible de la membrana plasmática, se denominó también “receptor de ATP permeable” y más adelante P2Z (Gordon, 1986). No fue hasta el año 1996, que tras llegar a clonarse, se denominó P2X₇ debido a su gran similitud con el resto de receptores P2X (Surprenant et al., 1996).

Cuando se expone este receptor a concentraciones milimolares de ATP en su forma disociada (ATP⁴⁻), el P2X₇ abre en cuestión de milisegundos un canal permeable a pequeños cationes (Ca²⁺, Na⁺, K⁺) (Figura 6) (North, 2002). No obstante, una exposición repetida o prolongada, provoca la formación de un poro no selectivo permeable a moléculas de hasta 900 Da (Figura 6) siendo para ello esencial el extremo C-terminal del receptor, considerablemente más largo que el de los otros receptores P2X (Surprenant et al., 1996; Rassendren et al., 1997; Hu et al., 1998). La formación de este poro requiere la señalización corriente abajo inducida por el P2X₇, y la participación del 95 % del extremo C-terminal, mientras que una pequeña porción de esta cola es suficiente para su actividad como canal iónico (Smart et al., 2003; Donnelly-Roberts et al., 2004; Faria et al., 2005).

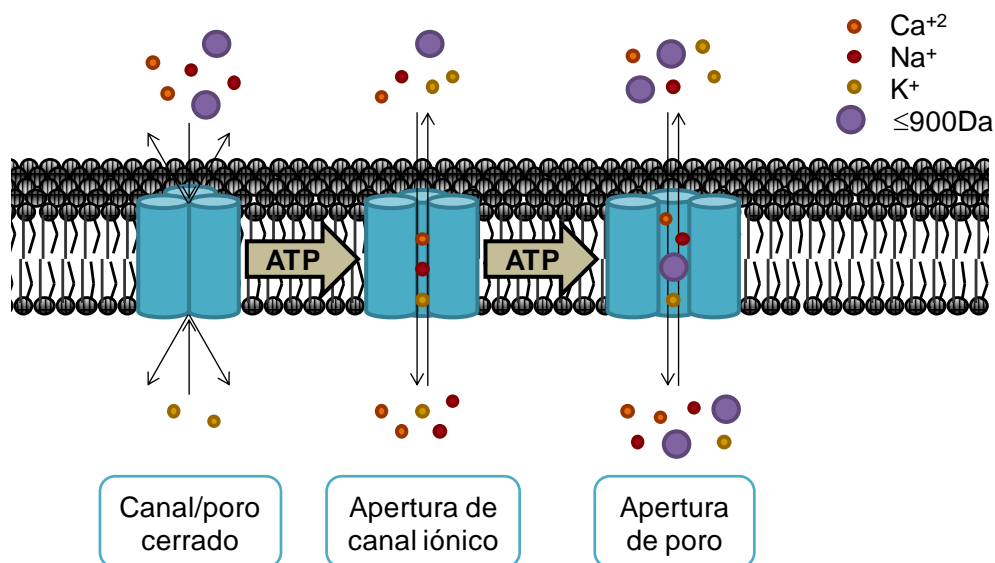


Figura 6. Formación del canal iónico y poro del receptor P2X₇. Paso de iones a través del canal y moléculas grandes a través del poro formado por el P2X₇.

Una de las funciones más conocidas de este receptor es su papel en la respuesta inmune. Se sabe que la estimulación del receptor P2X₇ provoca la liberación de citocinas inflamatorias tales como la IL-1 β , IL-6 and TNF- α (Suzuki et al., 2004). La secreción de estos factores pro-inflamatorios surge como resultado de toda una cadena de reacciones que ocurren en la estructura multimolecular llamada inflamasoma (Martinon et al., 2002). Estas moléculas liberadas promueven la activación microglial, la cual media la apoptosis de las neuronas afectadas debido a que secretan factores tóxicos como el NO y posteriormente fagocitan los restos celulares (Hanisch and Kettenmann, 2007; Ransohoff and Perry, 2009; Kettenmann et al., 2011).

A pesar de su importante papel en la respuesta inmune, dependiendo del tipo celular, el receptor P2X₇ puede actuar como inductor de muchas otras vías de señalización tales como la activación de las fosfolipasas A₂ (PLA₂) y D (PLD), cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y el factor nuclear κ B (NF κ B) (North, 2002).

En 2001, el grupo de Suprenant descubrió que el receptor P2X₇ interactuaba con un complejo proteico constituido por 11 componentes: la proteína de la

matriz extracelular laminina $\alpha 3$, las proteínas membranales integrina $\beta 2$ y el receptor tirosina fosfatasa β (PTPR β), y las proteínas intracelulares α -actinina 4, β -actina, supervilina, las proteínas de choque térmico Hsp90, Hsc71 y Hsp70, la fosfatidilinositol 4-hidroxikinasa (PI4K), y la proteína asociada a membrana guanilato cinasa P55 (MAGUK) (Kim et al., 2001). Estas interacciones podrían permitir al receptor P2X₇ actuar como conector entre el medio extracelular, el citoesqueleto y las vías de señalización intracelulares. Además, dos de las once proteínas citadas, la PTPR β y Hsp90 se han propuesto como moduladoras funcionales del receptor P2X₇ (Kim et al., 2001; Adinolfi et al., 2003).

2.4.2.1.1. PTPR β : una fosfatasa del SNC asociada al receptor P2X₇

La PTPR β es una tirosina fosfatasa cuya expresión está restringida al sistema nervioso central (Levy et al., 1993; Foehr et al., 2006), y su función es la de regular el estado de fosforilación de sus proteínas efectoras: β -catenina (Meng et al., 2000), β -aducina (Pariser et al., 2005b; Pariser et al., 2005c), Fyn (Pariser et al., 2005a), las subunidades α y β de canales de sodio (Ratcliffe et al., 2000), GIT1/Cat1 (Kawachi et al., 2001) y p190 RhoGAP (Tamura et al., 2006). Además, se ha observado que la PTPR β actúa también sobre el receptor purinérgico P2X₇ (Kim et al., 2001). La PTPR β es capaz de regular la supervivencia de neuronas dopaminérgicas así como la proliferación y diferenciación de sus progenitoras (Herradon and Ezquerro, 2009).

Esta fosfatasa presenta tres isoformas generadas por *splicing* alternativo: la isoforma transmembrana corta, la transmembrana larga y la isoforma secretada (Figura 7). Todas ellas contienen una región N-terminal extracelular con una alta similitud a la enzima anhidrasa carbónica (CAH), seguida de repeticiones de fibronectina de tipo III (FNIII) y una posterior región separadora libre de cisteínas. La isoforma transmembrana larga y la secretada presentan además en su región extracelular, un inserto de 860 aminoácidos que contiene cadenas de glicosaminoglicanos. Finalmente, las isoformas transmembranales conectan su región extracelular con dos dominios tirosina fosfatasa C-terminales

ubicados en el citoplasma celular (Krueger and Saito, 1992; Barnea et al., 1993; Levy et al., 1993; Maurel et al., 1994; Sakurai et al., 1996). La expresión de las isoformas transmembranales se concentra en las zonas del SNC en desarrollo, mientras que la isoforma secretada es ubicua en el cerebro. Esto sugiere que las células que producen una mayor cantidad de la isoforma secretada son las células más maduras que han emigrado del neuroepitelio (Canoll et al., 1993).

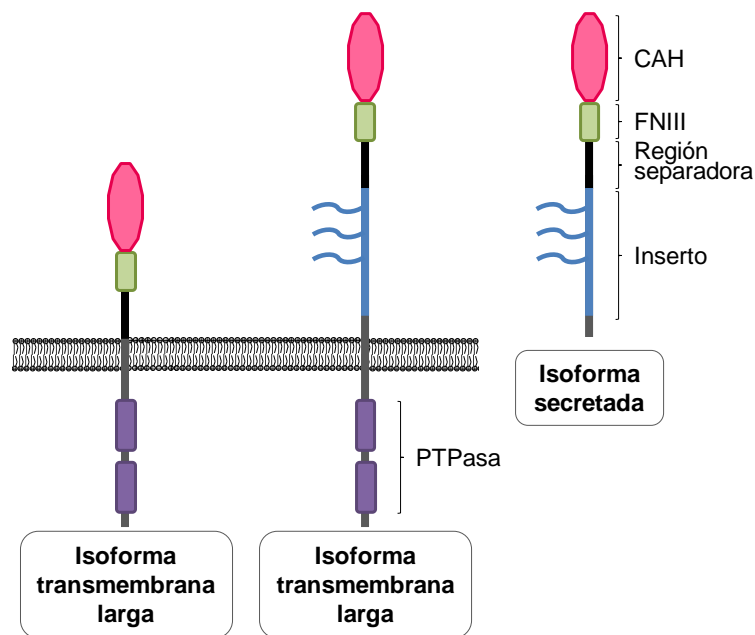


Figura 7. Isoformas de la fosfatasa PTPRβ. Las tres isoformas contienen una región anhidrasa carbónica (CAH), repeticiones de fibronectina de tipo III (FNIII) y una región separadora. La isoforma larga y la secretada contienen además un inserto con glicosaminoglicanos y ambas isoformas transmembranales poseen dominios tirosina fosfatasa (PTPasa) en su región citosólica.

La PTPRβ a nivel intracelular es capaz de asociarse a proteínas con dominios PDZ (Adamsky et al., 2003). Las proteínas con dominios PDZ han sido consideradas elementos clave en la organización de complejos proteicos en la membrana plasmática (Fanning and Anderson, 1999). Estas proteínas ejercen funciones dispares como pueden ser la localización de proteínas en la *zonula occludens* (Gonzalez-Mariscal et al., 2000), agrupación de receptores transmembranales (Sheng and Pak, 2000) y reclutamiento de proteínas citosólicas para generar complejos de señalización celular (Scott and Zuker, 1998). Muchas de estas proteínas se han encontrado como elementos de un

complejo multiprotéico. La familia de las cinasas MAGUK (membrane-associated-guanylate kinase) son proteínas de andamiaje que contienen varios dominios PDZ, además de dominios SH3 y un dominio guanilato cinasa inactivo. Todos estos dominios confieren una propiedad de interacción proteína-proteína que permiten a las proteínas MAGUK reclutar proteínas de señalización y controlar el ensamblaje de complejos multiprotéicos (Nix et al., 2000; Harris and Lim, 2001; McGee et al., 2001). Así, las proteínas MAGUK son capaces de aproximar a la PTPR β sus proteínas efectoras, tal y como lo hace MAGI-3. MAGI-3 es una proteína MAGUK asociada a la PTPR β que, sin ella verse afectada en cuanto a fosforilación se refiere, presenta a la fosfatasa PTPR β una proteína para que la defosforile (Adamsky et al., 2003). Las proteínas MAGUK también podrían estar actuando como conectoras entre la PTPR β y el receptor P2X₇, ya que estas tres proteínas han sido identificadas como miembros del mismo complejo proteico (Kim et al., 2001).

En cuanto a su región extracelular, se ha descrito la unión de varias proteínas a las diferentes regiones de la PTPR β . Así, se conoce la interacción de proteínas implicadas en la adhesión celular, como pueden ser la contactina o diferentes CAMs (cell adhesion molecules), con el dominio CAH de la PTPR β (Milev et al., 1994; Sakurai et al., 1996; Peles et al., 1998). También se ha descrito la unión de la proteína tenascina-C, implicada en adhesión además de migración y proliferación celular, a la región FNIII de la fosfatasa (Barnea et al., 1994; Grumet et al., 1994; Adamsky et al., 2001). Las citocinas pleiotropina (PTN) y midkina (MK) interactúan con los glicosaminoglicanos de la PTPR β (Figura 7, región I) (Maeda et al., 1996; Maeda et al., 1999; Meng et al., 2000).

PTN y MK son los dos únicos miembros de la familia de las midquinas (Kadomatsu and Muramatsu, 2004), cuya expresión aunque constitutiva, es mayor en las fases embrionarias, estando en células adultas limitada a neuronas y células gliales en desarrollo (Silos-Santiago et al., 1996).

La PTN y la MK comparten varios receptores, entre los que se encuentra la fosfatasa PTPR β . Se sabe que la PTN induce un cambio conformacional en la

PTPR β que provoca su dimerización. Este cambio incapacita la unión de la fosfatasa a su sustrato y por tanto, la imposibilidad de defosforilarlo (Meng et al., 2000; Fukada et al., 2006). Diversos estudios apoyan la redundancia tanto estructural como funcional de la PTN y la MK (Kadomatsu et al., 2013), lo que sugiere un posible mecanismo de acción de MK sobre la PTPR β similar al descrito para PTN.

Otra proteína regulada por PTN/MK es la cinasa del linfoma anaplásico (Anaplastic Lymphoma Kinase, ALK), aunque su mecanismo de regulación es aún controvertido. Algunos autores postulan que PTN es capaz de regular la actividad de ALK únicamente mediante la inhibición de la PTPR β (Moog-Lutz et al., 2005; Mathivet et al., 2007; Perez-Pinera et al., 2007; Deuel, 2013), mientras que otros defienden que las midquinas son además capaces de activar ALK mediante una interacción directa (Stoica et al., 2001; Bowden et al., 2002; Powers et al., 2002; Stoica et al., 2002; Wellstein, 2012; Herradon and Perez-Garcia, 2014).

A nivel funcional, es ampliamente conocido el papel que desempeñan la PTN y la MK en el crecimiento (Kadomatsu et al., 1988; Dugas et al., 2008; Muramatsu, 2010), diferenciación (Kadomatsu et al., 1988; Jung et al., 2004; Ishikawa et al., 2009; Luo et al., 2012) y supervivencia neuronal (Kadomatsu et al., 1988; Kikuchi et al., 1993; Gramage et al., 2008; Prediger et al., 2011), viéndose además sobreexpresados en las zonas de daño y reparación neuronal (Mi et al., 2007; Ishikawa et al., 2009; Jin et al., 2009; Muramatsu, 2010; Martin et al., 2011). Debido a la reproducción de algunas de estas funciones en neuronas dopaminérgicas, las citocinas PTN y MK han sido relacionadas y estudiadas como proteínas implicadas en la enfermedad de Parkinson (EP). Se ha sugerido una función reparadora del daño para la PTN, tras haber observado altos niveles de dicha citocina en la *substantia nigra* de pacientes y modelos animales de EP tratados con L-Dopa (Ferrario et al., 2004; Marchionini et al., 2007). Una disminución en la expresión de PTN y/o MK conlleva una pérdida de neuronas dopaminérgicas y consecuentemente, una reducción en la síntesis de dopamina (Jung et al., 2004; Prediger et al., 2011).

Se ha documentado que bajos niveles de expresión de PTN y/o MK acarrearán déficits tanto olfativos como de memoria, aunque sin implicar graves efectos en las funciones motoras, coincidiendo con los síntomas de la EP en sus estadios más tempranos (Prediger et al., 2011; Herradon and Perez-Garcia, 2014). Estas citocinas surgen como posibles tratamientos para la EP ya que, estudios realizados en los últimos años, revelan que la sobreexpresión de PTN hasta alcanzar los niveles de expresión presentes durante el desarrollo, favorecen la neuroprotección en modelos neurotóxicos de la EP (Taravini et al., 2011; Gombash et al., 2012).

2.5. Señalización purinérgica y GTPasas de la superfamilia Ras

Los receptores purinérgicos son proteínas integrales de membrana que funcionan como enlace entre el exterior y el interior celular. Así, la estimulación extracelular de estos receptores provoca la activación de diversos intermediarios moleculares y rutas de señalización. Por ejemplo, los receptores purinérgicos P2X₃ y P2Y₁ son capaces de incrementar la concentración de calcio intracelular y activar las proteínas cinasas C (PKCs) para mediar en la activación de la GTPasa Ras (Sellers et al., 2001; Choi et al., 2003; Chen et al., 2012). El receptor P2X₇ también es capaz de inducir la activación de Ras tanto en macrófagos RAW 264.7 (Aga et al., 2004; Skaper et al., 2009) como en microglía (Friedle et al., 2011).

3. GTPasas de la superfamilia Ras

3.1. Introducción a las pequeñas GTPasas

Las pequeñas GTPasas o proteínas G monoméricas, tienen un peso molecular comprendido entre 20 y 40 KDa. Presentan actividad hidrolasa intrínseca que junto con sus moléculas reguladoras y efectoras participan como elementos de control esenciales en las rutas de señalización que regulan la fisiología celular. Debido a su importancia en la señalización celular, queremos a continuación

dedicar un apartado a estas GTPasas para describir sus características así como su regulación.

La investigación sobre estas proteínas se inició en 1964, cuando Harvey observó que un virus preparado a partir de sarcoma murino producía una rápida formación de tumores en rata (Harvey, 1964). El oncogén viral responsable de este efecto se denominó Harvey *ras*, de *rat sarcoma*, también conocido como H-*ras*. Este oncogén resultó ser una versión alterada del gen que codificaba enzimas con capacidad intrínseca de unión a nucleótidos y actividad GTPasa (Scolnick et al., 1979; Gibbs et al., 1984). Posteriormente, se identificaron otros tres retrovirus que contenían los oncogenes *ras*: el virus de sarcoma murino (MSV) Kirsten, MSV-BALB y MSV-Rasheed (Kirsten and Mayer, 1967; Peters et al., 1974; Rasheed et al., 1978). Los estudios alrededor de estas GTPasas continuaron, y una década más tarde ya se conocían entre 40 y 50 proteínas similares a Ras, las cuales controlaban diferentes aspectos del crecimiento y comportamiento celular (Boguski and McCormick, 1993). Actualmente, existen más de 150 proteínas humanas pertenecientes a esta superfamilia (Wennerberg et al., 2005), con ortólogos evolutivamente conservados en *Drosophila*, *C. elegans*, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *Dictyostelium* y plantas (Colicelli, 2004).

Los miembros de la superfamilia Ras se clasifican, en base a su analogía de secuencia y función, en cinco grandes familias: Ras, Rho, Rab, Arf y Ran (Figura 8). Cada una de estas familias está especializada en la regulación de una o varias funciones: **Ras** está implicada en el crecimiento, metabolismo y proliferación celular; **Rho** en el citoesqueleto, y coopera con la familia Ras en la regulación del ciclo celular y la expresión génica, así como en procesos de transformación; **Rab** está especializada en el tráfico vesicular y de membrana; **Arf** participa en la biogénesis vesicular, transporte intracelular y remodelación de la actina; y finalmente la familia **Ran** regula el transporte nucleocitoplasmático durante las fases G1, S y G2 del ciclo celular y la organización de los microtúbulos durante la fase de mitosis (Wennerberg et al., 2005) (Figura 8).

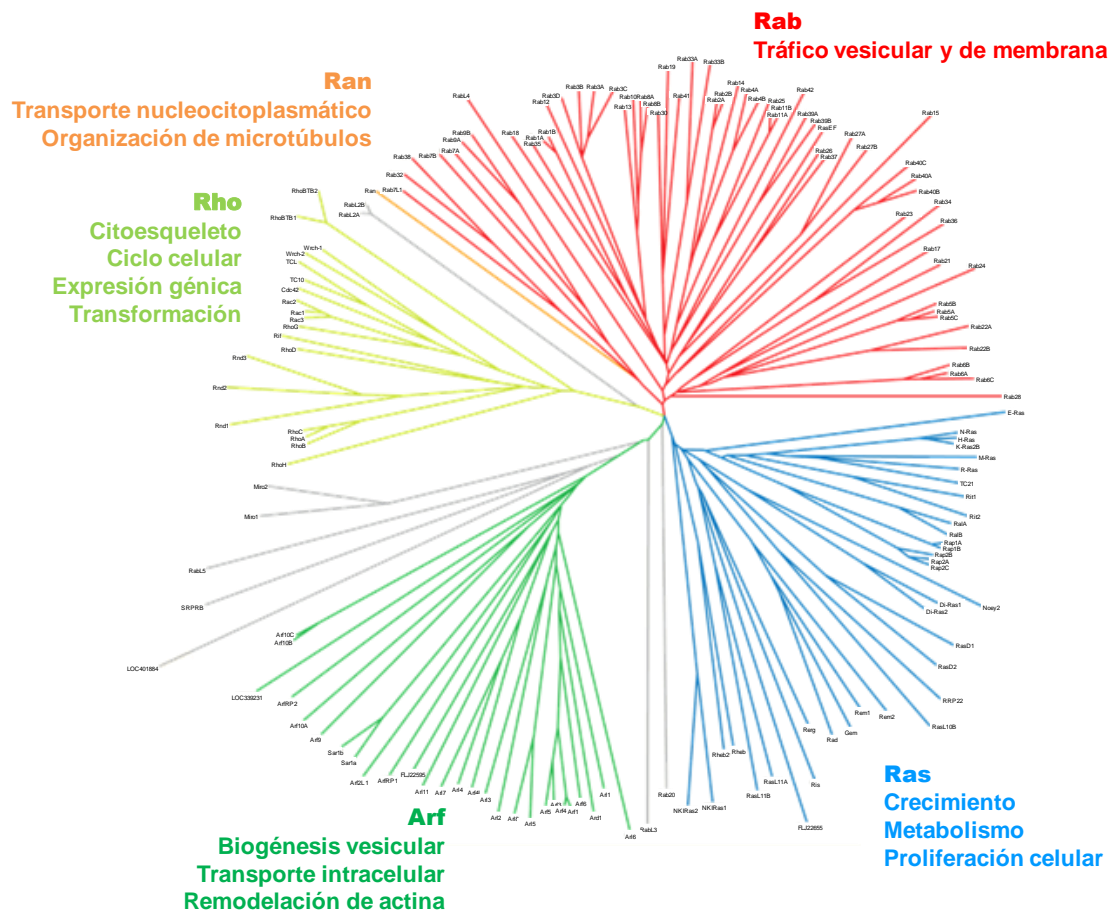


Figura 8. Clasificación y funciones de las GTPasas de la superfamilia Ras. Figura adaptada de Wennerberg *et al.*, 2005.

3.2. Estructura y regulación

Las pequeñas GTPasas actúan como interruptores moleculares regulados por su unión a GDP/GTP. Para ello, todos los miembros de este grupo contienen un conjunto de cajas G conservadas: caja G1, GXXXXGKS/T; caja G2, T; caja G3, DXXGQ/H/T; caja G4, T/NKXD; y caja G5, C/SAK/L/T. Estas cajas poseen motivos de unión a GDP/GTP que en su conjunto conforman un dominio G de aproximadamente 20 KDa (Figura 9), también presentes en otras GTPasas como la subunidad Gα (Bourne *et al.*, 1991).

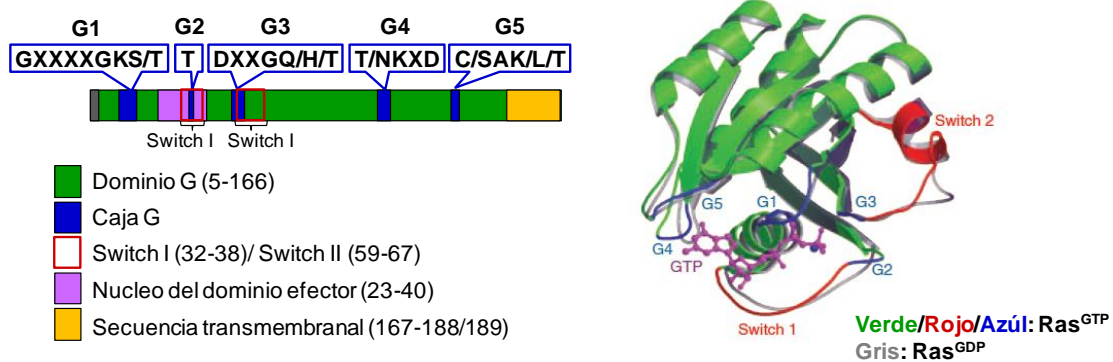


Figura 9. Dominios funcionales y estructura tridimensional de las GTPasas.

La actividad de las GTPasas depende de su estado de unión a las moléculas GDP o GTP. En su conformación unida a GDP, la proteína es inactiva e incapaz de transmitir ninguna señal a sus moléculas efectoras. Para su activación, las GTPasas requieren de un intercambio del GDP por GTP, que a su vez provocará una pequeña modificación conformacional en las regiones llamadas *switch I* y *switch II* de la proteína (Figura 9) (Herrmann, 2003). Esta nueva conformación confiere a la GTPasa una mayor afinidad por sus moléculas efectoras (Bishop and Hall, 2000; Repasky et al., 2004). Sin embargo, para que se de la unión de la GTPasa a su proteína efectora, ha de haber también un acercamiento físico entre ellas. Aunque existen algunas excepciones (Rit, RhoBTB, Miro, Sar1, Ran y Rerg), la gran mayoría de las GTPasas sufren modificaciones post-transduccionales (farnesilaciones, geranilgeranilaciones y palmitoilaciones) en su extremo C-terminal que permiten su anclaje en la membrana plasmática, donde actúan sobre sus proteínas efectoras, conduciendo así la transmisión de la señal corriente abajo (Magee et al., 1992; Glomset and Farnsworth, 1994; Casey and Seabra, 1996).

No obstante, el ciclo de activación/desactivación de las GTPasas requiere de la acción de proteínas reguladoras (Figura 10). Estas proteínas son capaces de discernir el estado de activación de las GTPasas mediante el reconocimiento de la configuración de las regiones *switch I* y *switch II*. Así, los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina o GEFs reconocen y actúan sobre la GTPasas inactivas promoviendo el cambio de GDP por GTP, mientras que las proteínas activadoras de las GTPasas o GAPs, tras reconocer el estado

activo de las GTPasas, se asocian a ellas induciendo la actividad GTPasa intrínseca de las mismas, lo que produce su regreso al estado unido a GDP o inactivo (Bos et al., 2007). Existe además un tercer grupo de proteínas reguladoras para algunas GTPasas, llamadas proteínas inhibidoras de la disociación de nucleótidos de guanina o GDIs. Estos reguladores se unen a las modificaciones post-transduccionales de las GTPasas secuestrándolas en el citosol. Mediante este mecanismo, las GDIs evitan por un lado el anclaje de las GTPasas a la membrana y su unión a los efectores, y por otro la unión de GEFs activadores a las GTPasas. (Colicelli, 2004; Cherfils and Zeghouf, 2013). Las proteínas reguladoras, además de ser componentes esenciales para la activación/desactivación de las GTPasas, son protagonistas de las respuestas específicas de señales, ya que cada regulador está a su vez controlado por distintos elementos corriente arriba.

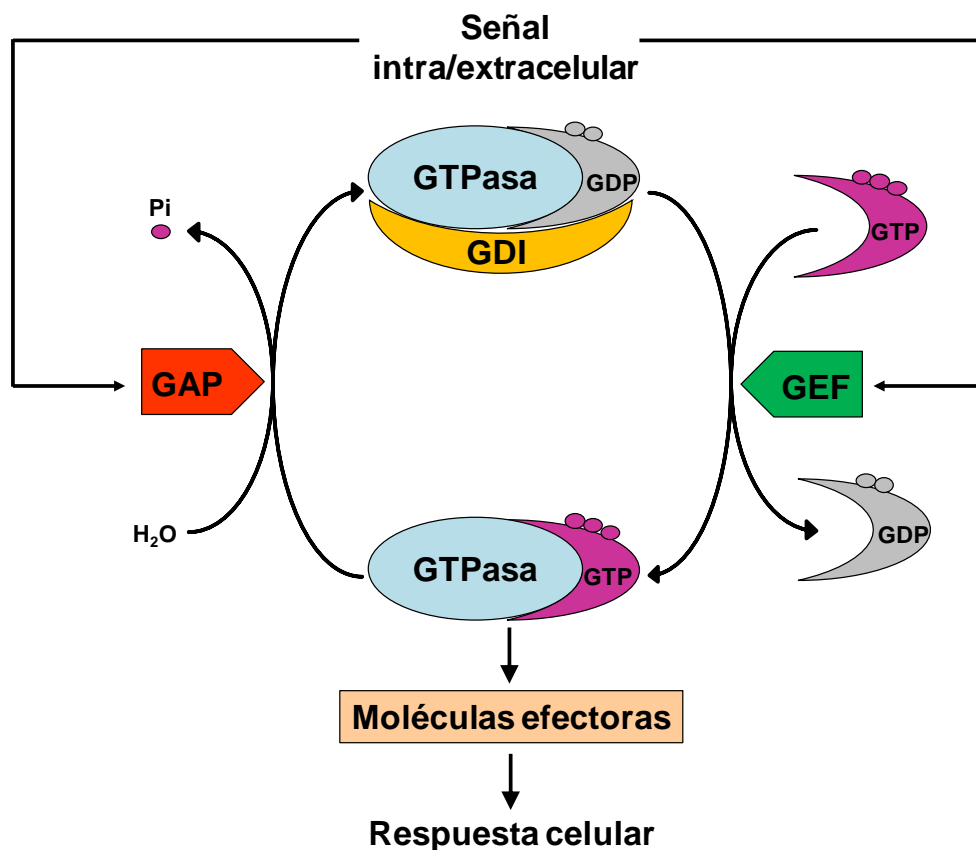


Figura 10. Ciclo de activación/desactivación de las GTPasas.

3.3. Familia Ras

El nombre de esta familia procede de los miembros fundadores de la misma, las oncoproteínas del sarcoma de rata (rat sarcoma). Debido al importante papel de estas GTPasas en la oncogénesis humana, existen multitud de proyectos científicos centrados en el estudio de las proteínas Ras. Sin embargo, la señalización celular de Ras es un campo de difícil estudio, ya que estas proteínas se activan en respuesta a diversos estímulos extracelulares, y tras activarse, se asocian a múltiples efectores catalíticamente muy diversos, promoviendo así una gran variedad de respuestas celulares. Los miembros de esta familia son responsables de varias rutas de señalización que finalmente controlan la expresión génica, regulando procesos como la proliferación, diferenciación y supervivencia celular.

Además de las cuatro proteínas Ras (H-Ras, N-Ras, K-Ras4A y K-Ras4B), esta familia incluye otros miembros como son las proteínas R-Ras (R-Ras, R-Ras2/TC21, R-Ras3/M-Ras), Ral (Ral-A y Ral-B), Rap (Rap1A, Rap1B, Rap2A y Rap2B), Rheb, Rin y Rit.

La vía de señalización de Ras mejor caracterizada es aquella promovida por el factor de crecimiento epidérmico (epidermal growth factor, EGF). Tras unirse a su receptor, se promueve la dimerización y autofosforilación en residuos tirosina citoplasmáticos de éste. Esta fosforilación sirve como sitio de unión para la proteína adaptadora Grb2, que a su vez interacciona con el GEF SOS. La unión Grb2-SOS induce el reclutamiento de este GEF en la membrana, donde actuará como activador de Ras (Boguski and McCormick, 1993; Li et al., 1993). Una vez activada, Ras se asocia a su proteína efectora Raf, promoviendo su translocación hacia la membrana plasmática. Allí, se dan procesos adicionales de fosforilación de Raf que permiten su total activación. Una vez activada, Raf promueve la activación por fosforilación de la cinasa de especificidad dual MEK1/2, que a su vez induce la fosforilación y activación de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (mitogen-activated protein kinases, MAPK) ERK1/2. Estas MAPKs activadas se translocan al núcleo,

dónde fosforilan ciertos factores de transcripción, induciendo cambios en la expresión génica (Chong et al., 2003). A esta vía de señalización se la presenta habitualmente como la ruta simple y lineal que enlaza la señalización en la superficie celular con el núcleo. Sin embargo, la realidad incluye una gran variedad de proteínas adaptadoras y moduladoras que hacen que la conexión del exterior e interior celular esté regida por mecanismos mucho más complejos.

Debido a su gran homología de secuencia, junto con su capacidad compartida de transformación y activación de la cascada de ERK, se creyó en un principio, que las cuatro proteínas Ras (H-Ras, N-Ras, K-Ras4A y K-Ras4B) cumplían las mismas funciones en la regulación de la fisiología celular. Sin embargo, según se avanzaba en el estudio de estas GTPasas, se fueron descubriendo diferencias que sugerían funciones no redundantes de estas proteínas Ras. Actualmente, se sabe por ejemplo, que K-Ras pero no H-Ras ni N-Ras, es necesaria en el desarrollo murino (Umanoff et al., 1995; Johnson et al., 1997).

Como se ha mencionado anteriormente, la modificación post-transduccional es un proceso esencial en la activación de las GTPasas. En el caso de las proteínas Ras, estas modificaciones consisten en la farnesilación del motivo C-terminal CAAX (donde A es un amino ácido alifático y X es metionina o serina), posterior proteólisis del AAX y carboximetilación final (Dai et al., 1998; Romano et al., 1998; Schmidt et al., 1998; Reuther and Der, 2000; Hancock, 2003). No obstante, existen diferencias en las modificaciones post-transduccionales de los distintos miembros de la familia Ras, ya que los inhibidores de la farnesilación afectan a H-Ras pero no a N-Ras ni K-Ras (Cox and Der, 1997; Oliff, 1999; Appels et al., 2005). Además, se ha observado que H-Ras, N-Ras y K-Ras4A atraviesan el aparato de Golgi y se palmitoilan antes de anclarse en la membrana, mientras que K-Ras4B se transporta directamente del retículo endoplasmático a la membrana sin pasar por el Golgi, y será su secuencia C-terminal rica en prolinas en lugar de la palmitoilación, la que actuará como señal de inicio de la proteólisis (Hancock et al., 1990; Choy et al., 1999; Hancock, 2003). Las diferencias de secuencia del extremo C-terminal también

confieren a las proteínas una variabilidad en la localización en la membrana, asociándolas a diferentes áreas de la misma (Roy et al., 1999; Hancock, 2003), lo que permite la especificidad de cada isoforma de Ras con sus proteínas efectoras. Así, se ha observado que K-Ras recluta a Raf y la activa de manera más eficiente que H-Ras, mientras que ésta es mejor activadora de la fosfatidil inositol 3-hidroxikinasa (PI3K) que la primera (Yan et al., 1998; Rajalingam et al., 2007).

Una de las subfamilias dentro de la familia Ras con mayor asociación a las proteínas Ras clásicas (H-Ras, N-Ras, K-Ras4A y K-Ras4B) es la subfamilia Rap. Su miembro más destacado, Rap1, se aisló en 1989 como una proteína análoga a Ras (Kitayama et al., 1989). Existe una estrecha relación entre Rap1 y las proteínas Ras. Ambas GTPasas comparten la serin treonin cinasa Raf como efectora, y se ha propuesto una función antagónica de Rap1 sobre Ras por competición en la unión a sus moléculas efectoras (Kitayama et al., 1989; Bos, 1998). No obstante, existen algunas diferencias entre ellas. Mientras Ras se ubica principalmente en la membrana plasmática, Rap1 está habitualmente localizada en membranas intracelulares de orgánulos como Golgi, vesículas endocíticas, y lisosomas (Pizon et al., 1994; de Rooij et al., 1999; Bivona et al., 2004). Además, existen proteínas efectoras como Krit1, capaces de unirse estrechamente a Rap1 pero no a Ras (Serebriiskii et al., 1997). Esta especificidad de efectores y localización intracelular, junto con la existencia de una gran variedad de estímulos activadores de Rap1, hacen que esta GTPasa tenga funciones únicas que la diferencian de los otros miembros de Ras.

En función del tipo celular, existen varios estímulos capaces de activar a Rap1. En fibroblastos por ejemplo, se activa tras el tratamiento con factores de crecimiento como PDGF, EGF, endotelina, ácido lisofosfatídico y bombesina (Zwartkruis et al., 1998; Posern et al., 2000; Song et al., 2002; Ohba et al., 2003), mientras que en plaquetas se activa por la trombina (Franke et al., 1997; Franke et al., 2000), en neutrófilos por quimiocinas y citocinas (Reedquist and Bos, 1998; He et al., 2011) y en linfocitos T y B por activación del TCR/BCR respectivamente (McLeod et al., 1998; Katagiri et al., 2004). Como ocurre con

el resto de las GTPasas, la unión entre el estímulo externo y la activación de Rap1 está mediada por las proteínas reguladoras GEFs.

3.3.1. RasGEFs: proteínas activadoras de GTPasas Ras

Los intercambiadores de nucleótidos funcionan como activadores de las GTPasas promoviendo el intercambio de GDP por GTP. El mecanismo mediante el cual los GEFs actúan sobre las GTPasas es doble. Por un lado, se unen a la GTPasa en su forma inactiva, desestabilizando su unión al GDP y provocando su disociación. Por otro lado, una vez que el dominio G de la GTPasa queda libre, los GEFs mantienen la estabilidad de la GTPasa. La presencia del GTP en el citoplasma es mayor que la del GDP, por lo que se favorece la entrada del GTP en el sitio de unión al nucleótido que se ha liberado en la GTPasa. La incorporación del GTP provoca la disociación del GEF de la GTPasa, permitiendo su activación molecular mediante el cambio conformacional de las regiones *switch I* y *II*, y favoreciendo de esta manera la asociación a sus proteínas efectoras (Schmidt and Hall, 2002).

En las células encontramos una gran variedad de GTPasas que requieren la presencia de un amplio número de GEFs reguladores para asegurar la especificidad de la señal. Por ello, existen GEFs específicos para cada una de las familias de las GTPasas, si bien es cierto que algunos GEFs excepcionales pueden actuar sobre miembros de diferentes familias.

El primer GEF descubierto fue precisamente un GEF específico de Ras. Este GEF, CDC25p, actuaba por encima de Ras en la cascada de señalización de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Broek et al., 1987). Tras él, se identificaron varias proteínas en levadura que compartían una gran homología con CDC25p (Boguski and McCormick, 1993). Hoy en día se conocen varias familias con actividad GEF sobre Ras en mamíferos: SOS, RasGRP (originalmente denominada Cal-DAG-GEF) y RasGRF (Figura 11) (Boguski and McCormick, 1993; Ebinu et al., 1998; Kawasaki et al., 1998; Quilliam et al., 2002). Todas ellas se caracterizan por compartir un dominio catalítico o de homología a

CDC25, compuesto por aproximadamente 250 residuos y que generalmente aparece en combinación con el dominio de unión a Ras, REM. Estos dos dominios son esenciales para la acción reguladora de esos GEFs sobre Ras. Los estudios de cristalografía de SOS muestran un modelo de interacción con Ras extrapolable al resto de los GEFs. Según este modelo, el dominio REM del GEF se asocia al *switch I* de Ras, tras lo cual el dominio catalítico CDC25 interacciona con el *switch II*, lo que conlleva la disociación del GDP de la GTPasa (Boriack-Sjodin et al., 1998).

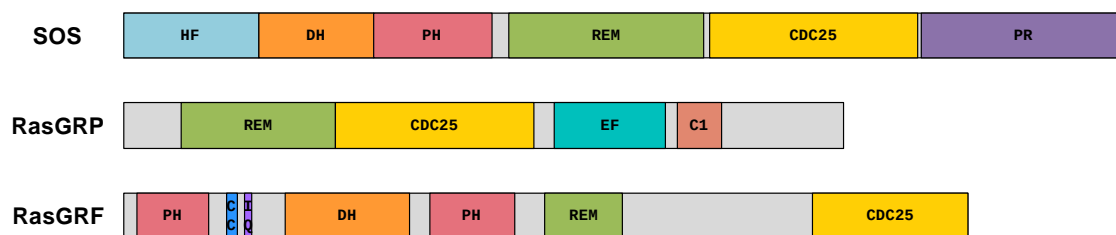


Figura 11. Factores intercambiadores de Ras (SOS, RasGRP y RasGRF) y sus principales dominios estructurales. CDC25, dominio de homología a Cdc25; DH, dominio de homología a Dbl; HF, dominio de unión a histonas; PH, dominio de homología a Pleckstrina; PR, dominio rico en prolinas; REM, dominio de intercambio de Ras (*Ras Exchange Motif*); EF, dominio de unión a calcio (*EF hands*); C1, dominio de unión a DAG; CC, dominio con estructura superhelicoidal o doble- α -helicoidal; IQ, dominio de unión a calmodulina (*Ilimaquinone domain*). Tamaño de las proteínas dibujado a escala en base a SOS1, RasGRF1 y RasGRP1. Figura adaptada de Fernández-Medarde and Santos, 2011 y Jun et al., 2013.

El resto de dominios presentes a lo largo de su secuencia permiten la interacción de estos GEFs con otras proteínas o lípidos para la regulación espacio-temporal de la activación de Ras mediada por diferentes estímulos externos. De esta manera, la familia SOS (SOS1 y SOS2) está involucrada en la activación de Ras mediada por tirosina cinasas estimuladas con factores de crecimiento, y las proteínas RasGRP (RasGRP1-4) controlan los mecanismos regulados por calcio y diacilglicerol (DAG) mediante la unión de la actividad de Ras a los receptores acoplados a proteínas G y posterior activación de PLC (Schlessinger, 1993; Ebinu et al., 1998; Buday and Downward, 2008). Por último, los RasGRF (RasGRF1 y RasGRF2) son los reguladores más importantes en la señalización neuronal (Cen et al., 1992; Shou et al., 1992; Fam et al., 1997). Estos, permiten la activación de Ras en estas células tras

darse un incremento intracelular de calcio y cAMP, mediado por la unión de ciertos neurotransmisores a sus receptores (Farnsworth et al., 1995; Tian and Feig, 2006; Fasano et al., 2009).

3.3.1.1. RasGRF: un RasGEF neuronal

RasGRF1, también conocido como 140-GRF1 por sus 140 KDa de peso molecular, es una proteína expresada mayoritariamente en neuronas y en menor medida en pulmón y páncreas (Cen et al., 1992; Shou et al., 1992; Guerrero et al., 1996). Análisis funcionales realizados en ratones RasGRF1 KO han demostrado su implicación en diversos procesos como el aprendizaje y memoria (Brambilla et al., 1997; Giese et al., 2001), el crecimiento y desarrollo (Itier et al., 1998; Fernandez-Medarde et al., 2002), la homeostasis de glucosa (Font de Mora et al., 2003) y la fotorrecepción (Fernandez-Medarde et al., 2009; Hysi et al., 2010). RasGRF2 o 135-GRF2 es, al igual que RasGRF1, una proteína preferencialmente encefálica (Fam et al., 1997), que además de participar en la regulación de la memoria y crecimiento (Fernandez-Medarde et al., 2002; Tian and Feig, 2006), juega también un papel en la señalización y proliferación de las células T (Ruiz et al., 2007, 2009).

Los genes codificantes para RasGRF1 y RasGRF2 producen varios transcritos mediante *splicing* alternativo. Aunque se han detectado, mediante *Northern blotting*, algunas isoformas pequeñas, los productos génicos más expresados en el encéfalo son los mRNAs codificantes para formas largas 140-RasGRF1 y 135-RasGRF2 (en adelante se referirá a ellos como RasGRF1 y RasGRF2) (Schweighoffer et al., 1993; Zippel et al., 1997). Estas dos proteínas han sido detectadas en células neuronales pero no en glía (Zippel et al., 1997). Su expresión en el encéfalo es ubicua, aunque se han observado diferencias en su intensidad de expresión (Wei et al., 1993).

RasGRF1 y RasGRF2 contienen dominios REM y CDC25, esenciales para la unión y activación de su proteína efectora Ras. Aunque *in vivo* son capaces de activar a la isoforma H-Ras, no se ha detectado su acción sobre N-Ras ni K-

Ras4B (Jones and Jackson, 1998). Además de los dominios REM y CDC25, existen otros dominios en su secuencia igualmente importantes para su regulación (Figura 12).

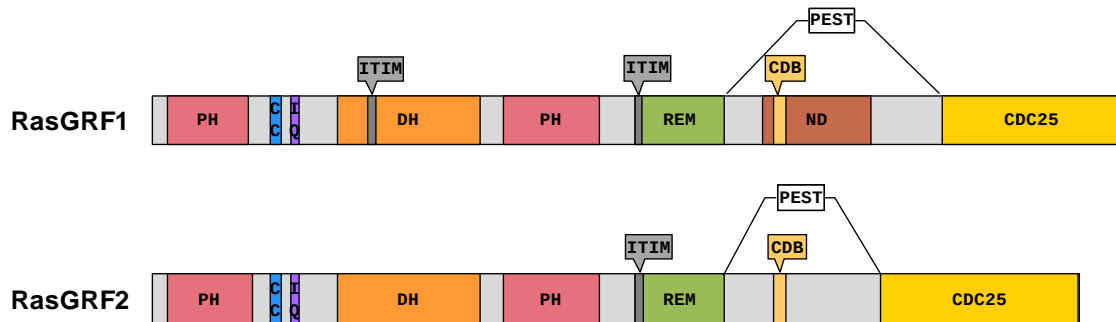


Figura 12. Dominios estructurales de RasGRF1 y RasGRF2. PH, dominio de homología a Pleckstrina; CC, dominio con estructura superhelicoidal o doble- α -helicoidal; IQ, dominio de unión a calmodulina (*Ilimaquinone domain*); DH, dominio de homología a Dbl; ITIM, motivo de inhibición basado en tirosina; REM, dominio de intercambio de Ras (*Ras Exchange Motif*); CDB, dominio de ubiquitinación (*cyclin destruction box*); ND, dominio neuronal; PEST, dominio rico en prolina, ácido glutámico, serina y treonina; CDC25, dominio de homología a Cdc25. Tamaño de las proteínas dibujado a escala. Figura adaptada de Fernández-Medarde, 2010.

El motivo IQ por ejemplo, media la activación de RasGRF en respuesta al calcio. Este ión, se une a la proteína calmodulina favoreciendo su interacción con el motivo IQ de RasGRF. La unión de la calmodulina promueve así la función intercambiadora de RasGRF sobre la GTPasa Ras (Farnsworth et al., 1995; Fam et al., 1997; Fan et al., 1998; de la Puente et al., 2002). Sin embargo, otros estudios sugieren que el mecanismo mediante el cual el calcio induce la activación de RasGRF implica la translocación del GEF del citoplasma a la membrana (Fan et al., 1998). No obstante, parece que el calcio induce otros cambios más allá de la simple translocación a la membrana del GEF, ya que la forma constitutivamente anclada a la membrana de RasGRF no muestra una actividad mayor que la forma salvaje (Gotoh et al., 1997).

El motivo IQ actúa junto con sus dominios *upstream* CC (*coiled-coiled*) y PH1 como una unidad única, regulando la translocalización del RasGRF hacia la membrana en respuesta a señales de calcio (Buchsbaum et al., 1996). Este módulo también parece tener un posible aunque aún indefinido papel como regulador de la expresión génica (Lavagni et al., 2009). Se desconocen

funciones individuales para el dominio CC de RasGRF. Aunque en ocasiones este dominio está involucrado en la oligomerización de las proteínas (McWhirter et al., 1993; Whitson et al., 2005), este no es el caso para RasGRF1, ya que, como veremos a continuación, su oligomerización se ha asociado a otro dominio. El PH1 es el dominio PH localizado próximo al amino terminal de RasGRF. Este dominio regula el anclaje de la proteína a la membrana mediante su unión al fosfatidilinositol (Harlan et al., 1994; Lemmon and Ferguson, 2000; Maffucci and Falasca, 2001). No obstante, no es un dominio esencial para la localización de la proteína en la membrana, ya que constructos de RasGRF carentes de PH1 no pierden por completo su asociación a la membrana (Cen et al., 1993; Blomberg and Nilges, 1997).

El dominio PH2 se encuentra localizado hacia el carboxilo terminal de RasGRF y su función es algo contradictorio. Algunos autores defienden su papel modulador de la actividad intercambiadora sobre Ras (Cen et al., 1993), mientras que otros proponen que la eliminación de esta región no tendría un efecto significativo en la actividad sobre dicha GTPasa (Arozarena et al., 2000). Esto sugeriría que el dominio PH2 probablemente estaría regulando la unión de RasGRF a sus proteínas efectoras pero no actuaría sobre la actividad catalítica del GEF (Fernandez-Medarde and Santos, 2011). Sin embargo, este dominio PH2 en tándem con el dominio catalítico DH parece que tiene un papel regulador sobre la actividad de las GTPasas de la familia Rho (Rossman et al., 2005), aunque el papel regulador del DH sobre Rac1 solo se ha podido observar tras la estimulación de proteínas G (Kiyono et al., 1999) o LPA (Innocenti et al., 1999). El dominio DH también se ha descrito como mediador de la oligomerización de RasGRF, aunque no se descarta la cooperación de otras proteínas en este proceso (Anborgh et al., 1999; Fernandez-Medarde and Santos, 2011).

RasGRF también puede regularse mediante modificaciones post-transduccionales. Así, el motivo PEST, rico en prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S) y treonina (T), es una región diana para fosforilaciones mediadas por PKA (Baouz et al., 2001) y/o CDK5 (Kesavapany et al., 2004; Kesavapany et

al., 2006), mientras que los motivos de inhibición ITIM lo son para tirosina fosfatasas tales como SHP-1, SHP-2 y SHIP (Sinclair, 2000). Por último, el motivo CDB (*cyclin destruction box*), es una pequeña región susceptible de ser ubiquitinada para conducir al factor intercambiador al proteasoma y llevar a cabo su degradación. (de Hoog et al., 2001).

Finalmente, el dominio neuronal (ND), se caracteriza por estar presente en la isoforma RasGRF1 pero no en RasGRF2. Este dominio es necesario y suficiente para la interacción de la proteína con la subunidad NR2B de los receptores NMDA, y promueve la activación de la ruta Ras-ERK mediada por la activación de dichos receptores (Krapivinsky et al., 2003).

3.3.1.1.1. Regulación de RasGRF1 mediada por calcio/calmodulina

Un incremento de la concentración citosólica de calcio es capaz de inducir la activación de RasGRF1 (Cullen and Lockyer, 2002). El aumento del calcio intracelular provoca la unión de la calmodulina al motivo IQ de este GEF y la consecuente activación del mismo (Farnsworth et al., 1995). Además, este motivo coopera con los dominios PH1 y CC para mediar la translocación del RasGRF1 a los compartimentos cercanos a sus proteínas efectoras para que pueda activarlas (Buchsbbaum et al., 1996). Los dominios DH y PH2 también son importantes en la transmisión de la señal de calcio corriente abajo, ya que los constructos de RasGRF1 con mutaciones en estos dominios, aunque mantienen la actividad reguladora sobre Ras, reducen su capacidad activadora de ERK (Freshney et al., 1997). La localización intracelular del RasGRF1 es también esencial en su actividad mediada por calcio. Así, se ha visto que la ionomicina, un ionóforo de calcio, induce una activación de RasGRF1 mayoritariamente en la membrana plasmática, y en menor medida en el retículo endoplasmático (Arozarena et al., 2004). Se postula que esta diferencia puede ser debida a la posibilidad de interacción con distintas proteínas en las diferentes localizaciones subcelulares (Sim and Scott, 1999; Levchenko et al., 2000; Marinissen and Gutkind, 2005; Casar et al., 2009).

3.3.1.1.2. Regulación de RasGRF1 por fosforilación

Las modificaciones post-transduccionales también son un importante mecanismo de regulación de RasGRF1. Este GEF contiene varios sitios de fosforilación para distintas cinasas intracelulares, produciendo efectos diferentes sobre RasGRF1.

CDK5 es una cinasa que fosforila a RasGRF1 y al igual que este GEF, la cinasa también se encuentra expresada mayoritariamente en el encéfalo, teniendo un papel relevante en la plasticidad neuronal asociada a memoria y aprendizaje (Fischer et al., 2003). La función de CDK5 sobre RasGRF1 sin embargo, no es directa, y requiere de la actuación de otra proteína, la p35. Esta proteína es la encargada de unirse tanto a CDK5 como a RasGRF1 y promover así la interacción de estas dos proteínas. Mediante la fosforilación del residuo Ser731 de RasGRF1, la CDK5 regula la estabilidad del GEF, promoviendo su degradación (Kesavapany et al., 2006).

La Ser 916 de RasGRF1 es otra serina susceptible de ser fosforilada. Se ha descrito que esta fosforilación se da tanto en las dendritas de neuronas corticales, sugiriendo un papel regulador de la plasticidad neuronal (Yang et al., 2003), como en neuronas del hipocampo en respuesta a señales inductoras de LTP (long-term potentiation). Se ha demostrado que la cinasa CaMKI está implicada en la fosforilación en Ser 916 de RasGRF1, aunque parece que el enzima que fosforila directamente este residuo es la PKA (Schmitt et al., 2005).

Además de en residuos de serina, RasGRF1 también se fosforila en tirosinas por acción de diversas tirosina cinasas, como por ejemplo los receptores Trk (MacDonald et al., 1999). Un estudio más específico ha revelado que es el dominio HIKE de la TrkA el responsable de fosforilar el dominio PH1 de RasGRF1. Esta modificación post-transduccional de RasGRF1 media en la extensión de neuritas inducida por NGF (Robinson et al., 2005). Este proceso

implica a H-Ras y ERK, aunque es independiente de las rutas de Rac1 y PI3K (Yang and Mattingly, 2006).

RasGRF1 también se fosforila por acción de otras tirosina cinasas citosólicas. Así, Src media la fosforilación de RasGRF1 provocando una mayor activación de Rac1, pero no de Ras (Kiyono et al., 2000b; Giglione et al., 2001). Sin embargo, otro miembro de su misma familia, de tirosina cinasas, Lck, produce el efecto contrario, induciendo la actividad GEF de RasGRF1 sobre Ras pero no sobre Rac1 (Giglione et al., 2001). La actividad intercambiadora de RasGRF1 sobre Ras también aumenta tras la fosforilación mediada por la tirosina cinasa ACK1 (Kiyono et al., 2000a).

3.3.2. PKCs como reguladoras de GTPasas Ras

Las PKCs son un grupo de serina/treonina cinasas pertenecientes a la familia AGC con un importante papel en la señalización intracelular de varios sistemas biológicos (Newton, 2003; Steinberg, 2008). Las diferentes isoformas se han clasificado en tres grupos, en función de su homología y capacidad de unir los cofactores fosfatidilserina (PS), diacilglicerol (DAG) y calcio (Ca^{+2}) (Figura 13):

- 1) PKC clásicas o cPKC (α , β I, β II y γ): Requieren para su activación de PS, DAG y Ca^{+2} .
- 2) PKC noveles o nPKC (ϵ , δ , η , θ): Requieren para su activación de PS y DAG pero no Ca^{+2} .
- 3) PKC atípicas o aPKC (λ , ζ): Requieren para su activación de PS pero no de DAG ni Ca^{+2} .

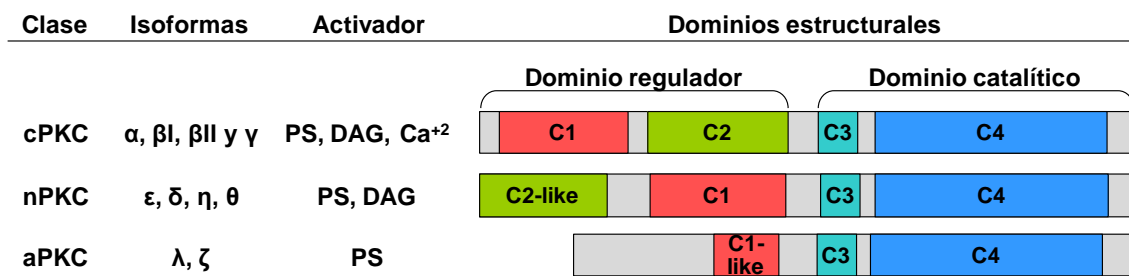


Figura 13. Dominios estructurales de las subfamilias de las PKCs. C1, dominio de unión a DAG; C2, dominio de unión a Ca^{+2} ; C3, dominio de unión a ATP; C4, dominio de unión al sustrato. Los dominios “like” no son capaces de unir los cofactores correspondientes en cada caso. Figura adaptada de Steinberg, 2008.

Ya en el año 1987 se observó que la isoforma K-Ras4B podía fosforilarse en su Ser181 en respuesta a la estimulación de la proteína cinasa C (PKC) con el éster de forbol PMA, desconociéndose aún si K-Ras4B era un sustrato directo de PKC (Ballester et al., 1987). Veinte años después, se detectó una translocación de esta GTPasa hacia la membrana mitocondrial también tras la estimulación de la PKC, lo que indujo al estudio de la K-Ras4B como posible sustrato de la cinasa PKC. Los resultados confirmaron que la PKC mediaba la fosforilación de K-Ras4B en su Ser181, y que además, esta modificación inducía la translocación de la GTPasa hacia la membrana mitocondrial en cuestión de minutos y promovía la apoptosis (Philips, 2005; Ashery et al., 2006; Silvius et al., 2006). Recientemente, se ha descrito que la fosforilación en Ser181 de la K-Ras4B favorece la activación de sus moléculas efectoras Raf1 y PI3K (Barcelo et al., 2013). Además, existe una estrecha relación entre la PKC y la calmodulina (CaM). Recordemos que esta última media la activación de Ras a través de la unión a la GEF activadora de RasGRF (Farnsworth et al., 1995). Según establecen Alvarez-Moya y colaboradores, la unión de la CaM a la GTPasa inhibe la fosforilación mediada por la PKC, y la fosforilación por PKC evita la unión de la CaM a K-Ras4B (Alvarez-Moya et al., 2010).

A pesar de no haberse encontrado secuencias consenso para la unión a PKC en el resto de proteínas Ras “clásicas” (N-Ras, H-Ras y K-Ras4A), sí que se han encontrado en otras GTPasas como son la GTPasa RhoE miembro de la

familia Rho (Riento et al., 2005; Madigan et al., 2009) o Ra1B (Martin et al., 2012), la cual se fosforila en sus serinas 11 y 198 respectivamente.

IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La activación de receptores purinérgicos mediada por ATP provoca la muerte de neuronas dopaminérgicas, lo que sugiere una posible relación directa entre la señalización purinérgica y la Enfermedad de Parkinson. No obstante, las cascadas de señalización que emanan de estos receptores y regulan la viabilidad neuronal se encuentran aún sin esclarecer.

Uno de los intermediarios moleculares que aumenta su actividad en respuesta a la estimulación purinérgica es Ras, una GTPasa clave en la regulación de numerosas rutas de señalización intracelular. Sobre esta base, postulamos la hipótesis de que las GTPasas de la superfamilia Ras podrían estar implicadas en la señalización mediada por los receptores purinérgicos, pudiendo actuar como reguladoras de la biología de las neuronas dopaminérgicas. Por ello, el objetivo principal de este trabajo consiste en caracterizar las moléculas intermediarias en las rutas de señalización celular mediadas por los receptores purinérgicos, centrándonos en las GTPasas de la superfamilia Ras y sus moléculas reguladoras y efectoras. Para ello planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar e identificar las GTPasas de la superfamilia Ras implicadas en dicha respuesta neuronal mediada por receptores purinérgicos.
2. Caracterizar las proteínas reguladoras y efectoras de las GTPasas identificadas en el objetivo 1.
3. Evaluar la implicación de la PTPR β , una tirosina fosfatasa asociada al receptor P2X₇, en la respuesta purinérgica en neuronas dopaminérgicas.
4. Estudiar la participación del calcio internalizado a través de los receptores purinérgicos en los diferentes procesos intracelulares de las neuronas dopaminérgicas.
5. Analizar el papel de las proteínas identificadas como moléculas intermediarias de la señalización purinérgica sobre la regulación de la viabilidad neuronal.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. Reactivos

La relación de reactivos utilizados en este trabajo se detallan en la Tabla 1:

Tabla 1. Principales productos utilizados en este trabajo con sus respectivas casas comerciales.

Casa comercial	Producto
Sigma-Aldrich Co. LLC. St. Louis, MO. USA	LB Broth LB Agar SOC Ampicillin Kanamycin 2XYT Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Fetal Bovine Serum (FBS) L-glutamine Penicillin-Streptomycin Phosphate Buffer Saline Trypsina/EDTA Trypan Blue Adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate (ATP) 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosine 5'-triphosphate triethylammonium salt (BzATP) A-740003 Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA) LY-294002 hydrochloride GF109203X hydrochloride

	Sodium orthovanadate ($\text{Na}_3\text{O}_4\text{V}$) Dimetyl sulfoxide (DMSO) β -mercaptoethanol Bromophenol blue Acrylamide/bisAcrylamide Sodium dodecyl sulfatate (SDS) Ammonium persulfate (APS) N,N,N',N'-Tetramethyl-ethanediamine (Temed) Tween 20 Brilliant Blue G Ponceau S
GE Healthcare Little Chalfont, UK	Glutation Sepharose 4B
Thermo Fisher Scientific Inc. Waltam, MA. USA	BenchMark Pre-Stained Protein Ladder Restore Western Blot Stripping Buffer

1.2. Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados se detallan en la Tabla 2:

Tabla 2. Anticuerpos utilizados.

Anticuerpos	Dilución WB	Referencia
Phospho-p42/44 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E)	1:2000	4370 (Cell Signaling)
p42/44 MAPK (Erk1/2) (137F5)	1:1000	4695 (Cell Signaling)
Anti-Ras, clone RAS10	1:1000	05-516 (Upstate, Millipore)
Rap1 (121): sc-65	1:1000	sc-65 (Santa-Cruz)
Anti-Rac1, clon 23A8	1:2000	05-389 (Upstate, Millipore)
RhoA (119): sc-179	1:1000	sc-179 (Santa-Cruz)
Anti-Cdc42 Immunoblotting kit	1:2000	17-299 (Upstate, Millipore)
Anti-P2X7 Receptor	1:1000	AB5581 (Chemicon, Millipore)
Living Colors EGFP Monoclonal Antibody	1:1000	632569 (Clontech)
ECL Mouse IgG, HRP-linked whole Ab (from sheep)	1:3000	NA931V (GE Healthcare)
ECL Rabbit IgG, HRP-linked F(ab')₂ fragment (from donkey)	1:3000	NA9340 (GE Healthcare)

2. MÉTODOS

2.1. Técnicas de ADN recombinante

2.1.1. Clonación de ADN

2.1.1.1. Reacción en cadena de la Polimerasa (Polimerase Chain Reaction, PCR) y mutagénesis dirigida

La mutagénesis dirigida es una técnica que permite la modificación puntual de pares de bases de la cadena de ADN (Figura 14). Esto se traduce en la generación de proteínas que escapan al control de su regulación bien por una pérdida o por una ganancia de función.

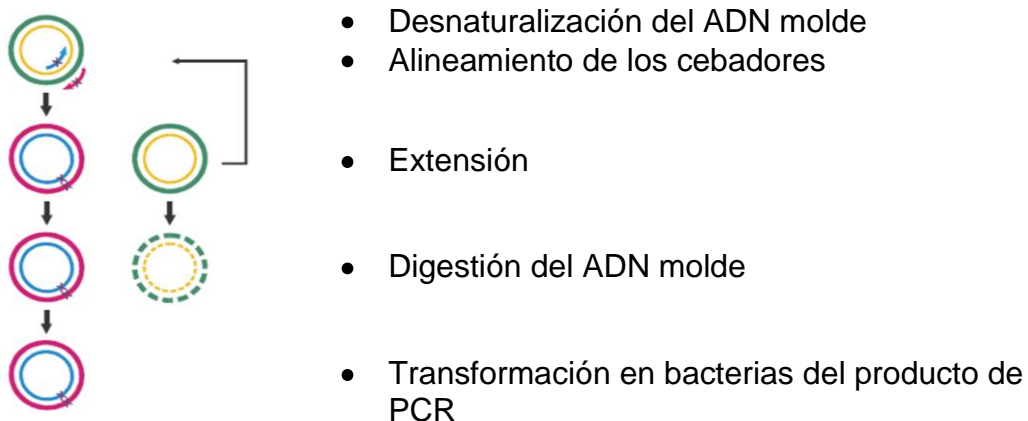


Figura 14. Esquema general del ensayo de mutagénesis dirigida

Primeramente, se diseñó el par de cebadores para cada una de las mutaciones puntuales deseadas (Tabla 3). Dichos cebadores consisten en una secuencia de unos 20 nucleótidos diseñados alrededor del aminoácido que se desea mutar. Además, contendrá la variación nucleotídica necesaria para provocar dicha mutación. En el diseño de cebadores se tuvo en cuenta la temperatura de alineamiento, es decir, la temperatura óptima de interacción del oligonucleótido con el ADN molde. Se intentó que cada pareja de cebadores tuvieran una temperatura de alineamiento lo más parecida posible.

Tabla 3. Mutaciones puntuales para la construcción del mutante RasGRF1mut1IQ.

		Nombre	Secuencia 5'→3'
1º reacción de PCR	ADN molde	RasGRF1wt	GAGTTTCCTTCGCGGATGGCTGT GCCGGCGAAAGTGGAAGAACATC ATC
	Cebador sentido	Fw (RasGRF1mut1IQ)	GAGTTTCCTT CAGGG GATGGCTG
	Cebador antisentido	Rv (RasGRF1mut1IQ)	CAGCCATCC CTGA AGGAAACTC
	Producto de PCR	RasGRF1mut1IQ	GAGTTTCCTT CAGGG GATGGCTGT GCCGGCGAAAGTGGAAGAACATC ATC
	Aa modificado	R214Q	CGC → CAG
2º reacción de PCR	ADN molde	RasGRF1mut1IQ	GAGTTTCCTT CAGGG GATGGCTGT GCC GG CGAAAGTGGAAGAACATC ATC
	Cebador sentido	Fw (RasGRF1mut2IQ)	GGCTGTGCC CAGC GAAAGTGG
	Cebador antisentido	Rv (RasGRF1mut2IQ)	CCACTTTCG CTGG CACAGCC
	Producto de PCR	RasGRF1mut1+2IQ	GAGTTTCCTT CAGGG GATGGCTGT GCC CAGC GAAAGTGGAAGAACATC ATC
	Aa modificado	R219Q	CGG → CAG
3º reacción de PCR	ADN molde	RasGRF1mut1+2IQ	GAGTTTCCTT CAGGG GATGGCTGT GCC CAGC GAAAGTGGA AAG AACATC ATC
	Cebador sentido	Fw (RasGRF1mut3IQ)	CGAAAGTGG CAGA AACATCATC
	Cebador antisentido	Rv (RasGRF1mut3IQ)	GATGATGTT CTGCC ACTTTCG
	Producto de PCR	RasGRF1mut IQ	GAGTTTCCTT CAGGG GATGGCTGT GCC CAGC GAAAGTGG CAGA AACATC ATC
	Aa modificado	K223Q	AAG → CAG

A continuación se prepararon las reacciones en cadena de la Polimerasa (Polimerase Chain Reaction, PCR). Para cada mutación puntual se preparó una reacción de PCR, proporcionando las condiciones óptimas para la polimerasa Pfu Ultra II Fusion HS DNA Polymerase (Agilent Technologies). La reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystem) en un volumen de 50 μ l, donde se cargaron 100 ng de ADN molde, 200 nM de cada cebador, 250 μ M de cada uno de los cuatro dNTPs, 1X del tampón de reacción y 1 μ l de la polimerasa Pfu Ultra (Agilent Technologies). Los ciclos se iniciaron a 95 °C durante 2 minutos para la desnaturalización del ADN molde, seguidos de 30 ciclos de amplificación. Cada ciclo de amplificación consistió en 20 segundos de desnaturalización a 95 °C; 20 segundos de alineación de los cebadores con el ADN a una temperatura de 5 °C más baja que la T^a de alineamiento de los cebadores y finalmente, la amplificación se llevó a cabo a 72 °C y a 15 segundos por kilobase. Cada reacción se acabó con una extensión final de 3 minutos a 72 °C. Con objeto de eliminar el ADN molde de la mezcla de reacción, los productos de PCR fueron tratados con 5 unidades de Dpn I (Promega) durante un mínimo de 1 hora a 37 °C.

Tras esta digestión, el producto de la PCR se introdujo en bacterias competentes, para finalmente extraerlo y purificarlo del cultivo bacteriano tal y como se describe más adelante (apartados 2.1.2.2 y 2.1.3). La verificación de la secuencia de ADNc de RasGRF1 mut IQ se llevó a cabo mediante secuenciación en los Servicios Generales de Investigación SGIker (UPV/EHU).

2.1.2. Transformación bacteriana

2.1.2.1. Obtención de bacterias competentes

Una colonia aislada de la cepa bacteriana *E. coli* DH5 α se inoculó en 20 ml de medio LB Broth (Sigma-Aldrich) y se cultivó en un incubador con agitación durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente, 5 ml de dicho cultivo se diluyó en medio LB Broth a un volumen final de 250 ml y se dejó crecer durante aproximadamente 4 h hasta alcanzar una densidad óptica óptima (OD 0,6-0,8).

A continuación, el cultivo bacteriano se centrifugó durante 15 minutos a 4000 r.p.m. a 4°C. El precipitado se resuspendió en 50 ml de TFB1 frío (ver apartado 2.9) y se incubó en hielo durante 30 minutos. Tras una centrifugación de 10 minutos a 4000 r.p.m. a 4°C, el nuevo precipitado se resuspendió en 10 ml de TFB2 frío (ver apartado 2.9). Las bacterias *E. coli* DH5 α competentes se alicuotaron y guardaron a -80°C.

2.1.2.2. Transformación

Las bacterias competentes *E. coli* DH5 α guardadas a -80°C se dejaron descongelar progresivamente en hielo. Una vez descongeladas, se les añadió unos 100 ng de ADNc y la mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos. La transformación bacteriana se llevó a cabo mediante choque térmico, el cual consistió en colocar el tubo que lleva la mezcla de bacterias y plásmido en un baño a 42°C durante 45 segundos e inmediatamente transferirlo a un baño de hielo durante 2 minutos. A continuación, se diluyó la mezcla con 500 μ l de medio SOC (Sigma-Aldrich) y se incubó en agitación a 200 r.p.m. durante 1 hora a 37°C. Finalmente, el cultivo bacteriano se sembró en placas de LB Agar (Sigma-Aldrich) que contenían el antibiótico cuya resistencia se encontraba en el plásmido introducido (100 μ g/ml Ampicilina o 50 μ g/ml Kanamicina) y se incubaron en una estufa a 37°C durante toda la noche.

2.1.3. Extracción de ADN de cultivos bacterianos

Una porción de una colonia bacteriana se inoculó en 250 ml de medio LB Broth con el antibiótico de resistencia, agitándolo toda la noche a 200 r.p.m. a 37 °C. Tras la centrifugación al día siguiente a 4000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C, el ADN plasmídico se extrajo con un kit (NucleoBond® Xtra Maxi, Macherey-Nagel) para evitar la contaminación con endotoxinas bacterianas.

Siguiendo las indicaciones del fabricante, el precipitado se resuspendió en 12 ml de tampón de resuspensión (Buffer RES) tras lo cual se lisaron añadiendo 12 ml de tampón de lisado (Buffer LYS). El tubo se invirtió 5 veces y se dejó 5 minutos a temperatura ambiente. El proceso de lisado se detuvo añadiendo 12

ml de tampón de neutralización (Buffer NEU). La columna se equilibró añadiendo 25 ml de tampón de equilibrado (Buffer EQU), y una vez vacía, se cargó con el lisado. A continuación se añadieron 15 ml de tampón de equilibrado posteriormente se retiró el filtro de la columna. Se añadieron 25 ml de tampón de lavado (Buffer WASH) a la columna, y finalmente el ADN fue eluido añadiendo 15 ml de tampón de elución (Buffer ELU). En los casos en los que era necesario concentrar el ADN eluido, se añadió 10.5 ml de isopropanol y 1.5 ml de 3 M acetato de sodio. La mezcla se centrifugó durante 30 minutos a 12000 r.p.m. a 4°C y el precipitado se resuspendió en 5 ml de 70% etanol. Tras otros 5 minutos de centrifugación se dejó secar el precipitado y una vez seco se disolvió en agua estéril, y se cuantificó en un NanoDrop (Thermo Fisher Scientific).

2.2. Expresión de proteínas recombinantes en bacterias.

2.2.1. Expresión de dominios de unión a GTPasas de las moléculas efectoras.

Para determinar el estado de activación de las GTPasas de la superfamilia Ras, se utilizaron proteínas de fusión recombinantes portadoras de los dominios de unión a GTPasas de las moléculas efectoras (ver Tabla 4). Para la producción de las proteínas de fusión, se creció una alícuota de cultivo bacteriano en medio 2XYT con el antibiótico de resistencia durante toda la noche en un incubador con agitación a 200 r.p.m. y a 37°C. Al final de la incubación el cultivo bacteriano se diluyó diez veces en medio 2XYT con antibiótico y se dejó crecer en las mismas condiciones que las descritas durante 1 h. Al cabo de este tiempo se añadió al cultivo 1 mM de Isopropyl β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG, Sigma-Aldrich) durante 4 horas. A continuación, las bacterias se centrifugaron durante 15 minutos a 4000 r.p.m a 4°C y se lisaron en tampón de lisis (ver apartado 2.9). Se utilizaron 6 ml de tampón de lisis por 500 ml de cultivo manteniéndose el lisado a 4°C en todo momento. El lisado se sometió a cuatro turnos de sonicación (Misonix Inc. Microson™ Ultrasonic Cell Disruptor XL Model DU-2000) a 5000 μ m de amplitud de onda durante 10 segundos cada uno combinados con 10 segundos de reposo.

Finalmente, la muestra sonicada se centrifugó durante 10 minutos a 13000 r.p.m a 4°C y la fracción soluble que contenía la proteína de fusión se alicuotó y guardó a -80°C durante un tiempo máximo de dos semanas.

Tabla 4. Construcciones de dominios de unión a GTPasas de moléculas efectoras.

Construcción	Proteína recombinante	Función del dominio	Vector
GST-RBD Raf	Ras	RBD de unión a Ras	pGEX-4T3
GST-RalGDS RBD	Rap1	RBD de unión a Rap1	pGEX-4T3
GST-CRIB (Pak)	Rac1	CRIB de unión a Rac1	pGEX-4T3
GST-RBD Rhotekin	RhoA	RBD de unión a RhoA	pGEX-4T3
GST-CRIB WASP	Wasp	CRIB de unión a Cdc42	pGEX-4T3

Para verificar la expresión de la proteína de fusión se sometió una pequeña muestra a una electroforesis en SDS-PAGE (ver apartado 2.6). El gel se tiñó con Azul Coomassie y se destiñó el gel en presencia de una mezcla de ácido acético glacial/metanol (ver apartado 2.9) (Figura 15).

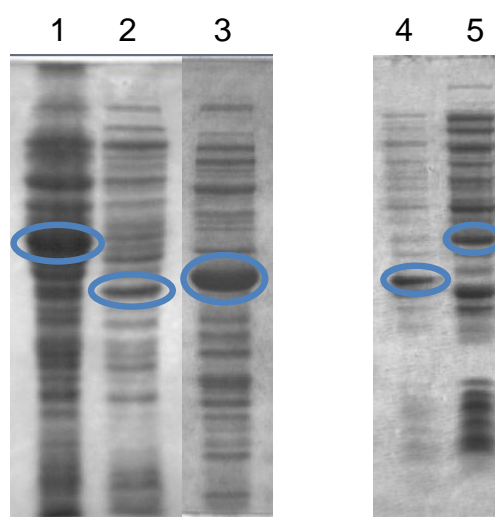


Figura 15. Inducción de la expresión de proteínas de fusión recombinantes en bacterias. Lisados totales migrados en geles de poliacrilamida al 12% (lisados 1, 2, 3) o al 10% (lisados 4, 5). Los círculos indican las proteínas de fusión recombinantes GST-RalGDS RBD (1), GST-RBD Raf (2), GST-CRIB WASP (3), GST-CRIB Pak (4) y GST-RBD Rhotekin(5).

2.3. Cultivos celulares y transfecciones transitorias

2.3.1. Cultivos celulares

Se utilizaron las líneas celulares SN4741, una línea neuronal proveniente de la *substantia nigra* de ratón (Son et al., 1999), y HEK 293T, células embrionarias de riñón humano (Human Embryonic Kidney). Ambas líneas celulares se cultivaron en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma-Aldrich), suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS, Sigma-Aldrich), 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich), 100 unidades/ml de penicilina y 100 ng/ml de estreptomycin (Penicillin-Streptomycin, Sigma-Aldrich), a 37°C, en una atmósfera al 5% de CO₂ y una humedad relativa del 95%.

2.3.1.1. Siembra

Las dos líneas celulares utilizadas crecieron en monocapa. Para su expansión, se lavaron con 1X PBS (Phosphate Buffer Saline, Sigma-Aldrich) equilibrado a 37°C y se trataron con Tripsina-EDTA (Trypsin/EDTA, Sigma-Aldrich). Se dejó que ésta actuara durante unos minutos a 37°C, y una vez despegadas y desagregadas las células, la tripsina se neutralizó añadiendo dos volúmenes de medio completo. Con objeto de contar las células viables, se diluyó un pequeño volumen de la suspensión celular en Azul Tripán (Trypan Blue, Sigma-Aldrich) previamente diluido en 1X PBS a razón 1:5. Las células viables se contabilizaron en una cámara de Neubauer utilizando un microscopio de luz visible (objetivo 10X). Las células se sembraron dependiendo de las condiciones experimentales. Los diferentes tipos de experimentos y sus condiciones de siembra se reflejan en la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones de siembra para cada tipo de experimento.

Experimento	Duración	Línea celular	Tipo de placa	Nº de células (por pocillo/placa)
Mantenimiento	3-4 días	SN4741	100 mm	1×10^6
Extracción de proteínas	1 día	SN4741	6 pocillos	0.75×10^6
Pull Down	1 día	SN4741	100 mm	3×10^6
MTT	2 días	SN4741	96 pocillos	0.03×10^6
Mantenimiento	3-4 días	HEK293T	100 mm	2×10^6
Extracción de proteínas	3 días	HEK293T	6 pocillos	0.5×10^6
Pull Down	3 días	HEK293T	6 pocillos	0.5×10^6

2.3.2. Transfecciones

2.3.2.1. Transfección celular con el reactivo de transfección Xfect

Las células HEK 293T se transfectaron utilizando el reactivo de transfección Xfect (Clontech Laboratories). A continuación, se describe brevemente el procedimiento seguido referido a un pocillo de una placa de 6 pocillos.

Se diluyeron 5-10 μg de ADN en el tampón de reacción Xfect llevándolo a un volumen final de 100 μl . Tras una agitación en vortex de 5 segundos, se añadieron 0,3 μl de polímero Xfect por cada 1 μg de ADN y se volvió a agitar en vortex durante 10 segundos. La mezcla de transfección se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos, con el fin de favorecer la formación de las nanopartículas. Finalmente, los 100 μl de reacción se añadieron al cultivo celular gota a gota. Tras una incubación de entre 4 horas y toda la noche en las condiciones de cultivo (37°C, 5% CO₂, 95% HR), se cambió el medio. 48 post-transfección, las células se trataron y se procedió a realizar el experimento correspondiente.

2.3.2.2. Transfección celular por electroporación

La electroporación fue el método elegido para la transfección de las células SN4741, ya que previamente en el grupo se comprobó que éste era el método más eficaz de transfección si se comparaba con los agentes de transfección Lipofectamina y FuGene 6 o el método de fosfato cálcico.

Las células se tripsinizaron y contaron tal y como se ha descrito previamente. Tras una centrifugación se resuspendieron a razón de 8×10^6 de células por cada 200 μ l de medio completo enfriado previamente en hielo. Para cada punto experimental se añadieron 15 ng de esiRNA (MISSION® esiRNA, Sigma-Aldrich) a una cubeta de electroporación también enfriada previamente, a la cual se añadieron seguidamente los 200 μ l de la suspensión celular. Se sometió a las células a un único pulso eléctrico de 260V y 950 μ F (electroporador BIO-RAD) y las cubetas se volvieron a colocar en hielo. Posteriormente, las células transfectadas se llevaron a 10 ml de medio de crecimiento completo equilibrado a 37°C en una placa de 100 mm de diámetro. Tras 24 horas de incubación en condiciones de crecimiento (37°C, 5% CO₂, 95% HR), se cambió el medio y se trataron las células para continuar con el experimento.

2.3.3. Tratamientos

Las células se trataron siguiendo las condiciones mostradas en la Tabla 6. En los casos en los que se utilizó algún inhibidor, las células no se estimularon hasta acabar el tiempo de tratamiento correspondiente al inhibidor. Al término de los tratamientos se retiró el medio y las células se lavaron con 1X PBS antes de ser lisadas.

Tabla 6. Drogas y condiciones experimentales utilizadas para el tratamiento de las células.

Droga	Función	Tiempo de tratamiento	Concentración final
ATP	Agonista de receptores P2X	5 min	500 μ M
BzATP	Agonista específico del receptor P2X ₇	10 min	100 μ M
A-740003	Antagonista específico del receptor P2X ₇	30 min	100 nM
EGTA	Quelante del Ca ⁺² extracelular	30 min	2 mM
LY-294,002 hydrochloride	Inhibidor de PI3K	1 h	20 μ M
GF109203X hydrochloride	Inhibidor de PKC	1 h	1 μ M
Na₃O₄V	Inhibidor de tirosina fosfatasas	20 min	1 mM

2.4. Extracción total de proteínas

En aquellos casos en los que interesaba analizar el extracto total de proteínas, las células se trataron y lavaron como se ha explicado anteriormente, tras lo cual se lisaron en tampón RIPA (ver apartado 2.9). Se utilizaron 250 μ l de tampón para lisar un pocillo de una placa de 6 pocillos.

2.5. Ensayo de precipitación por afinidad (*Pull Down*)

Las células se trataron según lo descrito, y tras un lavado con 1X PBS, se recogieron en 250 μ l de tampón de lisis en el caso de aquellas células sembradas en placas de 6 pocillos y 500 μ l de tampón de lisis para las sembradas en placas de 100 mm. Los lisados se dejaron incubar en hielo durante 20 minutos tras los cuales se centrifugaron a 13000 r.p.m. a 4°C durante 10 minutos, recuperando el sobrenadante. 80 μ l de dicho sobrenadante

se guardaron como muestra del lisado total, y el resto se incubó con la resina de glutationa-sefarosa previamente unida a los dominios de las proteínas efectoras fusionadas con GST.

Para la preparación de la resina unida a los dominios de las proteínas efectoras fusionadas con GST, se procedió de la siguiente manera. La resina de glutationa-sefarosa (GE Healthcare) se equilibró con tampón de lisado centrifugando tres veces a 4000 r.p.m a 4°C durante 1 minuto. Estos lavados son importantes para eliminar el etanol de la suspensión en la que la resina viene embebida, ya que éste puede interferir en pasos posteriores. Por cada punto de análisis se utilizaron 50 µl de la suspensión. Una vez equilibrada la resina, se incubó durante 1 hora a 4°C en agitación orbital con la proteína recombinante que contenía el domino de unión de la proteína efectora fusionada con GST. Por cada punto de análisis se utilizaron 25 µg de proteína de fusión recombinante. La proteína de fusión recombinante unida a la resina se lavó tres veces como se ha descrito anteriormente y se incubó con los lisados celulares durante 45 minutos a 4°C en agitación orbital. Finalmente, tras lavar la resina tres veces más, los complejos proteicos unidos a la resina se eluyeron con tampón de carga 2X.

En la Figura 16 se presenta un diagrama general de esta técnica.

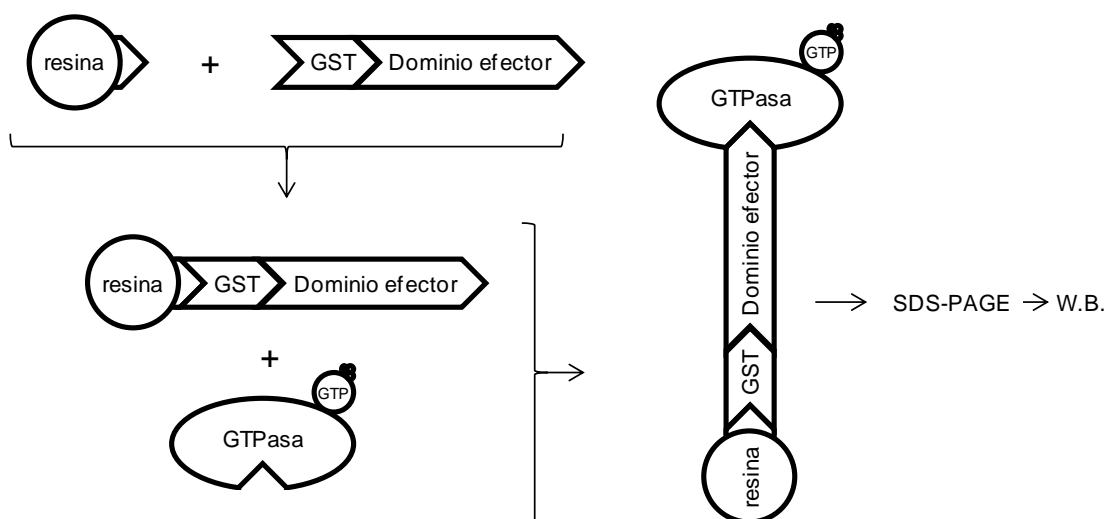


Figura 16. Diagrama general del ensayo de precipitación por afinidad de las GTPasas.

2.6. Separación de proteínas desnaturalizadas con SDS por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las muestras se migraron en geles de poliacrilamida con el fin de separar las proteínas según su peso molecular. Estos geles contienen dos fases, una fase superior denominada fase de concentración o *stacking*, donde se concentrará la muestra de proteínas, y una inferior conocida como fase de separación o *separating*, en la cual las proteínas se separarán en función de su tamaño. El porcentaje de poliacrilamida de la fase de concentración es siempre constante (5%), mientras que el porcentaje de la fase de separación varía dependiendo del tamaño de la proteína que se quiera separar: cuanto más pequeña sea la proteína mayor concentración de poliacrilamida necesitará el gel. Para la preparación del gel ver apartado 2.9.

Se añadió tampón de carga 2X a las muestras, tras lo cual fueron calentadas a 95°C antes de cargarlas en el gel de poliacrilamida. Junto con las muestras se cargó también un marcador de peso molecular (BenchMark Pre-Stained Protein Ladder, Life Technologies) para facilitar la identificación del tamaño de las proteínas visualizadas tras la inmunodetección. Las muestras se migraron en un sistema de electroforesis (MiniPROTEAN Tetra Cell Vertical Electrophoresis system, Bio-Rad) en tampón de electroforesis 1X (ver apartado 2.9) a un voltaje constante de 120 V hasta que el frente alcanzara el final del gel.

2.6.1. Análisis mediante Western blot

Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron desde el gel de poliacrilamida a una membrana de PVDF (polyvinylidene difluoride, Amersham Hybond-P, GE Healthcare). La membrana de PVDF ha de ser previamente activada sumergiéndola en metanol al 100% durante 10 sec. La transferencia se realizó en un sistema de transferencia (Mini Trans Blot Cell transfer system, BioRad) en tampón de transferencia 1X a un voltaje constante de 100 V durante 1 hora. La transferencia de las proteínas se verificó tiñendo la membrana con Ponceau S (Sigma-Aldrich), tras lo cual se lavó con tampón TBST (Tris Buffered Saline-Tween).

Posteriormente se bloqueó la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente en 5% de leche en polvo libre de grasa (Nestlé Sveltesse) diluida en TBST. El objetivo de este bloqueo es saturar los sitios no ocupados de la membrana y prevenir la posterior fijación no específica de los anticuerpos.

2.6.2. Inmunodetección

Con el fin de visualizar las proteínas de interés, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios indicados diluidos en 1% de la solución de bloqueo (leche en polvo libre de grasa) en agitación, a temperatura ambiente durante 1 hora, o a 4°C durante toda la noche. Tras esta incubación se lavaron las membranas con TBST realizando tres lavados de 5 minutos. A continuación se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el correspondiente anticuerpo secundario peroxidasa-conjugado diluido en TBST. Tanto los anticuerpos primarios como los secundarios se muestran en la Tabla 2. Para finalizar, se repitieron los lavados y la bandas inmunoreactivas se visualizaron por quimioluminiscencia en el ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad) utilizando el kit de ECL Clarity Western ECL Substrate kit (BioRad). Las cuantificaciones se realizaron por densitometría utilizando el software Quantity One software.

2.6.3. “Stripping” o decapado

Con objeto de reutilizar una membrana para detectar otra proteína de interés con otro anticuerpo primario, la membrana se lavó con TBST para eliminar los restos de ECL y se incubó en tampón de decapado (Restore Western Blot Stripping Buffer, Thermo Scientific) durante 15 minutos en agitación. Posteriormente la membrana se volvió a lavar con TBST, y se reinició el proceso de bloqueo e inmunobloteo siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

2.7. Análisis de viabilidad celular: ensayo MTT

La viabilidad celular fue cuantitativamente evaluada mediante el ensayo MTT. El MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) es una sal

de tetrazolio hidrosoluble de color amarillo que se reduce a formazán al ser metabolizado por las enzimas succinato-deshidrogenasas mitocondriales de las células viables, dando una coloración azul intensa insoluble en medio acuoso. El formazán se puede solubilizar mediante isopropanol y DMSO, y así ser medido por espectrofotometría, para extrapolar la viabilidad celular de las muestras.

Las células se sembraron por triplicado a razón de 30000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos. Al día siguiente se procedió al tratamiento de las células el cual se paró retirando el medio y lavando las células con PBS 1X. Con objeto de evitar la proliferación de las células durante el ensayo, se les añadió medio al 1% de FBS. Para este ensayo se utilizó el kit Cell Proliferation Kit I (MTT) de Roche. Siguiendo las indicaciones del fabricante, se añadieron 10 µl de reactivo MTT (MTT labeling reagent) sobre el medio recién renovado de cada pocillo. La placa se incubó a 37°C en 5% CO₂ durante 4h y la reacción se paró añadiendo a cada pocillo 100 µl de solución de solubilización del kit. Se dejó actuar durante toda la noche incubándolo en las condiciones de crecimiento (37°C, 5% CO₂) y al día siguiente se midió la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm en un lector de microplacas (Synergy™ HT Multidetector Microplate Reader, BIOTEK). Los valores obtenidos se transformaron en porcentajes dando el valor 100% de viabilidad a la absorbancia neta de las células control. El resto de valores correspondientes a los distintos tratamientos se presentan como porcentajes sobre el control.

2.8. Análisis estadístico

Los resultados se presentan como la media \pm SEM (error estándar de la media). La significancia de la diferencia entre dos grupos se determinó mediante un Test de Student de dos colas para muestras no pareadas. La probabilidad asociada a la prueba t se representa mediante asterisco según las siguientes equivalencias: Una * $p < 0.1$, ** $p < 0.05$ y *** $p < 0.01$.

2.9. Soluciones

TFB1

30 mM K Ac
50 mM MgCl₂
100 mM KCl
10mM CaCl₂
15% Glycerol

TFB2

10 mM sal sódica MOPS pH 7.0
75 mM CaCl₂
10 mM KCl
15% Glycerol

Tampón de lisis para proteínas recombinantes

50 mM Tris-HCl pH 8
50 mM NaCl
5 mM MgCl₂
1 mM DTT
1 mM PMSF

Tampón de lisado RIPA

50 mM Tris-HCl pH 7.4
150 mM NaCl
1% IGEPAL
0.25% Na-deoxycholate
1 mM EDTA
1 mM PMSF
1 mM Na₃VO₄
1 mM NaF
1 µg/ml Aprotinin
1 µg/ml Leupeptin

Tampón de lisis para Pull Down

10 mM Tris-HCl pH 7.6
150 mM NaCl
1% IGEPAL
10 mM MgCl₂
1mM PMSF

Tampón de carga 6X

350 mM Tris-HCl pH 6.8
34.4% Glycerol (v/v)
10% β-mercaptoethanol (v/v)
0.06% Bromophenol blue (w/v)

Gel de concentración (*Stacking*)

125 mM Tris-HCl pH 6.8

0.1% Sodium dodecyl sulfate (SDS)

0.1% Ammonium persulfate (APS)

0.2% N,N,N',N'-Tetramethyl-ethanediamine (Temed)

6% Acrylamide/bisAcrylamide

Gel de separación (*Separating*)

375 mM Tris-HCl pH 8.8

0.1% Sodium dodecyl sulfate (SDS)

0.1% Ammonium persulfate (APS)

0.1% N,N,N',N'-Tetramethyl-ethanediamine (Temed)

Acrylamide/bisAcrylamide (% variable)

Tampón de migración

0.25 mM Tris base

1.92 mM Glycine

1% SDS

Tampón de transferencia

120 mM Tris base

40 mM Glycine

20% Methanol

Tampón de lavado TBST

20 mM Tris-HCl pH 7.6

137 mM NaCl

0.5% Tween 20

Azul Coomassie

0.1% Brilliant Blue G

45% Methanol

45% H₂O,

10% Glacial Acetic Acid

Solución de desteñido

10% Methanol,

10% Glacial Acetic Acid

80% H₂O

VI. RESULTADOS

VI. RESULTADOS

La enfermedad de Parkinson (EP) se caracteriza por el deterioro gradual y progresivo de las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra* (SN) del cerebro. Sin embargo, el estudio de los mecanismos moleculares de esta enfermedad tanto en cultivos primarios mesencefálicos como en modelos animales, conlleva grandes dificultades técnicas, ya que, la SN se compone de una población celular muy heterogénea con un porcentaje muy reducido de neuronas dopaminérgicas. Para tratar de superar esta dificultad, Son y colaboradores establecieron como modelo *in vitro* una línea celular de neuronas dopaminérgicas procedentes de la SN de ratones embrionarios (Son et al., 1999). Dicha línea celular, la denominaron SN4741, y es la que se ha utilizado en el presente trabajo como modelo de estudio.

De hecho, Jun y colaboradores utilizando esta línea celular, demostraron que estas células respondían ante un estímulo purinérgico y además observaron que la muerte de las neuronas dopaminérgicas se veía acelerada por la activación del receptor purinérgico P2X₇ (Jun et al., 2007).

Nuestro objetivo en este trabajo ha consistido en desvelar los procesos moleculares de la señalización mediada por la activación de receptores purinérgicos en neuronas dopaminérgicas. Concretamente, focalizamos nuestro esfuerzo en el estudio de la señalización intracelular mediada por los receptores purinérgicos ionotrópicos en: 1) presencia de calcio extracelular y 2) ausencia de calcio extracelular.

1. SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR RECEPTORES PURINÉRGICOS EN PRESENCIA DE CALCIO EXTRACELULAR

Algunos modelos moleculares como el derivado de heroína 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydroxypyridine (MPTP), su ión aún más tóxico MPP+, o el análogo hidroxilado de la dopamina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) han servido para investigar en el complejo mecanismo molecular que cursa en la enfermedad de Parkinson. Así, se ha descrito que estos modelos son capaces de inducir daño celular en las neuronas dopaminérgicas (Przedborski and Jackson-Lewis, 1998; Zigmond and Keefe, 1998). Sin embargo, y a pesar de las diferencias mecánísticas que conducen a la muerte neuronal, ambas toxinas estimulan las cinasas activadas por mitógenos (Mitogen Activated Protein Kinases, MAPKs) (Kulich and Chu, 2001; Kuan and Burke, 2005; Zhu et al., 2007), así como, las cinasas reguladas por señales extracelulares (Extracellular Signal-Regulated Kinases, ERK1/2), las cuales parecen tener un papel importante en la regulación de las respuestas neuronales tanto fisiológicas como patológicas (Chu et al., 2004). En el citoplasma y las mitocondrias de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo de pacientes con la EP se han encontrado incrementos significativos de la forma fosforilada de ERK (p-ERK) (Zhu et al., 2002; Zhu et al., 2003).

Basados en estas investigaciones que relacionan directamente las células dopaminérgicas con la activación de ERK, nosotros planteamos que dicha fosforilación podría estar ocurriendo también en nuestro modelo celular en respuesta a una activación de los receptores purinérgicos. Con objeto de definir las condiciones de estimulación, se consideraron como punto de partida los tratamientos utilizados por Jun *et al.* (Jun et al., 2007), que demostraban que 3 mM de ATP durante 20 minutos producía una respuesta celular. Además decidimos incluir tiempos más cortos de tratamiento para comprobar si la señalización purinérgica también promovía una respuesta temprana en estas células. Así, se sembraron las células SN4741 en placas de 6 pocillos a razón de 75000 células por pocillo. Al día siguiente, se trataron con 3 mM de ATP durante 5, 10, 15 ó 20 minutos, dejando como control una muestra sin tratar tal y como se muestra en la Figura 17 A. Las células se lisaron en tampón RIPA,

se clarificaron los lisados por centrifugación y las proteínas de los lisados se separaron en geles de SDS-PAGE. Tras la migración y transferencia a una membrana de PVDF se procedió a realizar el *Western blot*. La membrana se incubó con el anticuerpo anti-phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) y tras el correspondiente *stripping*, se reincubó dicha membrana con el anticuerpo anti-p44/42 MAPK (ERK1/2). Tras la incubación con los anticuerpos secundarios correspondientes, la membrana se reveló con ECL. La estimulación purinérgica con 3 mM de ATP promueve la fosforilación de ERK1/2 con un pico máximo a los 5 minutos y va decayendo a partir de los 10 minutos siendo imperceptible a los 20 minutos (Figura 17 A).

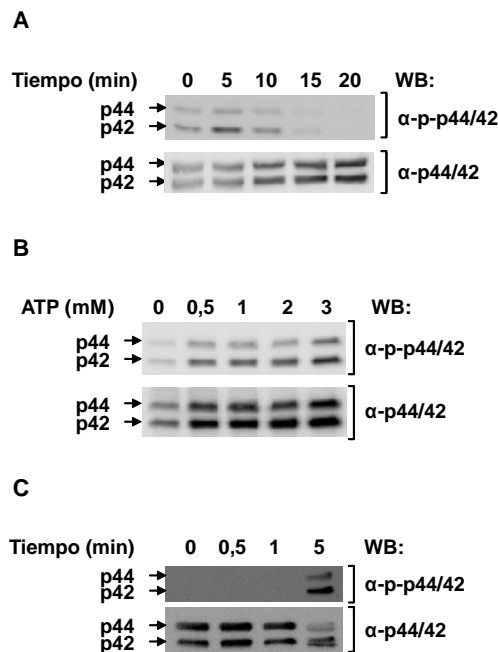


Figura 17. Efecto del ATP en la fosforilación de ERK1/2 (p44/42) en células SN4741. Las células SN4741 se estimularon con 3mM de ATP durante los tiempos indicados (A); concentraciones crecientes de ATP indicadas durante 5 minutos (B); o 0,5 mM de ATP durante los tiempos indicados (C). Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

A continuación examinamos qué rango de concentraciones de ATP promovían la fosforilación de ERK en las células SN4741. Para ello, las monocapas se trataron con concentraciones crecientes de ATP: 0; 0,5; 1; 2 ó 3 mM durante 5 minutos. Las muestras fueron procesadas de la misma manera que lo descrito en el párrafo precedente. Los resultados que obtuvimos mostraban que 0,5 mM de ATP aún siendo una concentración submaximal, era capaz de inducir una

respuesta maximal en cuanto a fosforilación de ERK, similar a la obtenida a 3 mM de ATP (Figura 17 B).

Finalmente, nos preguntamos cuan temprana podría ser la respuesta mediada por esta concentración submaximal de ATP. Para dar respuesta a esa cuestión, las células se trataron con 0,5 mM de ATP a 0, 0,5, 1 y 5 minutos y se procesaron como lo descrito anteriormente. Como se muestra en la Figura 17 C, la fosforilación de ERK no se visualizaba a tiempos de estimulación menores a 5 minutos.

Dado que la mayoría de resultados publicados hasta la fecha utilizan concentraciones altas de ATP y/o tratamientos más largos que 5 minutos para inducir la estimulación de la señalización purinérgica, los resultados presentados en la Figura 17 nos permitieron estandarizar el tratamiento (0,5 mM de ATP durante 5 minutos) para los experimentos que se llevaron a cabo posteriormente.

Nuestro siguiente objetivo consistió en averiguar qué miembros de la familia de los receptores purinérgicos eran los responsables de esta señalización. Para ello, y en base a que Jun y colaboradores habían mostrado que la respuesta celular de las neuronas dopaminérgicas ante el estímulo con ATP pasaba a través del receptor P2X₇ (Jun et al., 2007), nosotros utilizamos agonistas y antagonistas de este tipo de receptor.

El BzATP (2,3-O-(4-benzoylbenzoyl)-ATP) es un compuesto ampliamente utilizado para el estudio del receptor P2X₇ ya que es el agonista más eficaz para este receptor, siendo de 10 a 30 veces más potente que el ATP (North, 2002). El efecto de este compuesto en receptores purinérgicos de ratón no está muy estudiado, sin embargo, estudios realizados en otras especies demuestran que el BzATP no es un agonista exclusivo para el receptor P2X₇. Contrariamente a lo establecido por Wiley *et al.* (Wiley et al., 1996), quienes definían el BzATP como agonista específico para el receptor P2X₇, Bianchi y colaboradores (Bianchi et al., 1999) descubrieron que este compuesto era un agonista muy potente para los receptores hP2X₁ (pEC₅₀=8,74±0,1), hP2X₃ y

rP2X₃ (pEC₅₀=7,10±0,19 y pEC₅₀=7,50±0,35 respectivamente) y, aunque en menor medida, también activaba los receptores hP2X₄ (pEC₅₀=6,31±0,05) y rP2X₂ (pEC₅₀=5,26±0,06), además del hP2X₇ (pEC₅₀=5,33±0,02).

En cualquier caso, las células SN4741 se sembraron en placas de 6 pocillos y al día siguiente se estimularon con 0,5 mM de ATP como control o con 100 µM de BzATP durante 10 minutos. Las muestras se procesaron y el análisis por *Western blot* reveló que la fosforilación de ERK era similar en ambos casos (Figura 18 A panel superior calle 2 y 3 y barras 2 y 3 del histograma). Este resultado sugería que el ATP solamente activaba aquellos receptores capaces de unir también BzATP, reduciendo así los candidatos a mediar en la fosforilación de ERK a los receptores P2X₁, P2X₃, P2X₄, P2X₇ y P2X₂.

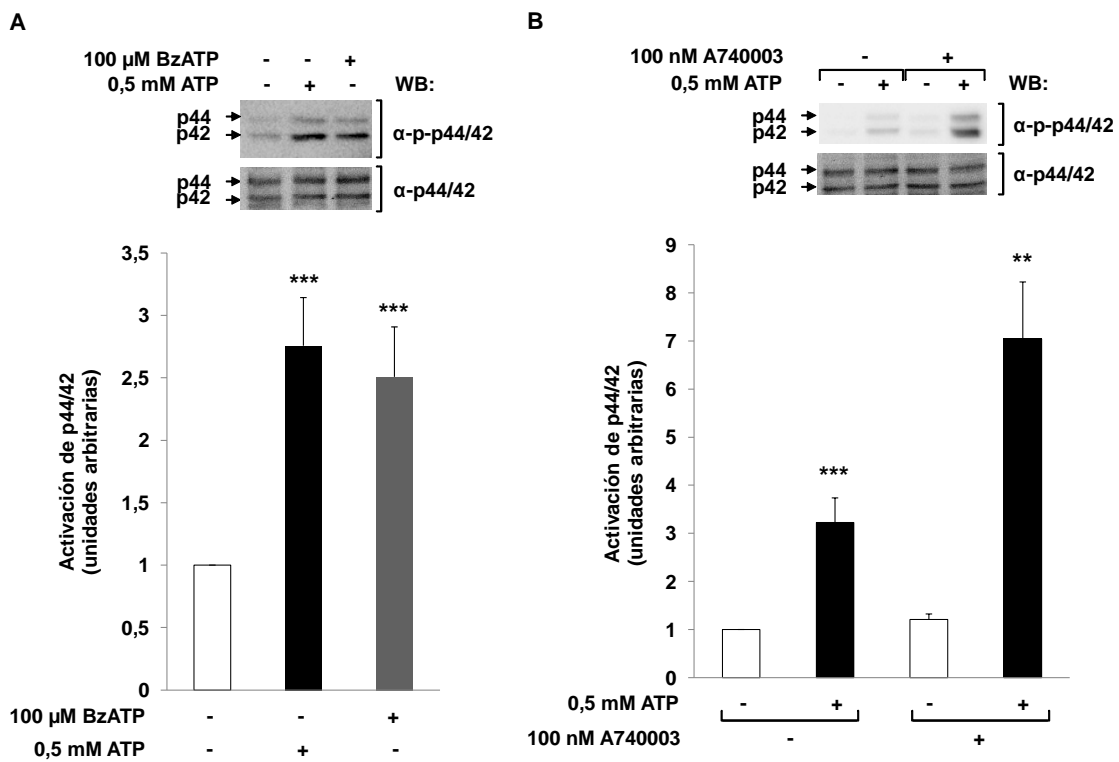


Figura 18. Fosforilación de Erk1/2 (p44/42) mediada por receptores purinérgicos independientes al P2X₇ en células SN4741. (A) Las células SN4741 se trataron con 0,5 mM de ATP durante 5 minutos, 100 µM de BzATP durante 10 minutos o se mantuvieron sin tratar. (B) Las células SN4741 se pretrataron con o sin 100 nM de A740003 durante 1 hora y posteriormente se estimularon o no con 0,5 mM de ATP durante 5 minutos. Los histogramas muestran las cuantificaciones de fosfo-ERK relativas al ERK total, basadas en la densitometría de los resultados obtenidos por *Western blot*. Los resultados son representativos de seis y tres experimentos independientes ±SEM respectivamente (**p<0.05; ***p<0.01).

Con objeto de verificar la hipótesis de que la ruta de señalización que controlaba la fosforilación de ERK se iniciaba a nivel del receptor P2X₇, nosotros utilizamos el antagonista A-740003, un compuesto altamente selectivo para el receptor P2X₇ en comparación a otros receptores P2 (Donnelly-Roberts and Jarvis, 2007). Para este experimento, las células se sembraron como hemos descrito previamente, y 24 horas después, se trataron o no con 100 μM de A-740003 durante 1 hora. Tras ese tiempo unas células se estimularon con 0,5 mM de ATP mientras se dejaron otras sin estimular. Tras procesar las muestras por SDS-PAGE seguidas de *Western blot* observamos que el antagonista no sólo no bloqueaba la activación de ERK, sino que además la potenciaba (Figura 18 B panel superior calle 4 y barra 4 del histograma). Esto parecía significar que la fosforilación de ERK estimulada por ATP no estaba mediada por el receptor P2X₇.

Debido a que la vía clásica de activación de ERK está mediada por la GTPasa Ras a través de la ruta Ras→Raf→MEK→ERK, nos planteamos averiguar cómo se encontraba el estado de activación de Ras, en las mismas condiciones estudiadas para ERK.

Así, tratamos las células con el agonista BzATP y el antagonista A-740003 del receptor P2X₇, al igual que se describe en los resultados representados en la Figuras 18. En este caso, sometimos los extractos celulares a un ensayo de precipitación por afinidad o *pull-down*, para lo cual incrementamos el número de células sembradas (3×10^6 de células por condición experimental). La Figura 19 (A, panel superior calle 2, barra 2 del histograma y B, panel superior calle 2, barra 2 del histograma) muestra que el ATP estimulaba la activación de la GTPasa Ras, al igual que lo hacía con ERK (Figura 18). El BzATP, se comportaba nuevamente como el ATP en la inducción de la activación de Ras, reafirmando la idea de que el ATP mediaba únicamente la activación de los receptores activados por BzATP en este sistema (Figura 19 A, panel superior calles 2 y 3, barras 2 y 3 del histograma). Sin embargo, los resultados obtenidos tras el tratamiento con el antagonista específico del P2X₇ diferían significativamente de lo esperado. El estado de activación de Ras no seguía el

mismo patrón que el que se observaba tras la fosforilación de ERK. En el caso de Ras, la activación disminuía tras el tratamiento con el A-740003 (Figura 19 B, panel superior calle 4, barra 4 del histograma). Esto sugiere que, al contrario que ERK, la activación de Ras estaría mediada por el receptor P2X₇. Sin embargo, el bloqueo de Ras inducido por el antagonista no es total, por lo que no se puede descartar la estimulación mediada por otros receptores purinérgicos.

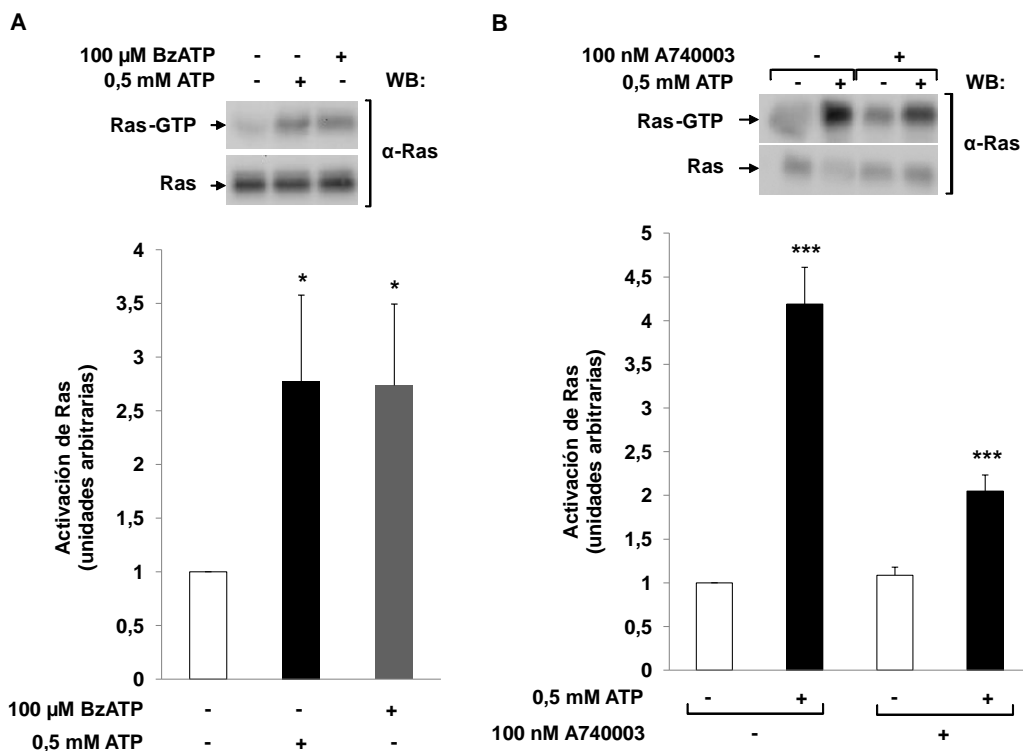


Figura 19. Activación de Ras mediada por el receptor P2X₇ en células SN4741. (A) Las células SN4741 se trataron con 0,5 mM de ATP durante 5 minutos, 100 μ M de BzATP durante 10 minutos o se mantuvieron sin tratar. (B) Las células SN4741 se trataron con o sin 100 nM de A740003 durante 1 hora previa a los 5 minutos de estimulación o no con 0,5 mM de ATP. Los extractos celulares fueron sometidos a un ensayo de *pull-down* y posterior visualización de la activación de Ras mediante *Western blot*. El Ras total sirvió como control de carga. Los histogramas muestran las cuantificaciones de Ras activado relativas al Ras total, basadas en la densitometría de los resultados obtenidos por *Western blot*. Los resultados son representativos de tres y dos experimentos independientes \pm SEM respectivamente (* p <0.1; *** p <0.01).

Los resultados del análisis de la activación de Ras nos podían dar también una idea de lo que podría estar sucediendo con ERK, y por qué aumentaba su activación mediada por ATP al utilizar el antagonista del P2X₇ (Figura 18 B, panel superior calle 4, barra 4 del histograma). Como hemos observado en

nuestros resultados, el ATP es capaz de unirse al P2X₇ en este sistema, ya que, a pesar de no señalar hacia ERK, esta unión es necesaria para activar a Ras. Por ello, postulamos que al utilizar el antagonista A-740003, estábamos evitando la unión de ATP al receptor P2X₇ y por tanto, favoreciendo la unión de más moléculas de ATP a aquellos receptores que señalan hacia ERK, promoviendo así una mayor activación de la cinasa.

Ras es probablemente la GTPasa de la superfamilia de pequeñas GTPasas más ampliamente estudiada, y dentro de este área de conocimiento, encontramos varios análisis de la relación de Ras con otras GTPasas de la misma superfamilia. Así, se conoce por ejemplo la necesidad de Ras en la activación de Rap1 mediada por Epac2 (Liu et al., 2008) o la cooperación de las subfamilias Ras y Rho a través de diferentes vías de señalización (Bar-Sagi and Hall, 2000; Caloca et al., 2003; Zugaza et al., 2004). En base a esto y teniendo en cuenta que habíamos observado una activación de Ras ante el estímulo purinérgico, planteamos analizar el estado de activación de la GTPasa de la misma familia, Rap1, y las GTPasas de la familia Rho: RhoA, Rac1 y Cdc42.

Para ello, se sembraron 3×10^6 de células por punto de análisis las cuales fueron tratadas o no con ATP durante 5 minutos. Tras someter los extractos a un ensayo de *pull-down*, los resultados se visualizaron por *Western blot*. Como se muestra en la Figura 20, ninguna de las cuatro GTPasas analizadas Rap1 (A), Rac1 (B), RhoA (C) y Cdc42 (D) se activaban a este tiempo tras la estimulación con ATP.

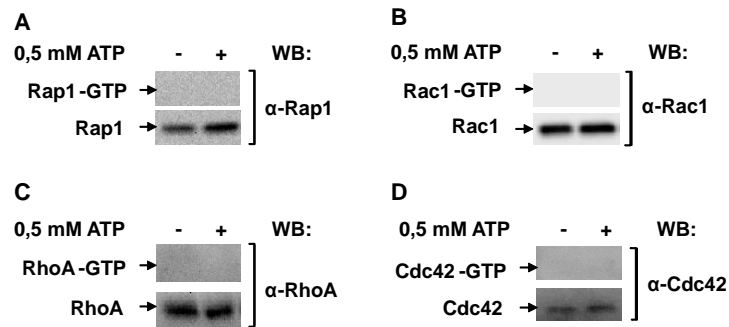


Figura 20. Estado de activación de las GTPasas de la superfamilia Ras mediado por ATP en células SN4741. Las células SN4741 se trataron o no con 0,5 mM de ATP durante 5 minutos. Los extractos celulares fueron sometidos a un ensayo de *pull-down* y posterior visualización de la activación de Rap1 (A), Rac1 (B), RhoA (C) y Cdc42 (D) mediante *Western blot*. El Rap1, Rac1, RhoA y Cdc42 total sirvió como control de carga respectivamente. Los resultados son representativos de cuatro experimentos independientes.

Los resultados parecían indicar que sólo Ras se veía afectada por la acción del ATP (Figuras 18 A y 19 A), por lo que procedimos a caracterizar el GEF responsable de la activación de Ras observada. RasGRF1 es uno de los GEFs para Ras, que se encuentra altamente expresado en el sistema nervioso central (Sturani et al., 1997). Nuestro interés en este GEF radica en su capacidad de transformar un incremento del calcio intracelular en una activación de Ras. Dicho efecto está mediado por la calmodulina, proteína que tras captar el calcio, se une a la región IQ de RasGRF1, activando su función de GEF para Ras (Farnsworth et al., 1995; Tian and Feig, 2006). De esta manera, RasGRF1 podría ser un candidato potencial a intermediar entre los receptores ionotrópicos P2X, los cuales favorecen el flujo de calcio al interior celular, y la GTPasa Ras.

Es por esto que nos propusimos examinar si RasGRF1 mediaba la activación de Ras. Para ello, sobreexpresamos no solo la forma salvaje de RasGRF1, sino también su forma mutada RasGRF1 mut IQ (Farnsworth et al., 1995) en las células HEK 293T. Estas células no expresan RasGRF1, por lo que consideramos que el efecto de la sobreexpresión de RasGRF1 sería específico, sin interferencias de las proteínas endógenas.

Estas células se sembraron en placas de 6 pocillos y se transfectaron con vector vacío; con el receptor P2X₇, que tampoco lo expresan; o se cotransfectaron con el receptor P2X₇ y la forma salvaje de RasGRF1; o el receptor y el mutante RasGRF1 mut IQ. 48 horas después de la transfección las células se estimularon o no con ATP y se realizó un ensayo de *pull-down* para determinar el estado de activación de Ras. Los extractos celulares también se sometieron al análisis de expresión de las proteínas transfectadas para comprobar su nivel de expresión.

Tal y como se muestra en la Figura 21, se observó un aumento significativo de la activación de Ras en presencia de RasGRF1 wt (comparar panel superior calles 5 y 6 con 1 y 2, barras 5 y 6 con 1 y 2 del histograma). Esta activación se daba tanto en las muestras estimuladas (panel superior calle 5, barra 5 del histograma) como en las no estimuladas (panel superior calle 6, barra 6 del histograma), probablemente debido a que la propia sobreexpresión del GEF provoca la activación en ausencia de estímulo. Sin embargo, la expresión de la forma mutada de RasGRF1 no indujo la activación de Ras ni siquiera en las muestras estimuladas con ATP (panel superior calle 8, barra 8 del histograma), lo cual sugería que la unión de calmodulina a RasGRF1 era necesaria para la correcta transmisión de la señal.

Con el objetivo de enlazar la activación de Ras con la estimulación de receptores ionotrópicos, quisimos comprobar la necesidad de la unión de calmodulina al calcio internalizado a través de los receptores. Para ello, se cotransfectaron el receptor P2X₇ y la forma salvaje de RasGRF1 junto con un mutante de calmodulina (CaM mut) incapaz de unir calcio. Esta transfección mostró que aunque se inducía un aumento de la activación de Ras con respecto a las muestras control (Figura 21, comparar barras 11 y 12 con 1 y 2), dicha activación era significativamente menor que en las células transfectadas con P2X₇ y RasGRF1 wt pero sin CaM mut (Figura 21, comparar panel superior calles 11 y 12 con 5 y 6, barras 11 y 12 con 5 y 6 del histograma), desvelando la importancia de la unión de calcio en el sistema.

Con todo ello, estos resultados proponen la vía calcio/calmodulina/RasGRF1 como eje de la activación de Ras en este sistema celular.

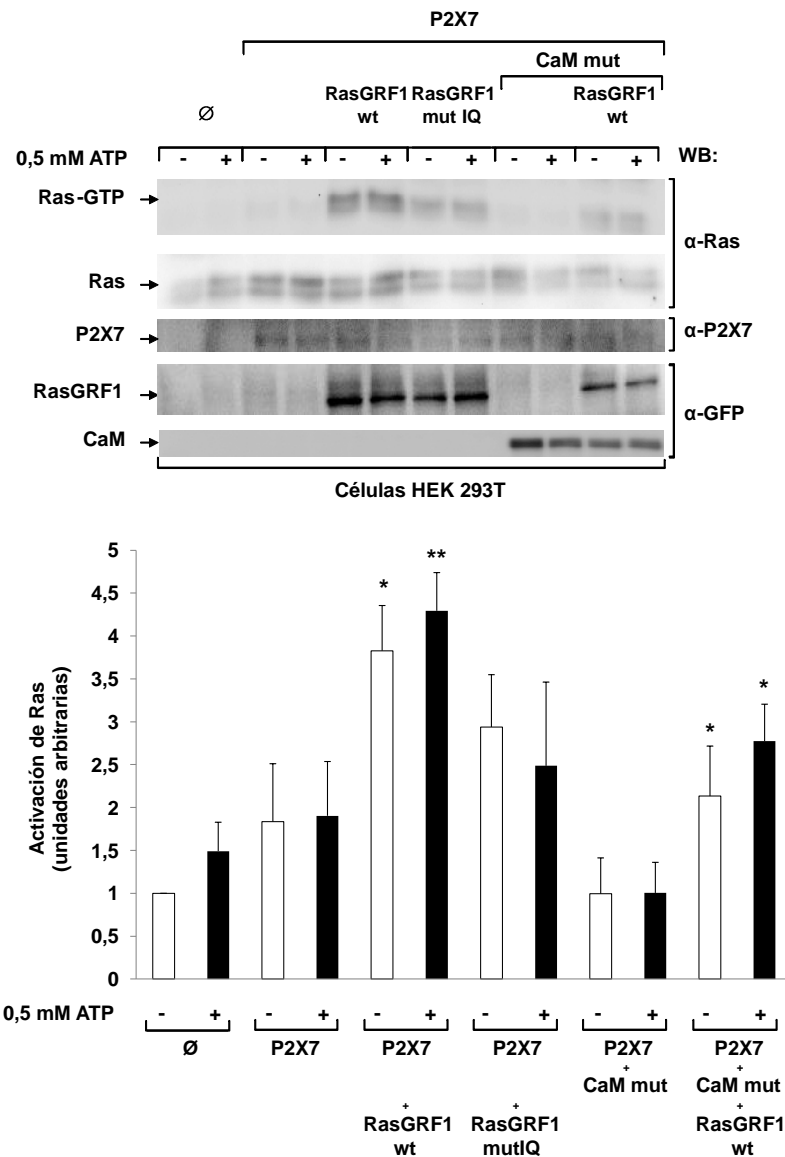


Figura 21. Implicación de la ruta Ca^{2+} /CaM/RasGRF1 en la activación de Ras en células HEK 293T. Las células HEK 293T se transfectaron con los plásmidos vector vacío:pCELLF-HA-P2X₇;pEGFP-RasGRF1wt;pEGFP-RasGRF1mutIQ;pcDNA3YFP-CaMmut en una proporción 1:1:1:1. 48 horas post-transfección, se trataron o no con 0,5 mM de ATP durante 5 minutos. Los extractos celulares fueron sometidos a un ensayo de *pull-down* y posterior visualización de la activación de Ras mediante *Western blot*. El Ras total sirvió como control de carga. Los paneles inferiores muestran los controles de transfección de P2X₇, RasGRF1 y CaM. El histograma muestra las cuantificaciones de Ras activado relativas al Ras total, basadas en la densitometría de los resultados obtenidos por *Western blot*. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes \pm SEM (* p <0.1; ** p <0.05).

Para continuar descifrando la ruta de señalización que conducía a la activación de Ras, procedimos a estudiar una de las grandes familias de serina/treonina cinasas implicadas en la señalización temprana, como son las PKCs. Hace una década, diversos estudios comenzaron a establecer una relación entre las PKCs y la enfermedad de Parkinson (Craig et al., 2001; Kaul et al., 2003; Yang et al., 2004) lo cual nos llevó a pensar que esta familia de serina/treonina cinasas podía estar jugando un papel en nuestra ruta de estudio. Para comprobarlo, utilizamos el inhibidor de amplio espectro de PKCs, GF109203X. Las células SN4741 se pretrataron con dicho compuesto durante 1 hora y posteriormente se estimularon con ATP, tras lo cual se prepararon los lisados para un ensayo de *pull-down*. La implicación de las PKCs en la activación de la GTPasa Ras fue determinada mediante *Western blot*. Este ensayo mostró la activación habitual de Ras tras la estimulación con ATP (Figura 22, panel superior calle 2, barra 2 del histograma), que sorprendentemente aumentaba de manera significativa en presencia de GF109203X (Figura 22 comparar, panel superior calles 4 con 2, barras 4 con 2 del histograma). Dicho resultado ponía de manifiesto que las PKCs estaban controlando la activación de Ras mediada por los receptores purinérgicos. Cuando se inhibía la actividad de las PKCs se liberaba ese control y aumentaban los niveles de Ras activo.

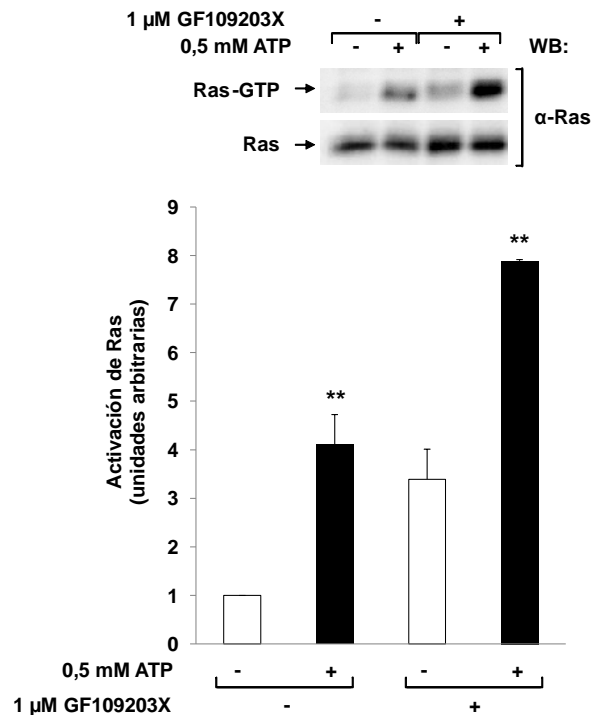


Figura 22. Efecto de las PKCs en la activación de Ras inducida por ATP en células SN4741. Las células SN4741 se pretrataron o no con 1 μM de GF109203X durante 1 hora y posteriormente se estimularon o no con 0,5 mM de ATP durante 5 minutos. Los extractos celulares fueron sometidos a un ensayo de *pull-down* y posterior visualización de la activación de Ras mediante *Western blot*. El Ras total sirvió como control de carga. El histograma muestra las cuantificaciones de Ras activado relativas al Ras total, basadas en la densitometría de los resultados de obtenidos por *Western blot*. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes $\pm\text{SEM}$ (** $p < 0.05$).

A pesar de la posibilidad de existir otros receptores purinérgicos implicados, los resultados presentados en la Figura 19 apuntaban al receptor P2X₇ como principal punto de partida de ruta de activación de Ras mediada por el estímulo de ATP. La activación de este receptor ha sido ampliamente asociada a una inducción de muerte en diferentes tipos celulares (Ferrari et al., 1999; Inoue, 2002; Le Feuvre et al., 2002; Le Stunff et al., 2004). Además, Jun y colaboradores describen una muerte necrótica mediada por el receptor P2X₇ tras la estimulación con ATP en la línea celular SN4741 (Jun et al., 2007). Esto hizo que planteáramos la posibilidad de que se estuviera induciendo muerte celular en nuestro sistema. Con objeto de aclarar este punto, nosotros procedimos a medir viabilidad celular mediante un ensayo de MTT.

Este ensayo se fundamenta en la cuantificación de la actividad enzimática mitocondrial para diferenciar entre las células viables y las que no lo son. Así, se trataron o no las monocapas celulares con ATP y se procedió a medir la actividad mitocondrial. Los resultados presentados en el histograma de la Figura 23 muestran que el ATP (0,5 mM ATP) no modifica la viabilidad de las células SN4741.

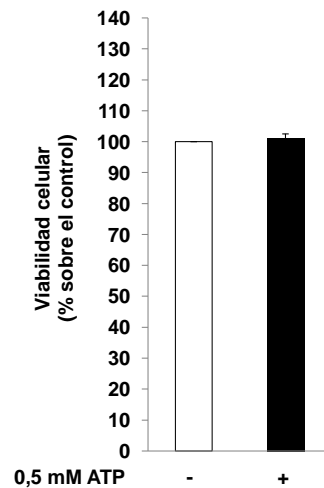


Figura 23. Efecto del ATP en la viabilidad de las células SN4741. Las células SN4741 se trataron o no con 0,5 mM de ATP durante 5 minutos y se sometieron al ensayo de viabilidad celular MTT. Los valores se presentan como porcentajes sobre el control sin tratar. Los resultados son representativos de nueve experimentos independientes \pm SEM.

Estos resultados podrían ser contradictorios respecto a los resultados obtenidos por otros autores citados previamente. Sin embargo, ha de tenerse en cuenta que en dichos ensayos la estimulación se ha llevado a cabo con concentraciones de ATP 6 o más veces superiores a la que nosotros hemos utilizado, y a tiempos más largos (de entre 20 minutos y varias horas). De hecho, experimentos de viabilidad celular realizados con distintas concentraciones de ATP durante 5 minutos, confirman que el ATP provoca una muerte en esta línea celular, pero que no obstante, son necesarias concentraciones mínimas de 3 mM para apreciar dicho efecto (Figura 24).

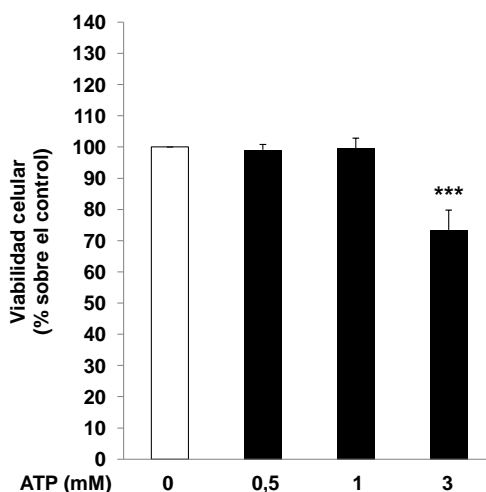


Figura 24. Efecto de concentraciones crecientes de ATP en la viabilidad de las células SN4741. Las células SN4741 se trataron o no con 0,5 mM, 1 mM y 3 mM de ATP durante 5 minutos y se sometieron al ensayo de viabilidad celular MTT. Los valores se presentan como porcentajes sobre el control sin tratar. Los resultados son representativos de cinco experimentos independientes \pm SEM (***) $p < 0.01$.

Como se ha mencionado anteriormente, la familia de los receptores purinérgicos ionotrópicos son receptores capaces de funcionar como canales iónicos. Sin embargo, el flujo de iones no es la única consecuencia de la activación de estos receptores. En 2001, Kim *et al.*, mediante un interesante estudio proteómico, desvelaron la asociación del receptor P2X₇ con proteínas tales como lamina α 3, integrina β 2, PTPR β y otras ocho proteínas intracelulares (α - y β -actina, supervilina, Hsp90, Hsc71, Hsp70, PI4K y MAGUK) (Kim *et al.*, 2001). En este mismo estudio, los autores describen la actividad basal de una fosfatasa que estaría constitutivamente defosforilando al receptor P2X₇, y que además, incrementaría su actividad tras la activación de dicho receptor.

Esta regulación por defosforilación del receptor hizo que planteáramos la hipótesis de un posible papel de las tirosina fosfatasas en la regulación de la señalización mediada por los receptores purinérgicos en nuestro sistema celular. Por ello, procedimos a realizar un experimento en el que se analizaba la activación tanto de Ras como de ERK previa inhibición de las tirosina fosfatasas y posterior estimulación del sistema con ATP. Las células se pretrataron con 1 mM de Na₃O₄V durante 20 minutos y posteriormente se

estimularon con 0,5 mM de ATP durante 5 minutos al cabo de los cuales se lisaron y los lisados se sometieron a un ensayo de *pull-down* para examinar el estado de activación de la GTPasa Ras. Las proteínas del precipitado se separaron por SDS-PAGE seguidas de *Western blot* y las bandas inmunorreactivas se visualizaron con anticuerpos específicos como se indica. La Figura 25 muestra, como cabía esperar, que el ATP estimulaba la activación de Ras (Figura 25 A, panel superior calle 2, barra 2 del histograma) y la fosforilación de ERK (Figura 25 B, panel superior calle 2, barra 2 del histograma). En esta misma línea, la inhibición farmacológica de las tirosina fosfatasas con $\text{Na}_3\text{O}_4\text{V}$ no modificaba ni la activación de Ras ni la de ERK mediada por ATP (Figura 25 A, panel superior línea 4, barra 4 del histograma y Figura 25 B panel superior línea 4, barra 4 del histograma). Sin embargo, en ausencia de estímulo, el bloqueo de las tirosina fosfatasas favorecía de manera significativa la activación tanto de Ras como de la fosforilación de ERK (Figura 25 A, panel superior calle 3, barra 3 del histograma y Figura 25 B panel superior calle 3, barra 3 del histograma), algo parecido a lo que ocurría cuando bloqueábamos la actividad de las PKCs (Figura 22).

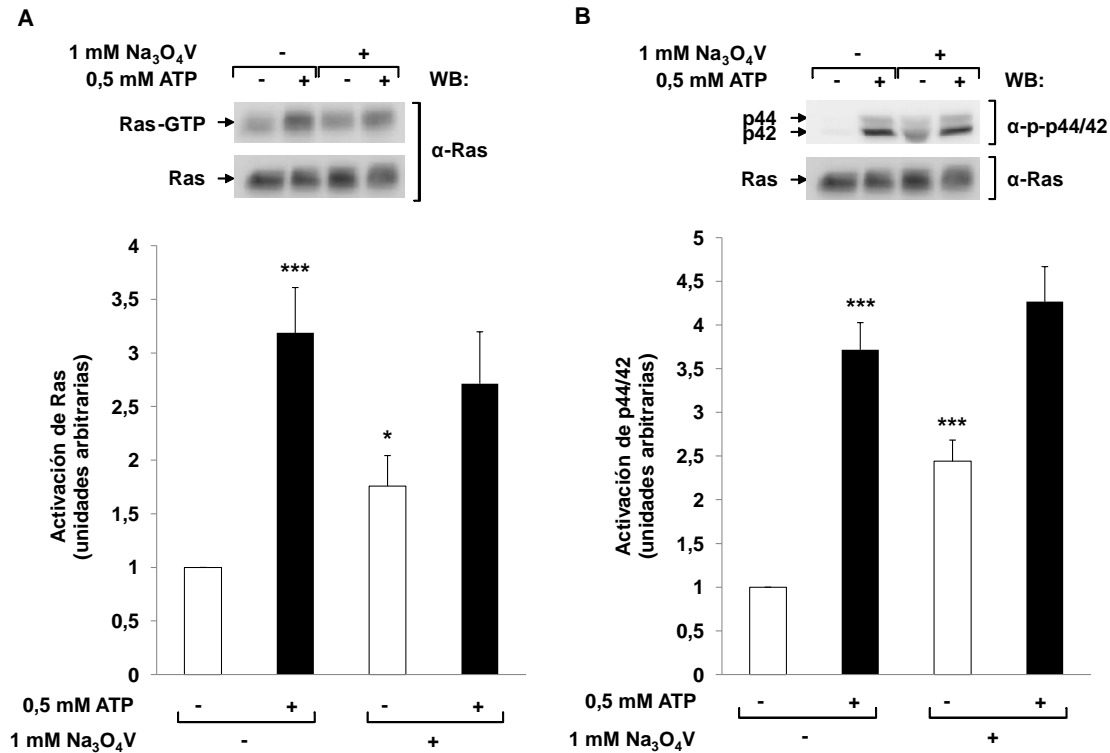


Figura 25. Implicación de las tirosina fosfatasas en la activación de Ras y ERK1/2 (p44/42) mediada por ATP en células SN4741. Las células SN4741 se pretrataron o no con 1 mM de Na₃O₄V durante 20 minutos y posteriormente se estimularon o no con 0,5 mM de ATP durante 5 minutos. Los extractos celulares fueron sometidos a un ensayo de *pull-down* y posterior visualización de la activación de Ras (A) y ERK1/2 (p44/42) (B) mediante *Western blot*. El Ras total sirvió como control de carga. Las gráficas muestran las cuantificaciones de Ras activado (A) y ERK1/2 (p44/42) activado (B) relativas al Ras total, basadas en la densitometría de los resultados obtenidos por *Western blot*. Los resultados son representativos de tres y dos experimentos independientes \pm SEM respectivamente (***) $p < 0.01$.

En paralelo a los experimentos descritos en la Figura 25, se llevaron a cabo otros ensayos encaminados a descifrar el papel de las tirosina fosfatasas sobre la viabilidad celular medida mediante ensayos de MTT. La inhibición de las tirosina fosfatasas potenciaba la viabilidad de las células SN4741, la cual se incrementaba en presencia de estímulo (25-30%) (Figura 26, barras 3 y 4 del histograma).

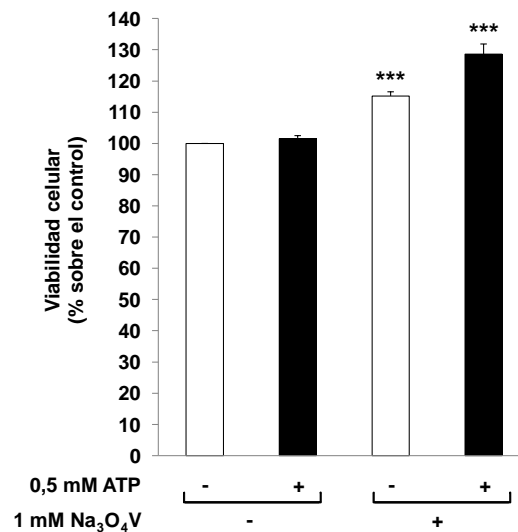


Figura 26. Implicación de las tirosina fosfatasas en la viabilidad de las células SN4741. Las células SN4741 se pretrataron o no con 1 mM de Na₃O₄V durante 20 minutos y posteriormente se estimularon o no con 0,5 mM de ATP durante 5 minutos, tras lo cual se sometieron al ensayo de viabilidad celular MTT. Los valores se presentan como porcentajes sobre el control sin tratar. Los resultados son representativos de cuatro experimentos independientes \pm SEM (***) $p < 0.01$.

Kim *et al.* han descrito que las tirosina fosfatasas participan en la señalización mediada por los receptores purinérgicos en neuronas dopaminérgicas (Kim *et al.*, 2001), existiendo una asociación física entre el receptor purinérgico P2X₇ y la tirosina fosfatasa beta (PTPR β). En base a estos resultados, nosotros decidimos comprobar si el efecto observado en el experimento anterior podía explicarse por la acción de la tirosina fosfatasa beta (PTPR β). Para ello, se transfectaron las células SN4741 por electroporación con un esiRNA que silenciaba específicamente dicha tirosina fosfatasa. Al cabo de 24 horas, se estimularon o no con ATP y se procedió a examinar la activación de Ras y de ERK1/2. Los resultados mostraron un perfil de activación de Ras similar al observado en la Figura 9: el silenciamiento de PTPR β no suponía cambio alguno en la activación mediada por ATP (Figura 27 A comparar, panel superior calles 2 y 4, barras 2 y 4 del histograma), pero sí en la actividad de Ras en ausencia de estímulo (Figura 27 A comparar, panel superior calles 1 y 3, barras 1 y 3 del histograma). Sorprendentemente, los resultados correspondientes a la activación de ERK desvelaron una diferencia significativa entre las muestras silenciadas y las muestras control activadas con ATP (Figura 27 B comparar, panel superior calles 2 y 4, barras 2 y 4 del histograma), teniendo la PTPR β

una función inhibitoria de la fosforilación de ERK. Además, dicha actividad inhibitoria, aunque en menor medida, se apreciaba también en condiciones basales (Figura 27 B comparar, panel superior calles 1 y 3, barras 1 y 3 del histograma).

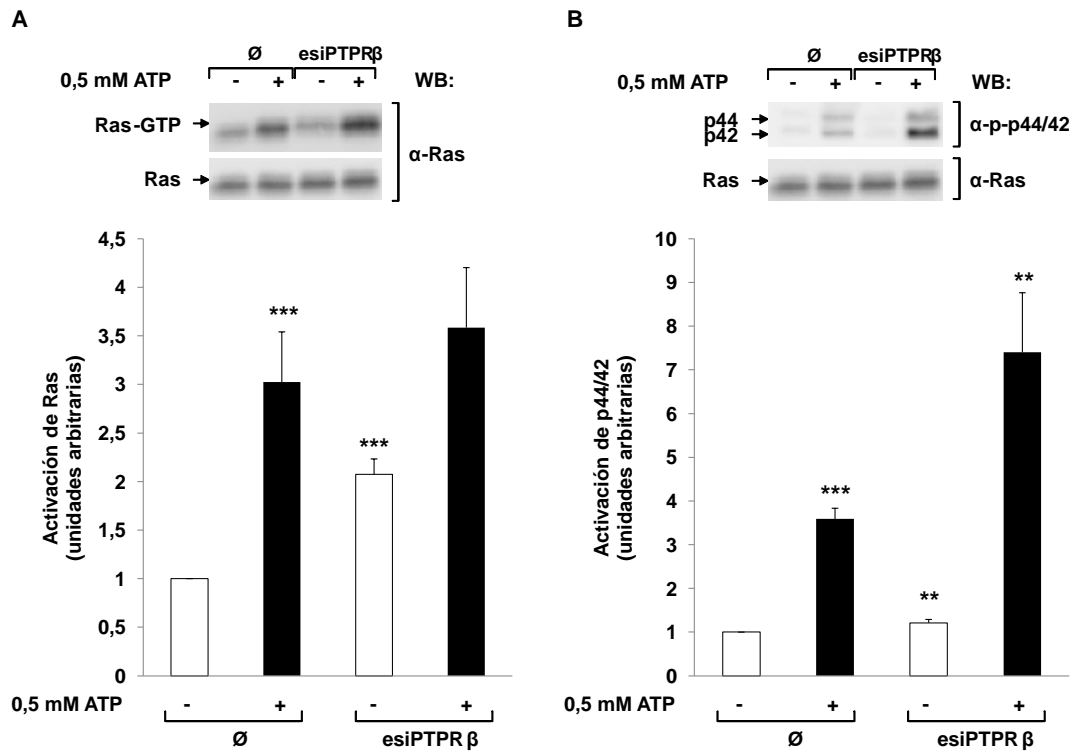


Figura 27. Efecto de la PTPRβ en la activación de Ras y ERK1/2 (p44/42) mediada por ATP en células SN4741. Las células SN4741 se transfectaron con esiPTPRβ o vector vacío y 24 horas post-transfección se trataron o no con 0,5 mM de ATP durante 5 minutos. Los extractos celulares fueron sometidos a un ensayo de *pull-down* y posterior visualización de la activación de Ras (A) y ERK1/2 (p44/42) (B) mediante *Western blot*. El Ras y ERK total sirvieron como control de carga. Los histogramas muestran las cuantificaciones de Ras activado (A) y ERK1/2 (p44/42) activado (B) relativas al Ras total, basadas en la densitometría de los resultados obtenidos por *Western blot*. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes \pm SEM (** $p < 0.05$; *** $p < 0.01$).

En cualquier caso, tal y como se hizo anteriormente con el inhibidor de las tirosina fosfatasa, se realizó un experimento paralelo al de la activación de Ras y ERK para estudiar el efecto, en este caso de la PTPRβ, sobre la viabilidad celular. Tras transfectar y tratar las células, se sometieron a un ensayo de MTT que nuevamente puso de manifiesto la participación de la PTPRβ en este sistema. La estimulación de ATP no varía la viabilidad celular (Figura 28, panel superior calle 2, barra 2 del histograma). Sin embargo, el

silenciamiento de la PTPR β potencia la viabilidad aun en ausencia de estímulo (Figura 28, panel superior calle 3, barra 3 del histograma). Aunque la tendencia es igual que la observada al utilizar el Na₃O₄V, el efecto del esiRNA es significativamente menor. No obstante, el esiRNA no afecta a toda la población celular sino a las células que se hayan transfectado y además, el efecto en las células transfectadas no es comparable al del inhibidor farmacológico ya que el esiRPTP β solamente silencia una de las tirosina fosfatasas, la PTPR β .

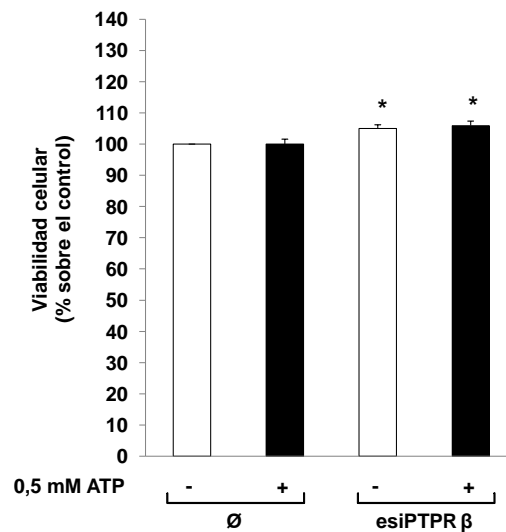


Figura 28. Implicación de la PTPR β en la viabilidad de las células SN4741. Las células SN4741 se transfectaron con esiPTP β o vector vacío y 24 horas post-transfección se trataron o no con 0,5 mM de ATP durante 5 minutos, tras lo cual se sometieron al ensayo de viabilidad celular MTT. Los valores se presentan como porcentajes sobre el control sin tratar. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes \pm SEM (* p <0.1).

2. SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR RECEPTORES PURINÉRGICOS EN AUSENCIA DE CALCIO EXTRACELULAR

Una de las funciones más importantes de los receptores purinérgicos es su papel como canales iónicos. Gracias a esta función, favorecen el flujo de iones a través de la membrana plasmática, capaz de desencadenar la señalización intracelular. Así, iones como el calcio pueden internalizarse mediante la activación de los receptores purinérgicos y jugar un papel como segundos mensajeros intracelulares. Para comprobar si este flujo y efecto intracelular se daba en nuestro sistema celular, decidimos estudiar las rutas de señalización mediadas por la activación de receptores purinérgicos en ausencia de calcio extracelular. Estas condiciones se lograban a través de la quelación del calcio extracelular con EGTA.

Nuestro primer objetivo se centró en comprobar si con estas nuevas condiciones se seguía dando una activación de las cinasas ERK1/2 o si por el contrario, la falta de calcio evitaba su fosforilación. Para ello, se sembraron las células y se trataron primeramente con EGTA durante media hora previa a la estimulación con ATP. Las muestras celulares se lisaron y los lisados se centrifugaron y procesaron. Los resultados que obtuvimos mostraban que ERK1/2 se fosforilaba tras la estimulación de los receptores purinérgicos con ATP en ausencia de calcio extracelular (Figura 29).

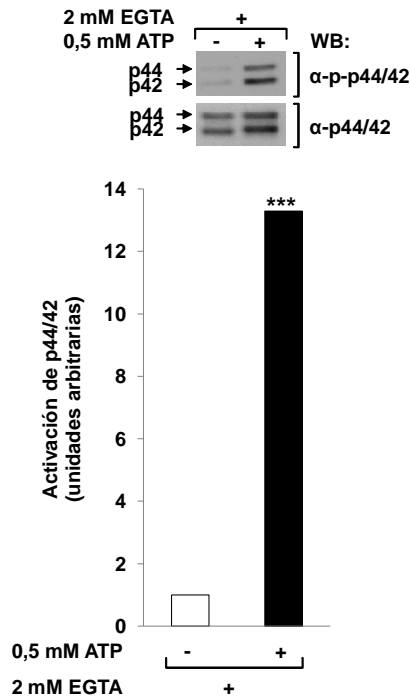


Figura 29. Activación de Erk1/2 (p44/42) mediada por receptores purinérgicos en células SN4741 en ausencia de calcio extracelular. El calcio extracelular se queló mediante el tratamiento con 2 mM de EGTA durante 30 minutos y posteriormente se estimularon o no con 0,5 mM de ATP durante 5 minutos. El histograma muestra las cuantificaciones de fosfo-ERK relativas al ERK total, basadas en la densitometría de los resultados obtenidos por *Western blot*. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes \pm SEM (***) $p < 0.01$.

Con objeto de comprobar cómo se encontraba Ras en estas condiciones, analizamos el estado de activación de esta GTPasa en ausencia de calcio extracelular. Las células se sembraron y se trataron con EGTA y posteriormente se estimularon con ATP. Tras ésto, se recogieron los lisados celulares y se sometieron a un ensayo de *pull-down* para el estudio de la activación de la GTPasa. Los resultados se correlacionaban con el estado de fosforilación de ERK: la ausencia de calcio facilitaba una gran activación de Ras mediada por ATP (Figura 30).

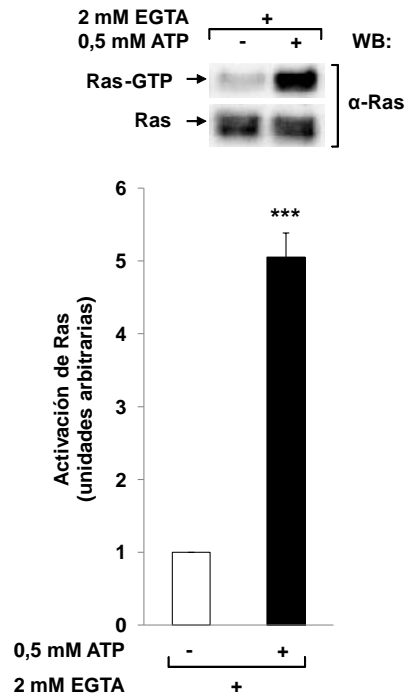


Figura 30. Activación de Ras mediada por receptores purinérgicos en células SN4741 en ausencia de calcio extracelular. El calcio extracelular de las células sembradas se queló mediante el tratamiento con 2 mM de EGTA durante 30 minutos y posteriormente se estimularon o no con 0,5 mM de ATP durante 5 minutos. Los extractos celulares fueron sometidos a un ensayo de *pull-down* y posterior visualización de la activación de Ras mediante *Western blot*. El Ras total sirvió como control de carga. La gráfica muestra las cuantificaciones de Ras activado relativas al Ras total, basadas en la densitometría de los resultados obtenidos por *Western blot*. Los resultados son representativos de seis experimentos independientes \pm SEM (***) $p < 0.01$).

El estudio comparativo de la activación de ERK y Ras en presencia vs. ausencia de calcio extracelular mostraba una mayor activación de ambas proteínas al quelar el calcio (Figura 31 A y B, comparar panel superior calles 4 y 2, barras 4 y 2 del histograma), lo cual era indicativo de una posible función inhibitoria, aunque no necesariamente directa, de dicho ion sobre Ras y ERK.

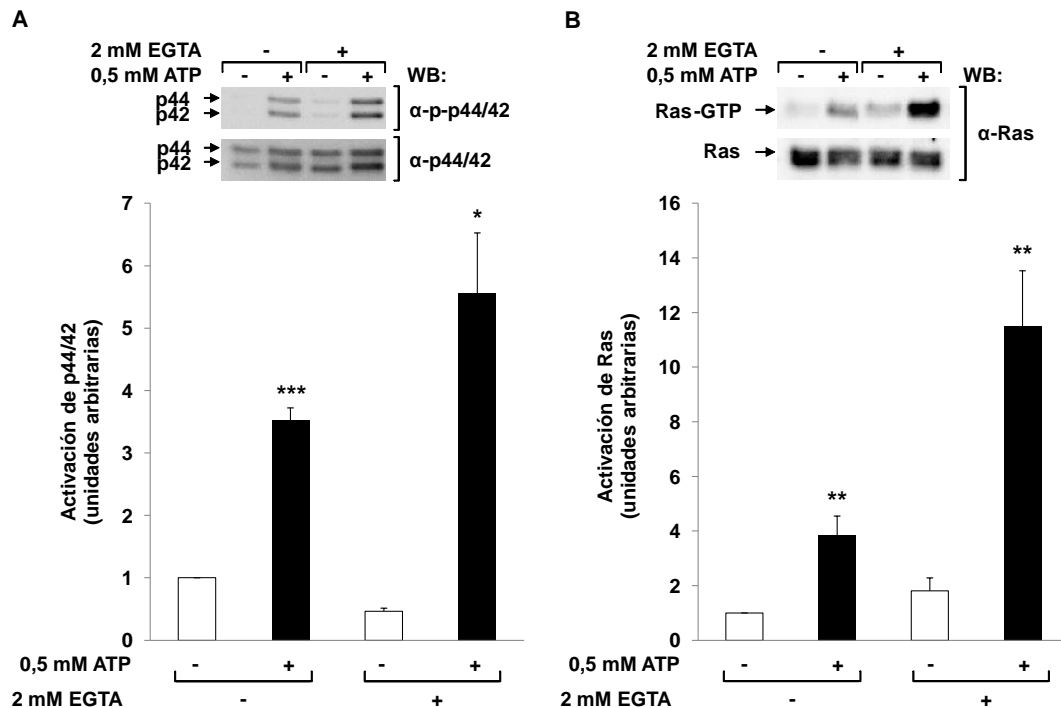


Figura 31. Activación de ERK y Ras mediada por receptores purinérgicos en células SN4741 en presencia y ausencia de calcio extracelular. El calcio extracelular de las células sembradas se queló mediante el tratamiento con 2 mM de EGTA durante 30 minutos o se dejaron sin tratar. Posteriormente se estimularon o no con 0,5 mM de ATP durante 5 minutos. Los extractos celulares fueron sometidos a un ensayo de *pull-down* y posterior visualización de la activación de ERK1/2 (p44/42) (A) y Ras (B) mediante *Western blot*. El ERK y Ras total sirvieron como control de carga. Los histogramas muestran las cuantificaciones de ERK1/2 (p44/42) (A) y Ras activado (B) relativas al ERK1/2 (p44/42) (A) y Ras (B) total, basadas en la densitometría de los resultados obtenidos por *Western blot*. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes \pm SEM (* $p < 0.1$; ** $p < 0.05$; *** $p < 0.01$).

Al igual que se hizo en presencia de calcio, se quiso conocer la capacidad de la estimulación de los receptores purinérgicos para activar las GTPasas Rap1, Rac1, RhoA y Cdc42, esta vez en ausencia de calcio extracelular. Tras quelar el calcio del medio, se estimularon o no las células con ATP para posteriormente someterlas a un ensayo de *pull-down* que permitiría analizar el estado de activación de las distintas GTPasas. Los resultados mostraron una activación incluso basal de la GTPasa Rap1 en ausencia de calcio (Figura 32 A, panel superior calle 1, barra 1 del histograma), que incrementaba significativamente tras el estímulo de los receptores purinérgicos (Figura 32 A, panel superior calle 2, barra 2 del histograma). Sin embargo, las GTPasas de la familia Rho (Rac1, RhoA y Cdc42) se mantenían inactivas como ocurría en

presencia de calcio (Figura 32 B, C y D). Estos resultados demuestran nuevamente la importancia del calcio como regulador de las señales intracelulares.

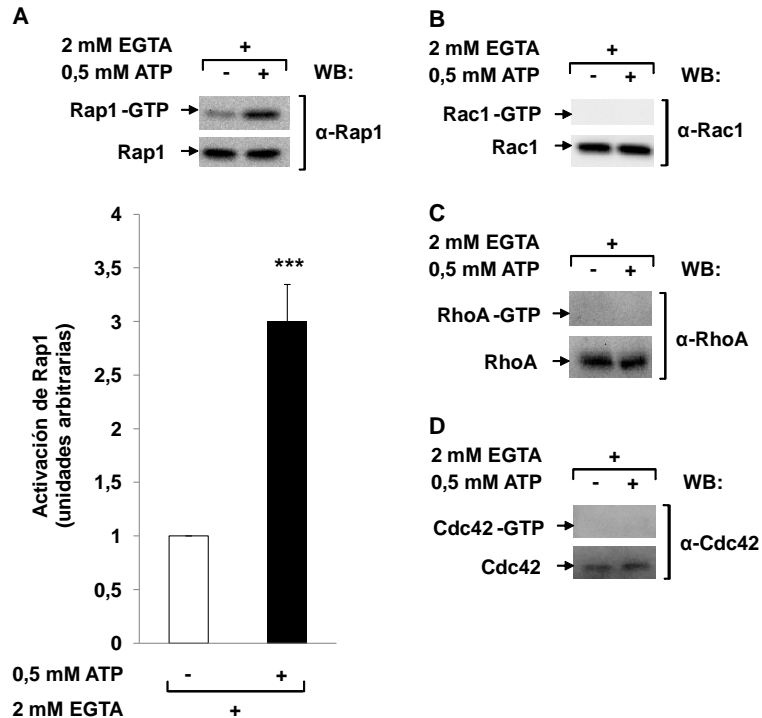


Figura 32. Efecto de la activación mediada por ATP en la activación de diferentes GTPasas en células SN4741 en ausencia de calcio extracelular. El calcio extracelular de las células sembradas se queló mediante el tratamiento con 2 mM de EGTA durante 30 minutos y posteriormente se estimularon o no con 0,5 mM de ATP durante 5 minutos. Los extractos celulares fueron sometidos a un ensayo de *pull-down* y posterior visualización de la activación de Rap1 (A), Rac1 (B), RhoA (C) y Cdc42 (D) mediante *Western blot*. El Rap1, Rac1, RhoA y Cdc42 total sirvió como control de carga respectivamente. La gráfica del panel A muestra las cuantificaciones de Rap1 activado relativas al Rap1 total, basadas en la densitometría de los resultados de obtenidos por *Western blot*. Los resultados son representativos de diez, siete, uno y uno experimentos independientes \pm SEM respectivamente (***) $p < 0.01$.

La GTPasa Ras, al igual que la mayoría de las pequeñas GTPasas, contiene dentro del dominio efector, regiones que sirven para interactuar de forma específica con moléculas efectoras. Una de estas proteínas efectoras es la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K) (Sjolander et al., 1991; Rodriguez-Viciano et al., 1994), la cual puede regular positivamente a la GTPasa Rap1 (Suga et al., 2001; Jung et al., 2006; Moore et al., 2013). Ante esta coyuntura, nosotros especulamos con la posibilidad de que en ausencia de calcio, la GTPasa Ras podría estar mediando la activación de Rap1 a través de la PI3K.

Para comprobarlo, evaluamos la actividad de Rap1 y Ras tras el tratamiento de las monocapas celulares con el inhibidor farmacológico de la PI3K, LY-294,002. Las células SN4741 se sembraron y tras 24 horas se pretrataron con el inhibidor LY-294,002. Al cabo de 30 minutos se añadió al medio de cultivo 2 mM de EGTA y finalmente 30 minutos después las monocapas se estimularon o no con ATP durante 5 minutos. Las células se lisaron y se sometieron a un ensayo de *pull-down* para analizar el estado de activación de la GTPasas Rap1 y Ras. Tal y como se muestra en la Figura 33 A, Rap1 se activaba al estimular el sistema con ATP en ausencia de calcio extracelular (panel superior calle 2, barra 2 del histograma), pero sin embargo, dicha activación disminuía en ausencia de actividad PI3K (panel superior calle 4, barra 4 del histograma), confirmando así la activación de Rap1 mediada por PI3K que planteábamos. No obstante, existiría una ruta independiente de PI3K ya que el bloqueo producido por el inhibidor de la PI3K no era total (comparar panel superior calles 4 y 3, barras 4 y 3 del histograma). Además, el inhibidor LY-294,002 no provocaba ningún efecto significativo sobre la activación de Ras (Figura 33 B, panel superior calle 4, barra 4 del histograma), lo que sugería una activación de PI3K/Rap1 independiente o *downstream* de Ras.

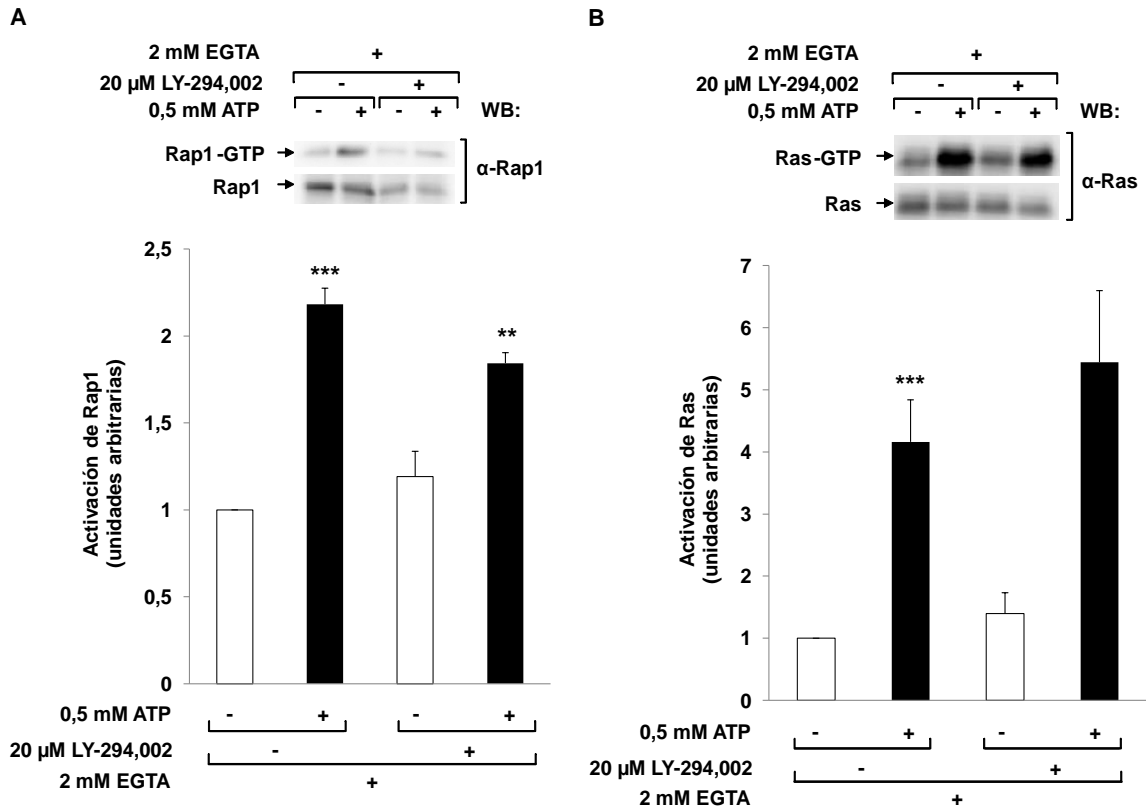


Figura 33. Implicación de la PI3K en la activación de Rap1 y Ras mediada por ATP en las células SN4741 en ausencia de calcio extracelular. Las células SN4741 se pretrataron o no con 20 μM de LY-294,002 durante 1 hora y 2 mM de EGTA durante 30 minutos previos a la estimulación o no con 0,5 mM de ATP durante 5 minutos. Los extractos celulares fueron sometidos a un ensayo de *pull-down* posterior visualización de la activación de Rap1 (A) y Ras (B) mediante *Western blot*, tomando Rap1 y Ras total como control de carga. Los histogramas muestran las cuantificaciones de Rap1 (A) y Ras (B) activado relativas al Rap1 (A) y Ras (B) total, basadas en la densitometría de los resultados obtenidos por *Western blot*. Los resultados son representativos de tres y cinco experimentos independientes \pm SEM respectivamente (** $p < 0.01$; ** $p < 0.05$).

Como hemos descrito, los resultados mostrados en la Figura 21 sugieren que Ras podría activarse mediante el sistema calcio/calmodulina/RasGRF1. Cabría esperar que esto no ocurriera en ausencia de calcio. Sin embargo, no se podía descartar la posibilidad de que RasGRF1 siguiera siendo la GEF activadora de Ras, ya que RasGRF1 también es capaz de activarse por fosforilación. (Kiyono et al., 2000a; Giglione et al., 2001; Norum et al., 2005; Kesavapany et al., 2006).

Para establecer si la activación de Ras dependía o no de RasGRF1, las células HEK 293T se sembraron y se transfectaron con las formas salvaje y mutante de RasGRF1, la mutante de calmodulina y el receptor P2X₇. 48 horas después de la transfección se queló el calcio extracelular mediante la adición de 2 mM de EGTA al medio de cultivo y se estimularon o no las células con 0,5 mM ATP. Además de llevar a cabo el ensayo de *pull-down* con objeto evaluar el estado de activación de Ras, los extractos celulares se utilizaron como controles de expresión de las proteínas de interés.

Como se puede observar en la Figura 34, la sobreexpresión de RasGRF1 wt conlleva la activación de Ras (comparar panel superior calles 5 y 6 con 1 y 2, barras 5 y 6 con 1 y 2 del histograma). Sorprendentemente, observamos una importante disminución de la activación de Ras al transfectar la forma mutante de calmodulina (comparar panel superior calles 11 y 12 con 5 y 6, barras 11 y 12 con 5 y 6 del histograma). Sin embargo, al analizar los controles de transfección, percibimos unas cantidades de calmodulina transfectadas significativamente mayores a las de RasGRF1 wt (Figura 34 paneles superiores correspondientes a RasGRF1 y CaM). Esto nos hizo pensar que el efecto observado podría deberse a un exceso de expresión del mutante de calmodulina.

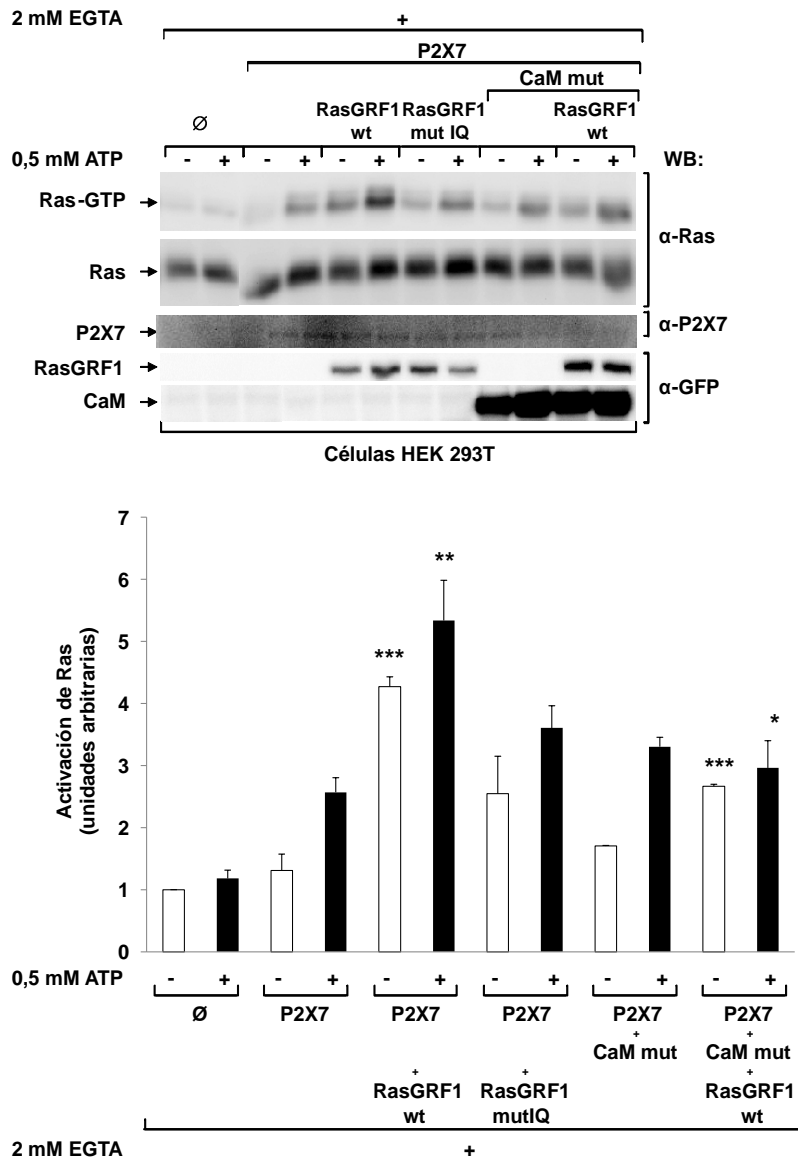


Figura 34. Implicación de la ruta $Ca^{2+}/CaM/RasGRF1$ en la activación de Ras en células HEK 293T en ausencia de calcio. Las células HEK 293T se transfectaron con los plásmidos vector vacío:pCELLF-HA-P2X₇;pEGFP-RasGRF1wt;pEGFP-RasGRF1mutIQ;pcDNA3YFP-CaMmut en una proporción 1:1:1:1. 48 horas post-transfección, el calcio extracelular se queló mediante el tratamiento con 2 mM de EGTA durante 30 minutos y posteriormente se estimularon o no con 0,5 mM de ATP durante 5 minutos. Los extractos celulares fueron sometidos a un ensayo de *pull-down* y posterior visualización de la activación de Ras mediante *Western blot*, tomando Ras total como control de carga. Los paneles inferiores muestran los controles de transfección de P2X₇, RasGRF1 y CaM. El histograma muestra las cuantificaciones de Ras activado relativas al Ras total, basadas en la densitometría de los resultados obtenidos por *Western blot*. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes \pm SEM (* $p < 0.1$; ** $p < 0.05$; *** $p < 0.01$).

Con el objetivo de equilibrar los niveles de expresión de RasGRF1 wt y de la calmodulina mutada, se cotransfectaron las células con diferentes ratios de los vectores codificantes para RasGRF1 y calmodulina. Como se muestra en la Figura 35, la expresión más proporcionada se encuentra en el ratio de cotransfección 1:0,1 (calle 4).

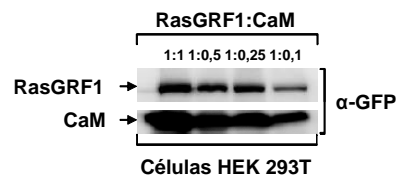


Figura 35. Optimización de las cantidades de transfección de RasGRF1 y CaM en células HEK 293T. Las células HEK 293T se transfectaron con los ratios indicados de los plásmidos pEGFP-RasGRF1wt:pcDNA3YFP-CaMmut. Las proteínas RasGRF1 y CaM transfectadas se visualizaron mediante *Western blot*.

Una vez establecido el ratio de transfección de los plásmidos, se repitió el experimento transfectando las mismas cantidades que en el experimento precedente (Figura 35) de todos los plásmidos, exceptuando el de la forma mutada de calmodulina, la cual se redujo a concentraciones 10 veces menores. Nuevamente la sobreexpresión de RasGRF1 wt inducía la activación de Ras (Figura 36, panel superior calles 5 y 6, barras 5 y 6 del histograma), efecto que no se veía reducido al cotransfectar la forma mutada de calmodulina. Este resultado confirma la hipótesis de que en ausencia de calcio extracelular, Ras se activa tras la estimulación de receptores purinérgicos a través de su GEF RasGRF1, aunque no por el sistema calcio/calmodulina.

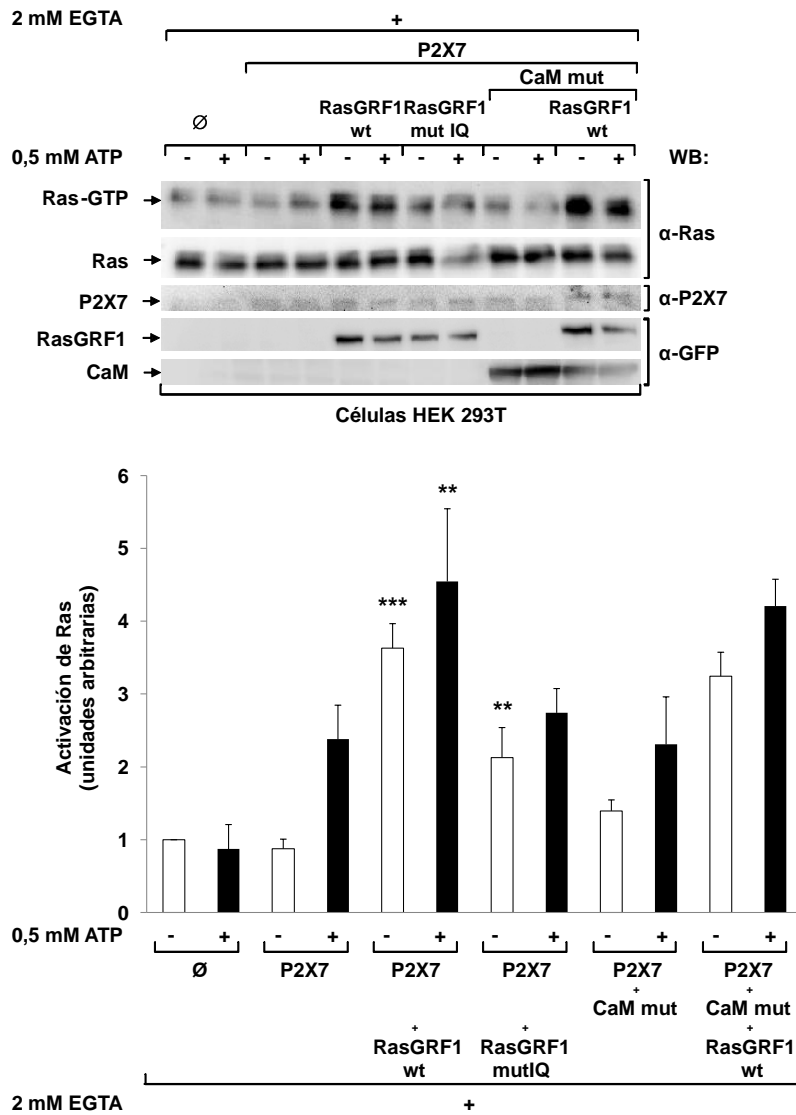


Figura 36. Implicación de la ruta $Ca^{2+}/CaM/RasGRF1$ en la activación de Ras en células HEK 293T en ausencia de calcio. Las células HEK 293T se transfectaron con los plásmidos vector vacío:pCELF-HA-P2X₇;pEGFP-RasGRF1wt;pEGFP-RasGRF1mutIQ;pcDNA3YFP-CaMmut en una proporción 1:1:1:0,1. 48 horas post-transfección, el calcio extracelular se queló mediante el tratamiento con 2 mM de EGTA durante 30 minutos y posteriormente se estimularon o no con 0,5 mM de ATP durante 5 minutos. Los extractos celulares fueron sometidos a un ensayo de *pull-down* y posterior visualización de la activación de Ras mediante *Western blot*, tomando Ras total como control de carga. Los paneles inferiores muestran los controles de transfección de P2X₇, RasGRF1 y CaM. El histograma muestra las cuantificaciones de Ras activado relativas al Ras total, basadas en la densitometría de los resultados obtenidos por *Western blot*. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes \pm SEM (** $p < 0.05$; *** $p < 0.01$).

Siguiendo la señalización observada en la estimulación de los receptores purinérgicos en presencia de calcio, decidimos volver a estudiar la implicación de las cinasas de respuesta temprana PKCs. Para ello, quelamos el calcio

extracelular con EGTA e inhibimos dichas cinasas utilizando el inhibidor farmacológico GF109203X. El análisis de la activación de Ras en estas condiciones nos mostraría la implicación de las PKCs en la ruta *upstream* de la GTPasa.

Las células se sembraron y 24 horas después se trataron con el inhibidor y el quelante de calcio antes de estimularlas con ATP. Como se muestra en la Figura 37, Ras vuelve a activarse tras la estimulación de los receptores purinérgicos (panel superior calle 2, barra 2 del histograma). Sin embargo, en estas condiciones a falta de calcio extracelular, la inhibición de la actividad de las cinasas PKCs no potencia la activación de Ras (comparar panel superior calles 4 y 2, barras 4 y 2 del histograma), como ocurría en presencia de calcio extracelular (Figura 22).

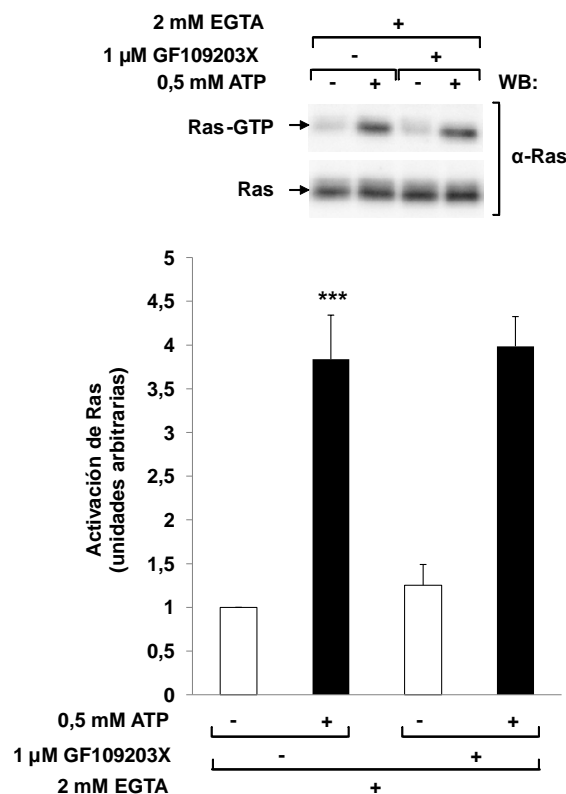


Figura 37. Implicación de las PKCs en la activación de Ras mediada por ATP en células SN4741 en ausencia de calcio extracelular. Las células SN4741 se pretrataron o no con 1 μM de GF109203X durante 1 hora y 2 mM de EGTA durante 30 minutos previos a la estimulación o no con 0,5 mM de ATP durante 5 minutos. Los extractos celulares fueron sometidos a un ensayo de *pull-down* y posterior visualización de la activación de Ras mediante *Western blot*, tomando Ras total como control de carga. El histograma muestra las cuantificaciones de Ras activado relativas al Ras total, basadas en la densitometría de los resultados obtenidos por *Western blot*.

Los resultados son representativos de cinco experimentos independientes \pm SEM (** $p < 0.01$).

Las PKCs se clasifican en tres subfamilias: las clásicas (cPKCs), nuevas (nPKCs) y atípicas (aPKCs). La cPKCs es la única de estas tres subfamilias que requiere de calcio para activarse. El hecho de haber observado la participación de PKCs en presencia pero no en ausencia de calcio, nos hizo pensar que, quizás, las PKCs implicadas en nuestra vía de señalización pertenecieran a la subfamilia de las PKCs clásicas.

También quisimos nuevamente, realizar un ensayo de MTT para analizar la viabilidad neuronal tras la estimulación de los receptores en ausencia de calcio extracelular, ya que, al fin y al cabo, la muerte de estas células es la consecuencia final de una estimulación que lleva al desarrollo de la enfermedad de Parkinson.

Así, se sembraron junto con las células control, aquellas que iban a ser estimuladas mediante ATP tras la quelación del calcio extracelular con EGTA. Las neuronas se sometieron al ensayo de viabilidad celular representado en la Figura 38. En presencia de calcio, las células mantenían una viabilidad que se veía alterada tras la quelación de dicho ion. La ausencia de calcio extracelular, produjo *per se* una pequeña muerte de aproximadamente el 5% de las neuronas dopaminérgicas, que aumentaba tras la estimulación de los receptores purinérgicos hasta alcanzar una pérdida del 20-25% de las células. Estos resultados muestran no sólo la participación sino también la necesidad absoluta del calcio para una adecuada viabilidad celular en este sistema.

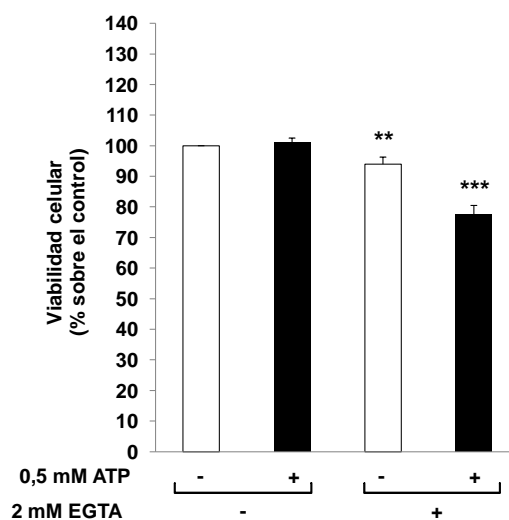


Figura 38. Efecto de la estimulación con ATP en la viabilidad de las células SN4741 en presencia y ausencia de calcio extracelular. El calcio extracelular de las células sembradas se queló mediante el tratamiento con 2 mM de EGTA durante 30 minutos o se dejaron sin tratar. Posteriormente se estimularon o no con 0,5 mM de ATP durante 5 minutos. Tras los tratamientos, las células se sometieron al ensayo de viabilidad celular MTT. Los valores se presentan como porcentajes sobre el control sin tratar. Los resultados son representativos de nueve experimentos independientes \pm SEM (** $p < 0.05$; *** $p < 0.01$).

Ya había quedado demostrada, tanto por nuestros resultados como por los descritos por Kim y colaboradores (Kim et al., 2001), la importancia de las tirosina fosfatasa en la regulación de la señalización intracelular emanada del receptor purinérgico, por lo que decidimos investigar si esta regulación se veía afectada en ausencia de calcio extracelular, midiendo la activación tanto de Ras como de ERK.

Así, sembramos la células que serían tratadas al día siguiente con 1 mM del inhibidor de las tirosina fosfatasa $\text{Na}_3\text{O}_4\text{V}$, 2 mM del quelante de calcio extracelular EGTA y 0,5 mM del estímulo ATP. Los lisados se procesaron para el análisis de la activación de la GTPasa Ras y la fosforilación de ERK. Los resultados ratificaban la activación de Ras (Figura 39 A, comparar panel superior calles 2 y 1, barras 2 y 1 del histograma) y ERK (Figura 39 B, comparar panel superior calles 2 y 1, barras 2 y 1 del histograma) tras la estimulación en ausencia de calcio, aunque el efecto de las fosfatasa en la estimulación de dichas proteínas era diferente. La inhibición farmacológica de

las tirosina fosfatasa provocaba una disminución de la activación de Ras equiparándola a sus niveles basales (Figura 39 A, comparar panel superior calles 4 y 2, barras 4 y 2 del histograma). Sin embargo, tal y como ocurría en presencia de calcio, las fosfatasa no parecían estar implicadas en la regulación de ERK (Figura 39 B, comparar panel superior calles 4 y 2, barras 4 y 2 del histograma), lo cual confirmaba una vez más la independencia de la señalización de Ras y ERK.

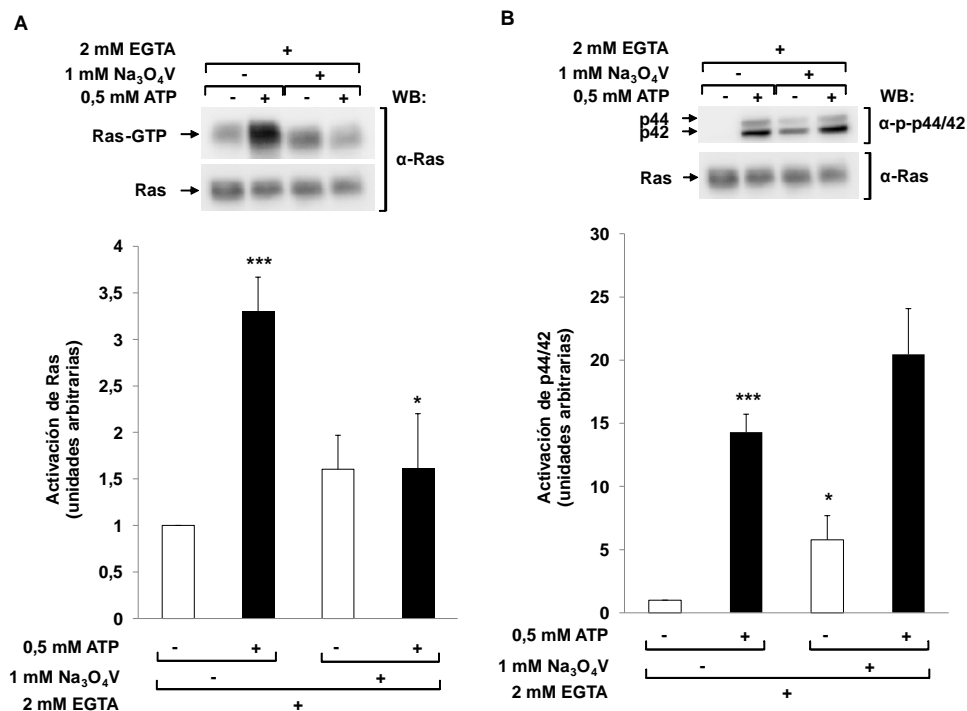


Figura 39. Implicación de las tirosina fosfatasa en la activación de Ras y ERK1/2 (p44/42) mediada por ATP en células SN4741 en ausencia de calcio extracelular. Las células SN4741 se pretrataron o no con 1 mM de Na₃O₄V durante 20 minutos y 2 mM de EGTA durante 30 minutos previos a la estimulación o no con 0,5 mM de ATP durante 5 minutos. Los extractos celulares fueron sometidos a un ensayo de *pull-down* y posterior visualización de de la activación de Ras (A) y ERK1/2 (p44/42) (B) mediante *Western blot*. El Ras total sirvió como control de carga. Los histogramas muestran las cuantificaciones de Ras activado (A) y ERK1/2 (p44/42) activado (B) relativas al Ras total, basadas en la densitometría de los resultados obtenidos por *Western blot*. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes \pm SEM (* p <0.1; ** p <0.05; *** p <0.01).

En paralelo, se examinó el efecto que las fosfatasa podrían ejercer sobre la viabilidad de las células. Habiendo observado que la inhibición de las tirosina fosfatasa aumentaba la viabilidad de las neuronas en presencia de calcio, y por otro lado, que la activación del sistema en ausencia de calcio provocaba

una muerte celular, quisimos verificar si en estas condiciones experimentales la inhibición de las tirosina fosfatasas podría rescatar la muerte celular mediada por ATP.

Así procedimos a sembrar células que tras 24 horas serían tratadas primeramente con el inhibidor Na₃O₄V durante 20 minutos, añadiendo 2 mM de EGTA 30 minutos antes de la estimulación con 0,5 mM de ATP. La viabilidad celular se midió mediante un ensayo MTT. Tal y como se muestra en la Figura 40, el ATP en ausencia de calcio mediaba pérdida de viabilidad celular (barra 2 del histograma), la cual se revertía cuando se inhibían las tirosina fosfatasas (comparar barras 4 y 2 del histograma). Este resultado confirmaba la hipótesis anteriormente planteada: la inhibición de las tirosina fosfatasas previene la muerte de las neuronas dopaminérgicas mediada por la activación de los receptores purinérgicos en ausencia de calcio extracelular. Además, podemos también observar que al igual que ocurría en presencia de calcio, el Na₃O₄V tenía un efecto incluso a falta de estímulo (comparar barras 3 y 1), sugiriendo una actividad basal de las tirosina fosfatasas en este sistema.

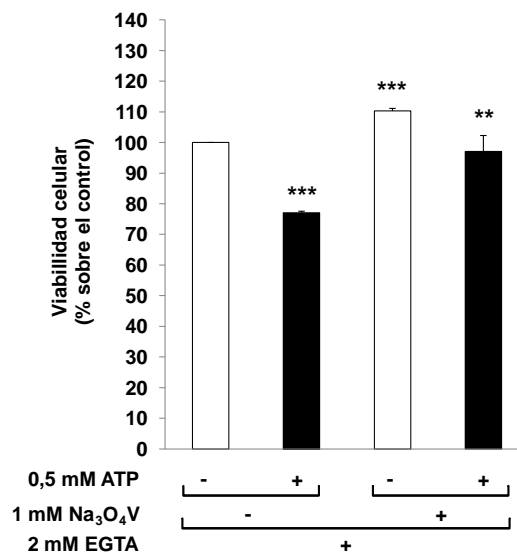


Figura 40. Implicación de las tirosina fosfatasas en la viabilidad de las células SN4741 en ausencia de calcio extracelular. Las células SN4741 se pretrataron o no con 1 mM de Na₃O₄V durante 20 minutos y 2 mM de EGTA durante 30 minutos previos a la estimulación o no con 0,5 mM de ATP durante 5 minutos. Tras los tratamientos, las células se sometieron al ensayo de viabilidad celular MTT. Los valores se presentan como porcentajes sobre el control sin tratar. Los resultados son representativos de cuatro experimentos independientes \pm SEM (** $p < 0.05$; *** $p < 0.01$).

Por último, debido a la importancia de su inhibición en el rescate de la muerte celular, quisimos ahondar en la implicación de las tirosina fosfatasa en la señalización en ausencia de calcio extracelular, estudiando un posible efecto de la PTPR β .

Las neuronas se transfectaron por electroporación con el esiRNA de las PTPR β o un vector vacío y 24 horas post-transfección se trataron con el quelante de calcio extracelular y posterior estimulación mediante ATP. Los lisados se sometieron al análisis de la activación de Ras y ERK. Como se muestra en la Figura 41, el silenciamiento de la tirosina fosfatasa PRPT β no parecía tener efecto alguno en la activación de Ras ni de ERK mediada por ATP (Figura 41 A y B, comparar panel superior calles 4 y 2, barras 4 y 2 del histograma). No obstante, el silenciamiento de la PTPR β inducía la activación de Ras en ausencia de estímulo (Figura 41 A, comparar panel superior calles 3 y 1, barras 3 y 1 del histograma).

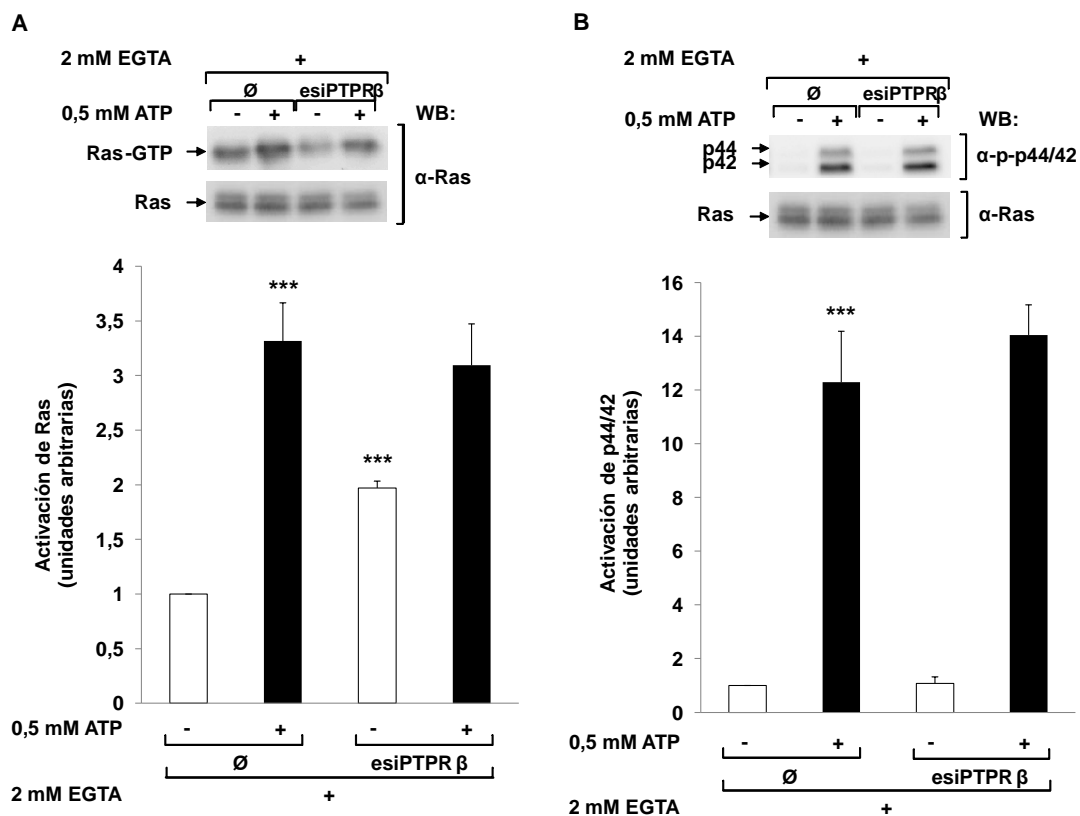


Figura 41. Efecto de la PTPR β en la activación de Ras y ERK1/2 (p44/42) mediada por ATP en células SN4741 en ausencia de calcio extracelular. Las células SN4741 se transfectaron con esiPTPR β o vector vacío y 24 horas post-transfección se pretrataron o no con 2 mM de EGTA durante 30 minutos previos a la estimulación o no

con 0,5 mM de ATP durante 5 minutos. Los extractos celulares fueron sometidos a un ensayo de *pull-down* y posterior visualización de la activación de Ras (A) y ERK1/2 (p44/42) (B) mediante *Western blot*. El Ras total sirvió como control de carga. Los histogramas muestran las cuantificaciones de Ras activado (A) y ERK1/2 (p44/42) activado (B) relativas al Ras total, basadas en la densitometría de los resultados obtenidos por *Western blot*. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes \pm SEM (* $p < 0.1$; *** $p < 0.01$).

Habiendo observado que las células silenciadas y las tratadas farmacológicamente para la inhibición de las tirosina fosfatasas en presencia de calcio seguían un perfil de viabilidad similar (Figuras 26 y 28), continuamos analizando el efecto de las PTPR β en la viabilidad celular en ausencia de calcio extracelular.

Para ello, se transfectaron las células con esiRNA y al cabo de 24 horas se trataron de igual manera al experimento anterior, tras lo cual se sometieron al ensayo de viabilidad celular MTT. La presencia de ATP marcaba la misma tendencia en cuanto a descenso de la viabilidad que habíamos observado previamente en ausencia de calcio (Figura 42 barra 2) y el silenciamiento de la PTPR β nuevamente marcaba un pequeño incremento de la viabilidad (Figura 42 barras 3 y 4). Como ocurrían en los experimentos en presencia de calcio (Figuras 27 y 28), los efectos del silenciamiento de la PTPR β en ausencia de calcio eran mucho menores que el efecto de la inhibición de todas las tirosina fosfatasas mediante el Na₃O₄V. No obstante, los dos tratamientos volvían a mostrar resultados con el mismo perfil de viabilidad (Figuras 40 y 42).

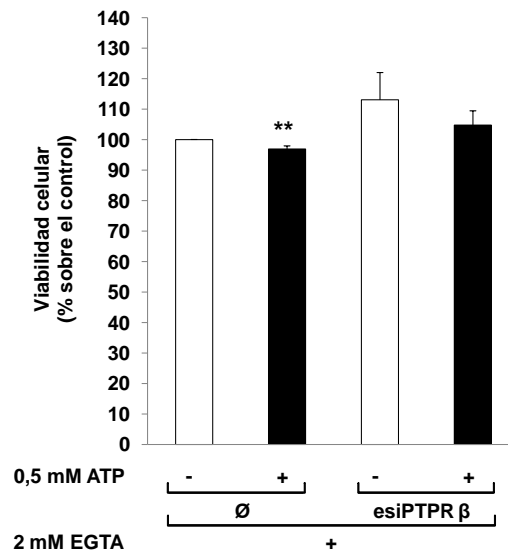


Figura 42. Implicación de la PTPR β en la viabilidad de las células SN4741 en ausencia de calcio extracelular. Las células SN4741 se transfectaron con esiPTPR β o vector vacío y 24 horas post-transfección se pretrataron o no con 2 mM de EGTA durante 30 minutos previos a la estimulación o no con 0,5 mM de ATP durante 5 minutos. Tras los tratamientos, las células se sometieron al ensayo de viabilidad celular MTT. Los valores se presentan como porcentajes sobre el control sin tratar. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes \pm SEM (** $p < 0.05$).

VII. DISCUSIÓN

VII. DISCUSIÓN

La pérdida progresiva de la población de neuronas dopaminérgicas de la *substancia nigra* del cerebro es un factor clave en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson (EP). Las células dopaminérgicas son responsables de la producción de dopamina, un neurotransmisor que se secreta en una población celular localizada en la base de los hemisferios cerebrales donde se encuentran las terminaciones de estas neuronas. A esta región del cerebro se la denomina estriado y su función es transmitir los impulsos nerviosos responsables del movimiento corporal, respuestas cognitivas y sensoriales. Es por ello que la falta de dopamina en el estriado conduce a la sintomatología asociada a la EP: temblor en reposo, bradicinesia, rigidez, alteraciones en la marcha, perturbaciones cognitivas, sensitivas, del humor, del habla y del sueño.

Se ha apuntado a la señalización purinérgica como el mecanismo mediador de la muerte de las neuronas dopaminérgicas (Jun et al., 2007), pudiendo constituir la señal inicial en el desarrollo de la EP. Siguiendo este supuesto, nosotros en este trabajo nos hemos centrado en la caracterización de la señalización intracelular mediada por receptores purinérgicos en neuronas dopaminérgicas. En primer lugar quisimos comprobar si la estimulación de los receptores purinérgicos reproducían la inducción de una respuesta celular en la línea neuronal SN4741, determinando en este caso la activación de ERK. Tras confirmarlo, se ajustaron tanto la concentración como los tiempos de tratamiento con ATP, con objeto de establecer las condiciones óptimas de estimulación. Estudiando el grado de fosforilación de ERK, mostramos que 0,5 mM de ATP era la concentración mínima que promovía esta respuesta intracelular. Curiosamente, esta concentración de ATP era considerablemente menor a las que otros grupos de investigación habían utilizado en sus estudios (Sato et al., 2006; Prasai et al., 2011; Liu et al., 2013)

En cuanto a la cinética de fosforilación de ERK, observamos que la estimulación purinérgica promovía la fosforilación de esta cinasa con un pico máximo a los 5 minutos decayendo a tiempos prolongados. Es por esto que

nuestro enfoque experimental se centró en la activación temprana de moléculas de señalización mediada por la estimulación de estos receptores. Estos resultados concuerdan parcialmente con los obtenidos por Kulich *et al.* quienes describieron, utilizando un modelo neurotóxico de EP, una respuesta bifásica en la fosforilación de ERK. Estos autores observaban una primera fase de activación de ERK a los pocos minutos de la estimulación, pudiendo variar entre 2 y 15 minutos en base al número de pases de las células. Dicha señal decaía progresivamente y aparecía una segunda fase de activación hora y media post-estímulo (Kulich and Chu, 2001).

Sin embargo, Jun *et al.* quienes también estudiaron la respuesta mediada por receptores purinérgicos, en este caso analizando el efecto en la viabilidad de la línea SN4741, percibieron que el efecto de muerte se producía tras 20 minutos de estimulación de los receptores. Estos resultados no permitían relacionar el perfil de activación temprana de ERK que nosotros observábamos, con dicha respuesta de muerte neuronal (Jun *et al.*, 2007). Ello sugeriría, o que ambas respuestas eran independientes, o que podía darse una relación secuencial, en la que la activación de ERK podría tratarse de uno de los primeros eventos en la ruta de señalización que finaliza en la muerte de estas neuronas.

Tal y como hemos descrito en el apartado de resultados, la estimulación de los receptores purinérgicos mediada por ATP promovía la activación tanto de la GTPasa Ras como de ERK en neuronas dopaminérgicas, aunque a través de vías de señalización ligeramente diferentes. Los resultados sugieren la participación de receptores purinérgicos capaces de activarse por BzATP como pueden ser el P2X₁, P2X₃, P2X₄, P2X₇ y P2X₂. No obstante, tras los experimentos llevados a cabo en presencia del antagonista específico para el receptor P2X₇, se descartó que este receptor fuera el responsable de la activación de ERK, mientras que consideramos que aunque no el único, sí fue uno de los mediadores mayoritarios de la activación de Ras. Basándonos en nuestros resultados, hipotetizamos que en neuronas dopaminérgicas, el ATP se unía al receptor P2X₇, además de a los otros P2X anteriormente mencionados. Esta unión permitía la activación de Ras mediada fundamentalmente por el P2X₇. Asimismo, al anular la capacidad de unión del

ligando a este receptor por la presencia de un antagonista específico, disminuía la activación de Ras, a la vez que se promovía una mayor unión del ATP a los receptores P2X₁, P2X₃, P2X₄ y/o P2X₂. Uno o varios de estos receptores son los responsables de la activación de ERK, por lo que el antagonista del receptor P2X₇ promovía indirectamente la activación de ERK.

Dada la importancia de las PKCs en la participación en la enfermedad de Parkinson (Kaul et al., 2003; Yang et al., 2004) y a la relación de esta familia de cinasas en la señalización intracelular temprana, se estudió el papel de las PKCs en la señalización purinérgica de neuronas dopaminérgicas. Observamos una implicación clara de las PKCs en la activación de Ras, aunque solamente en presencia de calcio extracelular. Dicha dependencia del calcio nos hizo pensar que quizás estas PKCs pertenecían a la subfamilia de las PKCs clásicas, ya que es la única de las tres subfamilias de las PKCs para la que este ion es indispensable para su activación. No obstante, sería interesante ahondar en este punto para esclarecer qué miembro de las PKCs sería el responsable de este efecto, y comprobar si pertenece a la subfamilia de las PKCs clásicas, tal y como proponemos. En cualquier caso, estas serina/treonina cinasas eran capaces de inhibir la activación basal de Ras, siempre en presencia de calcio extracelular. Esto sugería que el calcio extracelular estaría internalizándose a través de canales de calcio abiertos en condiciones basales. La mayoría de canales iónicos presentes en la membrana plasmática requieren de un estímulo externo, mediante el cual se da su apertura permitiendo así el flujo de calcio hacia el interior celular. Sin embargo, nuestros resultados sugerían una internalización de calcio independiente de estímulo.

Recientemente, Lalonde *et al.* han descrito la existencia de un flujo de calcio transmembranal en neuronas en reposo (Lalonde et al., 2014), lo que coincidiría con nuestros resultados. Este flujo de calcio podría estar relacionado con un proceso mediante el cual la célula es capaz de detectar una disminución del calcio almacenado en el retículo endoplasmático (RE) y provocar una entrada de calcio extracelular para rellenar dichos depósitos. A este proceso se le conoce como SOCE (Storage-Operated Calcium Entry). A pesar de

conocerse hace ya una década, este proceso ha estado asociado sistemáticamente a las células del sistema inmune, y su implicación en la señalización neuronal no se ha desvelado hasta hace poco tiempo. Tal y como sugieren Hooper y colaboradores, en neuronas inactivas (cerca del potencial de membrana en reposo), la falta de flujo de calcio a través de los canales dependientes de voltaje (VGCC) puede ser el desencadenante de la pérdida de homeostasis del calcio en el RE (Hooper et al., 2014). Cuando la actividad de los VGCCs es insuficiente para mantener los niveles de calcio en el RE, se activan las proteínas STIM presentes en la membrana de dicho orgánulo debido a la disociación del calcio unido a los dominios luminales. Es entonces cuando las proteínas STIM se asocian y activan a los canales CRAC (Calcium Release-Activated Channel), también llamados Orai1 por su gen codificante. Estos, son canales altamente selectivos para el calcio que permitirán su entrada y la reposición del RE, además de otros efectos moleculares mediados por calcio como segundo mensajero en la señalización intracelular (Soboloff et al., 2012)

No obstante, la falta de actividad de los VGCCs puede no ser la única promotora de la liberación de calcio del RE y posterior activación del SOCE. En nuestros experimentos, las células estaban cultivadas en medio complementado con 10 % de FBS y probablemente, los factores de crecimiento presentes en el suero, estaban activando a los receptores con siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G heterotriméricas (GPCRs). La activación de estos receptores induce un intercambio de GDP por GTP en la subunidad α de la proteína G heterotrimérica, lo cual provoca la disociación de las subunidades α y $\beta\gamma$. La subunidad α en su forma activa (cargada con GTP) es capaz de interactuar con la fosfolipasa C (PLC) y activarla. Esta enzima es responsable de hidrolizar el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP_2) de la membrana plasmática, generando dos metabolitos: inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). El IP_3 se difunde por el citosol llegando al retículo endoplasmático donde tras unirse a receptores específicos favorece la apertura de canales de calcio, con lo que se produce un flujo de calcio desde los almacenes del retículo endoplasmático hacia citosol. Este incremento de la concentración de calcio intracelular o el producido mediante la activación del

SOCE, junto con la producción del DAG a partir del PIP_2 , podría estar mediando la activación basal de las PKCs clásicas y consecuente inhibición de la GTPasa Ras.

Ras, sin embargo, no es el único miembro de las pequeñas GTPasas que ha resultado estar implicado en la señalización mediada por receptores purinérgicos. A pesar de que las GTPasas de la familia Rho no parecen presentar ningún tipo de activación en este sistema, al menos en las condiciones experimentales que hemos llevado a cabo, esto no es así para la GTPasa Rap1, un miembro de las GTPasas de la familia Ras. Tal y como muestran nuestros resultados, esta GTPasa no responde al estímulo activador mediado por los receptores purinérgicos en presencia de calcio. Sin embargo, cuando se quela el calcio extracelular, el hecho de secuestrar este calcio facilita una pequeña activación de Rap1, la cual se manifiesta de manera indiscutible tras la estimulación de los receptores purinérgicos. Estas observaciones sugerirían que el calcio ejercería una acción inhibitoria sobre la ruta de activación de Rap1 en condiciones normales. La manifestación de la forma activa de Rap1 en ausencia de calcio, coincidía con un incremento en la actividad de Ras, lo cual nos condujo a pensar que Ras podría mediar en la activación de Rap1. Asimismo, en estas condiciones, observábamos también una pequeña muerte celular que no se daba en presencia de calcio, o lo que es lo mismo, en ausencia total de Rap1 activo. Esto sugería un posible papel de Rap1 como mediador de la muerte neuronal.

Debido al papel de la PI3K como molécula efectora de Ras (Sjolander et al., 1991; Rodriguez-Viciano et al., 1994) y a su vez proteína reguladora de la actividad de Rap1 (Suga et al., 2001; Jung et al., 2006; Moore et al., 2013), se decidió estudiar la posible existencia de una ruta Ras/PI3K/Rap1 en estas células. En condiciones basales, la inhibición farmacológica de la PI3K no ejerció efecto alguno sobre la actividad de Rap1. Sin embargo, tras el estímulo de los receptores purinérgicos y en ausencia de calcio, la PI3K mostraba una regulación de Rap1, sin modificar la actividad de Ras. En estas condiciones, nosotros proponemos que Ras podría mediar la activación de Rap1 a través de la PI3K, aunque son necesarios unos niveles mínimos de actividad de Ras para

transmitir dicha señal hacia Rap1. Dichos niveles no se alcanzarían en condiciones basales, pero sí tras la estimulación purinérgica.

Considerando la importancia del calcio en nuestro sistema, centramos el estudio de la regulación de Ras en aquellos GEFs que pudieran estar regulados por calcio. Existen dos familias de GEFs para Ras especializados en la señalización neuronal asociados a flujos de calcio: RasGRP y RasGRF (Agell et al., 2002). RasGRP, incluye en su secuencia dos dominios típicamente asociados a la unión de calcio (dominios EF). Sin embargo, la participación de este ion como regulador de RasGRP no está claramente demostrada. Los dominios EF de este GEF no parecen actuar como típicos sensores de calcio, y se piensa que su papel podría estar más relacionado con la asociación de la proteína a la membrana plasmática (Stone, 2011). Por el contrario, tal y como muestran nuestros resultados, y coincidiendo con publicaciones anteriores, el otro GEF neuronal RasGRF, es un regulador de Ras claramente dependiente de calcio y calmodulina (Farnsworth et al., 1995). Nosotros comprobamos que el calcio era capaz de inducir la activación de Ras a través de su unión a calmodulina, ya que, la expresión en células HEK 293T de la forma mutante de calmodulina, incapaz de unir calcio, no favorecía la activación de Ras. El efecto de este mutante solamente era visible en presencia de calcio. La unión del calcio a calmodulina permite que la calmodulina cargada con dicho ion sea capaz de unirse y activar al GEF RasGRF1 mediando así la activación de Ras (Farnsworth et al., 1995). Sería interesante poder reproducir estos resultados en células que expresen RasGRF1 *per se*, ya que uno de los obstáculos que nos hemos encontrado en los ensayos con las células HEK 293T es que la propia sobreexpresión del RasGRF1 promueve la activación de Ras independientemente del estímulo purinérgico. Mediante experimentos en células SN4741 podríamos, además de comprobar la implicación de la ruta calcio/calmodulina/RasGRF1/Ras en estas células, estudiar el efecto de los receptores purinérgicos en ella.

Además del sistema calcio/calmodulina, nuestros resultados sugerían la presencia de otro mecanismo de activación de Ras, ya que, se seguía observando una activación de dicha GTPasa en ausencia de calcio, que

además se veía afectada tras la estimulación de los receptores purinérgicos. No obstante, en la bibliografía se describe un mecanismo de activación de RasGRF1 mediado por fosforilación. Se conoce por ejemplo la regulación por fosforilación en serinas de RasGRF1 mediada por PKA (Baouz et al., 2001) y Cdk5 (Kesavapany et al., 2006) o en tirosinas mediada por Src (Kiyono et al., 2000b), Ack1 (Kiyono et al., 2000a) y Trk-A, -B y -C (Robinson et al., 2005). A pesar de que nosotros no hemos sido capaces en nuestras condiciones experimentales de mostrar el estado de fosforilación de RasGRF1, consideramos la hipótesis de la presencia de una cinasa capaz de fosforilar en tirosina este GEF, ya que la fosforilación en estos residuos podría jugar un papel importante en el modelo de señalización de este sistema celular.

Si tal y como proponemos hubiera una regulación positiva por fosforilación, obviamente la señal de desactivación debería de estar controlada por la acción de proteína fosfatasas. De hecho, las proteínas tirosina fosfatasas surgen en este trabajo como elemento esencial de señalización. Antes de interpretar su mecanismo de acción mediado por la activación de receptores purinérgicos es necesario analizar su actividad en las condiciones basales de estas células. Como se muestra en el apartado de resultados, las tirosina fosfatasas presentan una actividad basal inhibitoria en neuronas tanto para Ras como para ERK. Esta actividad basal de las tirosina fosfatasas coincide con la descrita por Kim y colaboradores (Kim et al., 2001). Estos autores, describen la interacción del receptor purinérgico P2X₇ con 11 proteínas, entre las cuales se encuentra la tirosina fosfatasa PTPRβ, una fosfatasa cuya expresión está restringida al sistema nervioso central. Resultados previos han mostrado la actividad reguladora de esta fosfatasa sobre la proteína cinasa del linfoma anaplásico ALK (Moog-Lutz et al., 2005; Mathivet et al., 2007; Perez-Pinera et al., 2007; Deuel, 2013). Cabe destacar que la activación de ALK se ha asociado a la diferenciación neuronal y crecimiento de neuritas mediado por la ruta MAPK (Souttou et al., 2001; Motegi et al., 2004; Degoutin et al., 2007; Palmer et al., 2009). Esto, nos condujo a estudiar el papel de la fosfatasa PTPRβ como posible responsable de la inhibición de la actividad basal observada en Ras y en ERK. Los resultados mostraron que, la PTPRβ regulaba la activación de Ras de la misma manera que lo hacían el conjunto de las

tirosina fosfatasas, y que por tanto, la PTPR β podría tratarse de la fosfatasa responsable de dicha regulación. Sin embargo, esto no se mantenía en el caso de ERK. A pesar de inhibir la activación de ERK en presencia de calcio, la PTPR β no tenía efecto alguno sobre la cinasa cuando se quelaba el calcio extracelular. Esto indicaba una dependencia de calcio en la actividad inhibidora de la PTPR β sobre ERK. Como hemos propuesto anteriormente, las PKCs clásicas dependientes de calcio presentaban una actividad inhibidora sobre Ras. Por esta razón sugerimos que la actividad de la PTPR β sobre ERK podría estar mediada por esas mismas PKCs. Así, la fosfatasa estaría activando las cPKCs que a su vez funcionarían como inhibidoras de ERK en presencia de calcio. La PTPR β no mostraría ningún efecto sobre ERK en ausencia de calcio ya que, las PKCs clásicas no estarían activas en esas condiciones. Esta diferencia observada en cuanto al mecanismo de regulación de Ras y ERK no hacía más que confirmar una vez más la independencia de las rutas de activación de dichas proteínas, o que al menos ERK no estaba regulada únicamente a través de la vía clásica mediada por Ras. Por otro lado, estos resultados mostraban también que el mecanismo de regulación de ERK era diferente tras el silenciamiento específico de la PTPR β comparado con la inhibición farmacológica de todas las tirosina fosfatasas, sugiriendo que aunque la PTPR β funcionara como reguladora de ERK, existirían otras tirosina fosfatasas que podrían actuar también controlando la activación de ERK. No obstante, el mecanismo de acción de esas otras tirosina fosfatasas sería diferente al de la PTPR β , ya que su efecto sobre ERK parece independiente de calcio.

Como hemos visto, las tirosina fosfatasas funcionan como moduladores negativos de ERK en condiciones basales. Sin embargo, tras la estimulación purinérgica, estas fosfatasas no parecen ser funcionales, ya que tratamientos conducentes a su inhibición no producen ningún efecto sobre la actividad de ERK. Esto sugeriría que la estimulación de los receptores purinérgicos tendría un efecto represor sobre la actividad inhibidora de las tirosina fosfatasas, promoviendo así un mayor nivel de activación de ERK. Por otro lado, observamos que la estimulación de los receptores induce una mayor activación de ERK que la promovida mediante la inhibición farmacológica de las

fosfatasa basales. Esto indicaría que la estimulación de los receptores purinérgicos no solo promueve la activación de ERK mediante la inhibición de las fosfatasas, sino que existe además una ruta independiente a las fosfatasas por la cual los receptores purinérgicos activarían ERK. Silenciando la PTPR β mostramos un perfil de acción sobre ERK similar al observado tras la inhibición del conjunto de las fosfatasas, sin olvidar que la regulación de la PTPR β sobre ERK es dependiente de calcio.

Como se ha mencionado anteriormente, todo indicaba que la única fosfatasa que regulaba la actividad de Ras en condiciones basales era la PTPR β . Los experimentos de silenciamiento de esta fosfatasa sugerirían, que tal y como ocurría con ERK, los receptores purinérgicos estarían mediando la inhibición de la PTPR β y por ende, promoviendo la activación de Ras, aunque en este caso por un mecanismo independiente a calcio. Curiosamente, la inhibición de las tirosina fosfatasas mediante el tratamiento con ortovanadato muestra un perfil de activación de Ras diferente al de ERK, ya que la estimulación de los receptores no logra promover la activación de Ras cuando las fosfatasas están inhibidas. Este resultado sugeriría que los receptores purinérgicos, además de inhibir la actividad de la PTPR β , serían capaces de activar otra fosfatasa que a su vez induciría la activación de Ras. Esta hipótesis está en línea con lo publicado por Kim y colaboradores, en cuanto a que se observa una actividad fosfatasa mayor tras el estímulo de receptores purinérgicos (Kim et al., 2001). Según estos autores, existe una actividad fosfatasa basal que defosforila el receptor P2X₇, y el estímulo para ese receptor promueve una mayor activación de una fosfatasa que actúa sobre el propio receptor, es decir, la estimulación del P2X₇ induce una mayor defosforilación del mismo. Estos autores analizan la actividad global de las fosfatasas, sin diferenciar entre los diferentes miembros de esta familia, por lo que se interpreta que la fosfatasa con actividad basal sería la misma que la que aumenta su actividad tras la estimulación del P2X₇. Nuestros resultados sin embargo, sugieren la participación de diferentes fosfatasas en la señalización celular. Así, la PTPR β presentaría una actividad basal en las neuronas, mientras que sería otra fosfatasa, aún sin identificar, la que aumentaría su actividad tras la estimulación purinérgica. Dicha actividad podría actuar a través de los propios receptores purinérgicos tal y como

describen Kim *et al.* (Kim *et al.*, 2001), o mediante un mecanismo independiente a los receptores, promoviendo en cualquier caso la activación de Ras.

No obstante, la regulación de la actividad de Ras y ERK no es la única función de las tirosina fosfatasas en las neuronas dopaminérgicas. Otro de los efectos promovidos por la acción de estas fosfatasas es la muerte neuronal. Nuestros resultados muestran que la inhibición farmacológica de las tirosina fosfatasas por la acción del ortovanadato, previene la muerte de neuronas dopaminérgicas estimuladas con ATP. Este efecto protector de la muerte neuronal mediante la inhibición de las tirosina fosfatasas ya se había descrito en el modelo de EP inducido por la 6-OHDA (Yang *et al.*, 2007), lo cual pone el foco sobre estas fosfatasas como potenciales dianas terapéuticas.

Nuestra investigación se ha centrado en la tirosina fosfatasa PTPR β , que sin ser la única implicada, sí resultó ser una de las tirosina fosfatasas responsable de la muerte celular. Silenciando el gen codificante de la PTPR β con esiRNA, volvimos a observar un bloqueo de la muerte celular en este sistema experimental. La PTPR β regula el estado de fosforilación de sus proteínas efectoras β -catenina (Meng *et al.*, 2000), β -aducina (Pariser *et al.*, 2005b; Pariser *et al.*, 2005c), Fyn (Pariser *et al.*, 2005a), las subunidades α y β de canales de sodio (Ratcliffe *et al.*, 2000), GIT1/Cat1 (Kawachi *et al.*, 2001) y p190 RhoGAP (Tamura *et al.*, 2006). Desde un punto de vista funcional, estas proteínas efectoras han sido asociadas a la supervivencia de neuronas dopaminérgicas así como a la proliferación y la diferenciación de sus progenitoras (Herradon and Ezquerra, 2009). Es por ello que creemos, que mediante la inhibición tanto farmacológica como genética de la PTPR β podríamos estar favoreciendo la fosforilación y activación de las proteínas efectoras mencionadas, promoviendo así la supervivencia neuronal.

Además, esta implicación de la PTPR β en la pérdida de viabilidad de las neuronas dopaminérgicas, podría estar relacionada con la aparición de la enfermedad de Parkinson. La PTPR β es un receptor de membrana capaz de unir en su región extracelular pleiotropina (PTN) y midkina (MK), dos citocinas

que en estos últimos años están adquiriendo mayor relevancia en el área de la terapia contra la enfermedad de Parkinson. Los altos niveles de PTN en pacientes y modelos animales de Parkinson tratados con L-Dopa sugieren una función reparadora para esta citocina (Ferrario et al., 2004; Marchionini et al., 2007), que además ha demostrado, al igual que la MK, ejercer un papel neuroprotector cuando se sobreexpresa en modelos neurotóxicos de EP (Taravini et al., 2011; Gombash et al., 2012). Considerando el papel inhibidor de PTN/MK sobre la PTPR β y tras observar los efectos de esta fosfatasa como promotora de la muerte neuronal, probablemente mediante la defosforilación de sus proteínas efectoras β -catenina, β -aducina, Fyn, GIT1/Cat1 y/o p190 RhoGAP, hipotetizamos una posible nueva ruta de señalización asociada a la EP, en la que el tándem PTN/MK ofrecería una función reparadora y neuroprotectora sobre las neuronas dopaminérgicas por el bloqueo que ejercerían sobre la fosfatasa PTPR β .

No obstante, nuestros resultados sugieren la participación de otras tirosina fosfatasas, además de la PTPR β , en la muerte celular. Varias fosfatasas han demostrado jugar un papel importante en la muerte neuronal, aunque la participación de las proteínas defosforiladoras de residuos tirosina se limita a las descritas por Wu y colaboradores (Wu et al., 2002). Estos autores muestran una mayor expresión y participación de tirosina fosfatasas como DUSP1, DUSP5, DUSP6 o la PTPN23 en la muerte neuronal inducida por expansiones de poliglutaminas (Wu et al., 2002). La actividad fosfatasa de PTPN23 es un tanto controvertida, ya que algunos autores defienden su condición inactiva (Gingras et al., 2009), mientras otros, como el grupo de Maier han observado su capacidad defosforiladora sobre FAK, un proteína crucial en la regulación de la migración celular (Castiglioni et al., 2007; Mariotti et al., 2009). Las otras tres fosfatasas, DUSP1, DUSP5 y DUSP6, son proteínas expresadas en cerebro, pertenecientes a la familia de las fosfatasas de especificidad dual (Dual Specificity Phosphatases, DUSP), es decir, fosfatasas capaces de defosforilar en residuos de serina/treonina y tirosina. Algunos miembros de esta familia, entre los cuales se encuentran las fosfatasas mencionadas, se conocen también como fosfatasas de las MAPK (Mitogen-activated protein Kinase Phosphatase, MKP), ya que son capaces de actuar sobre las cinasas ERK, p38

y JNK (Camps et al., 2000). DUSP5 y DUSP6 son fosfatasa selectivas para ERK, aunque DUSP1 también puede actuar sobre dicha cinasa (Clark et al., 2008). Tal y como muestran nuestros resultados, la activación de ERK en neuronas dopaminérgicas está controlada mediante proteínas tirosina fosfatasa. Aunque la PTPR β explica algunos de nuestros resultados, no es la única tirosina fosfatasa implicada en la regulación de ERK, y por tanto, la DUSP1, DUSP5 y/o DUSP6 podría(n) surgir como la(s) tirosina fosfatasa(s) aún sin identificar de nuestro sistema neuronal.

La señalización de ERK se puede considerar como una ruta favorecedora de la supervivencia (Baines et al., 2002), aunque también se ha sugerido que puede promover la muerte celular (Chu et al., 2004; Zhuang and Schnellmann, 2006; Ren et al., 2009). Varios modelos de toxicidad neuronal asociados a la EP muestran una mayor actividad de ERK presente sobre todo en el citoplasma y mitocondrias, acompañado de un incremento de la mitofagia, es decir, de la degradación de mitocondrias por autofagia (Zhu et al., 2002; Chen et al., 2004; Dagda et al., 2008). Mientras niveles bajos de mitofagia confieren neuroprotección, una actividad excesiva por incremento de fosforilación de ERK es perjudicial para la funcionalidad de las neuronas. En nuestro sistema celular, observamos una diferencia entre las tirosina fosfatasas reguladoras de ERK y las reguladoras de la muerte celular en cuanto a que las primeras se inhiben tras la estimulación purinérgica, mientras que las implicadas en la muerte neuronal actúan de manera independiente al estímulo purinérgico. No obstante, es importante señalar que estos dos procesos pudieran estar en parte relacionados y regulados por las mismas fosfatasas (DUSP1, DUSP5 y/o DUSP6), aunque la señalización purinérgica *upstream* de éstas, afectara solamente a la vía de regulación de ERK.

Sin bien las fosfatasas han mostrado jugar un papel importante en la muerte neuronal, los ensayos de MTT tras la estimulación de los receptores purinérgicos, revelan otro modulador de la viabilidad celular en este sistema: el calcio. Los experimentos realizados en ausencia de calcio extracelular demuestran que la estimulación de los receptores purinérgicos conlleva siempre una muerte celular, y que además, la presencia de actividad fosfatasa

multiplica dicho efecto. En el caso de haber calcio en el medio extracelular, las fosfatasa también poseen una actividad basal que promueve la muerte celular, pero además, inhiben el efecto de proliferación mediado por receptores purinérgicos que se da en estas condiciones. Es probable que estos receptores mediadores de la proliferación celular sean receptores de la familia P2Y, ya que publicaciones anteriores describen la proliferación de progenitores neuronales mediada por este tipo de receptores (Ryu et al., 2003; Weissman et al., 2004; Resende et al., 2008). Estos resultados sugieren por una parte que los receptores purinérgicos activados pueden conducir a la muerte celular en ausencia de calcio, y por otra, que pueden mediar la proliferación celular siempre que haya calcio extracelular y que la actividad de las fosfatasa esté inhibida. En caso de que cualquiera de estos dos factores se vea alterado, especulamos que se podría producir una muerte de las neuronas dopaminérgicas que en último término podría asociarse con los primeros estadios de la EP.

Como se ha demostrado en el presente trabajo, la actividad de Ras, ERK y la muerte celular son tres elementos fundamentales en la señalización de las neuronas dopaminérgicas. Además, observamos que tanto el calcio como la actividad de tirosina fosfatasa son esenciales en la regulación de estas rutas de señalización. La fosfatasa PTPR β ha mostrado tener un papel esencial en este sistema, aunque los resultados sugieren la existencia de otras tirosina fosfatasa reguladoras de Ras, ERK y muerte celular. Sería interesante por tanto, plantear futuros experimentos para poder identificar las tirosina fosfatasa funcionales implicadas en la señalización y regulación las neuronas dopaminérgicas, comenzando por el estudio de fosfatasa asociadas al SNC como son la PTP1B (Dube and Tremblay, 2004), PTPN11 (Matozaki et al., 2009), STEP (Munoz et al., 2003; Paul et al., 2003), PTP ϵ (Toledano-Katchalski et al., 2003) o DUSPs (Camps et al., 2000; Wu et al., 2002). Creemos además, que tanto la regulación de Ras, como la de ERK y la muerte celular, muy probablemente no son procesos aislados sino que están relacionados de alguna manera entre sí. El estudio de la conexión entre estos tres elementos claves en la biología neuronal ayudaría a completar el esquema de señalización en este tipo celular, además de identificar nuevas posibles dianas

terapéuticas contra la muerte de neuronas dopaminérgicas implicadas en la enfermedad de Parkinson.

MODELO DE SEÑALIZACIÓN PROPUESTO

En base a los resultados presentados, proponemos un nuevo modelo de señalización celular mediada por receptores purinérgicos en neuronas dopaminérgicas, representado en la Figura 43. En esta señalización, es esencial la participación de las proteínas tirosina fosfatasa, que funcionan como reguladoras de otras proteínas tales como Ras o ERK, y de procesos como la muerte celular. Sin embargo, no todas las fosfatasa están reguladas de la misma manera ni actúan igual sobre los receptores. Otro de los factores importantes, es la disponibilidad del calcio extracelular, ya que tras internalizarse regula diversas rutas de señalización.

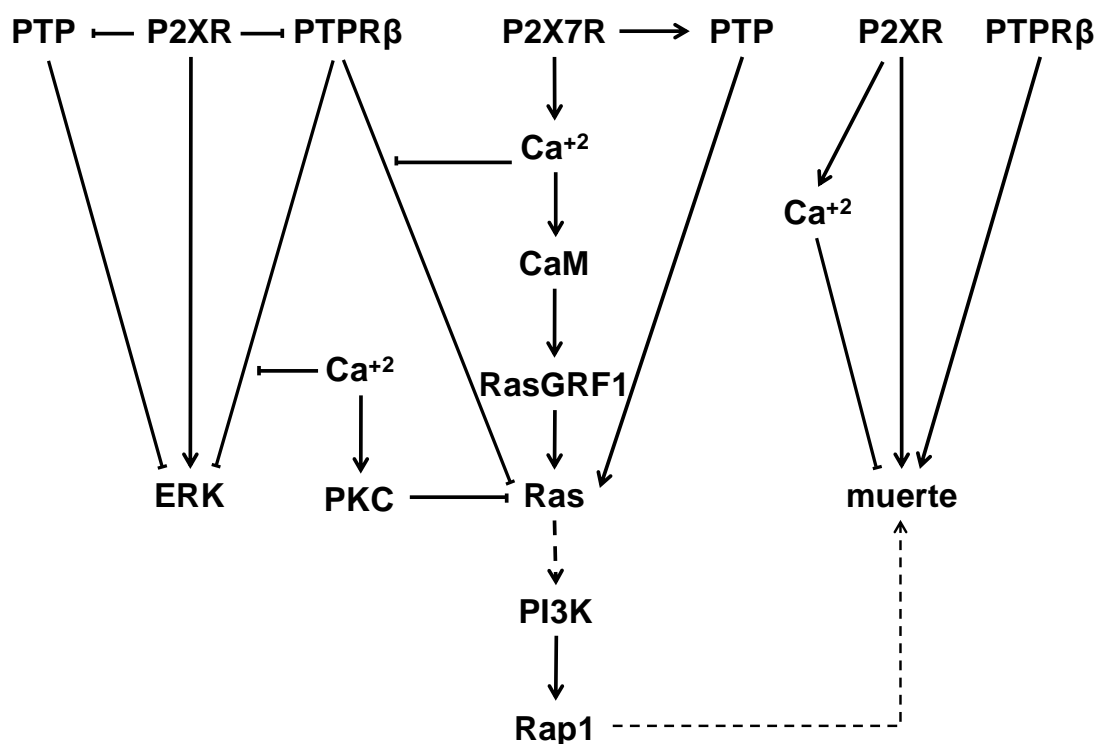


Figura 43. Esquema representativo propuesto para los modelos de cascadas de señalización mediadas por receptores purinérgicos en neuronas dopaminérgicas. Las interacciones observadas en este trabajo se representan mediante flechas continuas. Las flechas discontinuas representan interacciones basadas en evidencias no demostradas.

VIII. CONCLUSIONES

VIII. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral han dado lugar a las siguientes conclusiones:

1. 0,5 mM de ATP es la concentración mínima necesaria para mediar una señal celular detectable en neuronas dopaminérgicas.
2. La activación de la GTPasa Ras está mediada mayoritariamente por el receptor P2X₇, mientras que la activación de ERK la promueven los receptores P2X₁, P2X₃, P2X₄, y/o P2X₂.
3. Las PKCs dependientes de calcio regulan la activación neuronal de Ras.
4. La estimulación purinérgica de neuronas dopaminérgicas en ausencia de calcio extracelular conduce a la activación de Rap1 y a una mayor actividad de Ras, para finalmente desembocar en muerte celular.
5. El aumento de la actividad de Rap1 tras la estimulación purinérgica de neuronas dopaminérgicas es dependiente de PI3K.
6. Ras se activa mediante la ruta P2X₇/calcio/calmodulina/RasGRF1, en células HEK 293T.
7. La tirosina fosfatasa PTPRβ funciona como inhibidora de Ras y ERK en condiciones basales y es inhibida mediante la estimulación de los receptores purinérgicos en neuronas dopaminérgicas.
8. Los receptores purinérgicos median la activación neuronal de Ras además de inhibiendo una fosfatasa inhibidora (la PTPRβ), activando otra tirosina fosfatasa activadora de Ras.
9. La regulación basal de ERK mediada por la PTPRβ es dependiente de calcio.

10. La PTPR β no es la única fosfatasa reguladora de ERK en neuronas dopaminérgicas. Existen otras tirosina fosfatasas implicadas en la inhibición de ERK, esta vez independientes a calcio que son, al igual que la PTPR β , inhibidas tras la estimulación purinérgica.
11. Los receptores purinérgicos de neuronas dopaminérgicas promueven una activación de ERK independiente a la actividad de las tirosina fosfatasas.
12. La estimulación de receptores purinérgicos, en ausencia de calcio y/o presencia de actividad de la PTPR β y otras fosfatasas, induce la muerte de neuronas dopaminérgicas.

IX. BIBLIOGRAFÍA

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abraham EH, Prat AG, Gerweck L, Seneveratne T, Arceci RJ, Kramer R, Guidotti G, Cantiello HF. 1993. The multidrug resistance (mdr1) gene product functions as an ATP channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:312-316.
- Adamsky K, Arnold K, Sabanay H, Peles E. 2003. Junctional protein MAGI-3 interacts with receptor tyrosine phosphatase beta (RPTP beta) and tyrosine-phosphorylated proteins. *J Cell Sci* 116:1279-1289.
- Adamsky K, Schilling J, Garwood J, Faissner A, Peles E. 2001. Glial tumor cell adhesion is mediated by binding of the FNIII domain of receptor protein tyrosine phosphatase beta (RPTPbeta) to tenascin C. *Oncogene* 20:609-618.
- Adinolfi E, Callegari MG, Ferrari D, Bolognesi C, Minelli M, Wieckowski MR, Pinton P, Rizzuto R, Di Virgilio F. 2005. Basal activation of the P2X7 ATP receptor elevates mitochondrial calcium and potential, increases cellular ATP levels, and promotes serum-independent growth. *Mol Biol Cell* 16:3260-3272.
- Adinolfi E, Kim M, Young MT, Di Virgilio F, Surprenant A. 2003. Tyrosine phosphorylation of HSP90 within the P2X7 receptor complex negatively regulates P2X7 receptors. *J Biol Chem* 278:37344-37351.
- Aga M, Watters JJ, Pfeiffer ZA, Wiepz GJ, Sommer JA, Bertics PJ. 2004. Evidence for nucleotide receptor modulation of cross talk between MAP kinase and NF-kappa B signaling pathways in murine RAW 264.7 macrophages. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:C923-930.
- Agell N, Bachs O, Rocamora N, Villalonga P. 2002. Modulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by Ca(2+), and calmodulin. *Cell Signal* 14:649-654.
- Alvarez-Moya B, Lopez-Alcala C, Drosten M, Bachs O, Agell N. 2010. K-Ras4B phosphorylation at Ser181 is inhibited by calmodulin and modulates K-Ras activity and function. *Oncogene* 29:5911-5922.
- Anborgh PH, Qian X, Papageorge AG, Vass WC, DeClue JE, Lowy DR. 1999. Ras-specific exchange factor GRF: oligomerization through its Dbl homology domain and calcium-dependent activation of Raf. *Mol Cell Biol* 19:4611-4622.
- Appels NM, Beijnen JH, Schellens JH. 2005. Development of farnesyl transferase inhibitors: a review. *Oncologist* 10:565-578.
- Arozarena I, Aaronson DS, Matallanas D, Sanz V, Ajenjo N, Tenbaum SP, Teramoto H, Ighishi T, Zabala JC, Gutkind JS, Crespo P. 2000. The Rho family GTPase Cdc42 regulates the activation of Ras/MAP kinase by the exchange factor Ras-GRF. *J Biol Chem* 275:26441-26448.
- Arozarena I, Matallanas D, Berciano MT, Sanz-Moreno V, Calvo F, Munoz MT, Egea G, Lafarga M, Crespo P. 2004. Activation of H-Ras in the endoplasmic reticulum by the RasGRF family guanine nucleotide exchange factors. *Mol Cell Biol* 24:1516-1530.
- Ashery U, Yizhar O, Rotblat B, Kloog Y. 2006. Nonconventional trafficking of Ras associated with Ras signal organization. *Traffic* 7:119-126.

- Bahima L, Aleu J, Elias M, Martin-Satue M, Muhaisen A, Blasi J, Marsal J, Solsona C. 2006. Endogenous hemichannels play a role in the release of ATP from *Xenopus* oocytes. *J Cell Physiol* 206:95-102.
- Bain PG. 2007. Parkinsonism & related disorders. Tremor. *Parkinsonism Relat Disord* 13 Suppl 3:S369-374.
- Baines CP, Zhang J, Wang GW, Zheng YT, Xiu JX, Cardwell EM, Bolli R, Ping P. 2002. Mitochondrial PKCepsilon and MAPK form signaling modules in the murine heart: enhanced mitochondrial PKCepsilon-MAPK interactions and differential MAPK activation in PKCepsilon-induced cardioprotection. *Circ Res* 90:390-397.
- Ballester R, Furth ME, Rosen OM. 1987. Phorbol ester- and protein kinase C-mediated phosphorylation of the cellular Kirsten ras gene product. *J Biol Chem* 262:2688-2695.
- Baouz S, Jacquet E, Accorsi K, Hountondji C, Balestrini M, Zippel R, Sturani E, Parmeggiani A. 2001. Sites of phosphorylation by protein kinase A in CDC25Mm/GRF1, a guanine nucleotide exchange factor for Ras. *J Biol Chem* 276:1742-1749.
- Bar-Sagi D, Hall A. 2000. Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell* 103:227-238.
- Barbe MT, Monyer H, Bruzzone R. 2006. Cell-cell communication beyond connexins: the pannexin channels. *Physiology (Bethesda)* 21:103-114.
- Barcelo C, Paco N, Beckett AJ, Alvarez-Moya B, Garrido E, Gelabert M, Tebar F, Jaumot M, Prior I, Agell N. 2013. Oncogenic K-ras segregates at spatially distinct plasma membrane signaling platforms according to its phosphorylation status. *J Cell Sci* 126:4553-4559.
- Barnea G, Grumet M, Milev P, Silvennoinen O, Levy JB, Sap J, Schlessinger J. 1994. Receptor tyrosine phosphatase beta is expressed in the form of proteoglycan and binds to the extracellular matrix protein tenascin. *J Biol Chem* 269:14349-14352.
- Barnea G, Silvennoinen O, Shaanan B, Honegger AM, Canoll PD, D'Eustachio P, Morse B, Levy JB, Laforgia S, Huebner K, et al. 1993. Identification of a carbonic anhydrase-like domain in the extracellular region of RPTP gamma defines a new subfamily of receptor tyrosine phosphatases. *Mol Cell Biol* 13:1497-1506.
- Bianchi BR, Lynch KJ, Touma E, Niforatos W, Burgard EC, Alexander KM, Park HS, Yu H, Metzger R, Kowaluk E, Jarvis MF, van Biesen T. 1999. Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes. *Eur J Pharmacol* 376:127-138.
- Bishop AL, Hall A. 2000. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 348 Pt 2:241-255.
- Bivona TG, Wiener HH, Ahearn IM, Silletti J, Chiu VK, Philips MR. 2004. Rap1 up-regulation and activation on plasma membrane regulates T cell adhesion. *J Cell Biol* 164:461-470.
- Björklund A, Lindvall, O. . 1984. Dopamine-containing systems in the CNS. In: Björklund A, Hökfelt T. , editor. *Handbook of Chemical Neuroanatomy. Vol.2: Classical Transmitters in the CNS Part I.* Amsterdam: Elsevier Science. p 55-122.
- Blomberg N, Nilges M. 1997. Functional diversity of PH domains: an exhaustive modelling study. *Fold Des* 2:343-355.

- Bodin P, Burnstock G. 2001. Purinergic signalling: ATP release. *Neurochem Res* 26:959-969.
- Boguski MS, McCormick F. 1993. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 366:643-654.
- Boriack-Sjodin PA, Margarit SM, Bar-Sagi D, Kuriyan J. 1998. The structural basis of the activation of Ras by Sos. *Nature* 394:337-343.
- Bos JL. 1998. All in the family? New insights and questions regarding interconnectivity of Ras, Rap1 and Ral. *EMBO J* 17:6776-6782.
- Bos JL, Rehmann H, Wittinghofer A. 2007. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* 129:865-877.
- Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. 1991. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349:117-127.
- Bouvier M. 2001. Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat Rev Neurosci* 2:274-286.
- Bowden ET, Stoica GE, Wellstein A. 2002. Anti-apoptotic signaling of pleiotrophin through its receptor, anaplastic lymphoma kinase. *J Biol Chem* 277:35862-35868.
- Brambilla R, Gnesutta N, Minichiello L, White G, Roylance AJ, Herron CE, Ramsey M, Wolfer DP, Cestari V, Rossi-Arnaud C, Grant SG, Chapman PF, Lipp HP, Sturani E, Klein R. 1997. A role for the Ras signalling pathway in synaptic transmission and long-term memory. *Nature* 390:281-286.
- Broek D, Toda T, Michaeli T, Levin L, Birchmeier C, Zoller M, Powers S, Wigler M. 1987. The *S. cerevisiae* CDC25 gene product regulates the RAS/adenylate cyclase pathway. *Cell* 48:789-799.
- Buchsbaum R, Telliez JB, Goonesekera S, Feig LA. 1996. The N-terminal pleckstrin, coiled-coil, and IQ domains of the exchange factor Ras-GRF act cooperatively to facilitate activation by calcium. *Mol Cell Biol* 16:4888-4896.
- Buday L, Downward J. 2008. Many faces of Ras activation. *Biochim Biophys Acta* 1786:178-187.
- Buettner R, Papoutsoglou G, Scemes E, Spray DC, Dermietzel R. 2000. Evidence for secretory pathway localization of a voltage-dependent anion channel isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3201-3206.
- Burnstock G. 1972. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 24:509-581.
- Burnstock G, Campbell G, Bennett M, Holman ME. 1963. Inhibition of the Smooth Muscle on the Taenia Coli. *Nature* 200:581-582.
- Burnstock G, Campbell G, Bennett M, Holman ME. 1964. Innervation of the Guinea-Pig Taenia Coli: Are There Intrinsic Inhibitory Nerves Which Are Distinct from Sympathetic Nerves? *Int J Neuropharmacol* 3:163-166.
- Burnstock G, Kennedy C. 1985. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen Pharmacol* 16:433-440.
- Burnstock G, Knight GE. 2004. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol* 240:31-304.
- Caloca MJ, Zugaza JL, Matallanas D, Crespo P, Bustelo XR. 2003. Vav mediates Ras stimulation by direct activation of the GDP/GTP exchange factor Ras GRP1. *EMBO J* 22:3326-3336.
- Camps M, Nichols A, Arkinstall S. 2000. Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *FASEB J* 14:6-16.

- Canoll PD, Barnea G, Levy JB, Sap J, Ehrlich M, Silvennoinen O, Schlessinger J, Musacchio JM. 1993. The expression of a novel receptor-type tyrosine phosphatase suggests a role in morphogenesis and plasticity of the nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* 75:293-298.
- Casar B, Arozarena I, Sanz-Moreno V, Pinto A, Agudo-Ibanez L, Marais R, Lewis RE, Berciano MT, Crespo P. 2009. Ras subcellular localization defines extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 substrate specificity through distinct utilization of scaffold proteins. *Mol Cell Biol* 29:1338-1353.
- Casey PJ, Seabra MC. 1996. Protein prenyltransferases. *J Biol Chem* 271:5289-5292.
- Castiglioni S, Maier JA, Mariotti M. 2007. The tyrosine phosphatase HD-PTP: A novel player in endothelial migration. *Biochem Biophys Res Commun* 364:534-539.
- Cen H, Papageorge AG, Vass WC, Zhang KE, Lowy DR. 1993. Regulated and constitutive activity by CDC25Mm (GRF), a Ras-specific exchange factor. *Mol Cell Biol* 13:7718-7724.
- Cen H, Papageorge AG, Zippel R, Lowy DR, Zhang K. 1992. Isolation of multiple mouse cDNAs with coding homology to *Saccharomyces cerevisiae* CDC25: identification of a region related to Bcr, Vav, Dbl and CDC24. *EMBO J* 11:4007-4015.
- Clark AR, Martins JR, Tchen CR. 2008. Role of dual specificity phosphatases in biological responses to glucocorticoids. *J Biol Chem* 283:25765-25769.
- Cockcroft S, Gomperts BD. 1979. ATP induces nucleotide permeability in rat mast cells. *Nature* 279:541-542.
- Cockcroft S, Gomperts BD. 1980. The ATP4- receptor of rat mast cells. *Biochem J* 188:789-798.
- Coco S, Calegari F, Pravettoni E, Pozzi D, Taverna E, Rosa P, Matteoli M, Verderio C. 2003. Storage and release of ATP from astrocytes in culture. *J Biol Chem* 278:1354-1362.
- Colicelli J. 2004. Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci STKE* 2004:RE13.
- Cotzias GC, Van Woert MH, Schiffer LM. 1967. Aromatic amino acids and modification of parkinsonism. *N Engl J Med* 276:374-379.
- Cox AD, Der CJ. 1997. Farnesyltransferase inhibitors and cancer treatment: targeting simply Ras? *Biochim Biophys Acta* 1333:F51-71.
- Craig NJ, Duran Alonso MB, Hawker KL, Shiels P, Glencorse TA, Campbell JM, Bennett NK, Canham M, Donald D, Gardiner M, Gilmore DP, MacDonald RJ, Maitland K, McCallion AS, Russell D, Payne AP, Sutcliffe RG, Davies RW. 2001. A candidate gene for human neurodegenerative disorders: a rat PKC gamma mutation causes a Parkinsonian syndrome. *Nat Neurosci* 4:1061-1062.
- Cullen PJ, Lockyer PJ. 2002. Integration of calcium and Ras signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:339-348.
- Chambers JK, Macdonald LE, Sarau HM, Ames RS, Freeman K, Foley JJ, Zhu Y, McLaughlin MM, Murdock P, McMillan L, Trill J, Swift A, Aiyar N, Taylor P, Vawter L, Naheed S, Szekeres P, Hervieu G, Scott C, Watson JM, Murphy AJ, Duzic E, Klein C, Bergsma DJ, Wilson S, Livi GP. 2000. A G protein-coupled receptor for UDP-glucose. *J Biol Chem* 275:10767-10771.

- Chaudhuri KR, Schapira AH. 2009. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *Lancet Neurol* 8:464-474.
- Chen J, Rusnak M, Luedtke RR, Sidhu A. 2004. D1 dopamine receptor mediates dopamine-induced cytotoxicity via the ERK signal cascade. *J Biol Chem* 279:39317-39330.
- Chen XQ, Wang B, Wu C, Pan J, Yuan B, Su YY, Jiang XY, Zhang X, Bao L. 2012. Endosome-mediated retrograde axonal transport of P2X3 receptor signals in primary sensory neurons. *Cell Res* 22:677-696.
- Cherfils J, Zeghouf M. 2013. Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol Rev* 93:269-309.
- Chinta SJ, Andersen JK. 2005. Dopaminergic neurons. *Int J Biochem Cell Biol* 37:942-946.
- Choi RC, Siow NL, Cheng AW, Ling KK, Tung EK, Simon J, Barnard EA, Tsim KW. 2003. ATP acts via P2Y1 receptors to stimulate acetylcholinesterase and acetylcholine receptor expression: transduction and transcription control. *J Neurosci* 23:4445-4456.
- Chong Y, Stuyver L, Otto MJ, Schinazi RF, Chu CK. 2003. Mechanism of antiviral activities of 3'-substituted L-nucleosides against 3TC-resistant HBV polymerase: a molecular modelling approach. *Antivir Chem Chemother* 14:309-319.
- Choy E, Chiu VK, Silletti J, Feoktistov M, Morimoto T, Michaelson D, Ivanov IE, Philips MR. 1999. Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell* 98:69-80.
- Chu CT, Levinthal DJ, Kulich SM, Chalovich EM, DeFranco DB. 2004. Oxidative neuronal injury. The dark side of ERK1/2. *Eur J Biochem* 271:2060-2066.
- Dagda RK, Zhu J, Kulich SM, Chu CT. 2008. Mitochondrially localized ERK2 regulates mitophagy and autophagic cell stress: implications for Parkinson's disease. *Autophagy* 4:770-782.
- Dahl G, Locovei S. 2006. Pannexin: to gap or not to gap, is that a question? *IUBMB Life* 58:409-419.
- Dai Q, Choy E, Chiu V, Romano J, Slivka SR, Steitz SA, Michaelis S, Philips MR. 1998. Mammalian prenylcysteine carboxyl methyltransferase is in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 273:15030-15034.
- Dauer W, Przedborski S. 2003. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39:889-909.
- Dawson TM, Dawson VL. 2003. Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science* 302:819-822.
- de Hoog CL, Koehler JA, Goldstein MD, Taylor P, Figeys D, Moran MF. 2001. Ras binding triggers ubiquitination of the Ras exchange factor RasGRF2. *Mol Cell Biol* 21:2107-2117.
- de la Puente A, Hall J, Wu YZ, Leone G, Peters J, Yoon BJ, Soloway P, Plass C. 2002. Structural characterization of Rasgrf1 and a novel linked imprinted locus. *Gene* 291:287-297.
- de Rooij DG, Okabe M, Nishimune Y. 1999. Arrest of spermatogonial differentiation in *jsd/jsd*, *Sl17H/Sl17H*, and cryptorchid mice. *Biol Reprod* 61:842-847.
- Degoutin J, Vigny M, Gouzi JY. 2007. ALK activation induces Shc and FRS2 recruitment: Signaling and phenotypic outcomes in PC12 cells differentiation. *FEBS Lett* 581:727-734.

- Deuel TF. 2013. Anaplastic lymphoma kinase: "Ligand Independent Activation" mediated by the PTN/RPTPbeta/zeta signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* 1834:2219-2223.
- Devi LA. 2001. Heterodimerization of G-protein-coupled receptors: pharmacology, signaling and trafficking. *Trends Pharmacol Sci* 22:532-537.
- Ding Z, Kim S, Dorsam RT, Jin J, Kunapuli SP. 2003. Inactivation of the human P2Y₁₂ receptor by thiol reagents requires interaction with both extracellular cysteine residues, Cys17 and Cys270. *Blood* 101:3908-3914.
- Donnelly-Roberts DL, Jarvis MF. 2007. Discovery of P2X₇ receptor-selective antagonists offers new insights into P2X₇ receptor function and indicates a role in chronic pain states. *Br J Pharmacol* 151:571-579.
- Donnelly-Roberts DL, Namovic MT, Faltynek CR, Jarvis MF. 2004. Mitogen-activated protein kinase and caspase signaling pathways are required for P2X₇ receptor (P2X₇R)-induced pore formation in human THP-1 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 308:1053-1061.
- Donnelly-Roberts DL, Namovic MT, Han P, Jarvis MF. 2009. Mammalian P2X₇ receptor pharmacology: comparison of recombinant mouse, rat and human P2X₇ receptors. *Br J Pharmacol* 157:1203-1214.
- Drury AN, Szent-Gyorgyi A. 1929. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol* 68:213-237.
- Dube N, Tremblay ML. 2004. Beyond the metabolic function of PTP1B. *Cell Cycle* 3:550-553.
- Dubyak GR. 2013. Dueling nucleosides: cross-regulation of extracellular adenosine by guanosine. Focus on "Extracellular guanosine regulates extracellular adenosine levels". *Am J Physiol Cell Physiol* 304:C403-405.
- Dugas JC, Mandemakers W, Rogers M, Ibrahim A, Daneman R, Barres BA. 2008. A novel purification method for CNS projection neurons leads to the identification of brain vascular cells as a source of trophic support for corticospinal motor neurons. *J Neurosci* 28:8294-8305.
- Ebinu JO, Bottorff DA, Chan EY, Stang SL, Dunn RJ, Stone JC. 1998. RasGRP, a Ras guanyl nucleotide- releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. *Science* 280:1082-1086.
- Edwards M. QN, Bhatia K. 2008a. Parkinson's disease. In *Parkinson's disease and other movement disorders*. In: Press OU, editor. Oxford. p 17-80.
- Edwards M. QN, Bhatia K. 2008b. Tremor. In *Parkinson's disease and other movement disorders*. In: Press OU, editor. Oxford. p 102-118.
- Egan TM, Khakh BS. 2004. Contribution of calcium ions to P2X channel responses. *J Neurosci* 24:3413-3420.
- Eltzschig HK, Eckle T, Mager A, Kuper N, Karcher C, Weissmuller T, Boengler K, Schulz R, Robson SC, Colgan SP. 2006. ATP release from activated neutrophils occurs via connexin 43 and modulates adenosine-dependent endothelial cell function. *Circ Res* 99:1100-1108.
- Falck B, Hillarp NA, Thieme G, Torp A. 1982. Fluorescence of catechol amines and related compounds condensed with formaldehyde. *Brain Res Bull* 9:xi-xv.
- Falzoni S, Donvito G, Di Virgilio F. 2013. Detecting adenosine triphosphate in the pericellular space. *Interface Focus* 3:20120101.

- Fam NP, Fan WT, Wang Z, Zhang LJ, Chen H, Moran MF. 1997. Cloning and characterization of Ras-GRF2, a novel guanine nucleotide exchange factor for Ras. *Mol Cell Biol* 17:1396-1406.
- Fan WT, Koch CA, de Hoog CL, Fam NP, Moran MF. 1998. The exchange factor Ras-GRF2 activates Ras-dependent and Rac-dependent mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Biol* 8:935-938.
- Fanning AS, Anderson JM. 1999. PDZ domains: fundamental building blocks in the organization of protein complexes at the plasma membrane. *J Clin Invest* 103:767-772.
- Faria RX, Defarias FP, Alves LA. 2005. Are second messengers crucial for opening the pore associated with P2X7 receptor? *Am J Physiol Cell Physiol* 288:C260-271.
- Farnsworth CL, Freshney NW, Rosen LB, Ghosh A, Greenberg ME, Feig LA. 1995. Calcium activation of Ras mediated by neuronal exchange factor Ras-GRF. *Nature* 376:524-527.
- Fasano S, D'Antoni A, Orban PC, Valjent E, Putignano E, Vara H, Pizzorusso T, Giustetto M, Yoon B, Soloway P, Maldonado R, Caboche J, Brambilla R. 2009. Ras-guanine nucleotide-releasing factor 1 (Ras-GRF1) controls activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling in the striatum and long-term behavioral responses to cocaine. *Biol Psychiatry* 66:758-768.
- Fernandez-Medarde A, Barhoum R, Riquelme R, Porteros A, Nunez A, de Luis A, de Las Rivas J, de la Villa P, Varela-Nieto I, Santos E. 2009. RasGRF1 disruption causes retinal photoreception defects and associated transcriptomic alterations. *J Neurochem* 110:641-652.
- Fernandez-Medarde A, Esteban LM, Nunez A, Porteros A, Tessarollo L, Santos E. 2002. Targeted disruption of Ras-Grf2 shows its dispensability for mouse growth and development. *Mol Cell Biol* 22:2498-2504.
- Fernandez-Medarde A, Santos E. 2011. The RasGrf family of mammalian guanine nucleotide exchange factors. *Biochim Biophys Acta* 1815:170-188.
- Ferrari D, Los M, Bauer MK, Vandenabeele P, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K. 1999. P2Z purinoreceptor ligation induces activation of caspases with distinct roles in apoptotic and necrotic alterations of cell death. *FEBS Lett* 447:71-75.
- Ferrario JE, Taravini IR, Mourlevat S, Stefano A, Delfino MA, Raisman-Vozari R, Murer MG, Ruberg M, Gershanik O. 2004. Differential gene expression induced by chronic levodopa treatment in the striatum of rats with lesions of the nigrostriatal system. *J Neurochem* 90:1348-1358.
- Fischer A, Sananbenesi F, Spiess J, Radulovic J. 2003. Cdk5: a novel role in learning and memory. *Neurosignals* 12:200-208.
- Foehr ED, Lorente G, Kuo J, Ram R, Nikolich K, Urfer R. 2006. Targeting of the receptor protein tyrosine phosphatase beta with a monoclonal antibody delays tumor growth in a glioblastoma model. *Cancer Res* 66:2271-2278.
- Font de Mora J, Esteban LM, Burks DJ, Nunez A, Garces C, Garcia-Barrado MJ, Iglesias-Osma MC, Moratinos J, Ward JM, Santos E. 2003. Ras-GRF1 signaling is required for normal beta-cell development and glucose homeostasis. *EMBO J* 22:3039-3049.
- Franke B, Akkerman JW, Bos JL. 1997. Rapid Ca²⁺-mediated activation of Rap1 in human platelets. *EMBO J* 16:252-259.

- Franke B, van Triest M, de Bruijn KM, van Willigen G, Nieuwenhuis HK, Negrier C, Akkerman JW, Bos JL. 2000. Sequential regulation of the small GTPase Rap1 in human platelets. *Mol Cell Biol* 20:779-785.
- Freeman K, Tsui P, Moore D, Emson PC, Vawter L, Naheed S, Lane P, Bawagan H, Herrity N, Murphy K, Sarau HM, Ames RS, Wilson S, Livi GP, Chambers JK. 2001. Cloning, pharmacology, and tissue distribution of G-protein-coupled receptor GPR105 (KIAA0001) rodent orthologs. *Genomics* 78:124-128.
- Freshney NW, Goonesekera SD, Feig LA. 1997. Activation of the exchange factor Ras-GRF by calcium requires an intact Dbl homology domain. *FEBS Lett* 407:111-115.
- Friedle SA, Brautigam VM, Nikodemova M, Wright ML, Watters JJ. 2011. The P2X7-Egr pathway regulates nucleotide-dependent inflammatory gene expression in microglia. *Glia* 59:1-13.
- Fukada M, Fujikawa A, Chow JP, Ikematsu S, Sakuma S, Noda M. 2006. Protein tyrosine phosphatase receptor type Z is inactivated by ligand-induced oligomerization. *FEBS Lett* 580:4051-4056.
- Gallagher DA, Lees AJ, Schrag A. 2010. What are the most important nonmotor symptoms in patients with Parkinson's disease and are we missing them? *Mov Disord* 25:2493-2500.
- Gibbs JB, Sigal IS, Poe M, Scolnick EM. 1984. Intrinsic GTPase activity distinguishes normal and oncogenic ras p21 molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:5704-5708.
- Giese KP, Friedman E, Telliez JB, Fedorov NB, Wines M, Feig LA, Silva AJ. 2001. Hippocampus-dependent learning and memory is impaired in mice lacking the Ras-guanine-nucleotide releasing factor 1 (Ras-GRF1). *Neuropharmacology* 41:791-800.
- Giglione C, Gonfloni S, Parmeggiani A. 2001. Differential actions of p60c-Src and Lck kinases on the Ras regulators p120-GAP and GDP/GTP exchange factor CDC25Mm. *Eur J Biochem* 268:3275-3283.
- Gingras MC, Zhang YL, Kharitidi D, Barr AJ, Knapp S, Tremblay ML, Pause A. 2009. HD-PTP is a catalytically inactive tyrosine phosphatase due to a conserved divergence in its phosphatase domain. *PLoS One* 4:e5105.
- Glomset JA, Farnsworth CC. 1994. Role of protein modification reactions in programming interactions between ras-related GTPases and cell membranes. *Annu Rev Cell Biol* 10:181-205.
- Gombash SE, Lipton JW, Collier TJ, Madhavan L, Steece-Collier K, Cole-Strauss A, Terpstra BT, Spieles-Engemann AL, Daley BF, Wohlgenant SL, Thompson VB, Manfredsson FP, Mandel RJ, Sortwell CE. 2012. Striatal pleiotrophin overexpression provides functional and morphological neuroprotection in the 6-hydroxydopamine model. *Mol Ther* 20:544-554.
- Gonzalez-Mariscal L, Betanzos A, Avila-Flores A. 2000. MAGUK proteins: structure and role in the tight junction. *Semin Cell Dev Biol* 11:315-324.
- Gordon JL. 1986. Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem J* 233:309-319.
- Gotoh T, Niino Y, Tokuda M, Hatase O, Nakamura S, Matsuda M, Hattori S. 1997. Activation of R-Ras by Ras-guanine nucleotide-releasing factor. *J Biol Chem* 272:18602-18607.

- Gourine AV, Dale N, Llaudet E, Poputnikov DM, Spyer KM, Gourine VN. 2007. Release of ATP in the central nervous system during systemic inflammation: real-time measurement in the hypothalamus of conscious rabbits. *J Physiol* 585:305-316.
- Gramage E, Alguacil LF, Herradon G. 2008. Pleiotrophin prevents cocaine-induced toxicity in vitro. *Eur J Pharmacol* 595:35-38.
- Grumet M, Milev P, Sakurai T, Karthikeyan L, Bourdon M, Margolis RK, Margolis RU. 1994. Interactions with tenascin and differential effects on cell adhesion of neurocan and phosphacan, two major chondroitin sulfate proteoglycans of nervous tissue. *J Biol Chem* 269:12142-12146.
- Guerrero C, Rojas JM, Chedid M, Esteban LM, Zimonjic DB, Popescu NC, Font de Mora J, Santos E. 1996. Expression of alternative forms of Ras exchange factors GRF and SOS1 in different human tissues and cell lines. *Oncogene* 12:1097-1107.
- Hancock JF. 2003. Ras proteins: different signals from different locations. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:373-384.
- Hancock JF, Paterson H, Marshall CJ. 1990. A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell* 63:133-139.
- Hanisch UK, Kettenmann H. 2007. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10:1387-1394.
- Harlan JE, Hajduk PJ, Yoon HS, Fesik SW. 1994. Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* 371:168-170.
- Harris BZ, Lim WA. 2001. Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J Cell Sci* 114:3219-3231.
- Harvey JJ. 1964. An Unidentified Virus Which Causes the Rapid Production of Tumours in Mice. *Nature* 204:1104-1105.
- He Y, Kapoor A, Cook S, Liu S, Xiang Y, Rao CV, Kenis PJ, Wang F. 2011. The non-receptor tyrosine kinase Lyn controls neutrophil adhesion by recruiting the CrkL-C3G complex and activating Rap1 at the leading edge. *J Cell Sci* 124:2153-2164.
- Herradon G, Ezquerra L. 2009. Blocking receptor protein tyrosine phosphatase beta/zeta: a potential therapeutic strategy for Parkinson's disease. *Curr Med Chem* 16:3322-3329.
- Herradon G, Perez-Garcia C. 2014. Targeting midkine and pleiotrophin signalling pathways in addiction and neurodegenerative disorders: recent progress and perspectives. *Br J Pharmacol* 171:837-848.
- Herrmann C. 2003. Ras-effector interactions: after one decade. *Curr Opin Struct Biol* 13:122-129.
- Hoffmann C, Moro S, Nicholas RA, Harden TK, Jacobson KA. 1999. The role of amino acids in extracellular loops of the human P2Y1 receptor in surface expression and activation processes. *J Biol Chem* 274:14639-14647.
- Holton FA, Holton P. 1953. The possibility that ATP is a transmitter at sensory nerve endings. *J Physiol* 119:50P-51P.
- Holton FA, Holton P. 1954. The capillary dilator substances in dry powders of spinal roots; a possible role of adenosine triphosphate in chemical transmission from nerve endings. *J Physiol* 126:124-140.
- Holton P. 1959. The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J Physiol* 145:494-504.

- Hooper R, Rothberg BS, Soboloff J. 2014. Neuronal STIMulation at rest. *Sci Signal* 7:pe18.
- Hu Y, Fiset PL, Denlinger LC, Guadarrama AG, Sommer JA, Proctor RA, Bertics PJ. 1998. Purinergic receptor modulation of lipopolysaccharide signaling and inducible nitric-oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages. *J Biol Chem* 273:27170-27175.
- Hysi PG, Young TL, Mackey DA, Andrew T, Fernandez-Medarde A, Solouki AM, Hewitt AW, Macgregor S, Vingerling JR, Li YJ, Ikram MK, Fai LY, Sham PC, Manyes L, Porteros A, Lopes MC, Carbonaro F, Fahy SJ, Martin NG, van Duijn CM, Spector TD, Rahi JS, Santos E, Klaver CC, Hammond CJ. 2010. A genome-wide association study for myopia and refractive error identifies a susceptibility locus at 15q25. *Nat Genet* 42:902-905.
- Innocenti M, Zippel R, Brambilla R, Sturani E. 1999. CDC25(Mm)/Ras-GRF1 regulates both Ras and Rac signaling pathways. *FEBS Lett* 460:357-362.
- Inoue K. 2002. Microglial activation by purines and pyrimidines. *Glia* 40:156-163.
- Ishikawa E, Ooboshi H, Kumai Y, Takada J, Nakamura K, Ago T, Sugimori H, Kamouchi M, Kitazono T, Ibayashi S, Iida M. 2009. Midkine gene transfer protects against focal brain ischemia and augments neurogenesis. *J Neurol Sci* 285:78-84.
- Itier JM, Tremp GL, Leonard JF, Multon MC, Ret G, Schweighoffer F, Tocque B, Bluet-Pajot MT, Cormier V, Dautry F. 1998. Imprinted gene in postnatal growth role. *Nature* 393:125-126.
- Jankovic J. 2008. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79:368-376.
- Javitch JA. 2004. The ants go marching two by two: oligomeric structure of G-protein-coupled receptors. *Mol Pharmacol* 66:1077-1082.
- Jin L, Jianghai C, Juan L, Hao K. 2009. Pleiotrophin and peripheral nerve injury. *Neurosurg Rev* 32:387-393.
- Johnson L, Greenbaum D, Cichowski K, Mercer K, Murphy E, Schmitt E, Bronson RT, Umanoff H, Edelmann W, Kucherlapati R, Jacks T. 1997. K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras. *Genes Dev* 11:2468-2481.
- Jones MK, Jackson JH. 1998. Ras-GRF activates Ha-Ras, but not N-Ras or K-Ras 4B, protein in vivo. *J Biol Chem* 273:1782-1787.
- Jun DJ, Kim J, Jung SY, Song R, Noh JH, Park YS, Ryu SH, Kim JH, Kong YY, Chung JM, Kim KT. 2007. Extracellular ATP mediates necrotic cell swelling in SN4741 dopaminergic neurons through P2X7 receptors. *J Biol Chem* 282:37350-37358.
- Jun JE, Rubio I, Roose JP. 2013. Regulation of ras exchange factors and cellular localization of ras activation by lipid messengers in T cells. *Front Immunol* 4:239.
- Jung CG, Hida H, Nakahira K, Ikenaka K, Kim HJ, Nishino H. 2004. Pleiotrophin mRNA is highly expressed in neural stem (progenitor) cells of mouse ventral mesencephalon and the product promotes production of dopaminergic neurons from embryonic stem cell-derived nestin-positive cells. *FASEB J* 18:1237-1239.
- Jung SM, Ohnuma M, Watanabe N, Sonoda M, Handa M, Moroi M. 2006. Analyzing the mechanism of Rap1 activation in platelets: Rap1 activation

- is related to the release reaction mediated through the collagen receptor GPVI. *Thromb Res* 118:509-521.
- Kadomatsu K, Kishida S, Tsubota S. 2013. The heparin-binding growth factor midkine: the biological activities and candidate receptors. *J Biochem* 153:511-521.
- Kadomatsu K, Muramatsu T. 2004. Midkine and pleiotrophin in neural development and cancer. *Cancer Lett* 204:127-143.
- Kadomatsu K, Tomomura M, Muramatsu T. 1988. cDNA cloning and sequencing of a new gene intensely expressed in early differentiation stages of embryonal carcinoma cells and in mid-gestation period of mouse embryogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 151:1312-1318.
- Katagiri K, Shimonaka M, Kinashi T. 2004. Rap1-mediated lymphocyte function-associated antigen-1 activation by the T cell antigen receptor is dependent on phospholipase C-gamma1. *J Biol Chem* 279:11875-11881.
- Kaul S, Kanthasamy A, Kitazawa M, Anantharam V, Kanthasamy AG. 2003. Caspase-3 dependent proteolytic activation of protein kinase C delta mediates and regulates 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+)-induced apoptotic cell death in dopaminergic cells: relevance to oxidative stress in dopaminergic degeneration. *Eur J Neurosci* 18:1387-1401.
- Kawachi H, Fujikawa A, Maeda N, Noda M. 2001. Identification of GIT1/Cat-1 as a substrate molecule of protein tyrosine phosphatase zeta /beta by the yeast substrate-trapping system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6593-6598.
- Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, Housman DE, Graybiel AM. 1998. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* 282:2275-2279.
- Kesavapany S, Amin N, Zheng YL, Nijhara R, Jaffe H, Sihag R, Gutkind JS, Takahashi S, Kulkarni A, Grant P, Pant HC. 2004. p35/cyclin-dependent kinase 5 phosphorylation of ras guanine nucleotide releasing factor 2 (RasGRF2) mediates Rac-dependent Extracellular Signal-regulated kinase 1/2 activity, altering RasGRF2 and microtubule-associated protein 1b distribution in neurons. *J Neurosci* 24:4421-4431.
- Kesavapany S, Pareek TK, Zheng YL, Amin N, Gutkind JS, Ma W, Kulkarni AB, Grant P, Pant HC. 2006. Neuronal nuclear organization is controlled by cyclin-dependent kinase 5 phosphorylation of Ras Guanine nucleotide releasing factor-1. *Neurosignals* 15:157-173.
- Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. 2011. Physiology of microglia. *Physiol Rev* 91:461-553.
- Kikuchi S, Muramatsu H, Muramatsu T, Kim SU. 1993. Midkine, a novel neurotrophic factor, promotes survival of mesencephalic neurons in culture. *Neurosci Lett* 160:9-12.
- Kim M, Jiang LH, Wilson HL, North RA, Surprenant A. 2001. Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *EMBO J* 20:6347-6358.
- Kirsten WH, Mayer LA. 1967. Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus. *J Natl Cancer Inst* 39:311-335.
- Kitayama H, Sugimoto Y, Matsuzaki T, Ikawa Y, Noda M. 1989. A ras-related gene with transformation suppressor activity. *Cell* 56:77-84.
- Kiyono M, Kato J, Kataoka T, Kaziro Y, Satoh T. 2000a. Stimulation of Ras guanine nucleotide exchange activity of Ras-GRF1/CDC25(Mm) upon

- tyrosine phosphorylation by the Cdc42-regulated kinase ACK1. *J Biol Chem* 275:29788-29793.
- Kiyono M, Kaziro Y, Satoh T. 2000b. Induction of rac-guanine nucleotide exchange activity of Ras-GRF1/CDC25(Mm) following phosphorylation by the nonreceptor tyrosine kinase Src. *J Biol Chem* 275:5441-5446.
- Kiyono M, Satoh T, Kaziro Y. 1999. G protein beta gamma subunit-dependent Rac-guanine nucleotide exchange activity of Ras-GRF1/CDC25(Mm). *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:4826-4831.
- Krapivinsky G, Krapivinsky L, Manasian Y, Ivanov A, Tyzio R, Pellegrino C, Ben-Ari Y, Clapham DE, Medina I. 2003. The NMDA receptor is coupled to the ERK pathway by a direct interaction between NR2B and RasGRF1. *Neuron* 40:775-784.
- Krueger NX, Saito H. 1992. A human transmembrane protein-tyrosine-phosphatase, PTP zeta, is expressed in brain and has an N-terminal receptor domain homologous to carbonic anhydrases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:7417-7421.
- Kuan CY, Burke RE. 2005. Targeting the JNK signaling pathway for stroke and Parkinson's diseases therapy. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 4:63-67.
- Kulich SM, Chu CT. 2001. Sustained extracellular signal-regulated kinase activation by 6-hydroxydopamine: implications for Parkinson's disease. *J Neurochem* 77:1058-1066.
- Lalonde J, Saia G, Gill G. 2014. Store-operated calcium entry promotes the degradation of the transcription factor Sp4 in resting neurons. *Sci Signal* 7:ra51.
- Lavagni P, Indrigo M, Colombo G, Martegani E, Rosenblum K, Gnesutta N, Zippel R. 2009. Identification of novel RasGRF1 interacting partners by large-scale proteomic analysis. *J Mol Neurosci* 37:212-224.
- Le Feuvre R, Brough D, Rothwell N. 2002. Extracellular ATP and P2X7 receptors in neurodegeneration. *Eur J Pharmacol* 447:261-269.
- Le Stunff H, Auger R, Kanellopoulos J, Raymond MN. 2004. The Pro-451 to Leu polymorphism within the C-terminal tail of P2X7 receptor impairs cell death but not phospholipase D activation in murine thymocytes. *J Biol Chem* 279:16918-16926.
- Lemmon MA, Ferguson KM. 2000. Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem J* 350 Pt 1:1-18.
- Levchenko A, Bruck J, Sternberg PW. 2000. Scaffold proteins may biphasically affect the levels of mitogen-activated protein kinase signaling and reduce its threshold properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:5818-5823.
- Levy JB, Canoll PD, Silvennoinen O, Barnea G, Morse B, Honegger AM, Huang JT, Cannizzaro LA, Park SH, Druck T, et al. 1993. The cloning of a receptor-type protein tyrosine phosphatase expressed in the central nervous system. *J Biol Chem* 268:10573-10581.
- Li N, Batzer A, Daly R, Yajnik V, Skolnik E, Chardin P, Bar-Sagi D, Margolis B, Schlessinger J. 1993. Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to Ras signalling. *Nature* 363:85-88.
- Liu C, Takahashi M, Li Y, Song S, Dillon TJ, Shinde U, Stork PJ. 2008. Ras is required for the cyclic AMP-dependent activation of Rap1 via Epac2. *Mol Cell Biol* 28:7109-7125.

- Liu YW, Chen XQ, Tian X, Chen L, Wu YX, Huang D, Yi HL, Yi CL, Li CY. 2013. P2X3, but not P2X1, receptors mediate ATP-activated current in neurons innervating tooth-pulp. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 33:423-426.
- Locovei S, Bao L, Dahl G. 2006. Pannexin 1 in erythrocytes: function without a gap. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:7655-7659.
- Luo J, Uribe RA, Hayton S, Calinescu AA, Gross JM, Hitchcock PF. 2012. Midkine-A functions upstream of Id2a to regulate cell cycle kinetics in the developing vertebrate retina. *Neural Dev* 7:33.
- MacDonald JI, Verdi JM, Meakin SO. 1999. Activity-dependent interaction of the intracellular domain of rat trkA with intermediate filament proteins, the beta-6 proteasomal subunit, Ras-GRF1, and the p162 subunit of eIF3. *J Mol Neurosci* 13:141-158.
- Madigan JP, Bodemann BO, Brady DC, Dewar BJ, Keller PJ, Leitges M, Philips MR, Ridley AJ, Der CJ, Cox AD. 2009. Regulation of Rnd3 localization and function by protein kinase C alpha-mediated phosphorylation. *Biochem J* 424:153-161.
- Maeda N, Ichihara-Tanaka K, Kimura T, Kadomatsu K, Muramatsu T, Noda M. 1999. A receptor-like protein-tyrosine phosphatase PTPzeta/RPTPbeta binds a heparin-binding growth factor midkine. Involvement of arginine 78 of midkine in the high affinity binding to PTPzeta. *J Biol Chem* 274:12474-12479.
- Maeda N, Nishiwaki T, Shintani T, Hamanaka H, Noda M. 1996. 6B4 proteoglycan/phosphacan, an extracellular variant of receptor-like protein-tyrosine phosphatase zeta/RPTPbeta, binds pleiotrophin/heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM). *J Biol Chem* 271:21446-21452.
- Maffucci T, Falasca M. 2001. Specificity in pleckstrin homology (PH) domain membrane targeting: a role for a phosphoinositide-protein co-operative mechanism. *FEBS Lett* 506:173-179.
- Magee AI, Newman CM, Giannakouros T, Hancock JF, Fawell E, Armstrong J. 1992. Lipid modifications and function of the ras superfamily of proteins. *Biochem Soc Trans* 20:497-499.
- Marchionini DM, Lehrmann E, Chu Y, He B, Sortwell CE, Becker KG, Freed WJ, Kordower JH, Collier TJ. 2007. Role of heparin binding growth factors in nigrostriatal dopamine system development and Parkinson's disease. *Brain Res* 1147:77-88.
- Marinissen MJ, Gutkind JS. 2005. Scaffold proteins dictate Rho GTPase-signaling specificity. *Trends Biochem Sci* 30:423-426.
- Mariotti M, Castiglioni S, Garcia-Manteiga JM, Beguinot L, Maier JA. 2009. HD-PTP inhibits endothelial migration through its interaction with Src. *Int J Biochem Cell Biol* 41:687-693.
- Marsden CD. 1990. Parkinson's disease. *Lancet* 335:948-952.
- Martin TD, Mitin N, Cox AD, Yeh JJ, Der CJ. 2012. Phosphorylation by protein kinase Calpha regulates RalB small GTPase protein activation, subcellular localization, and effector utilization. *J Biol Chem* 287:14827-14836.
- Martin YB, Herradon G, Ezquerra L. 2011. Uncovering new pharmacological targets to treat neuropathic pain by understanding how the organism reacts to nerve injury. *Curr Pharm Des* 17:434-448.

- Martinon F, Burns K, Tschopp J. 2002. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* 10:417-426.
- Massano J, Bhatia KP. 2012. Clinical approach to Parkinson's disease: features, diagnosis, and principles of management. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a008870.
- Mathivet T, Mazot P, Vigny M. 2007. In contrast to agonist monoclonal antibodies, both C-terminal truncated form and full length form of Pleiotrophin failed to activate vertebrate ALK (anaplastic lymphoma kinase)? *Cell Signal* 19:2434-2443.
- Matozaki T, Murata Y, Saito Y, Okazawa H, Ohnishi H. 2009. Protein tyrosine phosphatase SHP-2: a proto-oncogene product that promotes Ras activation. *Cancer Sci* 100:1786-1793.
- Maurel P, Rauch U, Flad M, Margolis RK, Margolis RU. 1994. Phosphacan, a chondroitin sulfate proteoglycan of brain that interacts with neurons and neural cell-adhesion molecules, is an extracellular variant of a receptor-type protein tyrosine phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:2512-2516.
- McGee AW, Dakoji SR, Olsen O, Bredt DS, Lim WA, Prehoda KE. 2001. Structure of the SH3-guanylate kinase module from PSD-95 suggests a mechanism for regulated assembly of MAGUK scaffolding proteins. *Mol Cell* 8:1291-1301.
- McLeod SJ, Ingham RJ, Bos JL, Kurosaki T, Gold MR. 1998. Activation of the Rap1 GTPase by the B cell antigen receptor. *J Biol Chem* 273:29218-29223.
- McWhirter JR, Galasso DL, Wang JY. 1993. A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Mol Cell Biol* 13:7587-7595.
- Meng K, Rodriguez-Pena A, Dimitrov T, Chen W, Yamin M, Noda M, Deuel TF. 2000. Pleiotrophin signals increased tyrosine phosphorylation of beta catenin through inactivation of the intrinsic catalytic activity of the receptor-type protein tyrosine phosphatase beta/zeta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:2603-2608.
- Mi R, Chen W, Hoke A. 2007. Pleiotrophin is a neurotrophic factor for spinal motor neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:4664-4669.
- Milev P, Friedlander DR, Sakurai T, Karthikeyan L, Flad M, Margolis RK, Grumet M, Margolis RU. 1994. Interactions of the chondroitin sulfate proteoglycan phosphacan, the extracellular domain of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, with neurons, glia, and neural cell adhesion molecules. *J Cell Biol* 127:1703-1715.
- Moog-Lutz C, Degoutin J, Gouzi JY, Frobert Y, Brunet-de Carvalho N, Bureau J, Creminon C, Vigny M. 2005. Activation and inhibition of anaplastic lymphoma kinase receptor tyrosine kinase by monoclonal antibodies and absence of agonist activity of pleiotrophin. *J Biol Chem* 280:26039-26048.
- Moore SF, Hunter RW, Harper MT, Savage JS, Siddiq S, Westbury SK, Poole AW, Mumford AD, Hers I. 2013. Dysfunction of the PI3 kinase/Rap1/integrin alpha(IIb)beta(3) pathway underlies ex vivo platelet hypoactivity in essential thrombocythemia. *Blood* 121:1209-1219.

- Morale MC, Serra PA, L'Episcopo F, Tirolo C, Caniglia S, Testa N, Gennuso F, Giaquinta G, Rocchitta G, Desole MS, Miele E, Marchetti B. 2006. Estrogen, neuroinflammation and neuroprotection in Parkinson's disease: glia dictates resistance versus vulnerability to neurodegeneration. *Neuroscience* 138:869-878.
- Motegi A, Fujimoto J, Kotani M, Sakuraba H, Yamamoto T. 2004. ALK receptor tyrosine kinase promotes cell growth and neurite outgrowth. *J Cell Sci* 117:3319-3329.
- Munoz JJ, Tarrega C, Blanco-Aparicio C, Pulido R. 2003. Differential interaction of the tyrosine phosphatases PTP-SL, STEP and HePTP with the mitogen-activated protein kinases ERK1/2 and p38alpha is determined by a kinase specificity sequence and influenced by reducing agents. *Biochem J* 372:193-201.
- Muramatsu T. 2010. Midkine, a heparin-binding cytokine with multiple roles in development, repair and diseases. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 86:410-425.
- Murgia M, Hanau S, Pizzo P, Ripa M, Di Virgilio F. 1993. Oxidized ATP. An irreversible inhibitor of the macrophage purinergic P2Z receptor. *J Biol Chem* 268:8199-8203.
- Newton AC. 2003. Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem J* 370:361-371.
- Nix SL, Chishti AH, Anderson JM, Walther Z. 2000. hCASK and hDlg associate in epithelia, and their src homology 3 and guanylate kinase domains participate in both intramolecular and intermolecular interactions. *J Biol Chem* 275:41192-41200.
- North RA. 2002. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82:1013-1067.
- Norum JH, Methi T, Mattingly RR, Levy FO. 2005. Endogenous expression and protein kinase A-dependent phosphorylation of the guanine nucleotide exchange factor Ras-GRF1 in human embryonic kidney 293 cells. *FEBS J* 272:2304-2316.
- O'Connor SE, Dainty IA, Leff P. 1991. Further subclassification of ATP receptors based on agonist studies. *Trends Pharmacol Sci* 12:137-141.
- Ohba Y, Kurokawa K, Matsuda M. 2003. Mechanism of the spatio-temporal regulation of Ras and Rap1. *EMBO J* 22:859-869.
- Oliff A. 1999. Farnesyltransferase inhibitors: targeting the molecular basis of cancer. *Biochim Biophys Acta* 1423:C19-30.
- Palmer RH, Vernersson E, Grabbe C, Hallberg B. 2009. Anaplastic lymphoma kinase: signalling in development and disease. *Biochem J* 420:345-361.
- Pariser H, Ezquerra L, Herradon G, Perez-Pinera P, Deuel TF. 2005a. Fyn is a downstream target of the pleiotrophin/receptor protein tyrosine phosphatase beta/zeta-signaling pathway: regulation of tyrosine phosphorylation of Fyn by pleiotrophin. *Biochem Biophys Res Commun* 332:664-669.
- Pariser H, Herradon G, Ezquerra L, Perez-Pinera P, Deuel TF. 2005b. Pleiotrophin regulates serine phosphorylation and the cellular distribution of beta-adducin through activation of protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:12407-12412.
- Pariser H, Perez-Pinera P, Ezquerra L, Herradon G, Deuel TF. 2005c. Pleiotrophin stimulates tyrosine phosphorylation of beta-adducin through

- inactivation of the transmembrane receptor protein tyrosine phosphatase beta/zeta. *Biochem Biophys Res Commun* 335:232-239.
- Paul S, Nairn AC, Wang P, Lombroso PJ. 2003. NMDA-mediated activation of the tyrosine phosphatase STEP regulates the duration of ERK signaling. *Nat Neurosci* 6:34-42.
- Peles E, Schlessinger J, Grumet M. 1998. Multi-ligand interactions with receptor-like protein tyrosine phosphatase beta: implications for intercellular signaling. *Trends Biochem Sci* 23:121-124.
- Perez-Pinera P, Zhang W, Chang Y, Vega JA, Deuel TF. 2007. Anaplastic lymphoma kinase is activated through the pleiotrophin/receptor protein-tyrosine phosphatase beta/zeta signaling pathway: an alternative mechanism of receptor tyrosine kinase activation. *J Biol Chem* 282:28683-28690.
- Peters RL, Rabstein LS, VanVleck R, Kelloff GJ, Huebner RJ. 1974. Naturally occurring sarcoma virus of the BALB/cCr mouse. *J Natl Cancer Inst* 53:1725-1729.
- Philips MR. 2005. Compartmentalized signalling of Ras. *Biochem Soc Trans* 33:657-661.
- Pintor J, Miras-Portugal MT. 1995. A novel receptor for diadenosine polyphosphates coupled to calcium increase in rat midbrain synaptosomes. *Br J Pharmacol* 115:895-902.
- Pizon V, Desjardins M, Bucci C, Parton RG, Zerial M. 1994. Association of Rap1a and Rap1b proteins with late endocytic/phagocytic compartments and Rap2a with the Golgi complex. *J Cell Sci* 107 (Pt 6):1661-1670.
- Poewe W. 2008. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 15 Suppl 1:14-20.
- Posern G, Rapp UR, Feller SM. 2000. The Crk signaling pathway contributes to the bombesin-induced activation of the small GTPase Rap1 in Swiss 3T3 cells. *Oncogene* 19:6361-6368.
- Powers C, Aigner A, Stoica GE, McDonnell K, Wellstein A. 2002. Pleiotrophin signaling through anaplastic lymphoma kinase is rate-limiting for glioblastoma growth. *J Biol Chem* 277:14153-14158.
- Prasai P, Stefos GC, Becker W. 2011. Extracellular ATP activates NFAT-dependent gene expression in neuronal PC12 cells via P2X receptors. *BMC Neurosci* 12:90.
- Prediger RD, Rojas-Mayorquin AE, Aguiar AS, Jr., Chevarin C, Mongeau R, Hamon M, Lanfumey L, Del Bel E, Muramatsu H, Courty J, Raisman-Vozari R. 2011. Mice with genetic deletion of the heparin-binding growth factor midkine exhibit early preclinical features of Parkinson's disease. *J Neural Transm* 118:1215-1225.
- Przedborski S, Jackson-Lewis V. 1998. Mechanisms of MPTP toxicity. *Mov Disord* 13 Suppl 1:35-38.
- Quilliam LA, Rebhun JF, Castro AF. 2002. A growing family of guanine nucleotide exchange factors is responsible for activation of Ras-family GTPases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 71:391-444.
- Rajalingam K, Schreck R, Rapp UR, Albert S. 2007. Ras oncogenes and their downstream targets. *Biochim Biophys Acta* 1773:1177-1195.
- Ralevic V, Burnstock G. 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50:413-492.

- Ransohoff RM, Perry VH. 2009. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* 27:119-145.
- Rasheed S, Gardner MB, Huebner RJ. 1978. In vitro isolation of stable rat sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:2972-2976.
- Rassendren F, Buell GN, Virginio C, Collo G, North RA, Surprenant A. 1997. The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA. *J Biol Chem* 272:5482-5486.
- Ratcliffe CF, Qu Y, McCormick KA, Tibbs VC, Dixon JE, Scheuer T, Catterall WA. 2000. A sodium channel signaling complex: modulation by associated receptor protein tyrosine phosphatase beta. *Nat Neurosci* 3:437-444.
- Reedquist KA, Bos JL. 1998. Costimulation through CD28 suppresses T cell receptor-dependent activation of the Ras-like small GTPase Rap1 in human T lymphocytes. *J Biol Chem* 273:4944-4949.
- Reisin IL, Prat AG, Abraham EH, Amara JF, Gregory RJ, Ausiello DA, Cantiello HF. 1994. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a dual ATP and chloride channel. *J Biol Chem* 269:20584-20591.
- Ren Y, Jiang H, Yang F, Nakaso K, Feng J. 2009. Parkin protects dopaminergic neurons against microtubule-depolymerizing toxins by attenuating microtubule-associated protein kinase activation. *J Biol Chem* 284:4009-4017.
- Repasky GA, Chenette EJ, Der CJ. 2004. Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis? *Trends Cell Biol* 14:639-647.
- Resende RR, Britto LR, Ulrich H. 2008. Pharmacological properties of purinergic receptors and their effects on proliferation and induction of neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Int J Dev Neurosci* 26:763-777.
- Reuther GW, Der CJ. 2000. The Ras branch of small GTPases: Ras family members don't fall far from the tree. *Curr Opin Cell Biol* 12:157-165.
- Riento K, Totty N, Villalonga P, Garg R, Guasch R, Ridley AJ. 2005. RhoE function is regulated by ROCK I-mediated phosphorylation. *EMBO J* 24:1170-1180.
- Robinson KN, Manto K, Buchsbaum RJ, MacDonald JI, Meakin SO. 2005. Neurotrophin-dependent tyrosine phosphorylation of Ras guanine-releasing factor 1 and associated neurite outgrowth is dependent on the HIKE domain of TrkA. *J Biol Chem* 280:225-235.
- Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Patel SC, Patel RC, Patel YC. 2000. Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science* 288:154-157.
- Rodriguez-Oroz MC, Jahanshahi M, Krack P, Litvan I, Macias R, Bezard E, Obeso JA. 2009. Initial clinical manifestations of Parkinson's disease: features and pathophysiological mechanisms. *Lancet Neurol* 8:1128-1139.
- Rodriguez-Viciano P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ, Waterfield MD, Downward J. 1994. Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* 370:527-532.
- Romano JD, Schmidt WK, Michaelis S. 1998. The *Saccharomyces cerevisiae* prenylcysteine carboxyl methyltransferase Ste14p is in the endoplasmic reticulum membrane. *Mol Biol Cell* 9:2231-2247.

- Ross GW, Petrovitch H, Abbott RD, Nelson J, Markesbery W, Davis D, Hardman J, Launer L, Masaki K, Tanner CM, White LR. 2004. Parkinsonian signs and substantia nigra neuron density in decedents elders without PD. *Ann Neurol* 56:532-539.
- Rossmann KL, Der CJ, Sondel J. 2005. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:167-180.
- Roy S, Luetterforst R, Harding A, Apolloni A, Etheridge M, Stang E, Rolls B, Hancock JF, Parton RG. 1999. Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains. *Nat Cell Biol* 1:98-105.
- Rubio ME, Soto F. 2001. Distinct Localization of P2X receptors at excitatory postsynaptic specializations. *J Neurosci* 21:641-653.
- Ruiz S, Santos E, Bustelo XR. 2007. RasGRF2, a guanosine nucleotide exchange factor for Ras GTPases, participates in T-cell signaling responses. *Mol Cell Biol* 27:8127-8142.
- Ruiz S, Santos E, Bustelo XR. 2009. The use of knockout mice reveals a synergistic role of the Vav1 and Rasgrf2 gene deficiencies in lymphomagenesis and metastasis. *PLoS One* 4:e8229.
- Ryu JK, Choi HB, Hatori K, Heisel RL, Pelech SL, McLarnon JG, Kim SU. 2003. Adenosine triphosphate induces proliferation of human neural stem cells: Role of calcium and p70 ribosomal protein S6 kinase. *J Neurosci Res* 72:352-362.
- Sakurai T, Friedlander DR, Grumet M. 1996. Expression of polypeptide variants of receptor-type protein tyrosine phosphatase beta: the secreted form, phosphacan, increases dramatically during embryonic development and modulates glial cell behavior in vitro. *J Neurosci Res* 43:694-706.
- Sato A, Arimura Y, Manago Y, Nishikawa K, Aoki K, Wada E, Suzuki Y, Osaka H, Setsuie R, Sakurai M, Amano T, Aoki S, Wada K, Noda M. 2006. Parkin potentiates ATP-induced currents due to activation of P2X receptors in PC12 cells. *J Cell Physiol* 209:172-182.
- Saul A, Hausmann R, Kless A, Nicke A. 2013. Heteromeric assembly of P2X subunits. *Front Cell Neurosci* 7:250.
- Scolnick EM, Papageorge AG, Shih TY. 1979. Guanine nucleotide-binding activity as an assay for src protein of rat-derived murine sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:5355-5359.
- Scott K, Zuker CS. 1998. Assembly of the Drosophila phototransduction cascade into a signalling complex shapes elementary responses. *Nature* 395:805-808.
- Schlessinger J. 1993. How receptor tyrosine kinases activate Ras. *Trends Biochem Sci* 18:273-275.
- Schmidt A, Hall A. 2002. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* 16:1587-1609.
- Schmidt WK, Tam A, Fujimura-Kamada K, Michaelis S. 1998. Endoplasmic reticulum membrane localization of Rce1p and Ste24p, yeast proteases involved in carboxyl-terminal CAAX protein processing and amino-terminal a-factor cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:11175-11180.
- Schmitt JM, Guire ES, Saneyoshi T, Soderling TR. 2005. Calmodulin-dependent kinase kinase/calmodulin kinase I activity gates extracellular-

- regulated kinase-dependent long-term potentiation. *J Neurosci* 25:1281-1290.
- Schweighoffer F, Faure M, Fath I, Chevallier-Multon MC, Apiou F, Dutrillaux B, Sturani E, Jacquet M, Tocque B. 1993. Identification of a human guanine nucleotide-releasing factor (H-GRF55) specific for Ras proteins. *Oncogene* 8:1477-1485.
- Schwiebert EM. 1999. ABC transporter-facilitated ATP conductive transport. *Am J Physiol* 276:C1-8.
- Schwiebert EM, Egan ME, Hwang TH, Fulmer SB, Allen SS, Cutting GR, Guggino WB. 1995. CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP. *Cell* 81:1063-1073.
- Schwiebert EM, Kishore BK. 2001. Extracellular nucleotide signaling along the renal epithelium. *Am J Physiol Renal Physiol* 280:F945-963.
- Sellers LA, Simon J, Lundahl TS, Cousens DJ, Humphrey PP, Barnard EA. 2001. Adenosine nucleotides acting at the human P2Y1 receptor stimulate mitogen-activated protein kinases and induce apoptosis. *J Biol Chem* 276:16379-16390.
- Serebriiskii I, Estojak J, Sonoda G, Testa JR, Golemis EA. 1997. Association of Krev-1/rap1a with Krit1, a novel ankyrin repeat-containing protein encoded by a gene mapping to 7q21-22. *Oncogene* 15:1043-1049.
- Sheng M, Pak DT. 2000. Ligand-gated ion channel interactions with cytoskeletal and signaling proteins. *Annu Rev Physiol* 62:755-778.
- Shou C, Farnsworth CL, Neel BG, Feig LA. 1992. Molecular cloning of cDNAs encoding a guanine-nucleotide-releasing factor for Ras p21. *Nature* 358:351-354.
- Silos-Santiago I, Yeh HJ, Gurrieri MA, Guillerman RP, Li YS, Wolf J, Snider W, Deuel TF. 1996. Localization of pleiotrophin and its mRNA in subpopulations of neurons and their corresponding axonal tracts suggests important roles in neural-glia interactions during development and in maturity. *J Neurobiol* 31:283-296.
- Silvius JR, Bhagatji P, Leventis R, Terrone D. 2006. K-ras4B and prenylated proteins lacking "second signals" associate dynamically with cellular membranes. *Mol Biol Cell* 17:192-202.
- Sim AT, Scott JD. 1999. Targeting of PKA, PKC and protein phosphatases to cellular microdomains. *Cell Calcium* 26:209-217.
- Sinclair NR. 2000. Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs on activating molecules. *Crit Rev Immunol* 20:89-102.
- Sjolander A, Yamamoto K, Huber BE, Lapetina EG. 1991. Association of p21ras with phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7908-7912.
- Skaper SD, Debetto P, Giusti P. 2009. P2X(7) Receptors in Neurological and Cardiovascular Disorders. *Cardiovasc Psychiatry Neurol* 2009:861324.
- Smart ML, Gu B, Panchal RG, Wiley J, Cromer B, Williams DA, Petrou S. 2003. P2X7 receptor cell surface expression and cytolytic pore formation are regulated by a distal C-terminal region. *J Biol Chem* 278:8853-8860.
- Soboloff J, Rothberg BS, Madesh M, Gill DL. 2012. STIM proteins: dynamic calcium signal transducers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:549-565.

- Son JH, Chun HS, Joh TH, Cho S, Conti B, Lee JW. 1999. Neuroprotection and neuronal differentiation studies using substantia nigra dopaminergic cells derived from transgenic mouse embryos. *J Neurosci* 19:10-20.
- Song C, Satoh T, Edamatsu H, Wu D, Tadano M, Gao X, Kataoka T. 2002. Differential roles of Ras and Rap1 in growth factor-dependent activation of phospholipase C epsilon. *Oncogene* 21:8105-8113.
- Souttou B, Carvalho NB, Raulais D, Vigny M. 2001. Activation of anaplastic lymphoma kinase receptor tyrosine kinase induces neuronal differentiation through the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 276:9526-9531.
- Steinberg SF. 2008. Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol Rev* 88:1341-1378.
- Stoica GE, Kuo A, Aigner A, Sunitha I, Souttou B, Malerczyk C, Caughey DJ, Wen D, Karavanov A, Riegel AT, Wellstein A. 2001. Identification of anaplastic lymphoma kinase as a receptor for the growth factor pleiotrophin. *J Biol Chem* 276:16772-16779.
- Stoica GE, Kuo A, Powers C, Bowden ET, Sale EB, Riegel AT, Wellstein A. 2002. Midkine binds to anaplastic lymphoma kinase (ALK) and acts as a growth factor for different cell types. *J Biol Chem* 277:35990-35998.
- Stone JC. 2011. Regulation and Function of the RasGRP Family of Ras Activators in Blood Cells. *Genes Cancer* 2:320-334.
- Sturani E, Abbondio A, Branduardi P, Ferrari C, Zippel R, Martegani E, Vanoni M, Denis-Donini S. 1997. The Ras Guanine nucleotide Exchange Factor CDC25Mm is present at the synaptic junction. *Exp Cell Res* 235:117-123.
- Suga K, Katagiri K, Kinashi T, Harazaki M, Iizuka T, Hattori M, Minato N. 2001. CD98 induces LFA-1-mediated cell adhesion in lymphoid cells via activation of Rap1. *FEBS Lett* 489:249-253.
- Sui G, Fry CH, Montgomery B, Roberts M, Wu R, Wu C. 2014. Purinergic and muscarinic modulation of ATP release from the urothelium and its paracrine actions. *Am J Physiol Renal Physiol* 306:F286-298.
- Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G. 1996. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* 272:735-738.
- Suzuki T, Hide I, Ido K, Kohsaka S, Inoue K, Nakata Y. 2004. Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X7 receptor-activated microglia. *J Neurosci* 24:1-7.
- Tamura H, Fukada M, Fujikawa A, Noda M. 2006. Protein tyrosine phosphatase receptor type Z is involved in hippocampus-dependent memory formation through dephosphorylation at Y1105 on p190 RhoGAP. *Neurosci Lett* 399:33-38.
- Taravini IR, Chertoff M, Cafferata EG, Courty J, Murer MG, Pitossi FJ, Gershanik OS. 2011. Pleiotrophin over-expression provides trophic support to dopaminergic neurons in parkinsonian rats. *Mol Neurodegener* 6:40.
- Taylor AL, Kudlow BA, Marrs KL, Gruenert DC, Guggino WB, Schwiebert EM. 1998. Bioluminescence detection of ATP release mechanisms in epithelia. *Am J Physiol* 275:C1391-1406.

- Tian X, Feig LA. 2006. Age-dependent participation of Ras-GRF proteins in coupling calcium-permeable AMPA glutamate receptors to Ras/Erk signaling in cortical neurons. *J Biol Chem* 281:7578-7582.
- Toledano-Katchalski H, Kraut J, Sines T, Granot-Attas S, Shohat G, Gil-Henn H, Yung Y, Elson A. 2003. Protein tyrosine phosphatase epsilon inhibits signaling by mitogen-activated protein kinases. *Mol Cancer Res* 1:541-550.
- Umanoff H, Edelman W, Pellicer A, Kucherlapati R. 1995. The murine N-ras gene is not essential for growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1709-1713.
- Wei W, Schreiber SS, Baudry M, Tocco G, Broek D. 1993. Localization of the cellular expression pattern of cdc25NEF and ras in the juvenile rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 19:339-344.
- Weissman TA, Riquelme PA, Ivic L, Flint AC, Kriegstein AR. 2004. Calcium waves propagate through radial glial cells and modulate proliferation in the developing neocortex. *Neuron* 43:647-661.
- Wellstein A. 2012. ALK receptor activation, ligands and therapeutic targeting in glioblastoma and in other cancers. *Front Oncol* 2:192.
- Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ. 2005. The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* 118:843-846.
- Whitson SR, LeSturgeon WM, Krezel AM. 2005. Solution structure of the symmetric coiled coil tetramer formed by the oligomerization domain of hnRNP C: implications for biological function. *J Mol Biol* 350:319-337.
- Wiley JS, Chen JR, Snook MS, Gargett CE, Jamieson GP. 1996. Transduction mechanisms of P2Z purinoceptors. *Ciba Found Symp* 198:149-160; discussion 160-145.
- Wirdefeldt K, Adami HO, Cole P, Trichopoulos D, Mandel J. 2011. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur J Epidemiol* 26 Suppl 1:S1-58.
- Wise RA. 2004. Dopamine, learning and motivation. *Nat Rev Neurosci* 5:483-494.
- Wu ZL, O'Kane TM, Scott RW, Savage MJ, Bozyczko-Coyne D. 2002. Protein tyrosine phosphatases are up-regulated and participate in cell death induced by polyglutamine expansion. *J Biol Chem* 277:44208-44213.
- Yan J, Roy S, Apolloni A, Lane A, Hancock JF. 1998. Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 273:24052-24056.
- Yang H, Cooley D, Legakis JE, Ge Q, Andrade R, Mattingly RR. 2003. Phosphorylation of the Ras-GRF1 exchange factor at Ser916/898 reveals activation of Ras signaling in the cerebral cortex. *J Biol Chem* 278:13278-13285.
- Yang H, Mattingly RR. 2006. The Ras-GRF1 exchange factor coordinates activation of H-Ras and Rac1 to control neuronal morphology. *Mol Biol Cell* 17:2177-2189.
- Yang P, Dankowski A, Hagg T. 2007. Protein tyrosine phosphatase inhibition reduces degeneration of dopaminergic substantia nigra neurons and projections in 6-OHDA treated adult rats. *Eur J Neurosci* 25:1332-1340.
- Yang R, Liang BT. 2012. Cardiac P2X(4) receptors: targets in ischemia and heart failure? *Circ Res* 111:397-401.

- Yang S, Cheek DJ, Westfall DP, Buxton IL. 1994. Purinergic axis in cardiac blood vessels. Agonist-mediated release of ATP from cardiac endothelial cells. *Circ Res* 74:401-407.
- Yang Y, Kaul S, Zhang D, Anantharam V, Kanthasamy AG. 2004. Suppression of caspase-3-dependent proteolytic activation of protein kinase C delta by small interfering RNA prevents MPP⁺-induced dopaminergic degeneration. *Mol Cell Neurosci* 25:406-421.
- Zhao HB, Yu N, Fleming CR. 2005. Gap junctional hemichannel-mediated ATP release and hearing controls in the inner ear. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:18724-18729.
- Zhong X, Kriz R, Seehra J, Kumar R. 2004. N-linked glycosylation of platelet P2Y₁₂ ADP receptor is essential for signal transduction but not for ligand binding or cell surface expression. *FEBS Lett* 562:111-117.
- Zhu JH, Guo F, Shelburne J, Watkins S, Chu CT. 2003. Localization of phosphorylated ERK/MAP kinases to mitochondria and autophagosomes in Lewy body diseases. *Brain Pathol* 13:473-481.
- Zhu JH, Horbinski C, Guo F, Watkins S, Uchiyama Y, Chu CT. 2007. Regulation of autophagy by extracellular signal-regulated protein kinases during 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced cell death. *Am J Pathol* 170:75-86.
- Zhu JH, Kulich SM, Oury TD, Chu CT. 2002. Cytoplasmic aggregates of phosphorylated extracellular signal-regulated protein kinases in Lewy body diseases. *Am J Pathol* 161:2087-2098.
- Zhuang S, Schnellmann RG. 2006. A death-promoting role for extracellular signal-regulated kinase. *J Pharmacol Exp Ther* 319:991-997.
- Zigmond M, Keefe K. 1998. 6-Hydroxydopamine as a Tool for Studying Catecholamines in Adult Animals. In: Kostrzewa R, editor. *Highly Selective Neurotoxins*: Humana Press. p 75-107.
- Zimmermann H. 2000. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362:299-309.
- Zippel R, Gnesutta N, Matus-Leibovitch N, Mancinelli E, Saya D, Vogel Z, Sturani E. 1997. Ras-GRF, the activator of Ras, is expressed preferentially in mature neurons of the central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 48:140-144.
- Zugaza JL, Caloca MJ, Bustelo XR. 2004. Inverted signaling hierarchy between RAS and RAC in T-lymphocytes. *Oncogene* 23:5823-5833.
- Zwartkuis FJ, Wolthuis RM, Nabben NM, Franke B, Bos JL. 1998. Extracellular signal-regulated activation of Rap1 fails to interfere in Ras effector signalling. *EMBO J* 17:5905-5912.

