

UNIVERSIDAD DE VALENCIA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN PRÍNCIPE FELIPE
UNIVERSIDAD DE HELSINKI



HELSINGIN YLIOPISTO
HELSINGFORS UNIVERSITET
UNIVERSITY OF HELSINKI



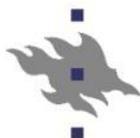
PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION



**“DISTRIBUCIÓN Y DINÁMICA DE LA PROLIL-
OLIGOPEPTIDASA (PREP) EN LA NEURONA Y SU
RELACIÓN CON LA DIFERENCIACIÓN,
MADURACIÓN, ENVEJECIMIENTO Y
NEURODEGENERACIÓN”**

VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Memoria presentada por
M^a José Moreno Baylach
para optar al grado de Doctora en Farmacia
Valencia, 2012



HELSINGIN YLIOPISTO
HELSINGFORS UNIVERSITET
UNIVERSITY OF HELSINKI



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

Yo, el **Doctor Juan Arturo García Horsman**, antiguo jefe del laboratorio de neurotransmisores del centro de investigación Príncipe Felipe y actual investigador del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Universidad de Helsinki:

INFORMO:

Que la memoria de Tesis Doctoral realizada por M^a José Moreno Baylach y titulada “Distribución y dinámica de la Prolil-oligopeptidasa (PREP) en la neurona y su relación con la diferenciación, maduración, envejecimiento y neurodegeneración”, ha sido realizada bajo mi dirección, expresando mi conformidad para la presentación de la misma, por considerar que reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación; a fin de optar al grado de Doctora.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente documento en Valencia, a 11 de junio de 2012.

Fdo. Dr. J. Arturo García Horsman

Fdo. Dr. Luis Franco Vera (tutor)

La realización de esta Tesis Doctoral se ha podido llevar a cabo gracias a la financiación de los siguientes proyectos:

- Fisiología y bioquímica de Prolil-oligopeptidasas. Ministerio de Educación y Ciencia, 2004-2009.
- Fisiología y bioquímica de Prolil-oligopeptidasas. Fundación Valenciana Centro de Investigación Príncipe Felipe. 2004-2007.
- Oligopeptidase Inhibitors In Brain Function And Dysfunction: Towards New Therapeutic Strategies For Neuroprotection. Neuropro. Health-F2-2008-223077, Comisión Europea, 2008-2012.
- Localization And Dynamics Of Prolyl Oligopeptidase In Cerebellar Granule Neurons And Its Role On Neural Differentiation, Maturation And Death. Centre For International Mobility Tm-08-5415, 2008.

Los resultados expuestos en esta tesis, a excepción de los que hacen referencia a la muerte neuronal inducida con diversos tóxicos, han sido publicados en estos dos artículos:

Moreno-Baylach, M.J., Felipo, V., Männistö, P.T. y García-Horsman, J.A. (2008). Expression and traffic of cellular prolyl oligopeptidase are regulated during cerebellar granule cell differentiation, maturation and aging. *Neuroscience*; 156(3): 580-585.

Moreno-Baylach, M.J., Puttonen, K.A., Tenorio-Laranga, J., Venäläinen, J.I., Storvik, M., Forsberg, M.M. y García-Horsman, J.A. (2011). Prolyl endopeptidase is involved in cellular signalling in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurosignals*; 19(2): 97-109.

A todas aquellas personas a las que esta tesis les pueda ser de utilidad para dar un paso más en el conocimiento de la función de la Prolil-oligopeptidasa en el cerebro.

AGRADECIMIENTOS

“Tener gratitud y no expresarla es como envolver un regalo y no darlo.”

William Arthur Ward (1921-1994), pensador y profesor estadounidense.

Sois muchas las personas que, bien a nivel profesional bien a nivel personal, habéis contribuido a que este proyecto saliese adelante. He tratado de acordarme de todos vosotros pero, si por descuido, me hubiera olvidado de alguno, ruego me disculpéis y os sintáis incluidos.

En primer lugar, quisiera darte un millón de gracias, Arturo, no sólo por la ayuda tan enorme que me has dado a la hora de diseñar los experimentos y encontrarle un sentido a todos los resultados obtenidos (sin ti no lo hubiera conseguido), sino también por apoyarme cada vez que sugería algún experimento; haciendo así que me sintiera como una verdadera investigadora, en fase de formación, pero investigadora. También tengo que agradecerte muchísimo lo bien que me acogiste y lo mucho que te preocupaste de que no me faltara nada durante mi estancia en Finlandia. Además de temas profesionales hemos hablado también de cosas más personales, por lo que además de mi respeto como magnífico científico que eres, también tienes mi cariño y admiración como persona. Jofre, quiero agradecerte todos estos años de amistad y ayuda en el laboratorio y fuera de él. Sabes encontrar lo positivo de cada cosa, transmites serenidad, seguridad y alegría allá donde vas. Me ha gustado mucho trabajar contigo en el laboratorio y tenerte como amigo.

Agradezco a Luis Franco su tutoría en este trabajo.

También agradecer a Vicente Felipe y a todo su laboratorio la ayuda prestada con los cultivos celulares, especialmente a M^a Carmen Castro Quero, pues gracias a lo meticulosa y responsable que eres trabajando, me ayudaste a conseguir unos resultados magníficos en todos los experimentos realizados con las células granulares de cerebelo, de forma reproducible.

Os doy las gracias, Alberto y Eva por el tiempo que me dedicasteis con el microscopio confocal, por vuestra paciencia e interés en conseguir todas estas magníficas imágenes de la localización de PREP en las células granulares de cerebelo que expongo en la tesis.

I would like to express my gratitude to all the people I worked with in Finland. Dino, thank you very much for teaching me with SH-SY5Y cultures and your nice company in the cell-lab. To Anna, Marjo and Kati for bringing all the stuff I needed, as soon as possible, to go on working. To Virpi and Elina for their advices in ERK 1/2 and radioactivity, respectively. To Pekka Männistö for his advices in the development of this proyect. To Raimo, Petteri, Atso, Timo, Ilkka, Nadia, Marjo, Martina, Oleg, Iida, Susanne, Mikko, Merja, Birgitta and Riita for your warm welcome.

I would also say thank you to Michael, my “crazy” German flatmate and very good friend. Thank you very much for making me laugh and see the sun through the darkness of the winter. Vielen Dank für alles.

Albert, moltes gràcies per la teva companyia i per aquestes llargues xerrades i rialles a la cuina, que mai oblidaré.

Aniko, thank you very much for your friendship and your wonderful Hungarian dishes. Everything was easier with you there. I also wish you a very good luck with your thesis.

Thank you very much Caroline, Jacek and Asun for teaching me all the English I needed to manage in research and in the life.

Son muchos los años de amistad con Eli, Amparo- delCentro de Investigación Príncipe Felipe- Teresiña y Elena, que espero poder seguir manteniendo, a pesar del trabajo y otros avatares que surjan.

Esmeralda, muchísimas gracias por estar siempre ahí, siempre, apoyándome en lo bueno y ayudándome a encontrar una solución en lo malo.

Amparito, gracias a ti me sentí con fuerzas para dar un carpetazo en La Fe y darme la oportunidad de encontrar a un buen director de tesis y a un buen compañero de laboratorio.

A Laura, que siempre me animó a acabar la tesis y no podrá verlo.

Y cómo olvidarme de mis amigos de diario, de mi “núcleo duro”: Luisito y Carmela, siempre dándome ánimos para acabar la tesis. Charo, tu

amistad significa mucho para mí. Mi gran amigo Álex, siempre ahí, en lo bueno y en lo malo. Muchas gracias a todos por enseñarme que fuera del laboratorio hay vida.

También a vosotros dos, mis padres, os quiero agradecer la paciencia y el apoyo que me habéis dado durante todos estos años, el sacrificio que habéis hecho para darme una buena formación desde pequeña y hacer de mí una persona. En parte, el fruto de todo ello va junto a esta tesis. Os debo muchas cosas. A vosotros dos y a Lorena os doy las gracias por ayudarme y animarme, en estos momentos, a poner todas mis fuerzas en conseguir algo que espero me dé la estabilidad y la felicidad que busco.

A mi tío Pepe y a mis abuelos paternos que, aunque éstos últimos ya no estén, siempre creyeron en mí. No pude agradecer a mi tío Manolo el mejor consejo que me han podido dar en la vida y que, transcurridos unos años he llegado a comprender: “El estudio no lo es todo en la vida, ojalá no llegues a los cuarenta y tengas la sensación de no haber vivido”. Espero que no sea tarde, estoy en ello.

A Rafael y a Angelita, por vuestro apoyo y calor familiar, que no he podido encontrar en muchos de los tíos y primos.

Y a ti, Vicente, por tus correcciones y comentarios, por tu enorme paciencia, por darle color, amor y sentido a mi vida, por compartir todo conmigo, por sacar siempre lo mejor de mí. Espero hacerte muy feliz también.

ÍNDICE

“Un viaje de mil kilómetros debe empezar por un paso”

LaoTsé (siglo VI a. C.), pensador chino.

ÍNDICE DE LOS CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN

1. Generalidades de la enzima Prolil-oligopeptidasa (PREP)

1.1.	La familia de las Prolil-oligopeptidasas: una familia peculiar de proteasas dependientes de serina.	3
1.2.	Identificación y caracterización de la enzima PREP.	5
1.3.	Estructura de PREP y su mecanismo catalítico.	7
1.4.	Enzimas alternativas a PREP.	8
1.5.	Distribución de PREP en mamíferos.	9
1.5.1.	Distribución de PREP en el cerebro de mamíferos.	12
1.5.2.	Distribución intracelular de PREP.	17
1.5.3.	Localización extracelular de PREP.	18
1.6.	Enzimología de PREP.	19
1.6.1.	Sustratos de PREP.	19
1.6.2.	Inhibidores específicos de PREP.	23
1.7.	PREP en procesos fisiológicos y patológicos.	27
1.7.1.	Desarrollo y envejecimiento.	27
1.7.2.	Muerte celular y neurodegeneración.	29
1.7.3.	PREP y las enfermedades asociadas a trastornos del humor: la relación de PREP con el inositol trifosfato (IP ₃).	31
1.7.4.	PREP y otros procesos patológicos como la hipertensión, la inflamación, la enfermedad celíaca y la esclerosis múltiple.	32

2. Estudio de la diferenciación neuronal

2.1.	El papel de PREP en la diferenciación neuronal.	35
2.2.	Los cultivos primarios de las células granulares de cerebelo como modelo de diferenciación y envejecimiento neuronal.	37
2.3.	Las células SH-SY5Y de neuroblastoma humano como un modelo neuronal de utilidad.	39
2.4.	La implicación del IP ₃ en el proceso de diferenciación neuronal.	41
2.5.	La vía de señalización dependiente de ERK 1 y ERK 2 durante el proceso de diferenciación neuronal.	42

3. Muerte neuronal

3.1.	PREP y la neurodegeneración. Muerte celular.	44
3.2.	Las células granulares de cerebelo como modelo de muerte neuronal.	47
3.3.	La línea celular SH-SY5Y como modelo de muerte neuronal.	48

4. Objetivo general y objetivos específicos

4.1. Objetivo general	50
4.2. Objetivos específicos	51

II. METODOLOGÍA

1. Material.	55
2. Métodos.	56
2.1. Métodos utilizados en cultivos primarios de células granulares de cerebelo.	
2.1.1. Cultivos primarios de células granulares de cerebelo.	56
• Tratamiento de las placas de cultivo con poli-lisina.	58
• Obtención del cultivo primario de células granulares de cerebelo.	58
2.1.2. Estimación de la viabilidad celular mediante el método MTT.	60
2.1.3. Lisis y fraccionamiento celular.	60
2.1.4. Ensayo de la actividad de PREP.	62
2.1.5. Medida de la concentración de proteína por el método de Bradford.	63
2.1.6. Inmunoelectrotransferencia.	63
2.1.7. Localización de PREP mediante el microscopio confocal.	64
• Fijación de las células granulares de cerebelo.	64
2.1.8. Muerte neuronal. Diseño experimental.	68
2.1.9. Análisis estadístico.	69
2.2. Métodos utilizados en la línea celular SH-SY5Y procedente de neuroblastoma humano.	
2.2.1. Subcultivo celular, mantenimiento y congelación.	70
2.2.2. Estudio de la implicación de PREP en la diferenciación inducida con ácido retinoico.	72
• Inhibición de PREP.	72
• Diferenciación con ácido retinoico.	75
• Obtención de una suspensión celular a partir de células adheridas en placa.	77
• Recuento directo de células en una cámara Bürker.	77
• Lisis y fraccionamiento celular.	78
• Ensayo de actividad de PREP.	79
• Estudio morfológico.	79

• Valoración de IP ₃ .	81
• Estudio de la expresión de PREP. Estimación de los niveles de ARN mensajero (ARNm).	81
• Estudio de los niveles de las quinasas 1 y 2 (ERK 1/2) extracelulares reguladoras de señal.	90
2.2.3. Muerte inducida con 6-OHDA.	91
2.2.4. Análisis estadístico de los datos.	92

III. RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL

1. Resultados.

1.1. Localización de PREP, mediante microscopía confocal, a lo largo de la vida de las células granulares de cerebelo.	97
1.2. Patrón de actividad de PREP en el citoplasma, en el núcleo y en las membranas durante el ciclo de vida de las células granulares de cerebelo.	98
1.3. Niveles de actividad de PREP durante la proliferación y diferenciación de la línea celular SH-SY5Y.	104
1.4. Variaciones en la transcripción del gen que codifica para PREP durante la diferenciación de células SH-SY5Y inducida por el ácido retinoico.	108
1.5. PREP y el sistema de señalización en células SH-SY5Y.	109
1.5.1. Inositol trifosfato (IP ₃).	110
1.5.2. Quinasas extracelulares reguladoras de señal (ERK 1/2).	112
1.6. La inhibición de PREP induce cambios morfológicos en las células SH-SY5Y diferenciadas con ácido retinoico.	114
1.7. Los inhibidores de PREP no protegen frente a la muerte inducida con diversos tóxicos.	119

2. Desarrollo argumental.

2.1. Localización de PREP, mediante microscopía confocal, a lo largo de la vida de las células granulares de cerebelo.	122
2.2. Patrón de actividad de PREP en el citoplasma, en el núcleo y en las membranas durante el ciclo de vida de las células granulares de cerebelo.	127
2.3. Niveles de actividad de PREP durante la proliferación y diferenciación de la línea celular SH-SY5Y.	130
2.4. Variaciones en la transcripción del gen que codifica para PREP durante la diferenciación de células SH-SY5Y inducida por el ácido retinoico.	131
2.5. PREP y el sistema de señalización en células SH-SY5Y.	133
2.5.1. Inositol trifosfato (IP ₃).	133

2.5.2.	Quinasas extracelulares reguladoras de señal (ERK 1/2).	135
2.6.	La inhibición de PREP induce cambios morfológicos en las células SH-SY5Y diferenciadas con ácido retinoico.	136
IV.	CONCLUSIONES	141
V.	BIBLIOGRAFÍA	145

ÍNDICE DE FIGURAS

1.	Estructura tridimensional de PREP.	7
2.	Distribución de PREP en tejidos periféricos.	10
3.	Distribución de los niveles de proteína y de actividad de PREP procedentes de diferentes órganos de ratón.	11
4.	Niveles de actividad de PREP y de expresión de ARNm en diferentes áreas del cerebro de rata.	13
5.	Disminución de los niveles proteicos de PREP en el hemisferio izquierdo del cerebro humano.	14
6.	Distribución de PREP en el cerebro de rata mediante inmunohistoquímica.	15
7.	Rata Wistar de entre 6 y 8 días de vida utilizada en la elaboración de cultivos primarios de células granulares de cerebelo.	57
8.	Células granulares de cerebelo (DIV7).	57
9.	Doble detección de PREP en células granulares de cerebelo mediante Fluo-JTP e inmunocitoquímica.	66
10.	Efecto de la fijación de células en la localización de PREP mediante marcaje con Fluo-JTP en cultivos primarios de células granulares de cerebelo.	67
11.	Actividades de PREP de células SH-SY5Y tratadas con diferentes concentraciones de JTP-4819, KYP-2047 y Z-Pro-Prolinal tras 24 horas de incubación.	72
12.	Efecto de los inhibidores de PREP (10 μ M) en el medio de cultivo tras medir la actividad de la enzima presente en los lisados de células SH-SY5Y tras 15 días de incubación en ausencia y en presencia del inhibidor.	74
13.	Cambios morfológicos en células SH-SY5Y de neuroblastoma humano tras la diferenciación inducida con 10 μ M de ácido retinoico.	76
14.	Esquema de la distribución de áreas y subáreas de cada pocillo en la toma de fotos para el estudio morfológico.	80

15. Localización de PREP en el interior de las células granulares de cerebelo a lo largo de su ciclo de vida. 98
16. Registro de las oscilaciones de actividad de PREP en la fracción citosólica, nuclear y membranal a lo largo del ciclo vital de las células granulares de cerebelo. 100
17. Curva de viabilidad de células granulares de cerebelo *in vitro*. 104
18. Detección de la proteína PREP mediante inmunoelectrotransferencia. 108
19. Niveles de actividad de PREP frente a los días *in vitro* (DIV) en citoplasma y en núcleos determinados en células SH-SY5Y en condiciones control, tras inducir la diferenciación con ácido retinoico y tras retirar este agente inductor. 113
20. Niveles de ARNm de *Prep* en células SH-SY5Y en condiciones control, tras inducción de la diferenciación con 10 μ M de ácido retinoico y tras la eliminación del mismo. 115
21. Diagrama de barras que muestra los niveles de IP₃ en células SH-SY5Y cultivadas bajo condiciones de proliferación o tras la inducción de la diferenciación con ácido retinoico, tanto en ausencia como en presencia de 10 μ M de JTP-4819. 118
22. Cocientes de fosforilación para ERK 1/2 en células SH-SY5Y durante el DIV 5 y el DIV 9, cultivadas bajo condiciones control, en presencia de JTP-4819 y en presencia y ausencia de ácido retinoico. 122
23. Frecuencia estadística de encontrar un número determinado de células con aspecto neuronal, de neuritas por célula y por campo y una longitud de neurita concreta en células SH-SY5Y tratadas con ácido retinoico en ausencia y en presencia de JTP-4819. 125
24. Frecuencia del número de conexiones entre neuronas medida el DIV6 en células SH-SY5Y, bajo la diferenciación inducida con ácido retinoico y en ausencia o en presencia del inhibidor JTP-4819. 128

25. Disminución de la viabilidad y de la actividad lactato deshidrogenasa tras la muerte inducida en células SH-SY5Y con distintas concentraciones de 6-OHDA. 121

ÍNDICE DE TABLAS

1.	Péptidos de pequeño tamaño (<30 aminoácidos) que contienen en su secuencia una prolina susceptible a la digestión por PREP y el tipo de evidencia de la digestión (<i>in vivo</i> o <i>in vitro</i>).	20
2.	Propiedades cinéticas de inhibidores de PREP.	26
3.	Composición de los tampones utilizados para la lisis de las células granulares de cerebelo.	61
4.	Composición de los tampones requeridos en el ensayo de actividad de PREP.	62
5.	Volúmenes (en μl) de cada componente para la preparación de la recta estándar, las muestras y los diferentes blancos necesarios para llevar a cabo el ensayo de cuantificación del IP_3 .	84
6.	Características de PREP-1 y PREP-2 utilizados en la PCR en tiempo real.	89
7.	Condiciones y resultados obtenidos tras la muerte inducida en células granulares de cerebelo con diversos tóxicos, en presencia y en ausencia de inhibidores de PREP.	119
8.	Alteración del patrón de expresión génica tras la inhibición de PREP en células SH-SY5Y.	126

ABREVIATURAS UTILIZADAS

6-OHDA: 6-hidroxidopamina

Å: Amstrong

a.C.: Antes de Cristo

Ac-SDKP: N-acetil-seril-aspartil-lisil-prolina

ADNc: ADN complementario

AMC: 7- amido- 4- metilcumarina

AR: Ácido retinoico

ARNm: ARN mensajero

Asp: Ácido aspártico

BME: Medio mínimo esencial

BSA: Albúmina sérica bovina

βA: Beta amiloide

°C: Grado centígrado/Celsius

CE: Clasificación enzimática

cm²: Centímetros cuadrados

CO₂: Dióxido de carbono

cols.: Colaboradores

DAPI: 4'-6-diamino-2-fenilindol

DIV: Días *in vitro*

DMEM: Medio mínimo esencial Dulbecco

DMSO: Dimetilsulfóxido

DO: Densidad óptica

DTT: Ditioneitol

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EEUU: Estados Unidos

ERK 1/2: Quinasas 1 y 2 extracelulares reguladoras de señal

Fluo-JTP: Inhibidor fluorescente de PREP

g: Unidad de centrifugación

h: Hora

³H: Tritio

His: Histidina

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

IC₅₀: Concentración inhibitoria 50

IP₃: Inositol trifosfato

JTP-4819: Inhibidor de PREP

K⁺: Potasio

KDa: Kilodalton
K_i: Constante de inhibición
KYP-2047: Inhibidor de PREP
LDH: Lactato deshidrogenasa
M: Molar
MAPK: Quinasas activadas por mitógenos
μl: Microlitro
μM: Micromolar
mg: Miligramo
ml: Mililitro
mM: Milimolar
min: Minuto
MTT: Bromuro de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio
nm: Nanómetro
nM: Nanomolar
NMDA: N-metil-D-aspartato
PBS: Tampón fosfato salino
PBSA: Albúmina sérica bovina disuelta en PBS
PBSAT: Tritón X-100 en tampón PBSA
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
RT-PCR: Retrotranscripción de ARN
pmol: Picomol
PPA: Proteína precursora de amiloide
PREP: Prolil-oligopeptidasa
PREP-1: Cebador 1 de PREP
PREP-2: Cebador 2 de PREP
RER: Retículo endoplásmico rugoso
s: Segundo
SBF: Suero bovino fetal
SDS/PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
Ser: Serina
SH-SY5Y: Línea celular de neuroblastoma humano
UNE: Unión no específica
ZIP: Proteína insensible a ZPP
ZPP: Z-Pro-Prolinal, inhibidor de PREP

INTRODUCCIÓN

“La escalera ha de barrerse empezando por arriba.”

Proverbio ruso.

1. GENERALIDADES DE LA ENZIMA PROLIL-OLIGOPEPTIDASA (PREP)

1.1. La familia de las prolil-oligopeptidasas: una familia peculiar de proteasas dependientes de serina.

Una de las funciones de las proteasas es su participación en la modificación post-traducciona de péptidos que se sintetizan de forma inactiva y que, tras la escisión proteolítica, se convierten en péptidos bioactivos. La mayoría de las peptidasas no pueden hidrolizar enlaces peptídicos que contienen residuos de prolina debido a la estructura única de este iminoácido y a la rigidez estructural que le confiere a la cadena polipeptídica. De hecho, muchos de los péptidos biológicamente activos contienen alguna prolina interna que les confiere protección a la degradación por la mayoría de las proteasas. Sin embargo, existen peptidasas específicas que reconocen el anillo de prolina- las cuales juegan un papel fisiológico importante y actualmente son dianas de la industria farmacéutica (Cunningham y O'Connor, 1997b; Rosenblum y Kozarich, 2003). Una de estas peptidasas específicas, y eje fundamental de la presente tesis, es la enzima **Prolil-oligopeptidasa** (PREP, CE 3.4.21.26) (Rawlings y cols., 2004). Las peptidasas homólogas se agrupan en familias en base a sus similitudes en secuencia. Aquellas familias que poseen una estructura terciaria común y provienen del mismo ancestro, son agrupadas en clanes. El clan de las peptidasas SC tiene dominios catalíticos que muestran una topología α/β hidrolasa, la cual se caracteriza por la presencia de una tríada catalítica constituida por una secuencia ácido-histidina-nucleófilo (Ser, Asp e His). La familia de las prolil-oligopeptidasas pertenece al clan SC y a la familia S9 (Rawlings y Barret, 1994). Esta familia de las proteasas

Introducción

dependientes de serina incluye las enzimas: PREP, Dipeptidil peptidasa IV (CE 3.4.14.5), Acilaminoacil-peptidasa (CE 3.4.19.1) y la Oligopeptidasa B (CE 3.4.21.83) (Rawling y cols., 1991; Venäläinen y cols., 2004a). La familia de las Prolil-oligopeptidasas difiere de las proteasas dependientes de serina clásicas, como la tripsina y la subtilisina, en su especificidad de sustrato, topología de la tríada catalítica y presencia de un dominio no catalítico. Además, las distintas enzimas que comprenden la familia de prolil-oligopeptidasas difieren entre sí en cuanto al sitio y a la especificidad del sustrato que cortan. En el caso de la enzima PREP, ésta sólo puede cortar en el extremo carboxilo de una prolina interna (-Pro-Xaa; donde Xaa \neq Pro) perteneciente a un péptido de no más de 30 aminoácidos; siempre y cuando el aminoácido que le sigue no sea una prolina (Mentlein, 1988; Cunningham y O'Connor, 1997b).

Los árboles filogenéticos indican que los miembros de la familia de las prolil-oligopeptidasas ya estaban presentes en el último ancestro universal común de todas las formas de vida y se encuentran ampliamente distribuidos en organismos que engloban desde bacterias y arqueas hasta humanos. Únicamente los hongos parece que carezcan de la enzima PREP (Venäläinen y cols., 2004a). Sin embargo, sí se han encontrado algunos homólogos de la familia peptidasa S9 en algunas especies de hongos (base de datos de peptidasas (MEROPS); Rawlings y cols., 2010).

¿Qué función desarrolla PREP para que ésta se conserve a lo largo de la evolución de los distintos seres vivos?

1.2. Identificación y caracterización de la enzima Prolil-oligopeptidasa (PREP).

PREP fue la primera enzima descubierta (Walter y cols., 1971), purificada y caracterizada (Koida y Walter, 1976, Kalwant y Porter, 1991) de la familia de las prolil-oligopeptidasas. Fue descubierta en el útero humano como una enzima que cortaba la hormona oxitocina (Walter y cols., 1971) y fue nombrada “enzima que cortaba detrás de la prolina”. Posteriormente, el nombre cambió a Prolil endopeptidasa (PEP) y en 1992 se llegó al consenso de que la proteína debía ser llamada Prolil- oligopeptidasa, dado que no cortaba proteínas de gran tamaño (IUBMB, 1992). También se pueden encontrar otros nombres en la literatura como Endopeptidasa post-prolina. El nombre abreviado de la proteína ha aparecido en la literatura como PE, PEP, PO, PREP, etc. Sin embargo, se ha acordado utilizar el término PREP para hacer referencia a la proteína Prolil-oligopeptidasa, manteniendo consistencia con el nombre del gen que codifica para esta proteína, *Prep*.

PREP ha sido considerada como una enzima soluble citoplasmática. No existen evidencias de que la proteína sufra ninguna modificación o procesado que le permita asociarse a algún tipo de estructura intracelular, o que sea exportada fuera de la célula. Sin embargo, se han registrado actividades de PREP en membranas, en organelas como las mitocondrias, en el espacio extracelular y en fluidos corporales como el suero y el líquido cerebrospinal. Todo esto puede sugerir la existencia de proteínas alternativas no caracterizadas todavía (O’Leary y cols., 1996; Cunningham y O’Connor, 1997a). Recientemente, se ha caracterizado PREP asociada a las membranas (Tenorio-Laranga y cols., 2008).

Introducción

Se han hecho numerosos estudios enfocados a ubicar PREP en el organismo, a fin de poder determinar qué funciones desarrolla en él. Si bien PREP se encuentra ampliamente distribuida por los diferentes órganos en mamíferos, uno de los mayores registros de actividad de la enzima ha sido detectado en el cerebro (Irazusta y cols., 2002; Agirregoitia y cols., 2005; Myöhänen y cols., 2008a). En la actualidad las funciones de PREP en el cerebro no están totalmente esclarecidas, pero sí se están recopilando datos que demuestran una asociación de la actividad de PREP con ciertos trastornos psiquiátricos tales como la depresión, el trastorno bipolar y la bulimia nerviosa (García-Horsman y cols., 2007a). También se han hecho estudios que corroboran que PREP está desempeñando una función en el cerebro, ya que inhibidores específicos de la enzima son capaces de revertir la pérdida de memoria debidas bien al envejecimiento, a lesiones o al tratamiento con drogas pro-amnésicas (Männistö y cols., 2007). De ello se hablará más adelante, de forma más extensa.

1.3. Estructura de PREP y su mecanismo catalítico.

PREP de mamíferos está constituida por una única cadena de 710 residuos (Rennex y cols., 1991). Fülöp y colaboradores (1998) consiguieron cristalizar la enzima nativa y el complejo formado por PREP con su inhibidor Z-pro-prolinal (ZPP) y caracterizar su estructura en alta resolución. PREP tiene una estructura cilíndrica de aproximadamente 60 Amstrongs (Å) de altura y 50 Å de diámetro, constituida por dos dominios; el dominio catalítico o peptidasa, que comprende los extremos amino y carboxi-terminales y que contiene la tríada catalítica Ser 554 (Rennex y cols., 1991), Asp 641 (Polgár, 1992) e His 680 (Stone y cols., 1991). Este dominio tiene actividad α/β hidrolasa (Ollis y cols., 1992; Polgár, 1992; Goosens y cols., 1995; Fülöp y cols., 1998) y comprende los residuos 1-72 y 428-710. Por otra parte, se encuentra el dominio β -hélice, que tiene una forma cilíndrica y

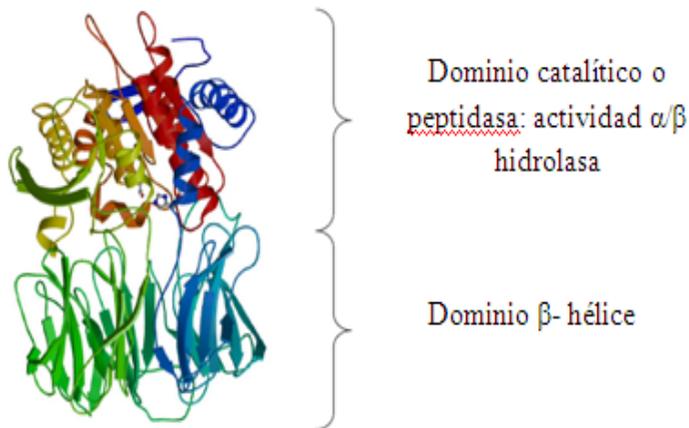


Figura 1. Estructura tridimensional de PREP. Se representa el extremo amino-terminal (en azul) y el carboxi-terminal (en rojo). Figura modificada a partir de la tomada de Fülöp y cols. (1998).

Introducción

está formado por 7 hojas β antiparalelas que comprenden los residuos 73-427 y, por tanto, se encuentra inmerso entre las dos porciones del dominio catalítico. Como se puede ver en la figura 1, el dominio β -hélice se encuentra fijado alrededor del túnel central embebido dentro del cilindro, cerca del centro activo.

Los primeros 72 residuos del dominio catalítico están formados por 2 hojas β antiparalelas y 2 α -hélice largas, conectadas entre sí. La primera y la última hoja están estabilizadas entre sí mediante fuerzas de interacción débiles de carácter hidrofóbico confiriendo una estructura a modo de “candado velcro” (Fülöp y cols., 1998).

Se ha postulado que el dominio β -hélice podría participar en el reconocimiento de oligopéptidos y actuar como filtro evitando la proteólisis de péptidos largos (>30 resíduos) (Fülöp y cols., 1998; Fülöp y cols., 2000; Rea y Fülöp, 2006; Gass y Khosla, 2007). Otros estudios recientes indican que la entrada de ligandos podría ocurrir a través de la interfase entre los dominios catalítico y β -hélice (Kaszuba y cols., 2009; Katszuba y cols., 2012). Sin embargo, todavía no se ha podido determinar en PREP de mamíferos cómo tiene lugar la entrada e interacción del sustrato con la enzima

1.4. Enzimas alternativas a PREP

Se han determinado enzimas con especificidades a nivel de sustrato similares a PREP, las cuales podrían ser confundidas al interpretar los resultados y adjudicar nuevas funciones a PREP.

Cunningham y cols. (1998) consiguieron purificar PREP procedente de un suero bovino y, tras hacer un estudio de hidrólisis con diferentes sustratos, determinaron que era incapaz de hidrolizar muchos sustratos fluorométricos y que tenía una especificidad de sustrato

significativamente menor que la PREP procedente de tejido; sugiriendo la posibilidad de que se tratase de una proteasa desconocida con funciones similares a la PREP de tejido ya conocida. Cunningham y O'Connor (1997a) encontraron otra enzima similar a PREP en suero bovino, a la que llamaron PREP insensible a ZPP (ZIP). Esta enzima presentaba la peculiaridad de ser resistente al inhibidor clásico de PREP ZPP pero sí era capaz de hidrolizar el sustrato Z-glycyl-prolyl-4-metilcumarinil-7-amida (Cunningham y O'Connor, 1997b), así como algunos de los sustratos hidrolizados también por PREP; como la angiotensina y la hormona liberadora de tiotropina pero no podía degradar otros sustratos como la sustancia P, la bradiquinina y la neurotensina (Birney y O'Connor, 2001). Posteriormente, ZIP se identificó como seprasa o α -proteína activadora de fibroblastos (CE 3.4.21.B28). Recientemente se ha aislado, purificado y caracterizado PREP asociada a membranas a partir de un extracto de cerebro de cerdo. Si bien guarda una gran similitud en su secuencia primaria con PREP citoplasmática, presenta algunas diferencias con ésta -como la capacidad de unión a membranas y su patrón de migración tras la electroforesis SDS/PAGE- sugiriendo que ambas enzimas, codificadas por el mismo gen, podrían ser producto de procesamiento alternativo del ARN mensajero (ARNm) o de modificaciones post-traduccionales de la proteína (Tenorio-Laranga y cols., 2008)

1.5. Distribución de PREP en mamíferos.

En mamíferos, la actividad de PREP se ha detectado en todos los órganos y tejidos estudiados, si bien las actividades más altas se han registrado en el cerebro (Kato y cols., 1980b; Daly y cols., 1985; Fuse y cols., 1990; Irazusta y cols., 2002; Bellemère y cols., 2004; Agirregoitia y cols., 2005; Myöhänen y cols., 2008a). Además, se han podido medir

Introducción

actividades bajas en todos los fluidos corporales (Goosens y cols., 1996; García-Horsman y cols., 2007a).

Los estudios realizados a fin de localizar a PREP *in situ* y determinar la distribución de su actividad en el cuerpo entero del ratón mostraron que la mayor cantidad de PREP se encontraba en el cerebro, pero también en el riñón, testículos y timo. Cantidades algo menores fueron detectadas en la vejiga, pulmones y corazón, mientras que los niveles bajos de la enzima se hallaban en el hígado (Myöhänen y cols., 2008b) (ver figura 2).

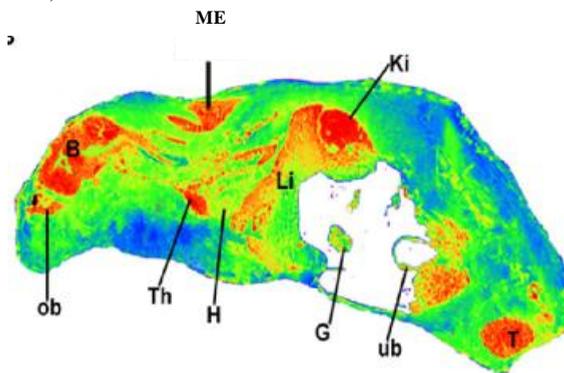
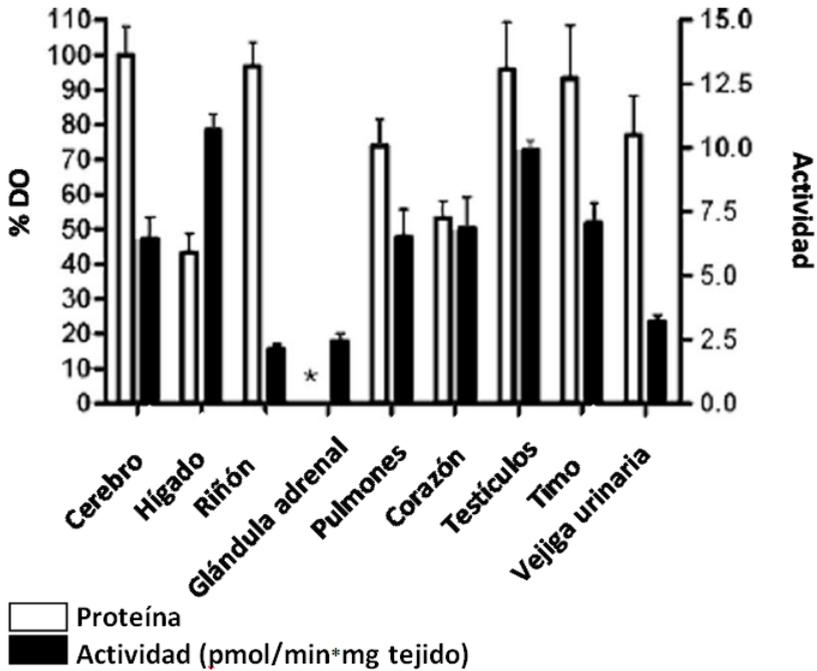


Figura 2. Distribución de PREP en tejidos periféricos, determinada mediante inmunohistoquímica y realizada en secciones del cuerpo entero de un ratón. PREP se encontró en mayor cantidad en el cerebro, riñones, testículos y timo, si bien también está presente en la vejiga urinaria, pulmones, corazón e hígado. ME (B) cerebro, (ob) bulbo olfatorio (Th) timo, (H) corazón, (Li) hígado, (G) tracto gastrointestinal, (ub) vejiga urinaria, (T) testículos, (Ki) riñón, (ME) músculo esquelético. Imagen tomada de Myöhänen y cols. (2008b).

Sorprendentemente, el ensayo de actividad en estos órganos reveló que la máxima actividad se encontraba en el hígado, seguido de los testículos. En el corazón, pulmones, timo y cerebro se encontraron unos niveles de actividad moderados, mientras que éstos eran muy bajos en la vejiga, glándula adrenal y riñón (ver figura 3) (Myöhänen y cols., 2008b).



*Figura 3. Figura comparativa entre la distribución de los niveles de proteína y de actividad de PREP procedentes de diferentes órganos de ratón. Los niveles de proteína han sido expresados en % de densidad óptica (DO) respecto al cerebro (considerado éste como el 100%), mientras que los niveles de actividad se han presentado como pmol de AMC/min*mg de tejido. El valor de la densidad óptica procedente de la glándula adrenal no fue analizado. Esta figura fue tomada de Myöhänen y cols., 2008b.*

Este estudio demostró que PREP se encontraba ampliamente distribuida en el organismo, si bien no lo estaba de forma homogénea. Además, resultó paradójico el hecho de que la cantidad de proteína PREP de un órgano no se encontrara en relación proporcional a los niveles de actividad de la enzima encontrados. Si bien las actividades más bajas se encontraron en el riñón, éstas se correspondieron con los niveles de proteína PREP más altos. Por otra parte, el hígado presentó una

actividad muy alta mientras que los niveles proteicos de PREP fueron muy bajos. Y, sorprendentemente en el cerebro se registró una actividad moderada mientras que los niveles de proteína se encontraron en mayor cantidad.

Estas diferencias halladas entre los niveles de actividad y de proteína podrían deberse a diferencias en la regulación de PREP y a la existencia de inhibidores endógenos que podrían actuar a modo de moléculas reguladoras de dicha actividad (Salers, 1994; Yamakawa y cols., 1994). Sin embargo, la función y el mecanismo de este inhibidor endógeno no han sido caracterizados todavía.

1.5.1. Distribución de PREP en el cerebro de mamíferos.

El hecho de que los niveles de proteína PREP sean altos en el cerebro apunta a que la enzima podría ejercer un papel importante en este órgano. A partir de aquí se han diseñado experimentos encaminados a determinar la distribución de PREP en las distintas regiones del cerebro así como a buscar sustratos de esta enzima que ayuden a esclarecer su función en el cerebro. Por ejemplo, se ha descrito que la sustancia P -péptido relacionado con el proceso de aprendizaje y memoria- es un sustrato de PREP, por lo que esta enzima podría actuar regulando los niveles de este péptido (Männistö y cols., 2007).

Irazusta y cols. (2002) llevaron a cabo los primeros estudios, basados en medidas de actividad, de la distribución de PREP en las diferentes áreas cerebrales (ver figura 4). Los resultados mostraron que la máxima actividad residía en la corteza mientras que las más bajas correspondían al cerebelo y al hipotálamo. En el resto de las regiones la actividad de PREP se encontraba distribuida de forma homogénea (Irazusta y cols., 2002). Sin embargo, cuando se hicieron los estudios basados en la

expresión del ARNm que codificaba para PREP, se vio que el patrón de expresión era diferente al patrón de actividades descrito anteriormente. Si en el hipotálamo y en el cerebelo se habían registrado los niveles de actividad de PREP más bajos (Irazusta y cols., 2002), éstos presentaban los niveles más altos de expresión de ARNm (Bellemère y cols., 2004) (ver figura 4).

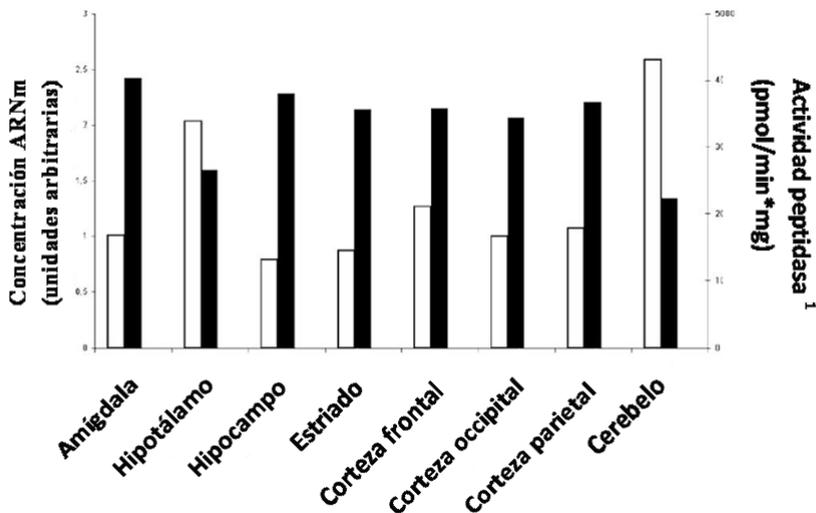


Figura 4. Figura comparativa entre los niveles de actividad de PREP y de expresión de ARNm en diferentes áreas del cerebro de rata. Datos procedentes del estudio realizado por Bellemère y cols. (2004). La cantidad de ARNm que codifica para PREP se encuentra expresada en unidades arbitrarias y corresponden a las barras blancas del gráfico. Las actividades enzimáticas, que aparecen en barras negras, corresponden a los datos obtenidos por Irazusta y cols.(2002) y se expresan como pmol/min x mg de tejido. RNAm presente en el núcleo caudal putamen; 1 Actividad total. Figura tomada de García-Horsman y cols. (2007a).

Myöhänen y cols. (2007) realizaron un estudio inmunohistoquímico a fin de localizar PREP en el cerebro humano y de rata. En humanos, PREP se encontraba ampliamente distribuida por todo el cerebro, si bien las mayores cantidades de esta proteína estaban presentes en el

Introducción

núcleo caudado, putamen, cerebelo, corteza insular, claustró e hipocampo.

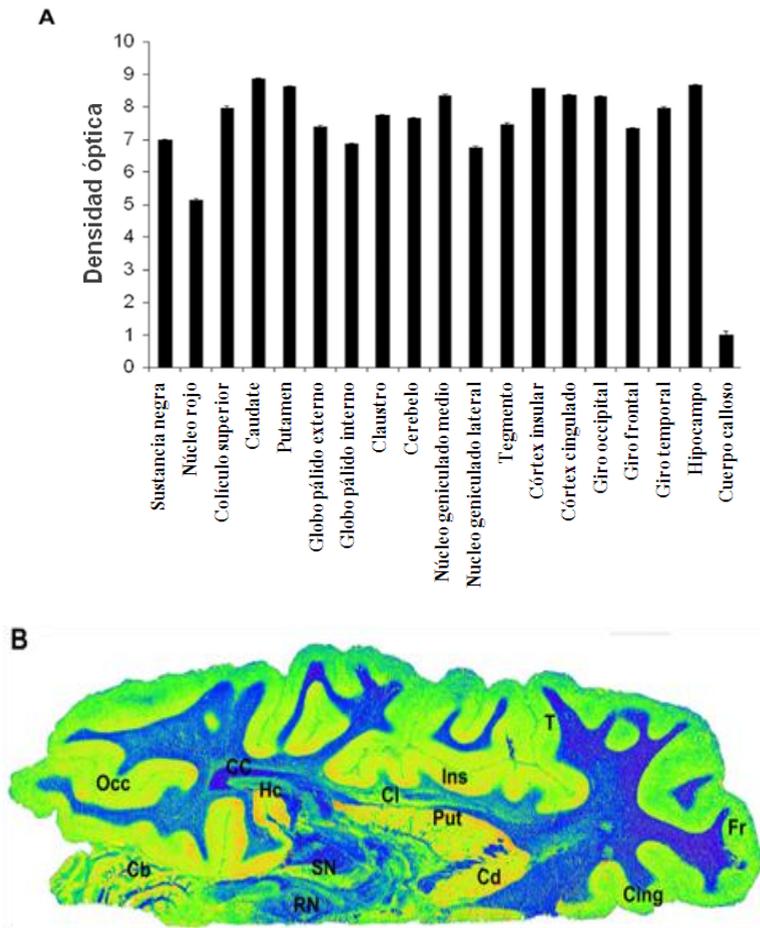


Figura 5. Distribución de los niveles proteicos de PREP en el hemisferio izquierdo del cerebro humano. (A) Los valores de densidad óptica (DO) de las áreas cerebrales analizadas están comparadas con el valor de la DO del cuerpo calloso, al que se le asigna el valor de $DO=1$. (B) Los tonos azules o fríos corresponden a niveles bajos de PREP, mientras que los tonos rojos o cálidos reflejan niveles altos de esta enzima. (Cb) cerebelo, (CC) cuerpo calloso, (Cd) caudado, (Cing) corteza cingulada, (Cl) claustró, (Fr) corteza frontal, (Hc) hipocampo, (Ins) corteza insular, (Occ) giro occipital, (Put) putamen, (RN) núcleo rojo, (SN) sustancia negra, (T) giro temporal. Figura tomada de Myöhänen y cols., 2007.

En el cerebro de rata, Myöhänen y cols. (2007) determinaron que los niveles de PREP más altos se encontraban en la sustancia negra, seguida de la corteza motora primaria, corteza piriforme, hipocampo, claustró y cerebello (ver figura 6).

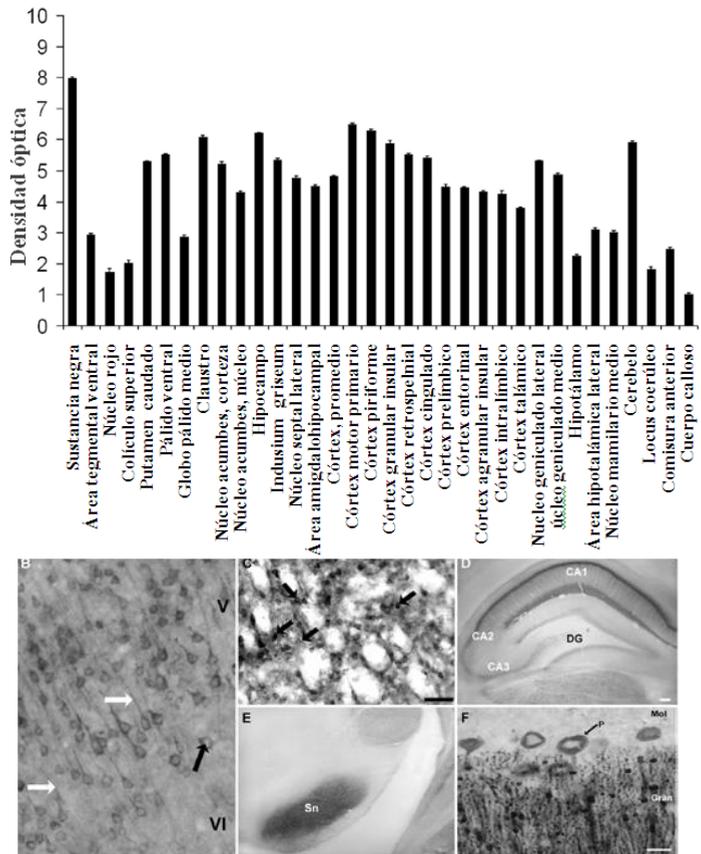


Figura 6. Distribución de PREP en el cerebro de rata, determinada mediante inmunohistoquímica. (A) Los valores de densidad óptica están comparados respecto al cuerpo calloso, al cual se le asignó el valor de 1. (B) En las capas V y VI de la corteza somatosensorial, PREP se encontró localizada tanto en los somas de las células piramidales (ver la flecha negra) como en las dendritas (ver las flechas blancas). (C) Las neuronas espinales del cuerpo estriado también aparecieron intensamente marcadas. PREP se encontró localizada, principalmente, en el campo CA1 del hipocampo (D), sustancia negra (E), y en las células Purkinje del cerebello (F). (CA1, CA2, CA3) campos CA del hipocampo; (DG) giro dentado; (Gran) célula granular de cerebello; (Mol) célula de la capa molecular; (P) célula de Purkinje; (Sn) sustancia negra. Barras de escala: B y C, 30 μm ; D, 50 μm ; E, 150 μm ; F, 10 μm . Figura tomada de Myöhänen y cols. (2007).

Introducción

Otro hecho importante derivado de estos estudios es que PREP se expresaba únicamente en neuronas, no en glia (Myöhänen y cols., 2007).

Estudios recientes basados en técnicas de inmunohistoquímica, en los que se ha estudiado la colocalización de PREP con sistemas de neurotransmisores, han sugerido que PREP podría estar implicada en la regulación de la neurotransmisión tálamo-cortical. La expresión de esta enzima en neuronas glutaminérgicas, GABAérgicas y colinérgicas tanto en el tálamo como en la corteza, sugiere que PREP podría ejercer una función en la neurotransmisión inhibitoria y excitatoria. Además, se han encontrado cantidades pequeñas de PREP en la membrana cortical IV en comparación con otras membranas corticales y, por tanto, PREP podría tener una mayor relación con las conexiones aferentes que con las eferentes entre la corteza y el tálamo. El papel de PREP en las señales aferentes también viene apoyado por el hecho de que la enzima se expresa en gran cantidad en las células de Purkinje del cerebelo (Myöhänen y cols., 2008c). Se han encontrado niveles altos de PREP en el hipocampo y, más concretamente, en las neuronas piramidales del campo CA1, lo que apunta a una posible función en el proceso de aprendizaje y memoria (Bellemère y cols., 2004; Myöhänen y cols., 2007). Además, PREP colocaliza con los receptores del inositol trifosfato (IP_3) en el tálamo, neuronas piramidales CA1 del hipocampo y células de Purkinje en el cerebelo (Myöhänen y cols., 2008c), por lo que PREP podría ejercer una función relacionada con la señalización del IP_3 , como se comentará más adelante.

1.5.2. Distribución intracelular de PREP.

Aunque PREP fue descrita como una enzima que se expresaba de forma constitutiva en el citoplasma (Dresdner y cols., 1982; Polgár, 2002), trabajos posteriores han sugerido que PREP podría estar ubicada fuera del citosol (Ohtsuki y cols., 1997; Ishino y cols., 1998; Agirregoitia y cols., 2003; Schulz y cols., 2005; Myöhänen y cols., 2008a; Tenorio-Laranga y cols., 2008). Esto último tiene sentido si se atiende al hecho de que la mayor parte de los neuropéptidos, posibles sustratos de PREP, se ubican en el espacio extracelular. Pero por otra parte, resulta curioso que PREP carezca de una señal de secreción, región transmembrana o alguna secuencia de anclaje a lípidos (Venäläinen y cols., 2004a, Tenorio-Laranga y cols., 2008).

A fin de localizar la PREP endógena, Schultz y cols. (2005), mediante un estudio inmunocitoquímico, observaron que PREP se encontraba distribuida perinuclearmente, guardando una estrecha relación con la tubulina -un componente del citoesqueleto-, ya que en presencia de necodazol, un agente despolimerizante de microtúbulos, la distribución de PREP en células de neuroblastoma desaparecía. Por ello, PREP podría estar implicada en los procesos asociados a los microtúbulos como el tráfico intracelular, organización y secreción de péptidos.

Esta localización perinuclear de PREP no sólo ha sido descrita en una línea celular, sino que también ha sido observada en estudios basados en inmunohistoquímica (Myöhänen y cols., 2008a). PREP también se ha encontrado en el interior de los núcleos en tejidos periféricos (Myöhänen y cols., 2008b) y cultivos celulares de células no neuronales (Ishino y cols., 1998) pero esta localización nuclear, hasta la realización de esta tesis, no se había observado nunca en el cerebro de animales adultos (Myöhänen y cols., 2007; Myöhänen y cols., 2008a).

Además de estas localizaciones, existen datos que apuntan que PREP se encuentra asociada a membranas (Agirregoitia y cols., 2003; Myöhänen y cols., 2008a; Tenorio-Laranga y cols., 2008).

Como ya se ha mencionado anteriormente, se ha descrito PREP asociada a membranas en varias líneas celulares (Chappell y cols., 1990) y en fracciones de sinaptosomas de cerebro porcino (Tenorio-Laranga y cols., 2008). Pese a que esta forma de PREP es capaz de hidrolizar los mismos sustratos que PREP citoplasmática (O'Leary y cols., 1996) su cantidad y actividad son menores que la encontrada en la variante citoplasmática (Irazusta y cols., 2002; Agirregoitia y cols., 2005; Tenorio-Laranga y cols., 2008).

En estudios realizados mediante inmunohistoquímica se ha mostrado la PREP asociada a membranas intracelulares como al retículo endoplásmico rugoso (RER), al aparato de Golgi, así como a la vaina de mielina (Myöhänen y cols., 2008a) lo que indica una posible implicación de PREP en el transporte celular.

1.5.3. Localización extracelular de PREP

Se han descrito varias actividades similares a PREP en diferentes líquidos extracelulares como en el suero (Goosens y cols., 1992), en la orina (Quinto y cols., 2000), en el líquido cerebroespinal (Momeni y cols., 2003) y también en el líquido seminal (Siviter y Cockle, 1995; Valdivia y cols., 2004). Sin embargo, PREP encontrada en suero es la que ha suscitado un mayor interés desde que se detectaron, en este fluido, niveles diferentes de la enzima en trastornos psiquiátricos como la depresión, conducta maníaca, esquizofrenia, trastornos de la alimentación y cuadros de ansiedad (García-Horsman y cols., 2007a). En la actualidad se desconoce de dónde proviene PREP extracelular y

resulta paradójico que, estando sus sustratos localizados principalmente en este espacio, la mayor parte de la enzima se localice en el citoplasma (Brandt y cols., 2007). Su presencia en el espacio extracelular podría deberse a una liberación de la enzima a ese espacio por un mecanismo desconocido (Ahmed y cols., 2005). En estudios realizados en ovejas se ha visto que PREP extracelular es liberada de los vasos del cerebro pudiendo ser ésta la principal fuente de PREP encontrada en el suero (Lawrence y cols., 1992).

Estudios basados en la medición de la actividad de PREP presente en el suero bovino han mostrado que únicamente el 50% de la actividad total es sensible al inhibidor específico de PREP, ZPP, y que ambas actividades podían separarse mediante cromatografía. La fracción resistente al inhibidor fue nombrada ZIP (Birney y O'Connor, 2001), como ya se ha descrito anteriormente al hablar de las enzimas alternativas a PREP.

1.6. Enzimología de PREP

Además de la actividad proteolítica, PREP está dotada de un sistema que impide el acceso de péptidos de más de 30 aminoácidos como se expuso al hablar de su estructura.

A continuación se hará un breve resumen de los sustratos de PREP descritos hasta la fecha así como de sus inhibidores, cuatro de los cuales (ZPP, JTP-4819, KYP-2047 y Fluo-JTP) se han utilizado en la realización de los experimentos de esta tesis.

1.6.1. Sustratos de PREP

La selectividad de PREP por determinados oligopéptidos fue descrita por primera vez por Camargo y cols. en 1979.

Introducción

A priori, todos los péptidos naturales con menos de 30 aminoácidos y que incluyen un residuo de prolina interno, son sustratos potenciales de PREP (García-Horsman y cols., 2007a).

García-Horsman y cols. (2007a) han recopilado todos los péptidos bioactivos conocidos hasta el momento, los cuales contienen al menos una prolina interna y son cortados por PREP (ver la tabla 1).

Tabla 1. Péptidos de pequeño tamaño (< 30 aminoácidos) que contienen en su secuencia una prolina susceptible de la digestión por PREP y el tipo de evidencia de la digestión (in vitro o in vivo).

Sustrato	Secuencia	Tipo de evidencia^a
<u>Sustancia P</u>	R-P-K-P-Q-Q-F-F-G-L-M	A, B, C, D(t), E, F
<u>TRH</u>	pQ-H-P-NH ₂	A, D(t)
<u>GnRH</u>	pQ-H-W-S-Y-G-L-R-P-G-NH	A, B, C, D(t), E, F
<u>Arginina-vasopresina</u>	C-Y-F-Q-N-C-P-R-G	A, D, E, F
<u>Angiotensina I</u>	D-R-V-Y-I-H-P-F-H-L	A
<u>Angiotensina II</u>	D-R-V-Y-I-H-P-F	A, B(t), C, D
<u>Angiotensina III</u>	R-V-Y-I-H-P-F	A
<u>Angiotensina IV</u>	R-V-Y-I-H-P-F	A
<u>Bradiquinina</u>	R-P-P-G-F-S-P-F-R	A, B(t), G
<u>Oxitocina</u>	C-Y-I-Q-N-C-P-L-G-NH	A
<u>β-Endorfina</u>	Y-G-G-F-M-T-S-E-K-S-Q-T-P-L-V-T-L-F-K-N-A-I-I-K-N-A-Y-K-K-G-E	A
<u>Neurotensina</u>	pQ-L-Y-E-N-K-P-R-R-P-Y-I-L	A
<u>α-MSH</u>	S-Y-S-M-E-H-F-R-W-G-K-P-V-NH ₂	D(t)
<u>β-Casomorfiina</u>	Y-P-F-P-F-P-I	A
<u>LVV-hemorfiina-7</u>	L-V-V-Y-P-W-T-Q-R-F	C
<u>Morficetina</u>	Y-P-F-P-NH ₂	A
<u>Urotensina II</u>	D-T-P-D-C-F-W-K-Y-C-V	A
<u>Octadecaneuropéptido ODN</u>	Q-A-T-V-G-D-V-N-T-D-R-P-G-L-L-D-L-K _b	A
<u>Humanina</u>	M-A-P-R-G-F-S-C-L-L-L-L-T-S-E-I-D-L-P-V-K-R-R-A _b	A
<u>Endomorfina-1</u>	Y-P-W-F-NH ₂	n.e.
<u>Endomorfina-2</u>	Y-P-F-F-NH ₂	n.e.

Tabla 1. Continuación.

Sustrato	Secuencia	Tipo de evidencia^a
<u>Enquelitina</u>	F-A-E- P-L-P-S -E-E-E-G-E-S-Y-S-K-E-V-P-E-M-E-K-RY-G-G-F-M-OH	n.e.
<u>Tyr-MIF-1</u>	Y- P-L -G-NH ₂	n.e.
<u>Tyr-W-MIF-1</u>	Y- P-W -G-NH ₂	n.e.
<u>Dinorfina A</u>	Y-G-G-F-L-R-R-I-R- P-K-L -K-W-D-N-Q	n.e.
<u>Galanina</u>	G-W-T-L-N-S-A-G-Y-L-L-G- P-H -A-V-G-N-H-R-S-F-SD-K-N-G-L-T-S	n.e.
<u>Neuromedina N</u>	K-I- P-Y -L	n.e.
<u>Neuromedina U</u>	Y-K-V-N-E-Y-Q-G- P-V-A-P-S -G-G-F-F-L-F-R- P-R -NNH ₂	n.e.
<u>Kinetensina</u>	I-A-R-H- P-Y -F-L	n.e.
<u>Orexina</u>	R-S-G- P-G -L-Q-G-RL-Q-R-L-L-Q-A-S-G-N-H-A-A-G-IL-T-M-NH ₂	n.e.
<u>Somatostatina</u>	S-A-N-S-N- P-A-M-A-P-R -E-R-K-A-G-C-K-N-F-F-W-KT-F-T-S-C	n.e.
<u>Factor de necrosis tumoral P55</u>	L- P-Q -I-E-N-V-K-G-T-E-E	n.e.
<u>Factor de necrosis tumoral P75</u>	S-M-A- P-G -A-V-H-L- P-Q -P	n.e.
<u>β-MSH</u>	D-F-D-M-L-R-C-M-L-G-R-V-Y-R- P-C -W-Q-V	n.e.
<u>Hormona concentradora de melanina</u>	D-F-K-K-D-E-G- P-Y -R-M-E-H-F-R-Y-G-S-P- P-K -D	n.e.
<u>Tuftsina</u>	T-K- P-R	n.e.
<u>Péptido precursor de TRH</u>	K-R-Q-H- P-G -K-R	n.e.
<u>Gastrina</u>	pE-G-P-W-L-E-E-E-E-E-A-Y-G-W-M-D-F-NH	N

Componentes modelo para el ensayo de actividad

- Suc-Gly-**Pro**-AMC
- Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-**Pro**-AMC
- Suc-Ala-**Pro**-pNA
- Z-Ala-**Pro**-4MbNA
- Z-Gly-**Pro**-AMC
- Z-Gly-**Pro**-bNA
- Z-Gly-**Pro**-pNA
- Z-Gly-**Pro**-Ala-OH
- Z-Gly-**Pro**-Leu-Gly-Pro-OH
- Z-Lys-**Pro**-4MbNA
- Pyr-His-**Pro**-4NA

Introducción

Los puntos de corte aparecen en negrita.

^a *A, digestión mediante PREP purificada; B, digestión a partir de extractos crudos de tejido; C, digestión sensible a inhibidores de PREP a partir de extractos crudos de tejido; D, modulación de los niveles de péptidos mediante inhibidores de PREP in vivo; E, efecto peptídico potenciado mediante inhibidores de PREP in vitro; F, efecto peptídico potenciado mediante inhibidores de PREP in vivo; G, modulación genética de PREP mediante péptidos o análogos; (t) tejido o dependiente del tipo celular; N, péptido resistente a PREP; n.e., no se encontró registro. Tabla modificada a partir de la tabla de García-Horsman y cols. (2007a).*

Muchos de estos sustratos se han identificado mediante estudios realizados *in vitro* a partir de extractos crudos de tejido, enzimas purificadas a partir de tejidos o enzimas recombinantes. Se desconoce si la información obtenida de estos estudios se corresponde a lo que sucede *in vivo* (García-Horsman y cols., 2007a).

A algunos de estos sustratos se les ha atribuido un papel importante en el cerebro (Bennett y cols., 1997; Tanabe y cols., 1997; Tanabe y cols., 1999; Morain y cols., 2002).

Además de estos péptidos, Brandt y cols. (2005) sugirieron la α -sinucleína, una proteína presente en los cuerpos de Lewy tan característicos en la enfermedad de Parkinson, como otro posible sustrato de PREP basándose en experimentos en los que se utilizó PREP recombinante para tratar un extracto peptídico procedente del cerebro entero de cerdo. A pesar de que no se pudo detectar la hidrólisis de la forma madura de la α -sinucleína por PREP, sí se obtuvieron datos que mostraban un aumento de la agregación de esta molécula en presencia de la enzima, proceso, a su vez sensible a ZPP y a mutaciones que inactivaron PREP (Brandt y cols., 2008). Brandt y cols. (2008) no detectaron ninguna actividad de la peptidilprolil isomerasa en PREP que pudiera modificar la conformación de la α -sinucleína.

Todos estos datos adquieren suma importancia a fin de descubrir nuevos sustratos de PREP que ayuden a esclarecer la función de PREP en el cerebro.

1.6.2. Inhibidores específicos de PREP

Desde la publicación de Yoshimoto y cols. a finales de los años 80 en la que se vio que algunos inhibidores de PREP, como el ZPP (Wilk, 1983) eran capaces de revertir la pérdida de memoria inducida por la droga amnésica escopolamina, se ha abierto una intensa investigación encaminada al diseño de nuevos inhibidores específicos de esta enzima y estudiar su posible utilización en el tratamiento de las deficiencias cognitivas asociadas al envejecimiento y/o enfermedades neurodegenerativas (Yoshimoto y cols., 1987; Toide y cols., 1995b; Shinoda y cols., 1996; Toide y cols., 1997a; Bellemère y cols., 2003; Männistö y cols., 2007). La capacidad de mejorar la capacidad cognitiva atribuida al ZPP, también ha sido confirmada por otros autores al utilizar otros inhibidores (Atack y cols., 1991; Portevin y cols., 1996). El ONO-1603, JTP-4819 y S-17092-1 han sido descritos como potenciadores cognitivos y algunos de ellos son objeto de estudio farmacocinético e incluso se encuentran en la fase clínica si bien todavía no ha sido registrado su uso como drogas (Katsube y cols., 1996; Toide y cols., 1997b; Umemura y cols., 1997; Miyazaki y cols., 1998; Katsube y cols., 1999; Shinoda y cols., 1999; Morain y cols., 2000; Morain y cols., 2002).

Probablemente, el aumento de la capacidad cognitiva atribuida a los inhibidores de PREP pudiera deberse a un aumento de los niveles de neuropéptidos en el cerebro, al impedir que éstos fueran degradados por PREP (Miura y cols., 1995; Toide y cols., 1995b; Shinoda y cols.,

Introducción

1996; Bellèmere y cols., 2003). Sin embargo, también hay otros autores que no han detectado este aumento (Jalkanen y cols., 2007; Männistö y cols., 2007). En referencia a esto último, estudios inmunohistoquímicos han mostrado una baja colocalización de PREP y la sustancia P en todo el cerebro, por lo que la hidrólisis de este péptido por la enzima parece poco probable (Myöhänen y cols., 2008c).

A pesar de estos resultados controvertidos acerca del papel de PREP en la regulación y control de los niveles de neuropéptidos, probablemente la enzima tenga alguna otra función sobre éstos, distinta a su degradación, dado que la presencia de PREP en la hendidura sináptica todavía no ha sido confirmada. Pero parece que la función de PREP en el cerebro no reside únicamente en la regulación de los niveles de ciertos neuropéptidos.

Miura y cols. (1997) determinaron que los inhibidores de PREP eran capaces de promover la transmisión sináptica en el hipocampo de ratas, mientras que Shishido y cols. (1999) atribuyeron a estos inhibidores la capacidad de protección de las neuronas frente a la muerte por isquemia.

La mayoría de todos estos inhibidores son análogos estructurales de sustratos de PREP y su diseño está basado en la preferencia que tiene esta enzima en cortar en el extremo carboxi-terminal de un residuo de prolina interno o un análogo de la misma, preferentemente cuando se sitúa en los sitios P1 y P2 (ver la tabla 2) (Wallén y cols., 2002a; Wallén y cols., 2002b; Wallén y cols., 2003a; Wallén y cols., 2003b; Venäläinen y cols., 2004b; Jarho y cols., 2005; Venäläinen y cols., 2006; García-Horsman y cols., 2007a; Jarho y cols., 2007; Männistö y cols., 2007).

La naturaleza del grupo de sustitución en el sitio P1 del anillo de pirrolidina se ha visto que es crucial para que el inhibidor se una al sitio activo de PREP. La sustitución de grupos de naturaleza electronegativa,

tales como el grupo aldehído, hidroxiacetil o ciano en el sitio P1 aumenta la potencia del inhibidor varias veces y, en muchos casos, los valores de la constante de inhibición (K_i) se mantienen en el rango sub-nanomolar. Los estudios cinéticos realizados revelaron que estos grupos electronegativos producían una inhibición de la enzima de larga duración *in vitro*, siendo la constante de disociación del complejo enzima-inhibidor de horas (Bakker y cols., 1990).

Además de los inhibidores sintetizados mencionados anteriormente, también han habido grupos que han tratado de aislar y analizar inhibidores a partir de fuentes naturales como del micelio de *Microbispora sp.* (Esumi y cols., 2002), del vino tinto procedente de uvas Cabernet Sauvignon (Yanai y cols., 2003) y del Ginkgo biloba (Lee y cols., 2004). Recientemente, Marques y cols. (2010) han descubierto que ciertos flavonoides de la planta *Scutellaria racemosa Pers* se comportan como inhibidores de PREP.

Barelli y cols. (1999) han descrito a S-17092-1 como un inhibidor específico de PREP que no inhibe a otras peptidasas como la Aminopeptidasa M y la Dipeptidilpeptidasa IV, entre otras.

Se han diseñado inhibidores fluorescentes de PREP a fin de poder localizarlo a nivel subcelular y poder así dilucidar qué funciones ejerce a este nivel (Venäläinen y cols., 2005; Myöhänen y cols., 2007).

Introducción

Tabla 2. Propiedades cinéticas de los inhibidores de PREP. *EI, complejo enzima-inhibidor. Tabla adaptada de Männistö y cols. (2007).

Compuesto	P2	P1	Potencia y duración de la inhibición
JTP-4819			IC ₅₀ = 0.83 nM Ex vivo : varias horas K _i = 0.055 nM
S-17092			K _i = 1.5 nM Vida media en plasma > 10 h
Z-Pro-Prolinal			K _i = 0.35 nM Vida media EI* 4,8 h
SUAM-1221			IC ₅₀ = 7.2 nM Vida media EI* 1,8 h K _i = 0.97 nM Ex vivo : varias horas
KYP-2047			K _i = 0.023 nM Vida media EI* 4,8 h Ex vivo : varias horas
ZTTA			K _i = 2.9 μM
Z-321			IC ₅₀ = 10 nM Vida media en plasma 1,8 h
Y-29794			K _i = 0.95 nM Ex vivo : varias horas

1.7. PREP en procesos fisiológicos y patológicos.

Se piensa que PREP podría estar implicada en muchos y muy diversos procesos fisiológicos, dado que se encuentra distribuida ampliamente en todo el organismo y posee la capacidad de digerir muchos péptidos bioactivos *in vitro*. De acuerdo con esto, algunas de las posibles funciones de PREP podrían centrarse en la división celular, diferenciación, transducción de señales y otros procesos implicados en el aprendizaje, memoria y desórdenes psiquiátricos. Sin embargo, la relevancia de PREP en dichas funciones todavía no ha sido esclarecida (García-Horsman y cols., 2007a). En la actualidad existen algunos grupos centrados en determinar qué función ejerce PREP en los procesos en los que, más probablemente, la enzima podría encontrarse implicada. A continuación se hará una síntesis de las funciones atribuidas a PREP a nivel del cerebro, ya que todo lo expuesto a continuación justifica la necesidad de los experimentos realizados en esta tesis.

1.7.1. Desarrollo y envejecimiento

Existen datos que evidencian una implicación de PREP en el desarrollo neuronal. Se ha descrito un aumento de los niveles de la actividad de PREP durante los primeros días del nacimiento, los cuales disminuyen durante las primeras semanas de la adultez (Dauch y cols., 1993; Yamanaka y cols., 1999), lo que apunta la necesidad de esta enzima durante el desarrollo del feto.

Los cambios de la actividad de PREP durante el desarrollo podrían ser fisiológicamente relevantes, dado que el periodo en el que se ha registrado un aumento de la actividad de PREP coincide con el momento de la diferenciación neuronal de cultivos primarios de neuronas de la corteza cerebral (Szappanos y cols., 1994). Todavía no

Introducción

ha sido totalmente esclarecido el mecanismo por el cual se observa un aumento general de la actividad de PREP durante la diferenciación neuronal, hecho que justifica la necesidad de los experimentos que se han realizado en esta tesis.

Se ha encontrado que PREP colocaliza con GAP 43 (neomodulina), una proteína asociada al crecimiento y cuyos niveles de expresión aumentan en los conos de crecimiento neuronal, por lo que PREP podría estar jugando un papel a ese nivel (Di Daniel y cols., 2006). La relación de PREP y GAP 43 está reforzada por el hecho de que los ratones que no pueden expresar PREP presentan alteraciones en los conos de crecimiento, restaurándose el fenotipo normal cuando se restaura la capacidad de expresar la enzima tanto nativa como catalíticamente inactiva en estos ratones, por lo que la actividad peptidasa de PREP no es requerida en la dinámica de los conos de crecimiento (Di Daniel y cols., 2009).

Por otra parte, los análisis de micromatrices de ADN han mostrado que en ratones longevos, la expresión de PREP se encuentra aumentada once veces en el hipotálamo si se compara con los niveles registrados en los ratones jóvenes (Jiang y cols., 2001). Sin embargo, tal efecto no parece ser homogéneo a lo largo de las diferentes áreas del cerebro, ya que ni los niveles de proteína PREP ni los de su actividad se ven aumentados ni disminuidos en la corteza o en el cerebelo en los ratones de edad avanzada, al compararlos con los ratones jóvenes (Jiang y cols., 2001). Por otra parte, tanto los niveles de la actividad de PREP como los de su proteína aumentan hasta dos veces en el hipocampo de ratones longevos (Rossner y cols., 2005). El mantenimiento de los niveles de la actividad de PREP también se ha observado en órganos como el hígado, riñón y corazón a excepción de lo que ocurre en el pulmón, en el cual se ha descrito un aumento ligero de la actividad de PREP en ratones de edad avanzada (Agirregoitia y cols., 2003a).

Con todo esto, parece que PREP podría jugar un papel en el desarrollo - mediante un mecanismo todavía desconocido- dado que se ha detectado un aumento de su actividad durante el desarrollo de diferentes áreas cerebrales que coincide con el momento de su diferenciación. Sin embargo, este aumento de la actividad de PREP sólo en determinadas áreas del cerebro durante el envejecimiento, podría sugerir alguna otra función de la enzima en el proceso de senescencia.

1.7.2. Muerte celular y neurodegeneración

Los ratones transgénicos tg 2576 que sobreexpresan la isoforma de 695 aminoácidos del β -amiloide humano, característica de las formas no esporádicas de la enfermedad de Alzheimer, presentan dificultades en el aprendizaje y la memoria cuando alcanzan los 9-10 meses de edad. Asimismo, un aumento de hasta cinco veces de los niveles de β A (1-40) y catorce veces de los de β A (1-42/43) también se relaciona con un déficit en estos dos procesos (Hsiao y cols., 1996). Los estudios realizados con estos animales mostraron que los ratones transgénicos tg 2576 adultos tenían niveles de la actividad de PREP aumentados con respecto a los ratones no transgénicos. La actividad de PREP en el hipocampo del ratón transgénico adulto era tan alta como la detectada en los ratones controles en edad avanzada, pero una vez los ratones transgénicos eran longevos, los niveles de actividad no se diferenciaban de la de los ratones control. Este “envejecimiento acelerado” de los ratones transgénicos tg 2576, en lo que se refiere a la actividad de PREP, no tenía lugar ni en la corteza ni en el cerebelo, indicando una modulación selectiva de esta actividad en el hipocampo mediante péptidos β -amiloide solubles/oligoméricos o fibrilares en la fase previa a la formación de placas. En correlación a esto, también se ha demostrado que el aumento de la expresión de PREP en el hipocampo de ratones transgénicos tg 2576 anterior a la aparición de las placas de

Introducción

β -amiloide, tiene lugar de forma paralela a la pérdida de memoria (Rossner y cols., 2005; Schulz y cols., 2005). El hecho de que un aumento de PREP esté asociado a la discapacidad cognitiva ha sido corroborado por Rampon y cols. (2000), ya que determinaron que los niveles de ARNm de PREP se encontraban disminuidos más de dos veces en el cerebro de ratones tras exponerlos a un ambiente enriquecido que promoviera el aprendizaje y la memoria.

Se ha visto que inhibidores de PREP tienen la capacidad de reducir tanto el número como la densidad de las placas de β -amiloide en el hipocampo de ratones con “senescencia acelerada”, mencionada anteriormente (Kato y cols., 1997). Asimismo, también tienen la capacidad de aumentar la viabilidad celular tanto en la corteza cerebral como en cultivos de cerebelo (Katsube y cols., 1999).

En consonancia con estos datos, cabe añadir que se ha publicado que diversos inhibidores de PREP aumentan el estado cognitivo y están siendo investigados como futuros fármacos en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (Toide y cols., 1997b; Shinoda y cols., 1999) y Parkinson (Schneider y cols., 2002). Incluso algún inhibidor, como es el caso del S17092-1, está siendo utilizado en estudios de fase I (Morain y cols., 2000; Morain y cols., 2002).

Todavía no se ha encontrado ninguna vinculación clara de PREP con la muerte neuronal. Los efectos protectores de los inhibidores de PREP varían dependiendo del inhibidor y el sistema experimental utilizado (Männistö y cols., 2007). Todo ello incita a la necesidad de diseñar nuevos experimentos que ayuden a esclarecer qué función ejerce PREP en la muerte neuronal, y cuál es el mecanismo y las condiciones en las que sus inhibidores podrían utilizarse como fármacos en el tratamiento de algunas enfermedades neurodegenerativas en el futuro.

1.7.3. PREP y las enfermedades asociadas a trastornos del humor: la relación de PREP con el inositol trifosfato (IP₃).

Los cambios en la actividad total de PREP en el suero han sido asociados con varios trastornos psíquicos desde que varios neuropéptidos sustratos de la enzima se han visto alterados en estas enfermedades (Maes y cols., 1994). Se ha descrito que los niveles bajos de la actividad de PREP en el suero se asocian a la depresión, estableciéndose una relación inversamente proporcional entre los niveles de la actividad y la gravedad del cuadro depresivo. De este modo, cuanto más baja es la cantidad de actividad de PREP en el suero, mayor es la melancolía que experimentan los pacientes (Maes y cols., 1994).

Por otra parte, en otros trastornos psíquicos como en el cuadro maníaco-depresivo y en el trastorno bipolar (descritos en pacientes no tratados) los niveles de la actividad de PREP sérica están aumentados. Tanto el fármaco antidepresivo fluoxetina como el antimaniaco valproato, restablecen los niveles de PREP a los valores encontrados en sujetos normales (Maes y cols., 1995). Estos descubrimientos apoyan la hipótesis de que los bajos niveles de la actividad de PREP podrían jugar un papel en la fisiopatología de la depresión, mientras que un aumento de los mismos podría estar relacionado con los cuadros psicóticos como la manía y el trastorno bipolar (Maes y cols., 1995, Harwood, 2003; Harwood y Agam, 2003; Cheng y cols., 2005).

En la actualidad existen dos hipótesis principales acerca de cómo influye la actividad de PREP en el estado fisiológico. La primera hace referencia a los sustratos de PREP, ya que algunos como la hormona liberadora de tirotriptina y la arginina-vasopresina se encuentran implicados en la fisiopatología de la depresión y la sustancia P, neurotensina y arginina-vasopresina en la esquizofrenia (Berger y cols., 1986; Prange y cols., 1987). Por tanto, las alteraciones en la actividad

de PREP podría modular la emoción y la respuesta al estrés produciendo cambios en la concentración de neuropéptidos activos implicados en los procesos. La otra hipótesis deriva de estudios de cribado realizados en 30.000 células de *Dictyostelium*, en las que se había interrumpido el gen que codificaba para PREP, viéndose que esta enzima guardaba una relación inversa con la molécula mediadora de señal IP_3 (Williams y cols., 1999; Williams y cols., 2002; Williams y cols., 2005), haciendo que la mutante carente de PREP en *Dictyostelium* fuese resistente a los efectos tóxicos del litio. La relación inversa de PREP con el IP_3 fue descrita también por Schulz y cols. (2002), al mostrar que los inhibidores de PREP o el ARN antisentido de *prep* aumentaban los niveles de IP_3 en cultivos celulares. Por tanto, PREP podría ejercer un papel importante en el cerebro a nivel fisiológico, bien modificando los niveles de ciertos neuropéptidos o bien participando, de forma más o menos directa, en vías de señalización celular.

1.7.4. PREP y otros procesos patológicos como la hipertensión, la inflamación, la enfermedad celíaca y la esclerosis múltiple.

Existen trabajos que han sugerido una posible implicación de PREP en la hipertensión, ya que la enzima es capaz de cortar el enlace peptídico prolina-7-fenilalanina-8 de la angiotensina I y de la angiotensina II (Chappell y cols., 1990; Welches y cols., 1993). Además se ha visto una correlación positiva entre la actividad de PREP y la enzima convertidora de angiotensina en pacientes con hipertensión, y la actividad de PREP en estos pacientes era mucho más alta en la corteza renal que en otros tejidos- lo que apoya la posible implicación de PREP en el sistema renina-angiotensina (Goosens y cols., 1996). Se ha visto que PREP está implicada en la liberación de N-acetil-seril-aspartil-lisil-prolina (Ac-SDKP), un tetrapéptido con propiedades antifibróticas y

que es hidrolizado casi exclusivamente por la enzima convertidora de angiotensina (Peng y cols., 2001; Rhaleb y cols., 2001a; Rhaleb y cols., 2001b; Cavasin y cols., 2004; Myöhänen y cols., 2011). Los niveles de Ac-SDKP aumentan proporcionalmente tras la administración de timosina- β_4 exógena, e inhibidores de PREP son capaces de revertir este aumento. Dado que la timosina- β_4 posee 43 aminoácidos, ésta debe ser hidrolizada por otras peptidasas previamente a que sea hidrolizada por PREP y se libere el péptido Ac-SDKP del extremo amino-terminal de la timosina- β_4 . Si bien los inhibidores de ACE aumentan los niveles de este tetrapéptido, al administrarlos conjuntamente con inhibidores de PREP, se evita la acumulación de Ac-SDKP, por lo que los inhibidores de PREP podrían convertirse en agentes terapéuticos en la hipertensión en un futuro (Cavasin y cols., 2004).

Recientemente, se ha propuesto que PREP podría actuar como un modulador de la respuesta inflamatoria (Gaggar y cols., 2008). Esta respuesta implica la formación del péptido acetilado en el nitrógeno alfa de prolil-glicil-prolina (N- α -PGP), procedente de la matriz extracelular y muy probablemente mediado por la acción de PREP. Posteriormente sería desacetilada a prolil-glicil-prolina, la cual posee una capacidad quimioatrayente sobre los neutrófilos tanto *in vitro* como *in vivo* (Weathington y cols., 2006). Además, se ha visto que los neutrófilos humanos en sangre periférica expresan PREP activa de forma constitutiva (O'Reilly y cols., 2009). La capacidad pro-inflamatoria de PREP abre nuevas puertas al diseño de inhibidores capaces de revertir este proceso inflamatorio sugiriendo, en un futuro, su aplicación bien en el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas que cursen con neutrofilia o bien como biomarcadores de estudios de evolución de estas enfermedades.

Muchos péptidos derivados del gluten inducen una respuesta inflamatoria mediada por las células T en enfermos con enfermedad

Introducción

celíaca, causando la destrucción de las vellosidades intestinales (Arentz-Hansen y cols., 2002). El único tratamiento efectivo para la enfermedad es seguir una dieta exenta de gluten. Estos péptidos son ricos en prolina y glutamina, así como altamente resistentes a la acción de las enzimas gástricas, lo que potencia su toxicidad. Se ha propuesto que ciertas peptidasas específicas de prolina podrían degradar estos péptidos inmunoactivos característicos de la enfermedad celíaca en individuos genéticamente susceptibles. Se ha sugerido, que la suplementación con la enzima Dipeptidil peptidasa IV (Hausch y cols., 2002), dipeptidil carboxipeptidasa (Hausch y cols., 2002) o PREP (Piper y cols., 2004; Gass and cols., 2005; Marti y cols., 2005) podría reducir o eliminar dichos péptidos del intestino, contribuyendo al tratamiento de la enfermedad. Sin embargo, existen resultados controvertidos acerca de las dosis de PREP efectivas en la degradación de los péptidos de gliadina. Mientras que Matysiak-Budnik y cols. (2005) determinaron que exposiciones prolongadas a PREP disminuían la efectividad detoxificante frente a los péptidos de gliadina, Khosla y cols. (2005) encontraron que únicamente PREP era efectiva en la digestión de péptidos tóxicos cuando se encontraba en dosis altas. El hecho de que la concentración de dichos péptidos no disminuyera podría deberse a la inactivación de otras proteasas esenciales para la que la degradación fuera completa.

Recientemente, Tenorio-Laranga y cols. (2010) han encontrado niveles bajos de PREP sérica en pacientes reincidentes de esclerosis múltiple (EM) al compararlos con pacientes sanos. Además, este hecho está relacionado con la edad y el grado de discapacidad que presentan los enfermos. Asimismo, esta actividad disminuida puede ser revertida por agentes reductores, sugiriendo que la inactivación de PREP podría deberse a la presencia de un ambiente oxidativo en el plasma de estos pacientes.

2. ESTUDIO DE LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL.

2.1. El papel de PREP en la diferenciación neuronal.

Son varios los trabajos que apuntan la participación de PREP en la diferenciación celular. Se ha encontrado un aumento considerable de la actividad de esta enzima durante el desarrollo del cerebro de la rata (Fuse y cols., 1990; Agirregoitia y cols., 2003b), así como durante la diferenciación de cultivos primarios de células de la corteza cerebral de la rata (Szappanos y cols., 1994). Además, dicho incremento no se limita únicamente durante el desarrollo y diferenciación neuronal, sino que también se ha observado durante el desarrollo de otros órganos (Fuse y cols., 1990; Yamakawa y cols., 1994; Matsubara y cols., 1998; Kimura y cols., 2002).

También se ha encontrado que la actividad de PREP se incrementa en la activación de macrófagos (Olivo y cols., 2005) y que esta enzima juega un papel importante en la diferenciación de los discos imaginales de *Sarcophaga peregrina* (Ohtsuki y cols., 1997).

¿A qué se debe este aumento en la actividad de PREP en los procesos de diferenciación anteriormente citados? ¿Qué función ejerce PREP durante el proceso? En la actualidad no se dispone de datos suficientes que respondan a estas preguntas. Resulta interesante, que dicho aumento haya tenido lugar durante los primeros días de la diferenciación por lo que PREP podría tener alguna función en el desarrollo rápido y fasciculación de las neuritas, así como en la formación de agregados neuronales (Kato y cols., 1980; Fuse y cols., 1990; Szappanos y cols., 1994). Esta hipótesis viene apoyada por el hecho de que una vez las neuronas se encuentran maduras, la actividad de PREP sólo aumenta ligeramente (Szappanos y cols., 1994) o disminuye (Kato y cols., 1980; Fuse y cols., 1990; Agirregoitia y cols., 2003b). De forma contraria, en animales con edad avanzada también se ha encontrado un aumento considerable de la actividad (Jiang y cols.,

2001; Agirregoitia y cols., 2003b). He aquí resultados controvertidos que apuntan la necesidad de desarrollar otros experimentos que ayuden a esclarecer el papel de PREP durante el desarrollo y diferenciación neuronal.

Muy probablemente, PREP podría participar en la hidrólisis de ciertos péptidos necesarios en el desarrollo de las neuritas (Kato y cols., 1980) e incluso en la muerte celular por envejecimiento (Agirregoitia y cols., 2003b), lo que justificaría los incrementos puntuales en la actividad durante estos dos procesos, mientras que en la maduración se mantuvieran constantes.

Dado pues que parece ser que la actividad de PREP se encuentra regulada durante el proceso de diferenciación, maduración y envejecimiento (Fuse y cols., 1990; Agirregoitia y cols., 2003b) de neuronas, resultaría de gran importancia demostrar que en otros modelos celulares -como lo son los cultivos primarios de células granulares de cerebelo y células SH-SYS5, de neuroblastoma humano, diferenciadas con ácido retinoico-, los niveles de PREP responden a cambios en el estado de desarrollo de las células. Así mismo, sería de gran trascendencia conocer en qué rutas podría estar participando PREP durante el proceso de diferenciación. Son precisamente estos dos puntos algunos de los objetivos que se han pretendido alcanzar con en esta tesis.

2.2. Los cultivos primarios de las células granulares de cerebelo como modelo de diferenciación y envejecimiento neuronal.

Las células granulares se encuentran formando las capas granulares de varias estructuras cerebrales como el cerebelo, el giro dentado del hipocampo, la capa superficial del núcleo coclear dorsal y el bulbo olfatorio. Particularmente en el cerebelo, esta capa granular es conocida como capa 3, y es la más interna de la corteza del cerebelo. La capa media está constituida por células de Purkinje y la más externa es

llamada capa molecular. Son muchos los trabajos que han recurrido a los cultivos primarios de células granulares a fin de estudiar los mecanismos que tienen lugar durante la diferenciación y envejecimiento neuronal. La importancia del estudio de estas células radica en el hecho de que comprenden la mayor población de neuronas del cerebro de vertebrados (Ito, 1984; Contestabile, 2002). Estas neuronas utilizan como principal neurotransmisor el glutamato y expresan diversos receptores de glutamato como los N-metil-D-aspartato (NMDA) (Garthwaite y cols., 1986; Burgoyne y Cambray-Deakin, 1988). Durante el desarrollo del cerebelo, las células granulares se generan en la capa germinal externa, donde se diferencian y migran a la capa granular interna para, finalmente, ser inervadas por los axones de las fibras musgosas aferentes (Altman, 1972; Ryder y Cepko, 1994). A su vez, las células granulares inervan a las células de Purkinje (Ito, 1984). Durante dicha migración, las células granulares requieren impulsos excitatorios para su desarrollo y diferenciación. De otro modo, mueren por apoptosis (Burgoyne y Cambray-Deakin, 1988; Wood y cols., 1993). Los cultivos primarios de células granulares constituyen el modelo *in vitro* más utilizado para estudiar la mayoría de los aspectos relacionados con el desarrollo y diferenciación, neurobiología funcional y patológica en una población bastante homogénea de neuronas -ya que se estima que más del 90% de las células presentes en el cultivo son células granulares (Savill y cols., 2005)-. Además, poseen muchas de las propiedades características de las células granulares en desarrollo *in vivo* (Lasher y Zagon, 1972; Fischer, 1982; Gallo y cols., 1987a; Balázs y cols., 1988c; Contestabile, 2002; Vaudry y cols., 2003; Rios y cols., 2004). Las células granulares neuronales pueden cultivarse *in vitro* durante varias semanas si se mantienen en condiciones despolarizantes; bien en presencia de altas concentraciones de potasio (K^+ , 25 mM) (Gallo y cols., 1987a) o bien si son expuestas a aminoácidos excitantes como el glutamato o el NMDA (Balázs y cols., 1988c). La

Introducción

despolarización de las células granulares de cerebelo que tiene lugar en presencia de altas concentraciones de KCl, aumenta la concentración de Ca^{+2} intracelular ($[\text{Ca}^{+2}]_i$) mediada por canales de Ca^{+2} voltaje-dependientes (Gallo y cols., 1987a). La señalización por Ca^{+2} es muy similar a algunos mecanismos de señalización implicados en los procesos de proliferación, diferenciación y migración de las células granulares de cerebelo *in vivo* (Gallo y cols., 1987a; Balázs y Hack, 1990). Por otra parte, las células granulares de cerebelo diferenciadas expresan receptores NMDA de glutamato tras una semana del cultivo, por lo que estas células representan un modelo adecuado para llevar a cabo estudios con estos receptores durante su diferenciación (Ring y Tanso, 2007).

Se han identificado numerosas moléculas implicadas en la proliferación, migración y formación de sinapsis en células granulares durante el desarrollo del cerebelo en vertebrados, aunque los mecanismos moleculares no han sido todavía dilucidados (Hatten y Heintz, 1995; Komuro y Rakic, 1998; Miyata y cols., 1999; Wechsler-Reya y Scott, 1999; Hall y cols., 2000; Scheiffele y cols., 2000; Szeleci y cols., 2001; Rios y cols., 2004).

Por todo lo expuesto en este apartado se decidió llevar a cabo el estudio de la posible implicación de PREP en los procesos de diferenciación, maduración y envejecimiento neuronal utilizando para ello los cultivos primarios de células granulares de cerebelo.

2.3. Las células SH-SY5Y de neuroblastoma humano como un modelo neuronal de utilidad.

La línea celular SH-SY5Y es una sub-línea celular procedente de la triple clonación de las células SK-N-SH procedentes de una biopsia de médula espinal de un paciente con neuroblastoma a principios de los años setenta (Biedler y cols., 1973). Esta línea celular ha sido utilizada como modelo de neuronas desde principios de los ochenta, dado que

estas células conservan muchas propiedades bioquímicas y funcionales propias de las neuronas (Ross y cols., 1983). La línea celular SK-N-SH contiene células con tres fenotipos diferentes: tipo neuronal o N, tipo Schwann o S y el intermediario o tipo I (Joshi y cols., 2006). La línea celular SH-SY5Y de neuroblastoma es del tipo N y posee actividades enzimáticas que actúan de marcadores de neuronas (tirosina y dopamina- β -hidroxilasas), así como recaptación específica de noradrenalina. Además, también expresa una o más proteínas de los neurofilamentos, así como receptores de factores de crecimiento nerviosos, muscarínicos y opioides (Ciccarone y cols., 1989). También posee la capacidad de proliferar en cultivo durante largos períodos de tiempo sin contaminarse, un prerrequisito que debe cumplir un modelo celular para su desarrollo *in vitro*.

Las células SH-SY5Y derivan de las células inmaduras neoplásicas de la cresta neural que exhiben propiedades de células madre, y son capaces de diferenciarse al ser tratadas con ácido retinoico (Masiá y cols., 2007; Singh y Kaur, 2007), ésteres de forbol -como el 12-O-tetradecanoilforbol-12-acetato (Påhlman y cols., 1981)-, factores neurotróficos -como el derivado de cerebro (Cernaianu y cols., 2008)-, AMP cíclico dibutírico (Kume y cols., 2008), purina (Guarnieri y cols., 2009) o estaurosporina (Mollereau y cols., 2007).

Por todo ello, la línea celular SH-SY5Y ha sido ampliamente utilizada en estudios de la fisiología y patología nerviosa, como el análisis de la diferenciación neuronal, el metabolismo, los procesos de neurodegeneración y neuroadaptación, la neurotoxicidad y la neuroprotección (Constantinescu y cols., 2007; Cheung y cols., 2009; Xie y cols., 2010).

Durante la diferenciación, las células SH-SY5Y dejan de dividirse y se convierten en una población estable mostrando neuritas extensas que guardan rasgos morfológicos, estructurales, bioquímicos y

Introducción

electrofisiológicos similares a los observados en neuronas del cerebro humano (Fagerström y cols., 1996). Asimismo, las células SH-SY5Y diferenciadas expresan gran variedad de marcadores neuronales específicos que incluyen: la noradrenalina, la proteína asociada al crecimiento 43 (GAP-43), receptores para factores neurotróficos, neuropéptidos, gránulos neurosecretores, la enolasa específica de neurona, núcleos neuronales (NeuN), proteínas vesiculares como la sinaptofisina, proteínas del citoesqueleto específicas de neuronas como las proteínas asociadas a microtúbulos (MAP), tau y proteínas del neurofilamento (Gimenez-Cassina y cols., 2006; Cheung y cols., 2009). Tanto las MAP como la GAP-43, NeuN y sinaptofisina son marcadores clásicos de neuronas maduras. Las SH-SY5Y diferenciadas mantienen muchas características comunes a muchas neuronas y su cultivo, mantenimiento y tratamiento son relativamente sencillos. Por ello se optó por utilizar este modelo celular para estudiar la implicación de PREP en el proceso de diferenciación inducida con ácido retinoico. De este modo, los resultados obtenidos en esta línea celular pueden ser comparados también con los obtenidos en cultivos primarios de células granulares.

2.4. La implicación del IP₃ en el proceso de diferenciación neuronal.

El IP₃ es un segundo mensajero que se produce como respuesta a muchos estímulos extracelulares (hormonas, factores de crecimiento, neurotransmisores, neurotrofinas, etc.) y controla una gran variedad de funciones celulares dependientes de Ca⁺² (proliferación y diferenciación celular, fertilización, desarrollo embrionario, procesos de secreción, contracción muscular, respuesta inmunológica, etc.), mediante la inducción de la liberación de este catión en los sitios donde se encuentra almacenado, como el retículo endoplásmico, al citoplasma. El IP₃ se une a su receptor específico en los lugares donde el Ca⁺² se encuentra almacenado.

Son muchos los trabajos en los que se ha encontrado que la vía de señalización del IP₃ se encuentra implicada en el proceso de diferenciación neuronal de diversos tipos celulares (Kaczmarek y Kaminska, 1989; Carey y Matsumoto, 1999; Tanaka y cols., 2006; Ma y cols., 2010; Yu y cols., 2011). Sin embargo, en el caso de la diferenciación de las células SH-SY5Y con ácido retinoico existen datos referentes a los niveles de expresión y de proteína de los receptores de IP₃ (Murray e Iqwe, 2003), pero no con los niveles de IP₃. Sí se han registrado cambios en los niveles de este segundo mensajero tras la diferenciación con ácido retinoico, pero como respuesta a la estimulación de receptores muscarínicos (Mackrill y cols., 1997; Martin y cols., 1999).

Generalmente se ha encontrado una relación inversa entre los niveles de esta enzima y los de IP₃. En caso de que PREP se encontrase implicada en el proceso de diferenciación de las células SH-SY5Y inducida con el ácido retinoico, y dado que existen datos que apuntan que la ruta de señalización del IP₃ está íntimamente relacionada con la diferenciación neuronal en este tipo celular y en otros, resulta muy interesante el

estudiar en esta tesis si la implicación de PREP en este proceso estuviese mediada por el IP₃.

2.5. La vía de señalización dependiente de ERK1 y ERK2 durante el proceso de diferenciación neuronal.

La vía de las quinasas MAP es una de las más conservadas evolutivamente y comprende tres subfamilias: la vía de las quinasas extracelulares reguladoras de señal (ERK), la vía de la p38 y la vía de la SAPK/JNK (Schaeffer y Weber, 1999; Widmann y cols., 1999). Mientras que la vía de las ERK está asociada a procesos de supervivencia (Parrizas y cols., 1997; Feng y cols., 1999; Hetman y cols., 1999; Chaïb-Oukadour y cols., 2004) y diferenciación (Perron y Bixby, 1999; Atwal y cols., 2000; Gavalda y cols., 2004), las otras dos vías se han encontrado que son inductoras de la muerte celular por apoptosis (Xia y col., 1998).

Si bien no se conocen todas las funciones de la vía ERK 1/2 durante la diferenciación neuronal, esta vía ha sido implicada en la regulación de la síntesis de proteínas en las dendritas (Tang y Schuman, 2002; Pfeiffer y Huber, 2006; Gelinas y cols., 2007), así como en la formación y estabilización de espinas dendríticas (Wu y cols., 2001; Goldin y Segal, 2003; Alonso y cols., 2010). Además esta vía también juega un papel importante en los procesos de plasticidad y memoria (Kelleher y cols., 2004; Sweatt, 2004; Giovaninni, 2006; Dupont y cols., 2011). Sin embargo, si la mayor parte de las funciones descritas hasta ahora vinculan la vía ERK 1/2 con procesos de supervivencia y diferenciación neuronal, también se ha visto que se encuentra relacionada en procesos de muerte de neuronas (Murray y cols., 1998; de Bernardo y cols., 2004). De ahí que esta función se haya utilizado para realizar estudios de neurodegeneración, como en modelos de la enfermedad de Alzheimer (Perry y cols., 1999; Rapoport y Ferreira, 2000), de la enfermedad de Parkinson (Kulich y Chu, 2001; Gómez-

Santos y cols., 2002), así como en modelos de demencia con cuerpos de Lewy (Zhu y cols., 2002). La vía de ERK 1/2 podría estar relacionada con mecanismos de muerte independiente de caspasas (Subramaniam y cols., 2004), pero los detalles de su activación y su posible relación con otras vías que participan en este proceso no han sido esclarecidos todavía.

Se ha descrito que la cascada de señalización mediada por ERK 1/2 se activa durante la diferenciación de las células SH-SY5Y con ácido retinoico (Masiá y cols., 2007), ya que este inductor induce la fosforilación persistente tanto de ERK1 como de ERK2. Actualmente no se ha dilucidado totalmente qué función ejerce esta vía de señalización durante la diferenciación celular inducida por el ácido retinoico. Miloso y cols. (2004) publicaron que ERK 1/2 podría estar implicada en la supervivencia neuronal y no en el desarrollo de las neuritas, tan características del fenotipo neuronal. Esta hipótesis podría estar respaldada por el hecho de que la fosforilación de ERK 1 y ERK 2 inducida por el ácido retinoico depende tanto de la PKC como de la PI3K (Miloso y cols., 2004) y ésta última se ha descrito que juega un papel importante en la supervivencia celular (Kandel y Hay, 1999; Kaplan y Cooper, 2001). Además, Miloso y cols. (2004), comprobaron que la supervivencia de las células SH-SY5Y, dependía de ERK 1, ERK 2 y PCK- independientemente de la presencia o ausencia de ácido retinoico- mientras que la neuritogénesis inducida por el ácido retinoico era dependiente de la PKC, pero independiente de ERK 1/2. El hecho de que ERK 1/2 no jugara un papel esencial en la formación de las neuritas también podría estar respaldado por los datos publicados por Enarsson y cols. (2002), los cuales encontraron que la activación de ERK 1/2 no es imprescindible durante las primeras fases de la diferenciación de células madre del sistema nervioso central.

La activación de ERK 1/2 durante la diferenciación inducida por ácido retinoico, bien desaparece a las pocas horas (Cañón y cols., 2004; Masiá y cols., 2007) o permanece durante varios días (Yen y cols., 1998; Bost y cols., 2002), dependiendo del tipo celular y de la dosis de ácido retinoico utilizada.

En caso de encontrar alguna implicación de PREP durante la diferenciación inducida por ácido retinoico en las células SH-SY5Y, resultaría interesante estudiar en esta tesis si existe una relación entre PREP y la vía de señalización ERK 1/2.

3. MUERTE NEURONAL

3.1. PREP y la neurodegeneración. Muerte celular.

Resulta interesante que algunos inhibidores de PREP sean capaces de revertir la pérdida de memoria inducida por la acción de determinadas drogas que causan una lesión neuronal (Kamei y cols., 1992, Toide y cols., 1995a; Jalkanen y cols., 2007; Männistö y cols., 2007; Peltonen y cols., 2010), así como la observada en roedores de edad avanzada (Männistö y cols., 2007). Asimismo, también se ha descrito la posibilidad de un efecto potenciador de la memoria, en animales sanos, cuando PREP se encuentra inhibida (Park y cols., 2010). Esto último podría abrir nuevas puertas a la investigación de estos inhibidores en la prevención de la enfermedad.

La implicación de PREP en el proceso neurodegenerativo de la enfermedad de Alzheimer ha sido sugerida por distintos autores, sin embargo, los resultados publicados hasta el momento resultan controvertidos.

Por una parte, al comparar los niveles de PREP en el cerebro de personas con enfermedad de Alzheimer, éstos han resultado ser más altos (Aoyagi y cols., 1990) o más bajos (Mantle y cols., 1996) al compararlos con los encontrados en el cerebro de personas sanas.

Por otra parte, tampoco existe una evidencia clara de que PREP participe en la formación o acumulación de β A, tan característica de la enfermedad de Alzheimer. Se ha postulado que PREP podría estar implicada en el procesamiento de la proteína precursora de amiloide (PPA) (Ishiura y cols., 1990). Un hecho que apoya esta hipótesis reside en que la inhibición de PREP reduce la acumulación del péptido β A en el hipocampo de ratón con senescencia acelerada (Kato y cols., 1997). Shinoda y cols. (1997) encontraron que el inhibidor específico JTP-4819 impedía la formación de β A en las células NG108-15, una línea celular híbrida de neuroblastoma/glioma, presuntamente mediante la inhibición de la escisión de la PPA detrás de un residuo de alanina en el sitio de corte de la γ -secretasa. También se ha sugerido que PREP podría cortar el motivo de la secuencia de internalización (YENPTY) en el extremo carboxi-terminal de la PPA. Dicho motivo parece ejercer un papel crucial en la secreción de péptidos β A (Soriano y cols., 2001). Existen resultados controvertidos acerca de si la inhibición de PREP reduce o no la secreción de β A. Además, resulta curioso que estas diferencias dependan del tipo celular estudiado. Mientras que en células de neuroblastoma y glioblastoma, la inhibición de PREP parece disminuir la secreción de β A de forma considerable (Rossner y cols., 2005), en células HEK 293 no se ha visto que esta enzima contribuyera ni a la formación ni a la degradación de estos péptidos (Petit y cols., 2000). También se ha visto que en ratones que sobreexpresan β A, los niveles de actividad de PREP son similares a los encontrados en la cepa salvaje. Por todo ello, se ha sugerido que los niveles bajos de actividad de PREP en enfermos con enfermedad de Alzheimer podrían estar asociados con la degeneración neuronal más que con la acumulación de β A (Laitinen y cols., 2001).

Existen otros trabajos que sugieren la implicación de PREP en los procesos de degeneración neuronal. Arif y cols. (2010) publicaron que tras la infusión de β A soluble en el hipocampo de ratas, los niveles de

Introducción

PREP aumentaban en dicha área, mientras que disminuían los de somatostatina y los de la sustancia P, ambos sustratos de esta enzima. Esto tenía lugar de forma previa a la pérdida de espinas, neuronas y a la activación de caspasas y la sintetasa de óxido nítrico (iNOS). Estos datos estaban en concordancia con los datos anteriormente publicados por este mismo investigador y su equipo, los cuales observaron un aumento de la actividad de PREP en el cerebro de ratas en las que se había inducido daño neuronal (Arif y cols., 2007). Probablemente el déficit cognitivo, tan característico de los pacientes con enfermedad de Alzheimer, pueda deberse a un aumento de la actividad de PREP, la cual podría contribuir a una disminución de los niveles de ciertos neuropéptidos implicados en los procesos de aprendizaje y memoria. Y esto podría estar en concordancia con los resultados que indican que los inhibidores de PREP podrían mejorar los déficits cognitivos (Toide y cols., 1995a; Shinoda y cols., 1996; Shishido y cols., 1999; Rossner y cols., 2005; Park and cols., 2010).

Resulta novedoso y muy interesante la publicación de unos resultados, en los que los inhibidores específicos de PREP disminuyen el número de células que contienen α -sinucleína en modelos celulares y animales de Parkinson (Brandt y cols., 2008; Myöhänen y cols., 2012), por lo que la administración de estos fármacos podrían tener una repercusión positiva en el tratamiento de esta enfermedad.

También se ha descrito la posibilidad de que PREP se encuentre implicada, de forma directa o indirecta, en procesos de neurotoxicidad (Klegeris y cols., 2008) y neuroinflamación (Penttinen y cols., 2011).

A fin de dar un paso más en el estudio de la función de PREP en el cerebro, en esta tesis se ha pretendido estudiar cuál sería la función de PREP en el proceso de muerte neuronal y si dicha función es dependiente de las condiciones ambientales en las que se produce la muerte (fisiológica o inducida, el tipo de neurotóxico y el modelo de

neuronas utilizado). Asimismo, también se ha estudiado el posible efecto protector de diversos inhibidores específicos de PREP en el proceso.

3.2. Las células granulares de cerebelo como modelo de muerte neuronal.

Las células granulares en cultivo (a diferencia de las presentes en el cerebro de mamíferos) requieren condiciones despolarizantes (25 mM de K^+) para su supervivencia (Gallo y cols., 1987a; Sei y cols., 1998; Contestabile, 2002; Caballero-Benítez y Morán, 2003; Franco-Cea y cols., 2004; Bui y cols., 2006). En caso contrario, mueren por apoptosis (D'Mello y cols., 1993; Yan y cols., 1994). Dada la homogeneidad de estos cultivos y que la inducción de la apoptosis es relativamente sencilla y reproducible, las células granulares de cerebelo están consideradas como uno de los modelos *in vitro* más empleados en el estudio de la muerte neuronal (Yan y Paul, 1997; Contestabile, 2002; Savill y cols., 2005; Giordano y Costa, 2011). Sin embargo, también se ha descrito una resistencia relativamente alta de estas neuronas a varios tipos de agentes inductores de daño celular (Wick y cols., 2004; Beier y cols., 2005). Por ello, se piensa que el mecanismo de apoptosis en cultivos de células granulares de cerebelo, así como la acción de varios agentes neuroprotectores antiapoptóticos, son diferentes en estas neuronas.

El hecho de que las células granulares de cerebelo sufran apoptosis en determinados procesos patológicos ha sido demostrada, como ocurre en ciertas enfermedades neurológicas crónicas como la ataxia cerebelar, atrofia múltiple y la mioclonía postanoxia (Bolla y Palmer, 1997; Dickson y cols., 1999; Widdess-Walsh y cols., 2003; Ogawa, 2004; Tai y Truong, 2007), por lo que el estudio de los mecanismos implicados durante la muerte en estas neuronas es de especial importancia. Sin embargo, en la actualidad no se conocen con exactitud las vías de

señalización que regulan la muerte neuronal de estas neuronas. Por tanto, un avance en el conocimiento de las señales de transducción que regulan la apoptosis podría ser de gran utilidad a la hora de descubrir y diseñar nuevos fármacos para aquellas enfermedades neurológicas en las que se ha descrito este proceso de muerte neuronal.

Por todas las razones aquí expuestas, se recurrió a los cultivos primarios de células granulares de cerebelo para llevar a cabo los experimentos de muerte neuronal inducida realizados en esta tesis.

3.3. La línea celular SH-SY5Y como modelo de muerte neuronal.

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por una pérdida de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas. Dado que las células SH-SY5Y poseen muchas características de las neuronas dopaminérgicas, esta línea celular está siendo ampliamente utilizada como modelo neuronal dopaminérgico en los estudios de esta enfermedad neurodegenerativa (Xie y cols., 2010) por varias razones. En primer lugar, las células SH-SY5Y tienen la capacidad de sintetizar dopamina y noradrenalina, dado que expresan la hidroxilasa de tirosina y la de dopamina (Oyarce y Fleming, 1991). En segundo lugar, expresan el transportador de dopamina (Takahashi y cols., 1994) y, en tercer lugar, la línea celular es susceptible de diferenciarse en un fenotipo neuronal (Cheung y cols., 2009) dependiendo del agente inductor utilizado.

Por ejemplo, el ácido retinoico induce un fenotipo neuronal colinérgico y, además, aumenta la susceptibilidad de las células SH-SY5Y a agentes neurotóxicos y neuroprotectores. Por otro lado, el tratamiento con ácido retinoico seguido del éster de forbol 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato induce un fenotipo neuronal dopaminérgico, además de disminuir la susceptibilidad a los agentes arriba mencionados. Esto hace que las células SH-SY5Y sean un

modelo apropiado para el estudio de procesos de neurotoxicidad y neuroprotección, a fin de dilucidar la implicación de ciertas moléculas en determinadas rutas moleculares (Cheung y cols., 2009).

Por todo ello, se ha considerado interesante estudiar el efecto neuroprotector de los inhibidores específicos de PREP ante la muerte inducida por la 6-hidroxidopamina (6-OHDA), utilizando para ello las células SH-SY5Y como modelo neuronal.

Esta introducción recoge los distintos principios e hipótesis que justifican la realización de esta tesis doctoral, cuyos objetivos se exponen a continuación.

En esta tesis se ha estudiado el posible efecto beneficioso del JTP-4819 y el ZPP en cultivos primarios de células granulares de cerebelo, en los que se ha inducido la muerte con concentraciones bajas de K^+ , 6-OHDA y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), así como en la línea celular SH-SY5Y tras su exposición a la 6-OHDA.

4. OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Esta tesis ha tenido por objeto determinar qué funciones ejerce la enzima prolil-oligopeptidasa, PREP, en los procesos de diferenciación, crecimiento, maduración y muerte neuronal, utilizando para ello dos modelos celulares: los cultivos primarios de células granulares de cerebelo y la línea celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano. El estudio del papel de esta enzima en la muerte de neuronas se ha realizado siguiendo dos enfoques diferentes: uno dejando que transcurra el propio ciclo de vida de las células granulares de cerebelo y otro, induciendo la muerte celular mediante diversos tóxicos.

En la introducción se han recogido los distintos trabajos publicados hasta ahora que apuntan que PREP podría ejercer un papel importante en determinadas áreas del cerebro y que una alteración en su nivel de expresión y/o actividad podría contribuir al desarrollo de diversas patologías nerviosas.

Si bien existen resultados controvertidos acerca de la implicación de PREP en diversas patologías nerviosas, sí se ha constatado que su mayor nivel de expresión y actividad reside en el cerebro, por lo que debe estar ejerciendo una función importante en este órgano, pero... ¿cuál?

Con este trabajo se pretende contribuir al conocimiento actual que se tiene del papel que desarrolla esta enzima durante el ciclo de vida de las neuronas, su implicación en los procesos de muerte neuronal inducida con diversos tóxicos, así como de la acción de inhibidores de PREP en los procesos de degeneración y regeneración neuronal, y reflexionar acerca de la utilidad de estos compuestos como futuros agentes terapéuticos de enfermedades neurodegenerativas. Para ello, a fin de

planificar el trabajo de laboratorio, este objetivo general ha sido desglosado en estos objetivos específicos.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Localizar PREP, mediante microscopía confocal, a lo largo de la vida del cultivo de células granulares de cerebelo.
2. Describir el patrón de actividad de PREP en el citoplasma, núcleo y membranas durante el ciclo de vida de las células granulares de cerebelo.
3. Determinar los niveles de actividad de PREP durante la proliferación de la línea celular SH-SY5Y y durante su diferenciación inducida con ácido retinoico.
4. Analizar las variaciones de los niveles de expresión del gen *prep* durante la diferenciación de las células SH-SY5Y inducida por el ácido retinoico.
5. Establecer el papel de PREP en los sistemas de señalización celular del IP_3 y de las quinasas extracelulares reguladoras de señal ERK 1/2 durante la diferenciación de las células SH-SY5Y.
6. Definir los cambios morfológicos que se observen en las células SH-SY5Y bajo diferenciación, tras incubarlas con inhibidores de PREP.
7. Estudiar el efecto protector de inhibidores de PREP en la muerte inducida por privación de potasio y adición de peróxido de hidrógeno en cultivos primarios de células granulares de cerebelo, así como por la incorporación del tóxico 6-OHDA tanto en estos cultivos primarios como en la línea celular SH-SY5Y.

METODOLOGÍA

“No sabré hacerlo” no ha producido jamás buen resultado. “Probaré a hacerlo” ha obrado casi siempre maravillas. “Lo haré” ha conseguido milagros.

Anónimo.

“Lo que se debe aprender a hacer, se aprende haciéndolo”.

Aristóteles (384-322 a. C), filósofo y científico griego.

1. MATERIAL

Todas las abreviaturas y siglas expuestas en este apartado de materiales y métodos también se encuentran en el apartado de abreviaturas y siglas de esta tesis.

❖ Instalaciones

Todos los experimentos realizados en células granulares de cerebelo, se realizaron en el ya extinguido Laboratorio de Neurotransmisores del Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia, mientras que todos aquellos en los que se utilizó la línea celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano se llevaron a cabo en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Helsinki.

❖ Material fungible y aparatos

- Todo el material fungible de uso común (puntas, cajas de puntas, tubos de 1,5 ml, tubos de 15 y 50 ml, gradillas, pipetas desechables, etc.) se obtuvieron del catálogo de productos de VWR.
- Todas las placas que se emplearon en el cultivo de células granulares de cerebelo y de la línea celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano provinieron de Nunc, Orange y Corning.
- Los aparatos empleados tales como espectrofotómetros, microscopios, ultracentrífugas, sonicadores, etc. se mencionan en la descripción del método correspondiente.

❖ Productos y reactivos químicos

Todos los reactivos y productos utilizados en la elaboración de esta tesis, así como la casa comercial de la que provienen, aparecen en el apartado de métodos en el que fueron utilizados.

❖ **Material biológico**

- Los cultivos primarios de células granulares de cerebelo se obtuvieron de cerebelos extraídos de ratas Wistar de entre 6 y 8 días de vida y fueron proporcionadas por el Dr. Vicente Felipe del Laboratorio de Neurobiología del Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia, siguiendo las directrices de normativa ética establecidas por la Unión Europea (86/609/EEC) de manipulación de animales de experimentación con fines científicos.
- La línea celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano pertenecían al Dr. Pekka Männistö del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Helsinki.

2. MÉTODOS

2.1. MÉTODOS UTILIZADOS EN CÉLULAS GRANULARES DE CEREBELO

2.1.1. Cultivos primarios de células granulares de cerebelo

Los cultivos primarios de células granulares de cerebelo fueron obtenidos siguiendo el protocolo descrito por Miñana y cols. (1998) a partir de cerebelos extraídos de ratas Wistar de entre 6 y 8 días de vida (ver figura 7), momento en el que la mayoría de las células granulares indiferenciadas se encuentran en la capa germinal externa de la corteza cerebelar y sólo una pequeña fracción comienzan a migrar hacia las capas más internas (Hatten y Heintz, 1995). Estos cultivos están constituidos, principalmente, por neuronas granulares.



Figura 7. Rata Wistar de entre 6 y 8 días de vida utilizada en la elaboración de cultivos primarios de células granulares de cerebelo.

Estas neuronas continúan diferenciándose “*in vitro*” siempre que se encuentren en condiciones despolarizantes, tal y como se ha descrito en la introducción. Las neuronas establecen conexiones entre ellas (ver figura 8).

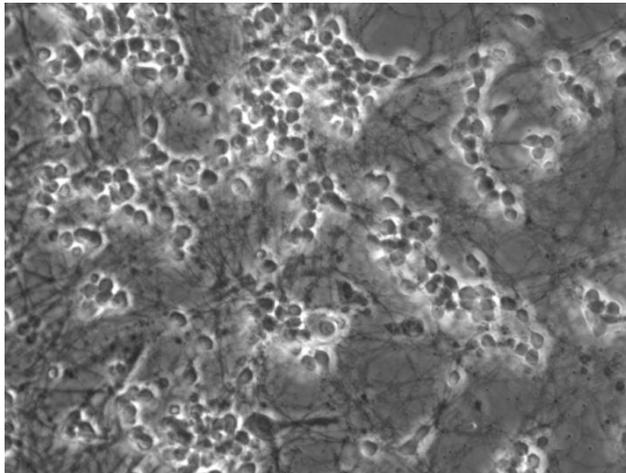


Figura 8. Células granulares de cerebelo (DIV 7). Los somas celulares refringentes desarrollaron prolongaciones dando lugar a una extensa red de conexiones entramadas que permiten la comunicación entre las neuronas.

❖ **Tratamiento de las placas de cultivo con poli-lisina**

El día anterior al cultivo, se cubrieron las placas a utilizar con poli-lisina (Sigma-Aldrich) a una concentración de 5 µg/ml en agua estéril y se dejaron a temperatura ambiente toda la noche. Al día siguiente, la poli-lisina se aspiró y las placas se lavaron con medio mínimo esencial (BME) puro (Gibco-Invitrogen, Grand Island, Estados Unidos (EEUU)).

❖ **Obtención del cultivo primario de células granulares de cerebelo**

Tras la decapitación de las crías, las meninges fueron eliminadas para minimizar la contaminación por fibroblastos. Tras la extracción rápida de los cerebros, los cerebelos se sumergieron en una placa petri estéril con 5 ml de tampón fosfato salino frío (PBS: NaCl 0,8%, KCl 2,7 mM, Na₂PO₄·2 H₂O 6,4 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM a pH 7,4). A continuación se lavaron con 5 ml de PBS y cortados en trozos muy pequeños, los cuales fueron lavados con 4,5 ml de PBS y trasvasados a un frasco de 75 cm². Se añadieron 8 ml de solución dispasa II (3mg/ml Roche, Barcelona, España), a fin de digerir la matriz extracelular proteica, durante 30 minutos a 37°C y una atmósfera húmeda con un 5% de CO₂. Una vez aspirada la dispasa los fragmentos se lavaron con 10 ml de 1 mM del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU) en PBS y, a continuación, con 10 ml de medio de cultivo BME puro. El homogenado fue resuspendido en 10 ml de una solución constituida por 40 mg/ml de DNasa (Roche Diagnostics, Barcelona, España) en medio BME puro. La disgregación mecánica de los fragmentos se realizó mediante la aspiración y expulsión repetidas en una pipeta de vidrio de 10 ml estéril. Este homogenado se incubó a 37°C durante 20 minutos y filtrado con una malla estéril nyal PAI4 1/2 de 90 µm de tamaño de poro (Sefar-Maissa, Barcelona, España). El

filtrado se centrifugó (400Xg, 5 min) y el sedimento fue resuspendido en medio BME, repitiendo la centrifugación y resuspensión dos veces más. Finalmente, las células se resuspendieron en 35 ml de medio BME completo (Basal Medium Eagle, 10% de suero bobino fetal (SBF) inactivado 30 min a 56°C, 2mM de glutamina, 100 µg/ml de gentamicina, 5 µg/ml anfotericina B y 25 mM de KCl) y se tomó 0,5 ml del homogenado para hacer el recuento celular con una cámara Bürker, empleando azul tripán como marcador de las células muertas. Todos los reactivos empleados para la elaboración del medio de cultivo BME completo procedían de Gibco-Invitrogen (Grand Island, EEUU). La suspensión celular fue diluida en el volumen de medio BME completo necesario, dependiendo del número de células y el tipo de placa requeridos en cada experimento. En las placas de poli-lisina se sembró el número de células requeridas para cada experimento. A continuación fueron incubadas a 37°C y una atmósfera húmeda con un 5% de CO₂ durante 20 minutos, tiempo suficiente para que las células se adhirieran a la placa. Tras aspirar el medio se añadieron 2 ml de medio BME completo (previamente atemperado en un baño a 37°C). Transcurridas 24 horas del cultivo se añadió el volumen necesario de citosín-β-arabinofuranósido (Ara-C, Sigma-Aldrich), para que la concentración final fuese de 10 µM. Este agente impide el crecimiento de las células no neuronales. A diferencia de los cultivos de líneas celulares, las células granulares de cerebelo condicionan su propio medio, por lo que éste no se cambia, sino que únicamente requieren un aporte de glucosa (Merck, Darmstadt, Alemania), cada 3 ó 4 días- que asegure una concentración final de 5,6 mM. En estas condiciones, los cultivos se mantuvieron a 37°C y una atmósfera húmeda con un 5% de CO₂ hasta que fueron requeridos para el experimento.

2.1.2. Estimación de la viabilidad celular mediante el método MTT

El MTT o Bromuro de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio, es una sal de tetrazolio hidrosoluble que confiere color amarillo a la disolución. Las enzimas succinato deshidrogenasa mitocondriales de las células viables reducen el MTT a formazán, un compuesto violeta insoluble en medio acuoso pero soluble en disolventes orgánicos como el dimetilsulfóxido (DMSO). Este derivado puede ser determinado espectrofotométricamente a 570 nm, lo que permite correlacionar la absorbancia detectada con el número de células vivas al encontrarse en relación directamente proporcional. Este método fue desarrollado en 1983 (Mosmann, 1983) y posteriormente modificado en 1986 por Francois Denizot y Rita Lang (Denizot y col., 1986). Dada su sencillez, esta técnica ha sido utilizada en numerosos estudios de viabilidad celular.

A partir de una disolución de MTT (Sigma-Aldrich) de 5 mg/ml en agua destilada, se añadieron 10 µl a las placas de cultivo para conseguir una concentración final de 0,1 mg/ml. Las células se incubaron en una atmósfera húmeda con un 5% de CO₂ y a 37°C durante 4 horas. Tras aspirar el medio, se añadieron 500 µl de DMSO. En un lector de placas (Victor2, PerkinElmer, EEUU) se midió la absorbancia a 570 nm, previa corrección de la interferencia a 690nm. Cada medida se realizó por triplicado. La viabilidad celular se estimó al interpolar en una recta patrón, previamente establecida.

2.1.3. Lisis y fraccionamiento celular

Las células se lavaron, dos veces, con 1 ml de PBS previamente atemperado a 37°C y se lisaron con 200 µl. de un tampón hipotónico a 4°C, cuya composición se especifica en la tabla 3. Los pocillos se rascaron y la placa se incubó a 4°C durante 15 min. El extracto

(fracción total) se centrifugó (1000g., 10 min., 4°C). El sobrenadante (citósol y membranas) se centrifugó (56.000g., 30 min., 4°C). El nuevo sobrenadante (fracción citosólica) se congeló a -80°C. El precipitado (fracción membranal) se lavó con 200 µl de NaCl 1M y, tras centrifugar de nuevo (56.000g., 30 min., 4°C), el precipitado se resuspendió en 50µl de tampón hipotónico, cuya composición figura en la tabla 3, y se congeló a -80°C.

Tabla 3. Composición de los tampones utilizados para la lisis de las células granulares de cerebelo.

Tampón	Composición
<u>Tampón hipotónico</u>	50 mM KH ₂ PO ₄ , 1,5 mM MgCl ₂ , 10 mM NaCl, 1mM DTT, 1mM EDTA; pH 7.4
<u>Tampón hipertónico</u>	50 mM KH ₂ PO ₄ , 1,5 mM MgCl ₂ , 250 mM NaCl, 1mM DTT, 1mM EDTA, 0,1% Tritón X-100; pH 7.4

El precipitado de la primera centrifugación (fracción nuclear) se lavó con 200 µl de tampón hipotónico y se centrifugó a 1000g durante 5 min. a 4°C. Este proceso de lavado se repitió una vez más. El precipitado fue resuspendido en 100 µl de tampón hipertónico e incubado en hielo durante 30 min. El lisado fue sonificado 2 x 5 s. (Branson Sonifier 150, Danbury, EEUU) con una amplitud de 3 y centrifugado (20.000g., 15 min, 4°C). El sobrenadante se congeló a -80°C. La concentración de proteína de cada una de las muestras se determinó mediante el kit comercial Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU), siguiendo el protocolo expuesto en el apartado 2.1.5.

2.1.4. Ensayo de la actividad de PREP

El ensayo realizado está basado en un protocolo publicado anteriormente (García-Horsman y cols., 2007b).

Las muestras de extractos citosólicos, membranales y nucleares, obtenidos mediante el protocolo de fraccionamiento celular ya descrito, fueron descongeladas en hielo. El ensayo se llevó a cabo en placas de 48 pocillos y cada muestra se hizo por triplicado. Se incubaron 12,5 μ l. de cada muestra (de 2 a 10 μ g de proteína) y 2.5 μ l. de 1 mM del sustrato de PREP Suc-Gly-Pro-7- amido- 4- metilcumarina (Suc-Gly-Pro-AMC, Bachem, Alemania) en un volumen final de 125 μ l. con tampón de incubación (ver tabla 4) durante 90 min a 37°C. Se incluyó un blanco que contenía tampón de lisis hipotónico (para las muestras citosólicas y membranales) así como un blanco con tampón de lisis hipertónico (para las muestras nucleares). La reacción fue parada con 125 μ l. de tampón de finalizado (ver tabla 4). La fluorescencia liberada por el AMC fue medida por un lector de fluorescencia en placa (Victor 2, PerkinElmer, EEUU) utilizando una longitud de onda de excitación a 360 nm y de emisión a 460nm.

Tabla 4. Composición de los tampones requeridos en el ensayo de actividad de PREP.

Tampón	Composición
<u>Tampón de incubación</u>	0,1 M NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O, 0,1M KH ₂ PO ₄ ; pH 7
<u>Tampón de finalizado</u>	1M CH ₃ COONa; pH 4,2

2.1.5. Medida de la concentración de proteína por el método de Bradford

El reactivo Bradford (Biorad, Hercules, CA, EEUU), empleado para la cuantificación proteica en los experimentos realizados en esta tesis, es una solución de Comassie Brilliant Blue G-250 de color rojizo que absorbe a 465 nm, pero cuando se une a las proteínas se torna de color azul con un máximo de absorción a 595 nm. La unión entre el colorante y la proteína tiene lugar de forma rápida (unos 2 minutos) y el complejo así formado es estable hasta una hora después de la unión. Este método, creado por Bradford (Bradford, 1976), se caracteriza por una alta sensibilidad por lo que se pueden detectar cantidades de proteína muy pequeñas (1-15 µg).

En cada ensayo se prepararon diluciones seriadas procedentes de una solución de albúmina sérica bovina (BSA, Thermo scientific, Hudson, EEUU) 1mg/ml. en agua mili-Q.

En una placa de 96 pocillos transparente se depositaron 10 µl de cada uno de los estándares y muestras por cuadruplicado y se añadieron 200 µl. del reactivo Bradford, previamente diluido en 4 partes de agua mili-Q. Transcurridos 5 min. se leyó la absorbancia de cada pocillo mediante un espectrofotómetro (Victor2, PerkinElmer) a 595nm. Las diluciones seriadas oscilaban entre 0 y 3,5 mg/ml, ya que en este rango existía una linealidad entre la absorbancia medida y la concentración de proteína presente. El tubo correspondiente a 0 mg/ml hace referencia al blanco, que contenía 10 µl del tampón en el que se encontraba la muestra.

La concentración de proteína en mg/ml de cada muestra se calculó al interpolar en esta recta el valor de absorbancia obtenido.

2.1.6. Inmunoelectrotransferencia

Las muestras de proteína para la inmunoelectrotransferencia fueron precipitadas en acetona fría (-20°C). El volumen de acetona añadido fue

4 veces el volumen de muestra. Tras homogenizar, los tubos se mantuvieron a -20°C durante 60 min y, a continuación, se centrifugaron (20.000g., 10 min., 4°C). Tras decantar el sobrenadante, los tubos se decantaron con cuidado y se dejaron abiertos hasta la evaporación completa. El precipitado se resuspendió en tampón de carga 1X (50 mM Tris-HCl; pH 6,8, 35% glicerol, 1% SDS, azul de bromofenol al 0,002% y 5mM de β -mercaptoetanol). Las electroinmunotransferencias se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Myöhänen y cols. (2007), en el que se utilizó un anticuerpo purificado de pollo para PREP humana (de elaboración propia; ver Myöhänen y cols., 2007) como primer anticuerpo a una dilución 1:5000. Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo IgY-HRP conjugado de cabra anti-pollo (Sigma-Aldrich) a una dilución 1:10.000. Se utilizaron técnicas estándares de SDS-PAGE, transferencia, bloqueo y secado. Se utilizó como control positivo de 1 a 5 femtomoles de PREP recombinante purificada, preparada según lo descrito por Myöhänen y cols. (2007).

2.1.7. Localización de PREP mediante el microscopio confocal.

❖ Fijación de las células granulares de cerebelo.

Se sembraron 750.000 células en placas de 12 pocillos que albergaban cubres redondos de 10 mm de diámetro. La fijación se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Bell y cols. (1987).

La placa que contenía las células se mantuvo en un baño a 37°C , así como todas las disoluciones utilizadas hasta el momento de la fijación.

Las células fueron lavadas 2 veces con 1 ml de medio BME puro, a fin de eliminar los restos de suero, e incubadas con 1 ml de disolución DTSP (ácido 3,3'-ditiodipropinoico di (N-hidroxisuccinimida éster), Sigma-Aldrich) durante 15 min. Transcurrido el tiempo, las células se lavaron 2 veces con 1 ml de glicina-PBSA (0,1 M glicina en albúmina

disuelta en tampón fosfato; 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 0,5 mM Na₂HPO₄, pH 7.4, 0,5% albúmina de suero bovino fetal) y otras dos con 1 ml de PBS (137mM NaCl, 3 mM KCl, 0,5 mM Na₂HPO₄, pH 7,4). Seguidamente, se incubaron en 1 ml de la disolución PBSAT (0,5 Tritón X-100 en tampón fosfato suplementado con 0,5% de albúmina) durante 15 minutos. Se realizaron 2 lavados con 1 ml de PBSAT durante 5 minutos. La placa fue retirada del baño y las células se incubaron con 1 ml de una disolución de paraformaldehído al 4% (Tousimis, Rockville, EEUU) en PBSAT durante 15 min a temperatura ambiente. Las células fijadas se lavaron, 2 veces y durante 5 minutos, con 1 ml de glicina-PBS y otras 2 veces con PBS el mismo tiempo.

Las células fueron incubadas con Fluo-JTP a una concentración final de 10 µM en PBS durante 20 minutos. Tras lo cual se lavaron 2 veces en 1 ml de PBS. Finalmente, los cubres redondos fueron montados sobre un porta y un cubreobjetos con una gota de una solución de glicerol al 85% en agua mili- Q que contenía 4',6- diamino-2-fenilindol (DAPI, Sigma-Aldrich), siguiéndose las instrucciones del fabricante. El DAPI permitió visualizar los núcleos de las células granulares de cerebelo. Se utilizó un microscopio confocal (Leica TCS-SP2-AOBS) que excitó las células a 405 nm (azul) y a 485 nm (verde). La fluorescencia emitida se detectó a 415-450 nm (azul) y a 500-575 nm (verde).

Se llevaron a cabo numerosos controles que aseguraran la especificidad del Fluo-JTP. La unión inespecífica del Fluo-JTP se determinó mediante el bloqueo de los sitios específicos con JTP-4819 o con ZPP, viéndose que dicha unión inespecífica era mínima (datos no mostrados).

De forma paralela se fijaron células granulares de cerebelo con el fin de realizar un doble marcaje; uno mediante inmunocitoquímica, usando un anticuerpo primario anti-PREP ya descrito anteriormente (Myöhänen y cols., 2007; Myöhänen y cols., 2008a) y, otro mediante Fluo-JTP,

Metodología

descrito aquí. Tal y como se muestra en la siguiente figura, no se detectaron cambios significativos entre ambos tipos de marcaje:

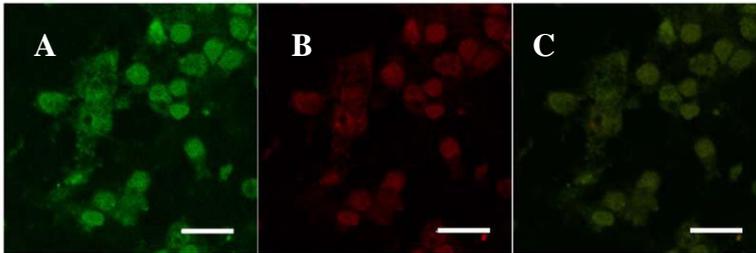


Figura 9. Doble detección de PREP en células granulares de cerebelo mediante Fluo-JTP (A) e inmunocitoquímica (B). Las células con 5 días *in vitro* (DIV 5) fijadas fueron incubadas durante toda la noche con un anticuerpo primario (dilución 1:500 del anticuerpo anti-PREP IgY purificado en 3% BSA en PBS, como se describió en Myöhänen y cols. (2007) y 2 horas con un anticuerpo anti-pollo IgY de mono conjugado con rojo Texas (dilución 1:500; producto #RDI-703075155, Research Diagnostics, Concord, MA, EEUU), como anticuerpo secundario. El panel C muestra el solapamiento de las fotografías A y B, mostrando una colocalización muy homogénea de los dos marcadores. Barra de escala 14 μm .

Además, las células fueron incubadas con Fluo-JTP antes de ser fijadas y la fluorescencia fue detectada en el microscopio confocal tras la fijación, lo que corrobora la unión específica del Fluo-JTP. Este control también mostró resultados cualitativos similares a los obtenidos tras incubar las células con el Fluo-JTP, estando éstas previamente fijadas. Sin embargo, desde el punto de vista cuantitativo, la intensidad de la fluorescencia del Fluo-JTP era menor cuando éste se añadía antes de la fijación de las células, requiriendo incubaciones más largas con el inhibidor fluorescente, a fin de conseguir resultados similares a los obtenidos cuando se añadía tras la fijación. En concreto, los núcleos eran menos brillantes, a menos que el fluoróforo se añadiese tras la fijación, como puede verse en la siguiente figura:

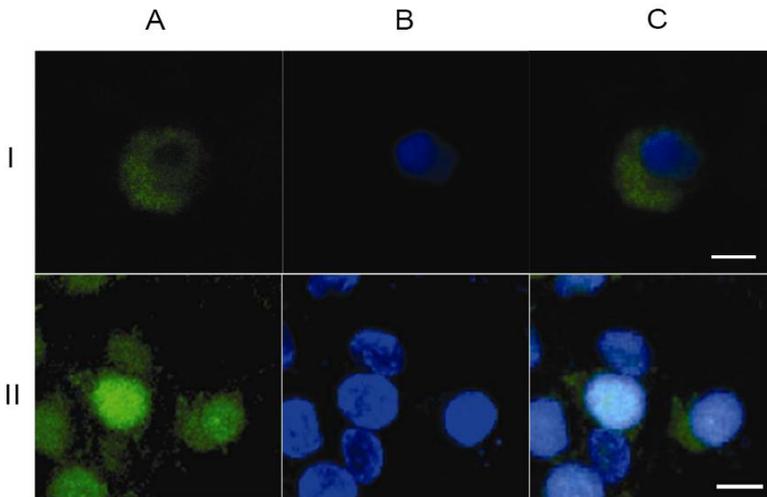


Figura 10. Efecto de la fijación de células en la localización de PREP mediante el marcaje con Fluo-JTP en cultivos primarios de células granulares de cerebelo. El Fluo-JTP se añadió antes (I) y después (II) de fijar las células. Las fotos muestran las fluorescencias de Fluo-JTP (A), y del DAPI (B), respectivamente. El solapamiento de ambas fotos aparece en la columna C. Puede apreciarse cómo el Fluo-JTP puede entrar tanto en las células sin fijar como en las fijadas, si bien la intensidad de la fluorescencia en los núcleos es considerablemente más intensa cuando se añade tras la fijación, hecho que puede ser explicado por la mayor accesibilidad que presenta el Fluo-JTP cuando las células se encuentran muertas tras la fijación. Para obtener estas fotos, en las células no fijadas, fueron necesarios 20 minutos de preincubación con Fluo-JTP, similar al tiempo de incubación del Fluo-JTP en células previamente fijadas (15 minutos). Aunque las células no fijadas fueron incubadas con el inhibidor fluorescente durante más de una hora con el fin de obtener una mayor intensidad del fluoróforo, la eficiencia siempre era menor que en células fijadas. La barra de escala marca $7\mu\text{m}$.

2.1.8. Muerte neuronal. Diseño experimental.

Las células granulares de cerebelo han sido descritas en numerosos trabajos como modelos para el estudio de la muerte neuronal (Gallo y cols., 1987a; Gallo y cols., 1987b; Contestabile, 2002).

En la tabla 7, que aparece en el apartado de resultados de esta tesis, aparecen las concentraciones utilizadas de cada uno de los tóxicos utilizados, así como los días *in vitro* (DIV) en los que se encontraban las células. Tanto el tipo de inhibidor de PREP utilizado, como su concentración y el tiempo de incubación antes de añadir los diversos tóxicos, se especifican también en dicha tabla.

La apoptosis por privación de K^+ fue inducida en las células granulares de cerebelo, tal y como se había descrito previamente (D'Mello y cols., 1993). Se sembraron 2 placas con las células en un medio que contenía 25 mM de K^+ . Una de estas placas se utilizó para hacer el estudio de viabilidad por el método MTT y la otra para llevar a cabo la lisis celular y la medición de la actividad de PREP, tanto en la fracción citosólica como en la nuclear. En el DIV 6 el medio completo con 25 mM de K^+ fue sustituido por otro que difería únicamente en la concentración de K^+ (5 mM). Los controles fueron tratados en las mismas condiciones y se les volvió a añadir medio completo fresco con 25 mM de K^+ .

En el caso de la 6-OHDA y el H_2O_2 , los medios no fueron cambiados, sino que fueron añadidos directamente al medio en el momento especificado en la tabla 7. También se sembraron dos placas; una para el estudio de la viabilidad y la otra en la que se realizó la lisis, el fraccionamiento celular y la medida de la actividad de PREP- como en el caso anterior-.

Cada una de las muestras de cada placa se realizó por triplicado. Así mismo, cada experimento fue realizado también por triplicado.

Para establecer la concentración óptima de la 6-OHDA y el H₂O₂ se buscó en la bibliografía el rango de concentraciones más ampliamente utilizado con éstas y otras líneas celulares. A continuación se estableció una recta de supervivencia celular frente a diferentes concentraciones del tóxico. Cada una de las concentraciones se llevó a cabo por triplicado. Se tomó aquella concentración que producía alrededor del 50% de muerte celular entre las 48 y las 72 h (datos no mostrados).

2.1.9. Análisis estadístico de los datos

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el programa GraphPad Prism (versión 4.03, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EEUU). Los datos procedentes de los estudios de viabilidad y actividad se sometieron a un análisis de varianza (one-way ANOVA), seguido del test de Tukey, a fin de analizar las diferencias entre el grupo control y los grupos problema. Se consideró como estadísticamente diferentes los casos en los que $P < 0.05$.

2.2. MÉTODOS UTILIZADOS EN LA LÍNEA CELULAR SH-SY5Y PROCEDENTE DE NEUROBLASTOMA HUMANO

Estas células se caracterizan por poseer muchas neuritas cortas, crecer lentamente en monocapa formando agrupamientos y presentar poca adherencia a la superficie de crecimiento de la placa (ver figura 13).

2.2.1. Subcultivo celular, mantenimiento y congelación

Las células SH-SY5Y de neuroblastoma humano (procedentes de la ATCC, Rockville, Maryland, EEUU) se sembraron y se cultivaron en medio esencial de Dulbecco (DMEM)/Ham's F12 (1:1) suplementado con un 15% de suero bovino fetal (inactivado previamente a 56°C durante 30 min), 2mM L-glutamina, 1% de aminoácidos no esenciales, 200 U/ml de penicilina y 200 µg/ml de estreptomina. Tanto el medio empleado como los suplementos arriba mencionados proceden de Invitrogen (Carlsbad, CA, EEUU).

Las células se cultivaron en frascos de 75 cm² que contenían 20 ml de medio suplementado y se mantuvieron a 37°C y una atmósfera húmeda con un 5% de CO₂. El medio fue cambiado cada 3-4 días.

Una vez los frascos presentaron alrededor del 90% de confluencia, las células se lavaron con 5 ml de PBS (137 mM NaCl, 3mM KCl, 0,5mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,4) y se incubaron con 5 ml de 0,05% tripsina-0,5mM EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) durante 4 minutos a 37°C. Posteriormente la suspensión se diluyó a la mitad en medio suplementado, a fin de inhibir la acción de la tripsina, y se centrifugó (500g., 3 min., temperatura ambiente). Las células se resuspendieron en 1ml de medio suplementado. De esta suspensión se tomó una alícuota para llevar a cabo el recuento de células vivas en una cámara Bürker, utilizando azul tripán para el conteo de las células muertas.

De esta suspensión celular, se tomó la cantidad necesaria para llevar a cabo la siembra en las placas para los distintos experimentos, y del resto de la suspensión se sembraron alrededor de 1×10^6 células en un frasco de 75 cm^2 para proseguir con el subcultivo. En todos los experimentos realizados en esta tesis se utilizaron células que tenían entre 17 y 27 pases.

La preservación de células durante largos periodos de tiempo se llevó a cabo en criotubos congelados en presencia del agente crioprotector DMSO; éste protege las células del daño físico producido por la formación de cristales de hielo y de la alteración osmótica provocada por el aumento de la concentración de sales en el medio extracelular.

Para ello 3×10^6 de las células de la suspensión anterior fueron sedimentadas (500g, 3 min, temperatura ambiente) y resuspendidas en 0.5 ml de solución A (60% DMEM/ F12 (1:1) + 40% suero bovino fetal inactivado). Posteriormente se trasvasaron a un criotubo (NUNC®) y éste se mantuvo en nevera durante 20 minutos. Transcurrido ese tiempo, se añadieron 0,5 ml de solución B (40% DMEM/ F12 (1:1) + 40% SBF inactivado + 20% DMSO estéril) y el tubo se introdujo en un contenedor con isopropanol (Cryo Freezing de Nalgene, New Jersey, EEUU). Este sistema permite congelar las células con un descenso de la temperatura de $1\text{-}3^\circ\text{C}/\text{min}$. Transcurridas 24 horas a -80°C el vial se guardó en un tanque de nitrógeno líquido hasta su nuevo uso.

La descongelación de estos viales procedentes de este tanque se realizó rápidamente a 37°C . Inmediatamente el contenido fue diluido 50 veces en medio DMEM suplementado, centrifugado y lavado de nuevo con este medio, para así eliminar los restos de DMSO. Después las células se sembraron en un frasco de 75 cm^2 y 20 ml de medio suplementado y se prosiguió con el cultivo como se ha mencionado previamente, hasta que éste alcanzó una confluencia adecuada.

2.2.2. Estudio de la implicación de PREP en la diferenciación inducida con ácido retinoico.

❖ Inhibición de PREP

Transcurridas 4 h. de la siembra de $0,5 \times 10^6$ células en cada pocillo se añadieron los inhibidores JTP-4819, KYP-2047 y/o ZPP donde correspondía a una concentración final de $10 \mu\text{M}$.

Tal y como se muestra en la siguiente figura, se vio que los 3 inhibidores podían entrar en las células SH-SY5Y, si bien la capacidad de penetración fue mayor para el ZPP:

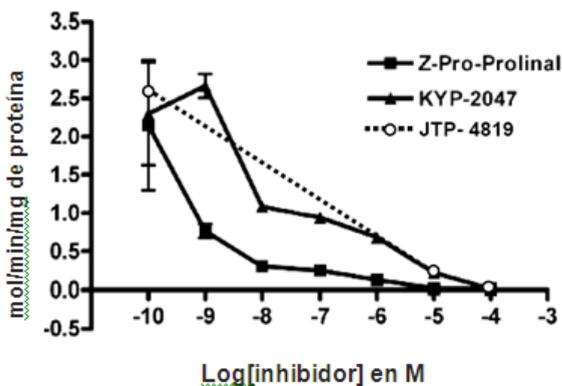


Figura 11. Actividades de PREP de células SH-SY5Y tratadas con diferentes concentraciones de JTP-4819, KYP-2047 y ZPP tras 24 horas de incubación. El experimento se repitió 3 veces con muestras por duplicado. Los resultados aparecen expresados como media \pm DE.

Las células se incubaron durante 24 h. con concentraciones crecientes del respectivo inhibidor de PREP (ZPP, KYP-2047 o JTP-4819). Transcurrido ese tiempo las células se lisaron y se midió la actividad de PREP, siguiendo los protocolos descritos más adelante. Estas concentraciones de inhibidores (10-100 veces superiores a sus IC_{50}) fueron suficientes para inhibir más del 95% de la actividad endógena de PREP en la línea celular SH-SY5Y, tal y como ya se había publicado anteriormente (Puttonen y cols., 2006; Puttonen y cols., 2008; comunicación personal de A.M. Lambeir).

Es importante destacar que durante todos los experimentos en los que se utilizaron los inhibidores, PREP estuvo inhibida prácticamente en su totalidad. El efecto de la presencia de un inhibidor endógeno de PREP en el medio de cultivo de las células SH-SY5Y se comprobó utilizando ZPP, JTP-4819 y KYP-2048. En los tres casos la actividad de PREP, medida en los cultivos celulares, en presencia del inhibidor, era inferior al 2% -tras compararla con la medida en células bajo condiciones control. El medio de las células se cambió cada 2-3 días, añadiéndose inhibidor fresco cada vez.

En la siguiente figura se muestra la gráfica correspondiente al JTP-4819.

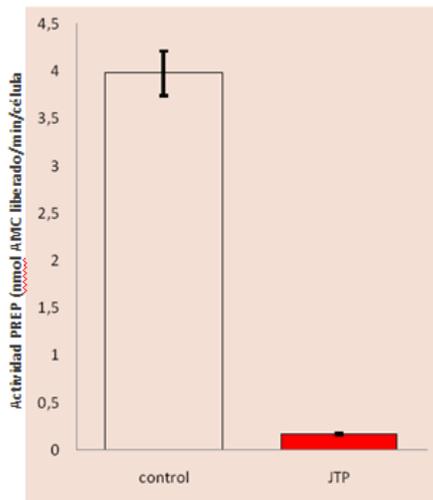


Figura 12. Representación del efecto de los inhibidores de PREP (10 μM) en el medio de cultivo, tras medir la actividad de la enzima presente en los lisados procedentes de células SH-SY5Y- tras 15 días de incubación en ausencia (control) y en presencia del inhibidor. Aquí se muestra el efecto del JTP-4819. Los datos mostrados corresponden a tres cultivos celulares diferentes (10^6 células) y, en cada uno de ellos, el experimento se realizó por duplicado. El ensayo de actividad se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito posteriormente.

La concentración (10 μM) de los inhibidores de PREP (ZPP, KYP-2047 y JTP-4819) utilizada en los experimentos realizados en esta tesis, inhiben PREP de forma específica, sin afectar a la actividad de otras proteasas de prolina específicas (DPP2, DPP4, DPP8, DPP9, α -FAP, aminopeptidasa P, prolidasa, imino/aminopeptidasa de prolina y FKBP12 (datos no mostrados) u otras proteasas de serina (Venäläinen, Tesis doctoral, Universidad de Kuopio, Finlandia, 2005). Las concentraciones del inhibidor de PREP necesarias para inhibir el 50% de la actividad endógena de PREP en las células SH-SY5Y eran ligeramente superiores, especialmente las del KYP-2047, a las determinadas a partir de homogenados de cerebro. Esto podría deberse a la escasa penetración de estos inhibidores a través de la membrana plasmática de las células SH-SY5Y, o a la existencia de bombas activas

que expulsaran el inhibidor al medio exterior. Esto también podría explicar las dificultades que se encontraron en la realización de esta tesis, al tratar de localizar PREP en la línea celular SH-SY5Y mediante el inhibidor fluorescente Fluo-JTP, tanto en células prefijadas como no fijadas.

Las concentraciones del inhibidor utilizadas son comparables con las estimadas en experimentos previos realizados en roedores (Walter y cols., 1971; García-Horsman y cols., 2007a; Männistö y cols., 2007). Las concentraciones por encima de 100 y 200 μM no afectan a la viabilidad de las células SH-SY5Y (comunicación personal de la Dra. A.M. Lambeir). En los experimentos realizados en esta tesis, también se observó que 100 μM de ZPP y JTP-4819 no afecta a la viabilidad de las células granulares de cerebelo (datos no mostrados).

❖ **Diferenciación con ácido retinoico**

Las células SH-SY5Y detienen su proliferación para adquirir un fenotipo neuronal, cuando son estimuladas con ácido retinoico, similar al observado durante la maduración de las células de la cresta neural (Tsokos y cols., 1987). Tras la exposición a este inductor de la diferenciación, las células SH-SY5Y desarrollan neuritas largas y estrechas (ver figura 13), así como un aumento del número de sinapsis entre ellas (Sidell y cols., 1983). A nivel subcelular se ha observado un aumento de la expresión de determinadas proteínas específicas neuronales (Reynolds y Maples, 1985; Melino y cols., 1991; Hill y Robertson, 1997), y cambios en la regulación y expresión de determinados genes implicados en el ciclo celular, morfología celular y neurotransmisión (Matsuo y Thiele, 1998; Truckenmiller y cols., 2001).

Por ello, la línea células SH-SY5Y expuesta al ácido retinoico está considerado como un modelo útil para estudiar las fases iniciales de la diferenciación neuronal (Påhlman y cols., 1995; Encinas y cols., 2000).

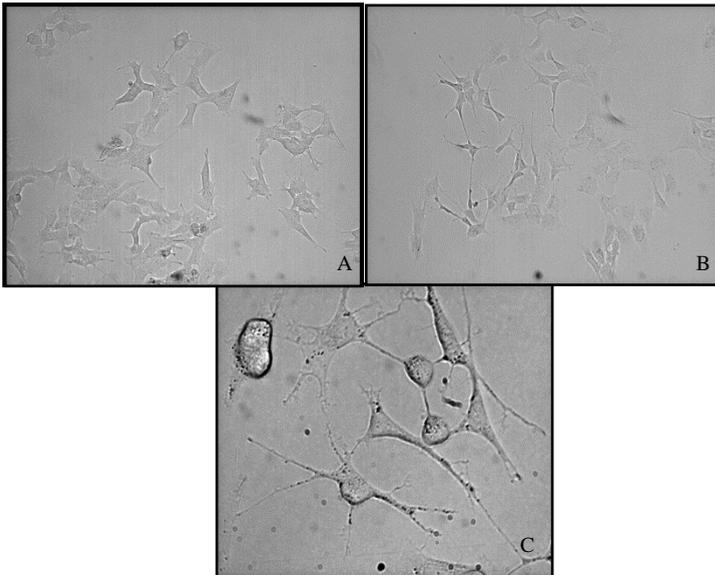


Figura 13. Cambios morfológicos en células SH-SY5Y de neuroblastoma humano tras la diferenciación inducida con 10 μ M de ácido retinoico. El ácido retinoico se añadió a las 24 horas del cultivo. Las fotos se tomaron en el DIV 7. (A) Las células no expuestas al ácido retinoico presentan neuritas cortas y numerosas, mientras que si están expuestas al agente (B) las neuritas se alargan y estrechan para formar sinapsis. (C) Detalle de células diferenciadas con ácido retinoico. Nótese las neuritas de gran longitud a fin de establecer conexiones entre las células.

Se preparó una disolución inicial de 10 mM de ácido retinoico (Sigma-Aldrich) en DMSO y, a partir de ésta, se prepararon diluciones 1mM en PBS que fueron esterilizadas a través de un filtro de 0,22 μ m de tamaño de poro y congeladas a -80°C en tubos de 1,5 ml marrones y opacos, para preservarlos de la luz. Dada su inestabilidad cada partida fue descartada al mes de su preparación.

Se sembraron $0,5 \times 10^6$ células/pocillo en placas de 6 pocillos con un volumen total de 2 ml de medio completo, tal y como se describe en el apartado 2.2.1. Para cada tiempo de estudio se sembraron 2 placas, una para el recuento celular y otra para la lisis y obtención de los extractos

citosólicos y nucleares. En todos los experimentos, el ácido retinoico se añadió a las 24 h. del cultivo, a una concentración final de 10 μ M. Las células, con medio suplementado únicamente, se consideraron como control de la proliferación. El día 8 todas las células fueron lavadas dos veces, con 2 ml de medio suplementado y, en algunos pocillos el ácido retinoico fue eliminado.

❖ **Obtención de una suspensión celular a partir de células adheridas en placa.**

En todos los experimentos se utilizaron células que tenían entre 17 y 27 pases.

Las células fueron lavadas con 2 ml de PBS (137 mM NaCl, 3mM KCl, 0,5mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,4), previamente atemperado a 37°C. A continuación se retiró el PBS y se añadieron 750 μ l de tripsina-EDTA (0,25% tripsina-0,5 mM EDTA en PBS), también mantenida a 37°C. La placa fue incubada a 37°C, 95% de humedad y 5% de CO₂ durante 4 minutos. Se añadieron 750 μ l de medio (DMEM)/Ham's F12 (1:1) completo y, mediante una pipeta, las células fueron aspiradas y expulsadas hasta homogeneizar. Las células procedentes de cada pocillo fueron trasvasadas a un tubo de 1,5 ml. Se tomó una alícuota para estimar la viabilidad celular, mediante el recuento en una cámara Bürker.

❖ **Recuento directo de células en una cámara de Bürker**

Esta cámara está diseñada de modo que permite obtener el número de células/mililitro (N) según la siguiente fórmula: $N = N_0 \times 10 \times 10^3 \times D$, siendo N_0 el número de células por 0,1 mm³ (correspondiente a cada cuadrado), 10 el factor de conversión de 0,1 mm³ a 1 mm³, 10³ el factor de conversión de mm³ a ml y D el factor de dilución correspondiente.

Metodología

En cada experimento se hizo el recuento en los 9 cuadrados que confinen la cámara y el valor de la media es el que se consideró como N_0 . Cada muestra se cuantificó por triplicado.

Se tomaron 15 μl de la suspensión celular homogénea en un tubo de 1,5 ml y se añadió un volumen igual de una solución de azul tripán al 0,4% (Sigma-Aldrich). Cuando el número de células en cada recuadro era superior a 100, se hacía una dilución 1/10 - para minimizar el error de lectura asociado a las altas densidades celulares-.

De este modo se procedió al recuento de células vivas y muertas, expresándose el porcentaje de viabilidad como:

Viabilidad celular (%) = (número de células vivas) \div (número de células vivas + número de células muertas) \times 100.

❖ Lisis y fraccionamiento celular

Las células se lavaron con 2 ml de PBS y se añadieron 300 μl de tampón de lisis hipotónico frío (ver tabla 3). Los pocillos se rasparon y las células se mantuvieron en hielo durante 20 min, tras lo cual se centrifugaron (800g, 10 min, 4°C), y los sobrenadantes (fracción citosólica) se congelaron a -80°C. Los precipitados se lavaron con 300 μl de tampón de lisis hipotónico frío y se centrifugaron (1000g., 5 min., 4°C). Los sobrenadantes se desecharon y los precipitados se resuspendieron en 100 μl de tampón de lisis hipertónico frío (ver tabla 3); se incubaron en hielo durante 30 min., se sonicaron 2x5 seg. (Branson Sonifier 150, Danbury, EEUU) y se centrifugaron (20.000g, 25 min, 4°C). Finalmente los sobrenadantes (fracción nuclear) se congelaron -80°C.

❖ **Ensayo de actividad de PREP**

El ensayo realizado está basado en un protocolo publicado anteriormente (García-Horsman y cols., 2007a).

Las muestras de extractos citosólicos y nucleares fueron descongelados en hielo. El ensayo se llevó a cabo en placas de 48 pocillos y cada muestra se hizo por triplicado. En el caso de muestras citosólicas se incubaron 53 μ l de cada muestra y 2.5 μ l del sustrato de PREP Suc-Gly-Pro-AMC (Bachem, Alemania), en un volumen final de 125 μ l con tampón de incubación (ver tabla 4) durante 60 min a 37°C. Se incluyó un blanco que contenía tampón de lisis hipotónico. Por otra parte, se incubaron 22,5 μ l de cada extracto nuclear y 2,5 μ l del mismo sustrato, en las mismas condiciones que los extractos citosólicos- siendo también el volumen final de 125 μ l en tampón de incubación. En este caso también se utilizó un blanco con el tampón de lisis hipertónico. La reacción fue parada con 125 μ l de tampón de finalizado (ver tabla 4). La fluorescencia liberada por el AMC fue medida por un lector de fluorescencia en placa (Victor 2, PerkinElmer, EEUU), bajo una longitud de onda de excitación a 360 nm y de emisión a 460 nm.

❖ **Estudio morfológico**

Para realizar este experimento se utilizaron placas de 6 pocillos y se sembraron $0,1 \times 10^6$ células en cada uno en 2 ml de medio suplementado, siguiendo el protocolo ya descrito. Transcurridas 4 horas del cultivo celular (DIV 0) se añadieron los volúmenes necesarios de JTP-4819, KYP-2047 o ZPP, en sus correspondientes pocillos, para alcanzar una concentración final de 10 μ M. Tras 24 horas del cultivo se añadió 10 μ M de ácido retinoico. Los inhibidores fueron añadidos por un investigador diferente al que llevó a cabo el estudio morfológico, a fin de asegurar la objetividad del estudio.

Metodología

Las células fueron incubadas en atmósfera húmeda y 5% de CO₂ a 37°C, y pasados 6 días del cultivo fueron observadas con un microscopio óptico de contraste de fases (Nikon Eclipse TE300; Garden City, N.Y., EEUU) y un objetivo 20X. Se tomaron fotos al azar como muestra la siguiente figura:

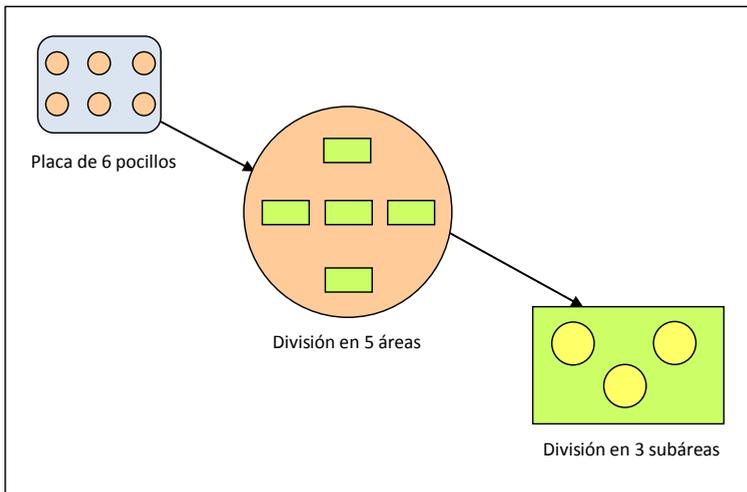


Figura 14. Esquema de la distribución de áreas y subáreas de cada pocillo en la toma de fotos para el estudio morfológico.

Se tomó 1 foto de cada subárea y, por tanto, 15 fotos de cada pocillo. En cada foto se hizo un recuento de lo siguiente:

- Número de neuronas diferenciadas: se tomaron aquellas neuronas diferenciadas con neuritas alargadas y estrechas, independientemente de que formaran conexiones con otras neuronas o no.
- Número de neuritas por neurona: se contaron aquellas que emergían del cuerpo neuronal o soma.
- Longitud de las neuritas: se expresó como el n° de veces del tamaño del soma.

- Número de conexiones por neurona: se obtuvo al dividir el número de conexiones presentes entre el número de neuronas implicadas.

Los resultados del conteo fueron analizados, tal y como se describe en el apartado 2.2.4., correspondiente al estudio estadístico.

❖ Valoración de los niveles de inositol trifosfato (IP₃)

El protocolo que se llevó a cabo en esta tesis para la cuantificación de IP₃ fue adaptado siguiendo el fundamento del kit comercial IP-3 radioreceptor assay kit (Perkin-Elmer, EEUU). Este ensayo se fundamentó en lo siguiente: el IP₃ no marcado presente en la muestra compete con una cantidad fija añadida de IP₃-[³H], por su unión a una cantidad limitada de receptor de IP₃, procedente de un extracto de cerebelo de rata. El IP₃ unido es separado del IP₃ no unido (IP₃ libre), mediante centrifugación; de modo que el complejo formado por la unión del IP₃ con el receptor queda en el fondo del tubo, mientras que el IP₃ libre permanece en el sobrenadante. Una vez descartado el sobrenadante la fracción unida es resuspendida y la radiactividad presente, procedente del IP₃-[³H], detectada en un contador de β-centelleo. De este modo, la radiactividad medida es directamente proporcional a la cantidad de IP₃-[³H] presente y, por tanto, inversamente proporcional a la cantidad de IP₃ sin marcar presente en la muestra. La cantidad de IP₃ no marcada presente en cada muestra puede calcularse por interpolación en una recta patrón en la que se han utilizado distintas cantidades de un estándar de IP₃ sin marcar.

➤ Aislamiento de células

Se sembraron 0,5x 10⁶ células en placas de 6 pocillos, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.2.1. Tras incubar las células el tiempo establecido para cada experimento, se obtuvo una suspensión celular a partir de las células adheridas a la placa, siguiendo el

Metodología

protocolo ya descrito. A continuación se centrifugó dicha suspensión (500g, 3 min, 20°C) y, tras descartar el sobrenadante, las células fueron resuspendidas en 1 ml de PBS, a fin de eliminar los restos de tripsina, EDTA y medio. Se centrifugó en las mismas condiciones anteriores y el sedimento obtenido se resuspendió en 620 µl de PBS frío, y se mantuvo en hielo hasta el momento de la lisis celular.

➤ Lisis de células

Se añadieron 60 µl de HClO₄ al 20% en PBS al tubo que contenía 300 µl de la suspensión celular. Los tubos se mantuvieron en hielo durante 20 minutos y se centrifugaron (2000g, 15 min, 4°C). A éstos se les añadió el volumen necesario de una solución de 1,5 M KOH-60 mM HEPES, hasta alcanzar un pH alrededor de 7,5 -utilizando papel indicador de pH (Merck, Darmstadt, Alemania)-. A continuación los tubos se centrifugaron, en las mismas condiciones anteriores, y los sobrenadantes se congelaron a -20°C, hasta realizar el ensayo de cuantificación de IP₃.

➤ Preparación de los distintos reactivos para el ensayo

• Preparación del estándar de IP₃

Se prepararon alícuotas de una disolución 50 µM de D-myo- inositol-1,4,5-trifosfato (Sigma-Aldrich) en agua mili-Q, las cuales fueron congeladas a -20°C hasta su utilización. En el momento de realizar la cuantificación del IP₃, las alícuotas necesarias se descongelaron en hielo y se preparó una disolución final de 4 nmoles/ml en agua mili-Q, la cual se mantuvo en hielo hasta su uso.

• Preparación del IP₃ radiactivo

El D-myo- inositol-1,4,5-trifosfato-[³H](Perkin- Elmer) utilizado tenía una actividad específica de 18 Ci/mmol y una concentración radiactiva de 0,01mCi/ml.

La concentración química de la disolución de IP₃ radiactiva fue 555,55 pmol/ml. Unos instantes antes de llevar a cabo la cuantificación de IP₃, se preparó una disolución de 50 pmol/ml en agua mili-Q, que se conservó en hielo hasta su uso.

- **Preparación del extracto crudo rico en receptor de IP₃**

Los cerebelos utilizados para la obtención del extracto fueron proporcionados por el Dr. Pekka Männistö del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Helsinki. Las ratas (raza Wistar, adquiridas de Harland Laboratories, Países Bajos, con un peso de 190-200 gramos) fueron decapitadas y, tras la extracción de los cerebros, los cerebelos fueron diseccionados, pesados, congelados en nitrógeno líquido y mantenidos a -80°C hasta su utilización.

Los cerebelos se descongelaron en hielo y se les añadió un 10% (p/v) de tampón de homogenización frío (100 mM KH₂PO₄, 1mM EDTA a pH 7.5) que contenía un cóctel de inhibidores de peptidasas (complete; Roche, Mannheim, Alemania). Los cerebelos se homogenizaron (Kontes® Microtube Pellet Pestle® Rods with motor, Daigger, Vernon Hills, Illinois, EEUU) tras lo cual, los homogenados se trasvasaron a un tubo único para proceder a la lisis celular con ultrasonidos con un sonicador (Branson Sonifier 150, Danbury, EEUU), 2 x 5 segundos y una amplitud de 3. A continuación el extracto se centrifugó (5000 rpm, 10 min, 4°C) y, el sobrenadante se alicuotó y congeló a -80°C hasta su utilización. Se determinó la concentración de proteína mediante el ensayo Bradford, como se explicará más adelante. La concentración del extracto, determinada por el método Bradford, fue de 7 mg/ml. Se preparó una disolución del extracto con una concentración final de 1,25 mg/ml en el tampón de homogenización frío en el momento de la cuantificación del IP₃.

➤ **Preparación de las muestras**

Unos instantes antes de llevar a cabo el ensayo de cuantificación de IP_3 , las muestras se descongelaron en hielo y se diluyeron en un volumen doble de agua mili-Q.

➤ **Cuantificación del IP_3**

A partir de la disolución de 4 nmoles/ml de IP_3 estándar, se preparó una recta patrón que contenía 100, 50, 25, 12,5 y 6,25 pmoles de IP_3 en cada tubo. Además, se preparó un tubo para saber las cuentas totales (CT), otro con un blanco para conocer la unión no específica (UNE) y un blanco cero (B_0). Los estándares de la recta patrón, así como las muestras y los blancos mencionados, se prepararon por triplicado según la siguiente tabla:

Tabla 5. Volúmenes (en μ l) de cada componente para la preparación de la recta estándar, las muestras y los diferentes blancos necesarios para llevar a cabo el ensayo de cuantificación del IP_3 .

Componente	Estándar	Muestra	UNE	B_0	CT
Tampón de incubación (0,1 M Tris-HCl, 4 mM EDTA, pH 9)	165	165	165	165	490
Agua mili-Q				125	
Estándares de IP_3 (100-6,25 pmol)	125				
Estándar de IP_3 (4nmol/ml)			125		

Tabla 5. Continuación.

Componente	Estándar	Muestra	UNE	B ₀	CT
Muestra		125			
IP ₃ -[³ H] radiactivo (50 pmol/ml)	10	10	10	10	10
Receptor de IP ₃ (extracto crudo de cerebelo de rata; 1,25 mg/ml de proteína)	200	200	200	200	
Volumen total	500	500	500	500	500

Los tubos se incubaron en hielo 10 min. A excepción del tubo CT, se centrifugaron (4000g, 5 min, 4°C) y, tras descartar los sobrenadantes, los sedimentos fueron resuspendidos en 500 ml de agua mili-Q. Se tomaron 400 µl de cada tubo y se trasvasaron a un tubo de 4 ml (Zinsser Minis®1000, Zinsser Analytic, Frankfurt, Alemania) al cual se añadió 2 ml de líquido de centelleo (Optiphase HiSafe3, Perkin-Elmer, EEUU). Las dos fases desaparecieron, tras agitar con un agitador eléctrico a máxima velocidad. Finalmente la radiactividad fue medida en un contador de β-centelleo (1414 Winspectral; Wallac, Mass., EEUU). La radiactividad de los distintos estándares, así como de las muestras se expresaron como:

$$\%B/B_0 = \frac{\text{cpm estándar o muestra} - \text{cpm UNE}}{\text{cpm } B_0 - \text{cpm UNE}}$$

Metodología

Los pmoles de IP₃ se calcularon al interpolarse los valores obtenidos en la recta estándar, la cual se preparó para cada experimento. Los resultados se expresaron como pmol/10⁶ células. Tanto las muestras como los experimentos se realizaron por triplicado.

❖ **Estudio de la expresión de PREP. Estimación de los niveles de ARNm.**

➤ **Cultivo celular**

Se sembraron 1x10⁶ células por pocillo en placas de 6 pocillos, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.2.1., y se incubaron a 37°C hasta el momento de su utilización.

➤ **Tratamiento**

A las 24 h. del cultivo (DIV1) se añadió ácido retinoico a la mitad de los pocillos, para obtener una concentración final de 10 μM. Los pocillos con únicamente medio fueron considerados controles. El día 8 las células se lavaron, dos veces, con 2 ml de medio completo. Se añadieron otros 2 ml de medio y se adicionó el ácido retinoico de nuevo, en la mitad de los pocillos que habían estado expuestos a él desde el día 1, mientras que el ácido retinoico fue retirado en la otra mitad de los pocillos cuyas células también habían estado expuestas a él. Los controles también fueron lavados. El mantenimiento de las células se llevó a cabo cambiando el medio cada 3-4 días.

➤ **Aislamiento de células**

Tras despegar con una solución de tripsina las células adheridas en los pocillos, siguiendo el protocolo ya expuesto, se procedió a su conteo en una cámara Bürker y a la lisis y extracción del ARN total de 2x10⁶ células, como se detalla a continuación.

➤ **Lisis y extracción de ARN total**

• **Consideraciones generales**

La lisis y la extracción del ARN total de las células presentes en cada muestra se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante del kit utilizado (Aurum Total RNA Mini Kit; Biorad, Hércules, CA, EEUU).

Dado que el ARN es una molécula muy lábil, fue necesario tomar una serie de medidas especiales durante su extracción. Por ello siempre se trabajó con guantes libres de RNasas (MoBio Laboratories Inc, CA, EEUU). Asimismo, la superficie del banco de trabajo, las pipetas, las superficies de las cajas de puntas, el rotor y la cámara de la centrífuga se pulverizaron con UltraClean[®] Lab Cleaner, una solución que degrada las RNasas (MoBio Laboratories Inc, CA, EEUU). Todo el material desechable, como los tubos (Biorad, Hércules, CA, EEUU y Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU) y las puntas con filtro, (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU) eran estériles y libres de RNasas.

La extracción del ARN, la preparación de los cócteles de reacción para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la ubicación del termociclador, se realizaron en habitaciones separadas para evitar cualquier riesgo de contaminación.

• **Preparación de los reactivos necesarios para la extracción del ARN**

Todos los reactivos empleados se prepararon siguiendo las instrucciones del fabricante.

• **Procedimiento de lisis y extracción**

Se lisaron 2×10^6 células, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Se tomó una alícuota de 5 μ l del eluato final, para determinar la concentración del ARN total de la muestra, como se

Metodología

explica a continuación. El resto se congeló a -80°C hasta su utilización. Las muestras se realizaron por triplicado.

- **Determinación de la concentración de ARN total**

Las muestras se descongelaron en hielo, donde permanecieron durante la medición.

La concentración del ARN total ($\text{ng}/\mu\text{l}$) se determinó con el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientifics, Wilmington, DE, EEUU), utilizando $1\ \mu\text{l}$ de cada muestra. Los valores del cociente A_{260}/A_{280} obtenidos oscilaron entre 2,08-2,38. Las mediciones se realizaron por triplicado y se tomó como concentración de ARN de la muestra el valor medio de concentración obtenido de las 3 medidas.

- **Retrotranscripción del ARN**

Para la retrotranscripción del ARN (RT-PCR) se utilizó el kit iScriptTM cDNA Synthesis Kit (Biorad, Hércules, CA, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron placas blancas de 48 pocillos libres de RNasas (Biorad, Hercules, CA, EEUU). El termociclador empleado fue el MiniOpticon Real Time PCR System (Biorad, Hercules, CA, EEUU). En la mezcla de reacción se utilizaron $10\ \mu\text{l}$ de muestra (entre 60 y 500 ng de ARN total). Las muestras se realizaron por triplicado.

- **Amplificación del ADNc mediante PCR a tiempo real**

Se utilizó el termociclador MiniOpticon Real Time PCR System (Biorad, Hercules, CA, EEUU) utilizando los reactivos del kit iQTM SYBR[®] Green Supermix (Biorad, Hercules, CA, EEUU) y siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. A partir de la secuencia del gen que codifica para PREP disponible en el banco de genes (GenBank, NCBI) se diseñaron los cebadores PREP-1 y PREP-2 utilizando el

programa Gene Runner 3.05 (Hasting Software Inc., NY, EEUU). Ambos cebadores fueron sintetizados por Oligomer (Helsinki, Finlandia). El tamaño del fragmento amplificado fue de 360 pares de bases.

La secuencia de nucleótidos de PREP-1 y PREP-2 se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 6. Características de PREP-1 y PREP-2 utilizados en la PCR en tiempo real.

Cebador	Dirección	Secuencia (5' → 3')	Tamaño (nt)	T _m
PREP-1	Sentido	5' ATGCTGTCCCTTCAGTACC C 3'	20 nt	62,8°C
PREP-2	Antisentido	5'GCTGAACGCATAACCTC GG 3'	19 nt	65,5°C

En todas las placas, se utilizaron como blanco tres pocillos en los que en vez de muestra se añadieron 2 µl de agua libre de RNasas. Además, también se utilizaron como patrón interno varias muestras, de las que ya se había hecho la PCR y se conocían los valores de Ct, a fin de poder comparar los Ct obtenidos en sucesivas PCR con el ya conocido y corregir así los Ct de las nuevas muestras, respecto a la desviación entre el valor de Ct inicial y el Ct nuevo del patrón interno. Para comprobar la especificidad del producto amplificado, una vez terminada la PCR a tiempo real, se añadió un programa de aumento de temperatura para verificar la temperatura de fusión (T_m) del amplificado.

Los valores de C_t se compararon con una curva estándar de un fragmento del plásmido de prep cDNA (fragmento Bam HI/Eco RI procedente del plásmido pBADHumPREP, descrito en Venäläinen y cols., 2006).

❖ Estudio de los niveles de las quininas 1 y 2 (ERK 1/2) extracelulares reguladoras de señal

Las quininas 1 y 2 extracelulares reguladoras de señal (ERK 1/2) fueron determinadas mediante inmunoelectrotransferencia. Tras lavar las células con PBS y desprenderlas de las placas, siguiendo el protocolo ya descrito, se tomaron $0,5 \times 10^6$ células. Éstas fueron resuspendidas en 120 μ l de tampón de lisis (20mM Tris HCl, 1% Tritón X-100, 250 mM NaCl, 10% Glycerol, 2 mM EDTA, pH 7.5), en presencia de un cóctel de inhibidores de fosfatasa (PhosSTP; Roche). Las células se sonicaron 5x2 seg., se incubaron 30 minutos en hielo y se centrifugaron (20.000g, 15 min, 4°C). El sobrenadante se congeló a -80°C para hacer la inmunotransferencia. La electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (12% acrilamida-besacrilamida), así como la inmunoelectrotransferencia, fueron realizadas en condiciones estándar. Se realizaron 2 geles idénticos; uno de ellos fue incubado con el anticuerpo anti ERK 1/2 (1:1000, anticuerpo policlonal anti-humano de ratón, Santa Cruz, CA, EEUU), mientras que el otro lo estuvo con anti-fosfo- ERK 1/2 (1:1000, anticuerpo monoclonal anti-humano, Danvers, Mass., EEUU). Tras lavar 3 veces con TTBS (500 μ l Tween-20 en 1 litro de 0,5 M NaCl y 20 mM Tris-HCl pH 7.6), se añadió el anticuerpo secundario (1:3000, complejo IgG-peroxidasa de cabra anti-humano, Pierce, Mass., EEUU) y los geles fueron incubados durante 2 h. La detección de las bandas se llevó a cabo mediante el Supersignal West Femto (Pierce, Thermo Fisher Scientific Inc., EEUU). La señal fue grabada por el Syngene Bio Imager y la densidad de la banda fue medida con el Genesnap software (Syngene, Cambridge, Reino Unido). Las kinasas fosforiladas (p-ERK 1/2) fueron determinadas mediante el cálculo del cociente de las bandas de intensidad de la forma fosforilada en relación a la no fosforilada. Se realizaron 4 experimentos por condición y la densidad de banda se expresó como el valor medio de cada uno de los resultados obtenidos.

2.2.3. Muerte inducida con 6-OHDA

Se utilizaron 4 placas de 96 pocillos en las que se sembraron 90.000 células en cada pocillo en 150µl de medio DMEM/ Ham's F12 (1:1) completo, siguiendo el protocolo ya descrito en el apartado 2.2.1. A las 24 h. se añadió el inhibidor a los pocillos correspondientes (10 µM). Las placas se mantuvieron a 37°C durante 7 horas. Se preparó una batería de tubos con medio completo a los cuales se les añadió el volumen necesario de 6-OHDA con un 0,2% de ácido ascórbico, previamente esterilizado (Acrodisc®, Pall Life Sciences) para obtener concentraciones finales del tóxico entre 30 y 100 µM en presencia y en ausencia de 10 µM de JTP. Se añadieron 150 µl de cada condición a su pocillo correspondiente. De este modo el experimento constaba de pocillos con medio en presencia y ausencia del inhibidor (controles) y pocillos con 6-OHDA en presencia y ausencia del inhibidor. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 15 y 44 h. Para cada tiempo, una placa se utilizó para ensayo de viabilidad por MTT y la otra para la medición de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). Tanto las muestras como los experimentos se realizaron por triplicado.

❖ Medida de la supervivencia tras citotoxicidad inducida con 6-OHDA

La supervivencia se estimó mediante el método MTT. En cada pocillo se añadió 10 µl de la disolución madre de MTT, ya descrita, y la placa se incubó 3 horas a 37°C. Tras aspirar el medio se añadieron 200 µl de DMSO y se midió la absorbancia, a una longitud de onda de 550 nm en un espectrofotómetro (BioRad, Model 550, Hercules, CA, EEUU), tras restar a 655 nm la señal de ruido de fondo.

Los resultados se expresaron como el porcentaje de supervivencia obtenido respecto del control. Las muestras se realizaron por triplicado.

❖ **Medida de la liberación de LDH tras citotoxicidad inducida con 6-OHDA**

Se llevó a cabo mediante el kit Cytotox-ONE™ (Promega, Madison, WI, EEUU). Los reactivos fueron reconstituidos y conservados siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Este kit mide la liberación de la enzima LDH citosólica al medio por parte de las células dañadas, dado que no mantienen la integridad de su membrana. Para ello la conversión de lactato en piruvato llevada a cabo por esta enzima, es acoplada a otra reacción que transforma el producto resazurina en un producto fluorescente llamado resorufina. De este modo, la intensidad de fluorescencia medida es directamente proporcional a la cantidad de LDH presente en el medio. Se añadieron 50 µl del reactivo CytoTox-One a 50 µl del medio de cada pocillo. La lectura de los pocillos se realizó mediante fluorescencia (Varioskan, Thermo, Waltham, MA, EEUU), empleando una longitud de onda de excitación de 560 nm y de emisión de 590 nm. Los resultados se expresaron como el porcentaje respecto al control tras restar el blanco, siendo éste el valor medio de fluorescencia obtenido en los pocillos con medio sin células.

2.2.4. Análisis estadístico de los datos

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa GraphPad Prism (versión 4.03, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EEUU). Los datos procedentes de los estudios de viabilidad y actividad se sometieron a un análisis de varianza (one-way ANOVA), seguido del test de Tukey, a fin de analizar las diferencias entre el grupo control y los grupos problema. Se consideró como estadísticamente diferentes en los casos en los que $P < 0.05$.

Para llevar a cabo el análisis de los transcritos de ARN, los niveles de IP₃ y las bandas de densidad de ERK 1/2 fosforiladas se realizaron

análisis de varianza de 2 o más factores (Two-way ANOVA), seguidos del test de Bonferroni. Los errores estándar de la media (SEM) se mostraron como bandas de error.

Para realizar análisis estadístico para el estudio morfológico de las células SH-SY5Y en presencia y en ausencia de JTP-4918, se recurrió al proyecto R para la computación estadística (<http://www.R-project.org>), utilizando modelos lineales generalizados (McCullagh y Nelder, 1989): regresión de Poisson para los contajes de neuronas diferenciadas y neuritas, regresión gamma para la longitud de las neuritas y regresión logística multinomial para el cómputo de conexiones entre neuronas. Se consideró como estadísticamente diferentes aquellos análisis en los que $p < 0,05$.

RESULTADOS
Y
DESARROLLO
ARGUMENTAL

“Aunque los hombres se jacten de sus grandes acciones, muchas veces no son el resultado de un gran designio, sino puro efecto del azar.”

Francois de la Rochefoucauld (1613-1680), escritor francés.

“Ciencia es todo aquello sobre lo cual siempre cabe discusión”

José Ortega y Gasset (1883-1955), filósofo y ensayista español.

1. RESULTADOS

1.1. Localización de PREP, mediante microscopía confocal, a lo largo de la vida de las células granulares de cerebelo.

PREP fue visualizada a lo largo del cultivo de las células granulares de cerebelo, tras fijar las células con paraformaldehído e incubarlas en presencia del inhibidor fluorescente Fluo-JTP, tal y como se ha detallado en el apartado de metodología. Se encontró que durante los primeros DIV de la diferenciación, y más concretamente en el DIV 3, PREP se localizaba, principalmente, en el núcleo de la mayoría de estas neuronas si bien también aparecía en el citoplasma (ver figura 15.).

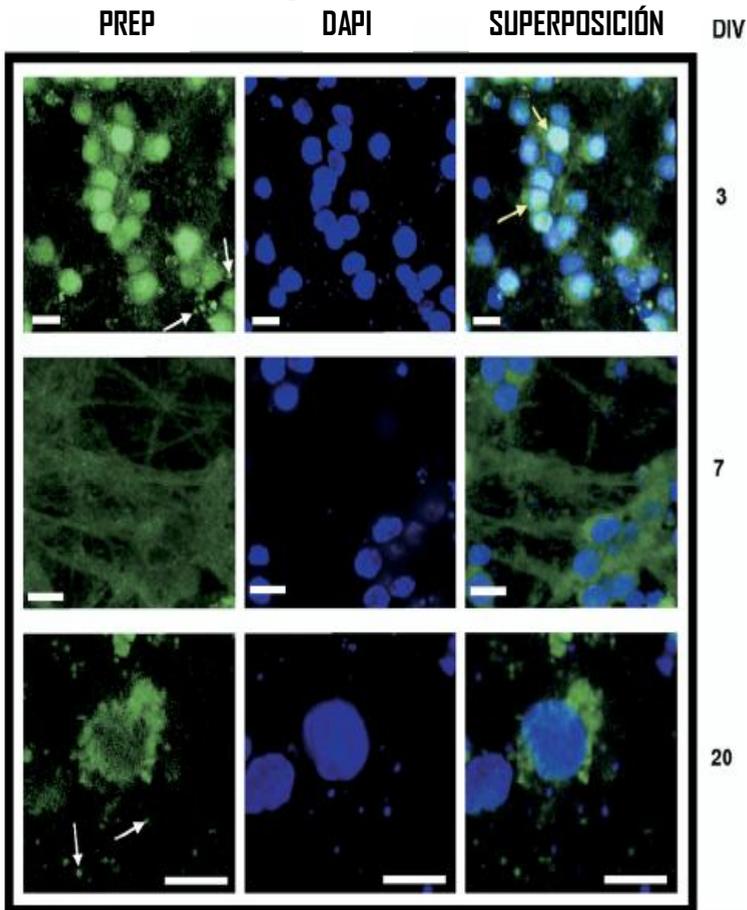


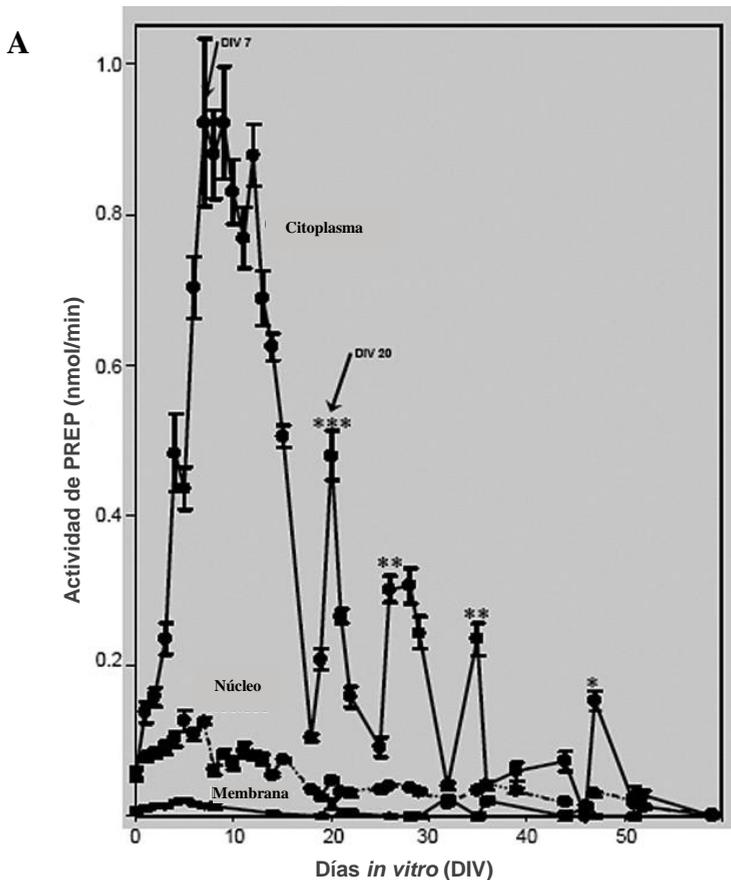
Figura 15. Localización de PREP en el interior de las células granulares de cerebelo a lo largo de su ciclo de vida. Las células fueron fijadas en los días que figuran como DIV, incubadas con el inhibidor de PREP conjugado con fluoresceína (fluo-JTP, en verde) y teñidas con DAPI para la visualización de los núcleos, en azul. Las estructuras similares a vesículas que aparecen en verde están remarcadas mediante flechas blancas. Las flechas amarillas señalan algunos de los núcleos que presentaron PREP en su interior. La barra representa una escala de 10 μm . Las fotos muestran la proyección de: 20 imágenes tomadas a lo largo del eje Z en un espacio de 18.357 μm para el DIV 3; 5 imágenes en un campo de 20 μm (DIV 7); y 25 imágenes en un espacio de 25 μm (DIV 20).

Los núcleos aparecieron intensamente marcados, pudiéndose distinguir claramente del citoplasma (ver flechas amarillas en la figura 15.). La fluorescencia también se localizó alrededor de los núcleos, de forma intensa, a modo de agrupaciones de vesículas en forma de racimo- en cuyo interior también se encontró la enzima. Además, se encontraron vesículas intensamente fluorescentes dispersas y alejadas de los núcleos (ver flechas blancas en la figura 15.).

En las neuronas maduras de 7 días, PREP se encontró ampliamente distribuida por todo el citoplasma y también en la red de conexión de las neuritas, sin seguir un patrón determinado. En las neuronas envejecidas (DIV 20) PREP tendió a “migrar” hacia el soma nuclear, localizándose perinuclearmente, en el interior de vesículas. También fue posible distinguir pequeñas agrupaciones de fluorescencia intensa - al igual que durante los primeros estadios de la diferenciación-, situadas lejos del núcleo y ampliamente distribuidas en la preparación, sin seguir un patrón marcado. Durante esta fase, a diferencia de lo observado durante la maduración (DIV 7), las proyecciones de las neuritas no aparecieron marcadas con el inhibidor fluorescente.

1.2. Patrón de la actividad de PREP en el citoplasma, en el núcleo y en las membranas durante el ciclo de vida de las células granulares de cerebelo.

Las células fueron cultivadas hasta los tiempos que aparecen en la figura 16, tras lo cual se lisaron siguiendo el protocolo descrito en el apartado de metodología. Una vez obtenidos los extractos citoplasmáticos, nucleares y membranales a estos tiempos, se procedió a la medida de la actividad de PREP presente. Se encontró que el patrón de actividad de PREP fue diferente entre las distintas fracciones celulares (citoplasmática, nuclear y membranal) analizadas, así como a lo largo del tiempo para cada una de las fracciones. Además, dicho patrón de actividad se ajustó a los resultados obtenidos de la localización de la enzima, mediante su unión a Fluo-JTP, a lo largo de la vida de las células granulares de cerebelo (ver figuras 15 y 16).



B

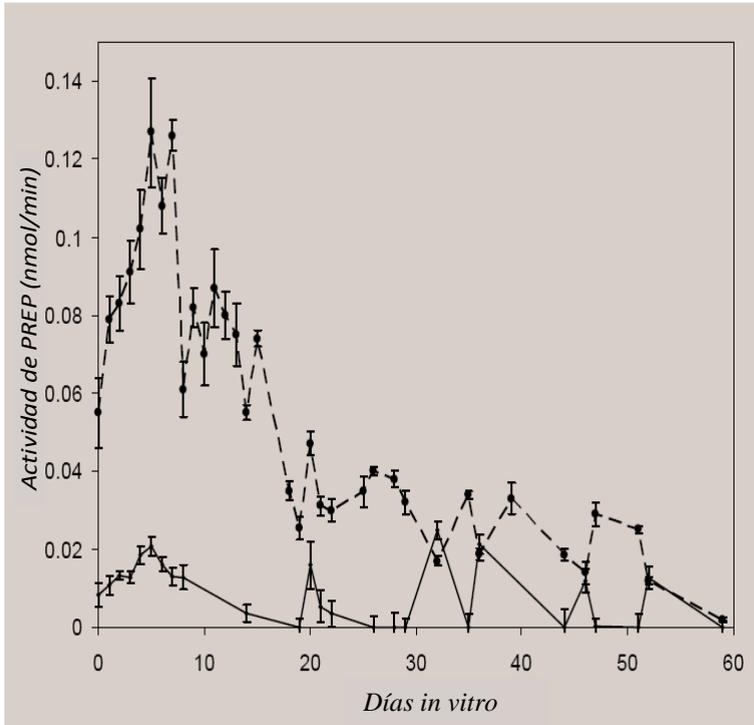


Figura 16. Registro de las oscilaciones de la actividad de PREP en la fracción citosólica, nuclear y membranar a lo largo del ciclo vital de las células granulares de cerebelo. Cada medida fue realizada por triplicado. Las barras de error indican \pm S.E.M., $n=6-18$. Los valores de p hacen referencia al valor con respecto al pico anterior: * <0.05 ; ** <0.01 ; *** <0.001 . Las flechas muestran los puntos en los que se hizo la inmunotransferencia (DIV 7 y DIV 20). (A) Actividades de PREP en los extractos citosólicos (línea continua), nucleares (línea discontinua) y membranar (línea fina). (B) Ampliación de la imagen A. Actividad de PREP en la fracción nuclear (línea discontinua) y membranar (línea continua).

Sin embargo, este patrón de actividades fue mucho más curioso de lo que realmente se esperaba. A partir del DIV 7, cuando las células

expresaron el pico más alto de actividad de la enzima, se encontraron otros picos posteriores a lo largo del cultivo de las neuronas.

En el DIV 1 la actividad de PREP fue relativamente pequeña en el citoplasma, la cual aumentó unas diez veces hasta el DIV 7, durante la diferenciación neuronal y cuando las células ya desarrollaron sus conexiones entre ellas (ver la figura 16A). El pico de expresión de PREP, en el DIV 7, coincidió con el momento de la completa diferenciación en las células granulares de cerebelo. Posteriormente, la actividad total de PREP disminuyó hasta los DIV 10-11, momento en el que volvió a ascender hasta alcanzar otro pico máximo en el DIV 13. Durante los siguientes 25-26 días se encontraron picos oscilantes de actividad con una frecuencia de entre 7 y 8 días, esto es, con picos de actividad alrededor de los DIV 20, 28, 35 y 42, con descensos consecutivos en “amplitud”. A su vez, el pico 42 coincide con un descenso brusco en el número de células (ver figura 17). Pese a que las células comenzaron a morir a partir de este punto, alrededor del día 49 se detectó otro pico de actividad significativamente más alto que el previo. A continuación, se observó un descenso de la actividad de PREP hasta cero en el DIV 59 (Figura. 16), punto en el que la viabilidad también se acercó a cero (Figura. 17).

El comportamiento de la actividad de PREP en la fracción nuclear correspondiente al DIV 1 fue comparable con el observado en el citosol, si bien los niveles detectados fueron diez veces menores (ver figura 16). Sólo se detectó un ligero aumento durante la maduración, si bien permaneció casi constante durante la diferenciación y maduración. Finalmente, el nivel de la actividad de PREP decayó en el punto en el que también se detectó la mínima viabilidad celular (DIV 59) (ver figuras 16 y 17). La actividad de PREP en el núcleo no fue cíclica. Se encontró un aumento pequeño, pero significativo, en los días 7-8;

Resultados y desarrollo argumental

después del cual ésta descendió lentamente hasta que la viabilidad celular fue prácticamente nula (Figs. 16 y 17).

En cuanto a la actividad de PREP asociada a las membranas, sólo resultó ser el 10% de la actividad citosólica o nuclear en el DIV 1 (ver figura 16). En los días posteriores se apreció un ligero aumento, hasta el día 7-8; a partir del cual descendió hasta alcanzar niveles indetectables (DIV 18). A medida que las células fueron envejeciendo se detectaron picos oscilantes en la actividad, si bien dichos niveles se encontraron muy cercanos al límite de detección (Figura. 16).

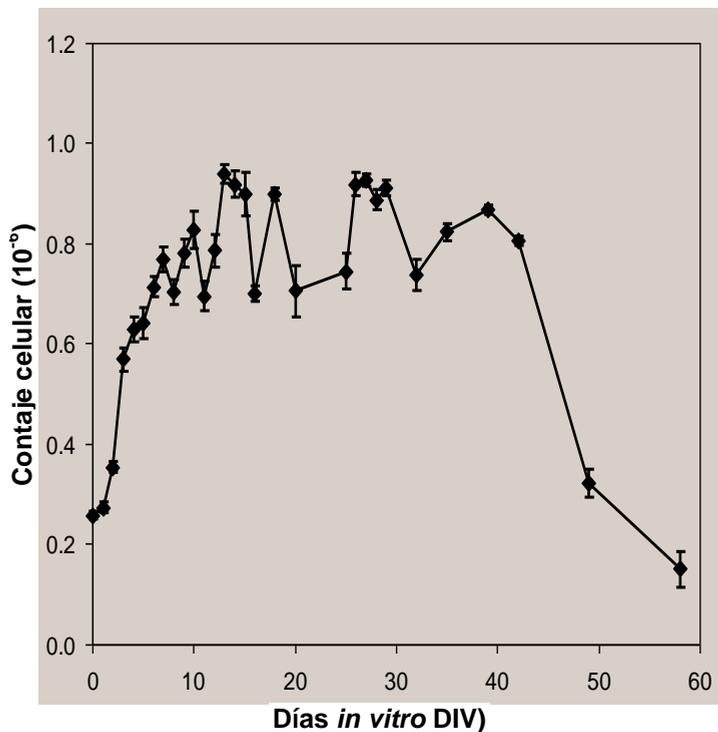


Figura 17. Curva de viabilidad de las células granulares de cerebelo in vitro. El número de células es solamente relativo. La viabilidad celular en el DIV 0 fue medida mediante un microscopio, empleando un hemocitómetro. La recta estándar fue construida representando el número de células obtenido mediante contaje, frente al valor correspondiente obtenido mediante absorbancia por el método de MTT. El crecimiento

aparente que se observó tras los primeros días del cultivo, dado que estas células no se dividen, se debió al aumento del volumen celular y al crecimiento y desarrollo de las neuritas. El valor absoluto de células fue prácticamente el mismo hasta el día 42, a partir del cual las células comenzaron a morir rápidamente hasta el día 59.

La presencia de la proteína PREP en las diferentes fracciones subcelulares fue confirmada mediante electroinmunotransferencia, utilizando un anticuerpo anti-PREP específico, ya descrito (Myöhänen y cols., 2007). En la figura 18 aparecen las fracciones citoplasmáticas, nucleares y membranales procedentes de las células granulares de cerebelo en cultivo, correspondientes al DIV 7 y al DIV 20. Los niveles de proteína detectados no se correspondieron con los niveles de actividad medidos en estos puntos. Mientras que en el DIV 7 la actividad en el citosol fue diez veces superior a la actividad medida en el núcleo, la intensidad de la banda obtenida mediante electroinmunotransferencia fue sólo ligeramente superior en la fracción citoplasmática que en la fracción nuclear. La fracción correspondiente a las membranas también mostró cantidades considerables de proteína PREP en comparación con los niveles de la actividad de PREP registrados, siendo éstos cien veces inferiores a los detectados en la fracción citoplasmática.

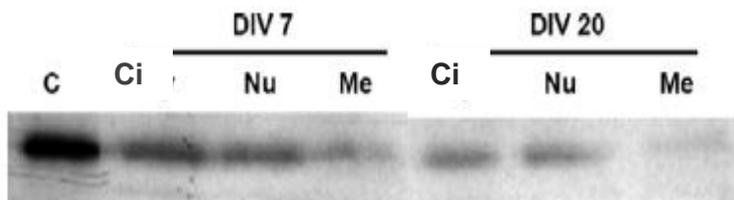
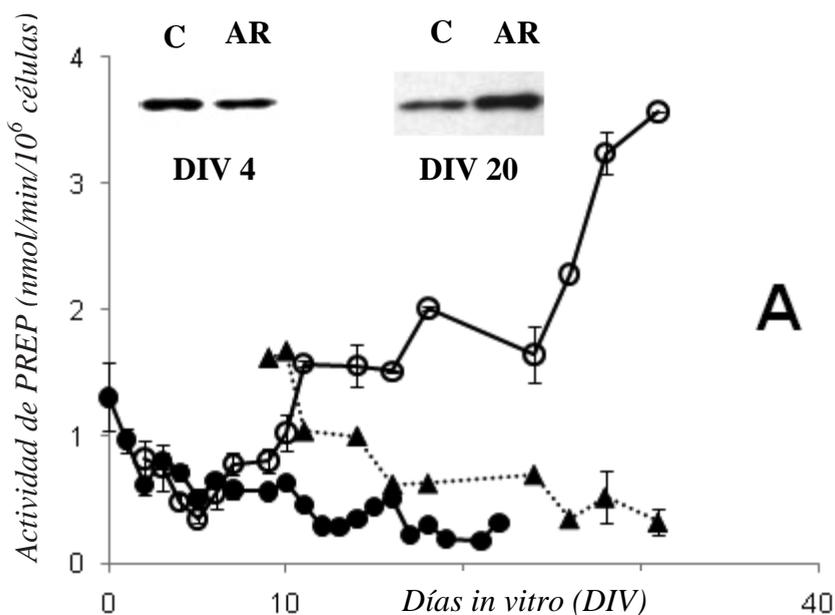


Figura 18. Detección de la proteína PREP mediante inmunoelectrotransferencia. La electroforesis se realizó con 10 µg de proteína procedentes de la fracción citoplasmática (Ci), nuclear (Nu) y membranal (Me) obtenidas a partir de un cultivo de células granulares de cerebelo, correspondientes al DIV 7 y al DIV 20. La detección de PREP se llevó a cabo mediante un anticuerpo específico anti-PREP. Se utilizó PREP recombinante purificada como control (C). Las condiciones se describen en el apartado de metodología.

1.3. Niveles de la actividad de PREP durante la proliferación y la diferenciación de la línea celular SH-SY5Y.

Se midieron los niveles de actividad de PREP en los extractos citoplasmáticos y nucleares de las células SH-SY5Y en proliferación durante más de 30 días. Tal y como se puede apreciar en la figura 19A, se observó que la actividad de PREP en el citoplasma disminuyó lentamente y de forma continua a partir del día 0, a medida que las células iban dividiéndose, hasta que alcanzaron el estado de confluencia en las placas -hecho que sucedió entre los días 10 y 15 tras el cultivo-. A partir del día 15 la actividad de PREP citosólica se mantuvo a niveles bajos hasta el final del experimento.



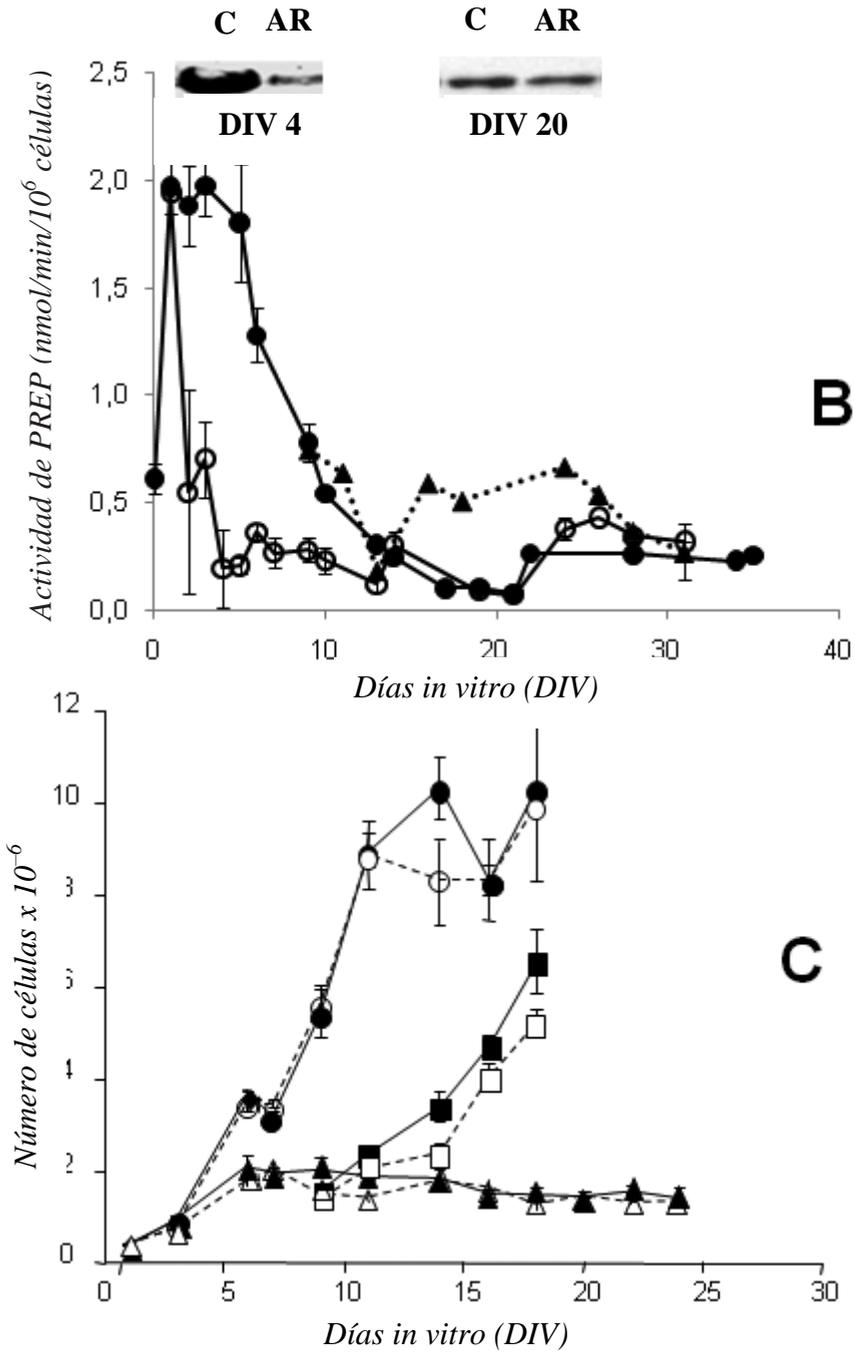


Figura 19. Niveles de actividad de PREP frente a los días in vitro (DIV) en citoplasma (A) y en núcleos (B) determinados en células SH-SY5Y en condiciones control (●), tras inducir la diferenciación con ácido retinoico (AR) (10 μ M; ○) y tras retirar el AR (▲).

Resultados y desarrollo argumental

Los niveles de proteína de PREP determinados mediante inmunoelectrotransferencia para el DIV 4 y el DIV 20 en las células control (C) y las células en diferenciación inducida (RA) figuran en un recuadro, en la parte superior de las gráficas A y B. (C) Curva de crecimiento de las células SH-SY5Y en condiciones de proliferación (●,○), durante la diferenciación inducida con ácido retinoico (▲ y Δ), tras retirar el ácido retinoico(■ y □) y

Por otra parte, en el DIV 1 la actividad de PREP dentro de los núcleos aumentó hasta tres veces tras compararla con los niveles encontrados inicialmente (DIV 0), tal y como se puede apreciar en la figura 19B. Este aumento de la actividad nuclear, que supera en un 200% la actividad medida en los citoplasmas, se mantuvo hasta el DIV 5. Tan pronto como las células entraron en la fase logarítmica de crecimiento (del DIV 5 en adelante; ver figura 19C), la actividad de PREP nuclear disminuyó drásticamente hasta que las células alcanzaron la confluencia en la placa, hecho que ocurrió a partir del día 10. En ese momento, la actividad de PREP en los núcleos alcanzó el mismo nivel que el detectado en los citoplasmas.

Paralelamente se registró la actividad de PREP en un cultivo, en el cual se indujo la diferenciación de las neuronas mediante la adición de ácido retinoico en el DIV 1. Bajo estas condiciones, la actividad citoplasmática era similar a la registrada en las células control hasta el DIV 5 (ver figura 19A), momento en el que las células dejaron de proliferar para poder diferenciarse, tal y como se aprecia en la figura 19C. Se observó un aumento constante de la actividad de PREP citoplasmática a partir del DIV 5 hasta el DIV 10, instante en el que apareció una meseta hasta el DIV 25, tras lo cual aumentó de forma abrupta.

Por otra parte, la actividad de PREP en los núcleos disminuyó considerablemente en el DIV 2, es decir, transcurridas 24 horas tras la adición del ácido retinoico, hasta alcanzar niveles similares a los

medidos en el control. La actividad de PREP nuclear se mantuvo baja hasta el final del experimento.

A las 24 horas de retirar el ácido retinoico (DIV 8), la actividad de PREP en el citoplasma disminuyó hasta alcanzar niveles similares al control (ver figura 19A). En estas mismas condiciones, la actividad de la enzima en los núcleos también fue similar a los niveles encontrados en el control (ver figura 19B). Sin embargo, tras el DIV 10, se observó un aumento continuo de la actividad nuclear, momento que coincidió con un incremento en la proliferación de las células, tal y como se puede observar en la figura 19C. Finalmente, tras el DIV 25 y una vez alcanzado el estado de confluencia, la actividad de PREP en los núcleos volvió a disminuir hasta alcanzar los niveles encontrados en el control.

Los cambios en los niveles de actividad de PREP, tanto en los citoplasmas como en los núcleos, se correlacionaron con los cambios observados en los niveles de proteína analizados por inmunoelectrotransferencia, tal y como se muestra en el recuadro superior de las gráficas 19A y 19B.

El conteo celular se llevó a cabo en una cámara Bürker; tanto en condiciones control como tras la adición (en el DIV 1) y eliminación (en el DIV 8) del ácido retinoico, siguiendo el protocolo explicado en el apartado de metodología.

En estos experimentos también se estudió el efecto de la inhibición de PREP con 10 μM de JTP-4819 (ver figura 19C). Pese a que dichas concentraciones fueron suficientes para inhibir la enzima casi totalmente (ver figura 12), no se apreció ningún cambio en el crecimiento de las neuronas respecto a aquellas que crecieron en condiciones control, en presencia del ácido retinoico o tras eliminarlo, como se muestra en la figura 19C. Estos mismos resultados también se observaron al utilizar 10 μM de ZPP y 10 μM de KYP-2047.

1.4. Variaciones en la transcripción del gen que codifica para PREP durante la diferenciación de las células SH-SY5Y inducida por el ácido retinoico.

Con la finalidad de esclarecer el origen del aumento de la actividad de PREP observada tras la diferenciación inducida por el ácido retinoico, se midieron los niveles de transcripción del gen *prep*, de acuerdo a lo expuesto en el apartado de metodología.

Se midieron los niveles de ARNm de *prep* en condiciones de proliferación (control), durante la inducción de la diferenciación en presencia de 10 μ M de ácido retinoico, así como tras la eliminación de este inductor.

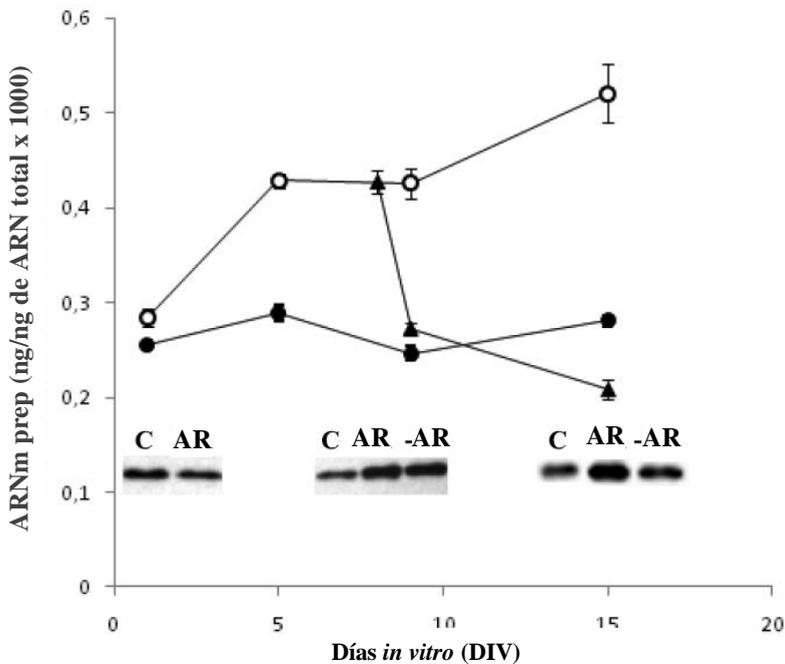


Figura 20. Niveles de ARNm de *prep* en las células SH-SY5Y en condiciones control (●), tras la inducción de la diferenciación con 10 μ M de ácido retinoico (○) y tras la eliminación del mismo (▲) a lo largo del cultivo celular (en DIV). Los niveles de ARNm fueron medidos mediante RT-PCR cuantitativa, utilizando el ARN total extraído tras la lisis de 0.5×10^6 células en cada una de las condiciones mencionadas y siguiendo el protocolo descrito en el apartado de metodología.

En la parte inferior de las curvas de expresión del ARNm de prep, se representan los niveles de proteína PREP determinados mediante la técnica de inmunoelectrotransferencia para el DIV 1, DIV 9 y DIV 15 en condiciones control (C), durante la diferenciación inducida con el ácido retinoico (AR) y tras eliminarlo (-AR).

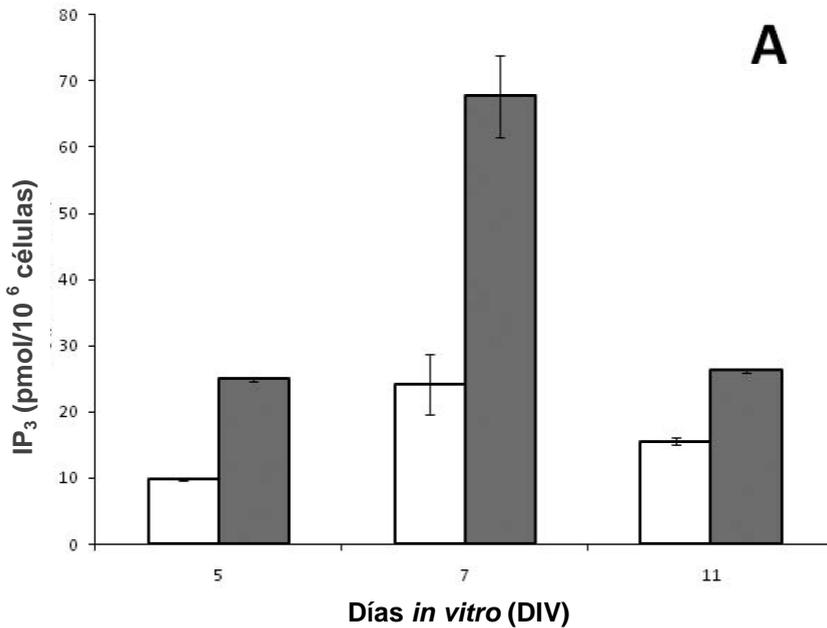
Tal y como muestra la figura 20, los niveles de ARNm de *prep* no variaron durante el cultivo de las células en condiciones control. Sin embargo, sí se registró un aumento considerable de los niveles de ARNm de *prep* tras la adición del ácido retinoico, observándose un incremento de la transcripción de entre el 60 y el 100% los DIV 5, 9 y 15 en comparación con las condiciones control ($p < 0,005$) (ver figura 20). Tras la eliminación del ácido retinoico de los medios de cultivo (DIV 8), donde se encontraban las células bajo condiciones de diferenciación, los niveles de ARNm de *prep* descendieron hasta los encontrados en las células control, es decir, bajo condiciones de proliferación (ver figura 20). Esta variación era consistente con los cambios observados en la inmunoelectrotransferencia que figura debajo de las curvas de la figura 20.

1.5. PREP y el sistema de señalización en las células SH-SY5Y.

Con el propósito de esclarecer qué función ejerce PREP en la diferenciación de las células SH-SY5Y con ácido retinoico, que justifique tanto el aumento de la actividad enzimática como de los niveles de expresión del gen que la codifica observados, se estudió la posible relación de esta enzima con vías de señalización, que bien guardan una relación estrecha con PREP- como el IP_3 - o bien que está implicada en la diferenciación de la línea celular SH-SY5Y con el ácido retinoico- como la vía de las quinasas extracelulares reguladoras de señal (ERK 1/2)-, ambas descritas en la introducción.

1.5.1. Inositol trifosfato (IP₃)

Se midieron los niveles de IP₃ en las células SH-SY5Y tras la inducción de la diferenciación con ácido retinoico, y se compararon con los detectados en condiciones de proliferación (control), tanto en presencia como en ausencia de inhibidores de PREP. La figura 21 muestra los niveles celulares de IP₃ en el DIV 5, DIV 7 y DIV 11 medidos en células que se encontraban tanto en condiciones de proliferación como de diferenciación con ácido retinoico.



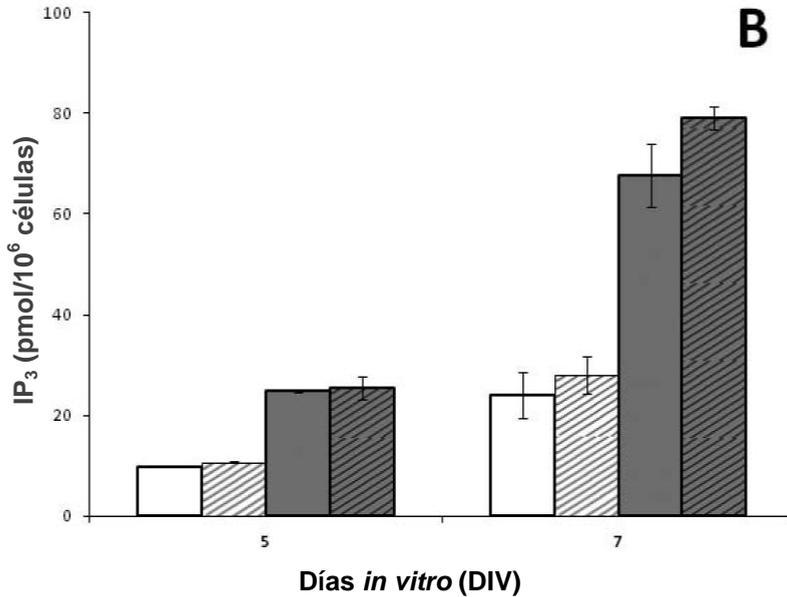


Figura 21. Diagrama de barras que muestra los niveles de IP_3 en células SH-SY5Y cultivadas bajo condiciones de proliferación (barra blanca) o tras la inducción de la diferenciación con ácido retinoico (barra gris), tanto en ausencia (A) como en presencia de $10 \mu M$ de JTP-4819 (B, barras rayadas). La diferencia entre los niveles de IP_3 en condiciones control y en presencia de ácido retinoico eran significativas (DIV 5, $p < 0,005$; DIV 7, $p < 0,05$ y DIV 11, $p < 0,01$), mientras que no se observó ningún cambio significativo en presencia del inhibidor en ninguna de las condiciones anteriores (control vs. ácido retinoico).

Durante la proliferación se observó que los niveles de IP_3 mostraban un aspecto acampanado con un pico el DIV 7, momento que coincidió con el aumento del crecimiento celular (ver figura 19C) y una disminución considerable de la actividad nuclear de PREP (ver figura 19B). Bajo estas condiciones, se detectó una disminución de los niveles de IP_3 en el DIV 11, momento que coincidió con el estado de confluencia de las células (ver figura 19C) y en el que la actividad de PREP en los núcleos o citoplasmas era mínima.

En condiciones de diferenciación inducida por el ácido retinoico, se observó un comportamiento muy similar al obtenido en condiciones control. Sin embargo, los niveles de IP_3 encontrados durante la diferenciación eran casi tres veces superiores a los medidos en las células bajo proliferación en todos los DIV analizados. Resulta interesante mencionar que en presencia del ácido retinoico, el pico de mayor nivel de IP_3 medido correspondió al DIV 7, momento en el que las células estaban diferenciadas y su crecimiento se encontraba detenido (ver figura 19C), a la vez que la actividad de PREP en el citoplasma y en el núcleo eran bajas. En el DIV 11, cuando los niveles de IP_3 se encontraban, de nuevo, disminuidos, la actividad de PREP en los citoplasmas alcanzó la meseta. La inhibición de PREP con $10 \mu M$ de JTP-4819 desde el DIV 0 no produjo ninguna variación de los niveles de IP_3 en estos experimentos, ni en condiciones de proliferación ni de diferenciación inducida, tal y como refleja la figura 21B.

1.5.2. Quinasas extracelulares reguladoras de señal (ERK 1/2)

Como ya se ha descrito en la introducción de esta tesis, ERK 1 y ERK 2 son quinasas de la familia de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK) implicadas en la regulación de muchos procesos celulares, especialmente en la proliferación y en la diferenciación. También se ha expuesto que el ácido retinoico actúa a modo de un interruptor en un programa genético que implica la activación de ERK 1/2.

Se midieron los ratios de fosforilación de ERK 1/2 en las células SH-SY5Y durante el DIV 5 y DIV 9 en condiciones de proliferación (control), tras la inducción de la diferenciación con ácido retinoico y tras la inhibición con $10 \mu M$ de JTP-4819. Los resultados obtenidos en este experimento se exponen en la figura 22.

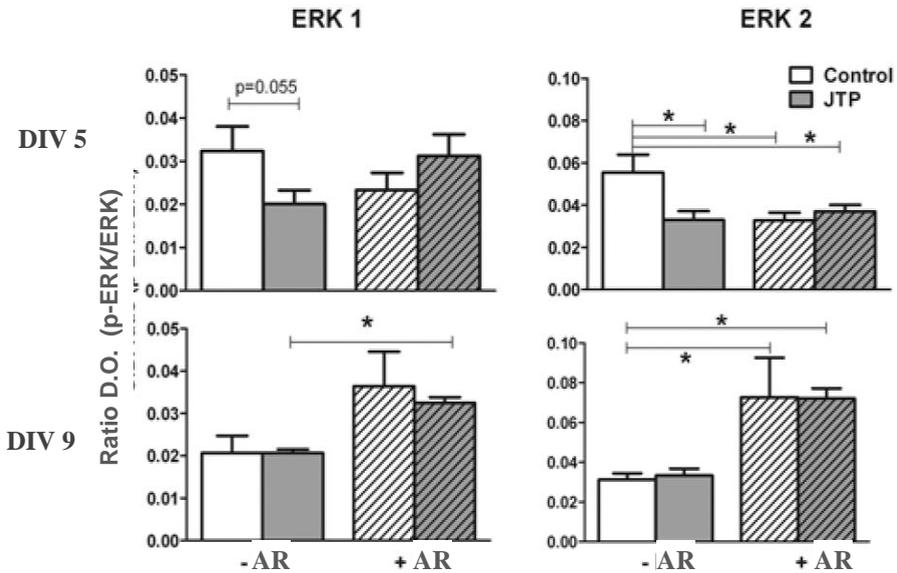


Figura 22. Ratios de fosforilación (p-ERK/ERK) para ERK 1/2 durante la proliferación y diferenciación con ácido retinoico en células SH-SY5Y. El experimento se realizó en el DIV 5 y DIV 9, bajo condiciones control (barras blancas), en presencia de JTP-4819 (barras grises), y en presencia y ausencia de ácido retinoico (barras rayadas). * $p < 0,05$. El ácido retinoico fue eliminado en el DIV 8 (-AR).

En estas condiciones, se vio que el ácido retinoico indujo una disminución de los niveles de fosforilación de ERK 1/2 en estadios tempranos (DIV 5), lo cual fue significativo únicamente para ERK 2. Sin embargo en estadios tardíos (DIV 9), la ratio de ambas quinasas fosforiladas aumentaron notablemente.

Durante las primeras etapas (DIV 5) de la diferenciación con el ácido retinoico, la inhibición de PREP no produjo ningún efecto en los niveles de fosforilación de ERK 2 y sólo indujo un ligero aumento en la fosforilación de ERK 1, similar a la disminución encontrada en condiciones control. En condiciones de proliferación (control), la inhibición de PREP indujo una disminución de los niveles de ambas quinasas -si bien sólo resultó significativo en el caso de ERK 2-, de

modo que el inhibidor de PREP simuló el efecto observado con el ácido retinoico.

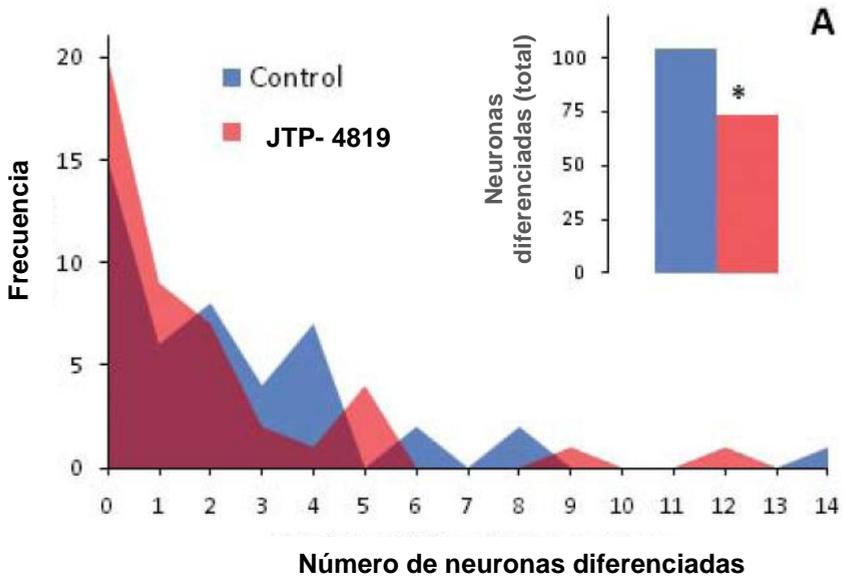
En etapas más tardías (DIV 9) JTP-4819 no indujo ningún cambio en los niveles de fosforilación de ERK $\frac{1}{2}$, en el caso de células tratadas con ácido retinoico (+AR) ni tras su eliminación (-AR). PREP fue inhibida también con ZPP, obteniéndose los mismos resultados que en el caso del JTP-4819.

1.6. La inhibición de PREP induce cambios morfológicos en las células SH-SY5Y diferenciadas con ácido retinoico.

El desarrollo de neuritas y la conformación de árboles o redes de proyecciones son rasgos morfológicos clave en la caracterización de la diferenciación de las neuronas. El crecimiento de neuritas juega un papel fundamental tanto en procesos de plasticidad como en la regeneración neuronal. La diferenciación de las células SH-SY5Y con el ácido retinoico se ha utilizado como modelo para estudiar procesos moleculares implicados en la formación de neuritas, tal y como se ha explicado en la introducción.

Pese a encontrar un aumento de la actividad enzimática de PREP, así como de los niveles de expresión del gen que la codifica, durante la diferenciación de las células SH-SY5Y inducida con el ácido retinoico, no se encontró que la inhibición de esta enzima indujese cambios en la viabilidad celular, ni cambios morfológicos detectables a simple vista. Esto condujo a la realización de un examen más minucioso en el que se estudiaron diversos parámetros morfológicos, con el fin de estudiar si PREP jugaba algún papel en la morfogénesis inducida por el ácido retinoico en las células SH-SY5Y. Se trabajó con células en el DIV 6, en presencia y en ausencia de $10 \mu\text{M}$ de JTP-4819.

La figura 23 muestra las frecuencias estadísticas de encontrar un número determinado de neuronas diferenciadas, un número determinado de neuritas así como un tamaño definido de neuritas por campo, tanto en cultivos control como en presencia del inhibidor de PREP en el medio de cultivo.



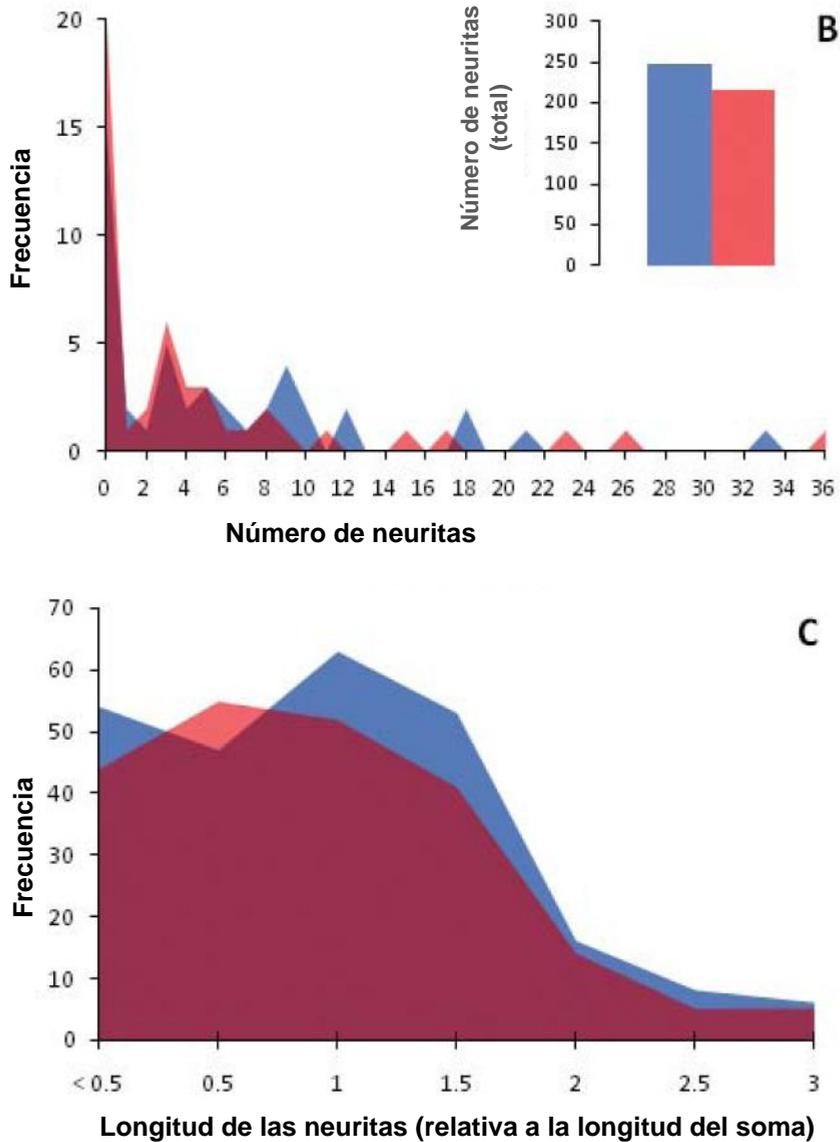


Figura 23. Frecuencia estadística de encontrar un número determinado de células con aspecto neuronal (A), de neuritas por célula y por campo (B) y una longitud de neurita concreta (C), en células SH-SY5Y tratadas con ácido retinoico en ausencia (áreas y barras azules) y en presencia (áreas y barras rojas) de JTP-4819. Tanto el contejo como el análisis estadístico se llevó a cabo tal y como se explica en el apartado de materiales y métodos. El contejo total aparece en el recuadro. * $p < 0,05$.

La frecuencia de encontrar células no diferenciadas o únicamente una neurona diferenciada por campo, fue significativamente mayor cuando PREP estaba inhibida. La frecuencia de encontrar dos o más células diferenciadas por campo también fue considerablemente menor en presencia del inhibidor, tal y como se puede apreciar en la figura 23A. Al contar el número total de células diferenciadas en condiciones control y en presencia de JTP-4819, se pudo determinar que este número era significativamente menor cuando las células tenían el inhibidor de PREP en el medio. Asimismo, la frecuencia estadística de encontrar, en un campo, células que carecieran de neuritas era considerablemente superior en aquellas células que habían sido tratadas con JTP-4819 que en aquellas no tratadas (control). De forma general, la probabilidad de detectar pocas neuritas (menos de cuatro) también era mayor en aquellos cultivos en los cuales PREP se encontraba inhibida (ver figura 23B).

Además, la frecuencia de detectar una determinada longitud de las neuritas también era menor cuando el inhibidor de PREP se encontraba presente en el medio, al compararla con la frecuencia hallada en aquellos cultivos carentes del mismo (ver figura 23C).

Respecto al número de conexiones encontradas entre las diversas neuronas, los resultados hallados también se ajustaban a los resultados mostrados en la figura 23. La figura 24 muestra que el número de neuronas que no desarrollaban ninguna conexión con sus neuronas vecinas era significativamente mayor en presencia de JTP-4819 que en el control, mientras que en éste último el número de neuronas que establecían una única conexión era mayor que en presencia del inhibidor.

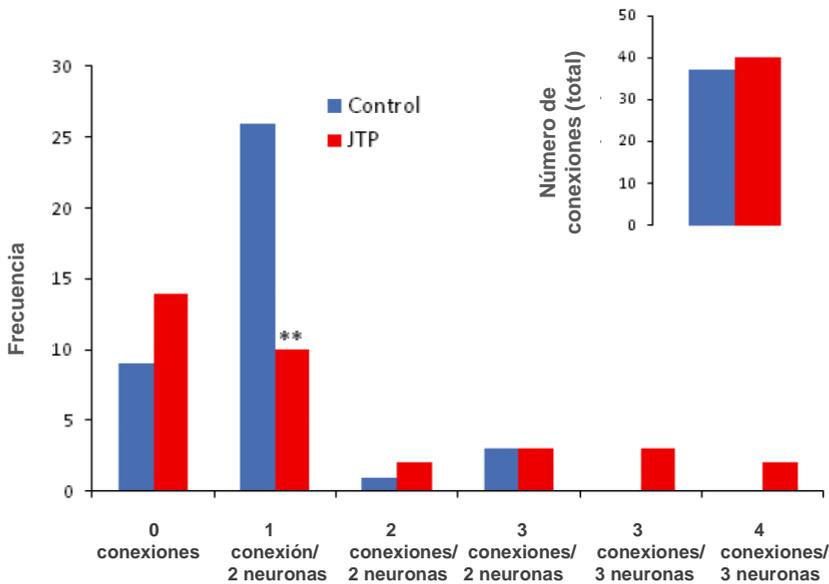


Figura 24. Frecuencia del número de conexiones entre neuronas medida el DIV 6 en células SH-SY5Y, bajo la diferenciación inducida con ácido retinoico y en ausencia (barras azules) o en presencia (bandas rojas) del inhibidor JTP-4819. Las frecuencias representadas hacen referencia al conteo obtenido en cinco campos por placa, tomados al azar, en tres placas diferentes. Se tomaron como significativamente diferentes aquellos valores en los que $p < 0,05$.

Por el contrario, no se observó ninguna diferencia entre las células control y las tratadas con JTP-4819 respecto a la frecuencia de aparición de dos o más conexiones entre dos neuronas. Curiosamente, en presencia del inhibidor de PREP se vio que la frecuencia de aparición de tres o cuatro conexiones entre tres neuronas era mayor que en el caso de los controles.

1.7. Los inhibidores de PREP no protegen frente a la muerte inducida con diversos tóxicos.

Con el fin de poder determinar si los inhibidores de PREP revertían la muerte inducida en cultivos primarios de células granulares de cerebelo se llevaron a cabo ensayos de viabilidad, en las diversas condiciones expuestas en la siguiente tabla:

Tabla 7. Condiciones y resultados obtenidos tras la muerte inducida en células granulares de cerebelo con diversos tóxicos en presencia y en ausencia de inhibidores de PREP (experimentos realizados por triplicado).

DIV	Concentración del inhibidor y tiempo de incubación antes de añadir el tóxico	Concentración utilizada del tóxico	% de viabilidad a las 48 horas en presencia del tóxico sin inhibidor	% de viabilidad a las 48 h. en presencia del tóxico y del inhibidor
6	5 μM Fluo-JTP; 30 min.	5 mM K⁺	60-70	60-70
6	10 μM ZPP; 24 h.	5 mM K⁺	60-70	60-70
6-7	10 μ M ZPP; 30 min.	50 μ M 6-OHDA	40-50	40-50
5-6	10 μ M ZPP; 24 h.	50 μ M 6-OHDA	50-60	50-60
0	10 μ M ZPP; 24 h.	50 μ M 6-OHDA	60-70	60-70
5	10 μM ZPP; 24 h.	100 μM H₂O₂	50-60	50-60
1	10 μM ZPP; 24 h.	70 μM H₂O₂	50-60	50-60

Resultados y desarrollo argumental

La viabilidad celular se determinó por el método del MTT, descrito en el apartado de metodología.

Los porcentajes de viabilidad encontrados en células tratadas con estos tóxicos, en las condiciones mostradas en la tabla, eran muy similares en presencia o en ausencia de los inhibidores de PREP, por lo que se pudo concluir que esta enzima no estaba implicada en la muerte inducida por dichos tóxicos. Los controles (sin tóxico) en presencia y en ausencia de inhibidor, utilizados en estos experimentos, mostraron el mismo patrón de viabilidad celular; descartándose cualquier posible efecto tóxico de los inhibidores de PREP.

Para una misma concentración de tóxico, la supervivencia de las células resultó ser independiente del DIV en el que se encontraban y del momento de la adición del inhibidor.

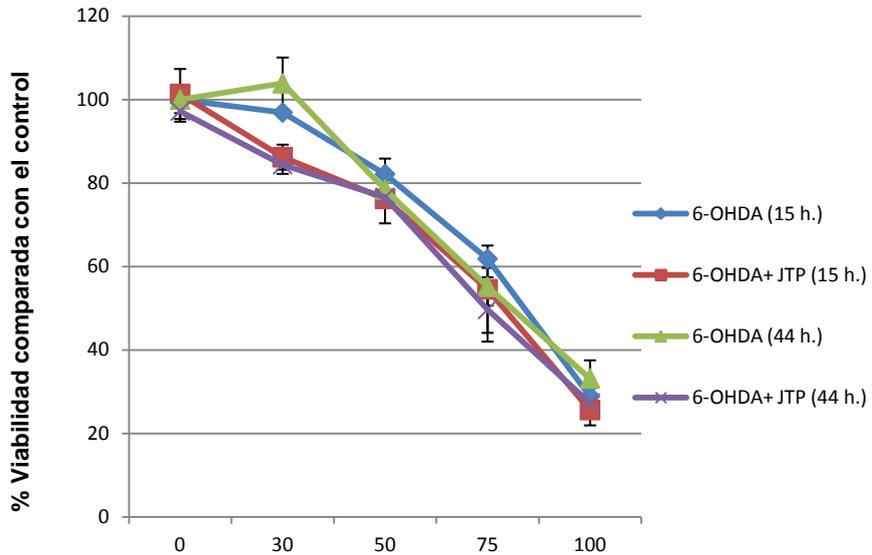
Paralelamente se realizaron ensayos de actividad de PREP en cada uno de los experimentos, observándose que la actividad de PREP en aquellas células tratadas con los tóxicos disminuía a medida que disminuía la viabilidad celular.

Con el fin de comprobar si estos resultados también eran reproducibles en otro tipo celular, se procedió a inducir muerte por apoptosis en células SH-SY5Y en presencia de 6-OHDA y, del mismo modo que sucedía en las células granulares de cerebelo, el inhibidor no produjo ningún cambio en la viabilidad celular (ver figura 25A).

Paralelamente se hizo un ensayo de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa, tal y como se describe en el apartado de metodología, la cual aumentaba a medida que la viabilidad celular disminuía- como rasgo característico de su liberación tras la muerte celular por apoptosis (ver figura 25B).

Resultados y desarrollo argumental

A



B

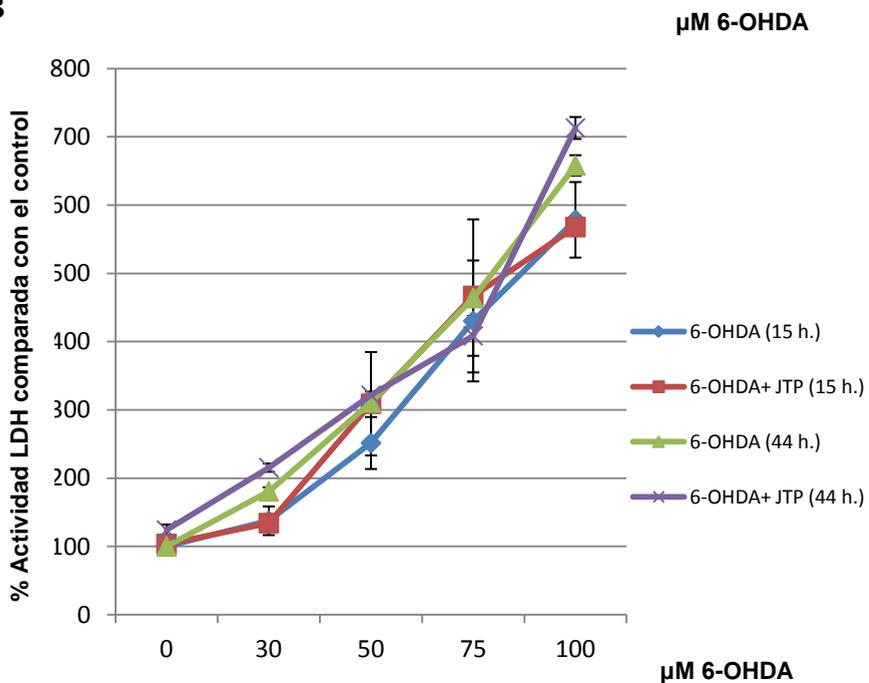


Figura 25. Disminución de la viabilidad y de la actividad lactato deshidrogenasa tras la muerte inducida en células SH-SY5Y con distintas concentraciones de 6-OHDA. (A) % de viabilidad celular. Las células fueron incubadas con 10 μM de JTP durante 7 horas antes de añadir el tóxico (experimento realizado por triplicado). No se encontró ningún efecto protector del inhibidor. (B) Aumento de la actividad LDH liberada tras la muerte inducida. Se consideró como significativamente diferentes cuando $p < 0,05$.

2. DESARROLLO ARGUMENTAL

2.1. Localización de PREP, mediante microscopía confocal, a lo largo de la vida de las células granulares de cerebelo.

En esta tesis se recogen los patrones de expresión y de actividad de PREP a lo largo de la diferenciación, maduración y envejecimiento de cultivos primarios de células granulares de cerebelo. Para ello se ha recurrido a la utilización del Fluo-JTP, un inhibidor fluorescente específico de PREP, como una herramienta adecuada para estudiar la localización de esta enzima a nivel intracelular durante estos procesos. Estudios recientes, así como los resultados que se muestran en este trabajo, confirman el hecho de que PREP no es únicamente una enzima citoplasmática que se expresa de forma constitutiva, sino todo lo contrario, que se encuentra estrechamente regulada y se ubica en otros compartimentos celulares, y quizás extracelularmente, además de en el citosol (García-Horsman y cols., 2007a; Männistö y cols., 2007).

Mediante los resultados obtenidos en esta tesis se describe, por primera vez, que tanto la proteína PREP (mediante electroinmunotransferencia y ensayos de unión a inhibidores) como su actividad, se encuentran localizadas en los núcleos de las células granulares de cerebelo durante los primeros estadios de su diferenciación. La localización nuclear de PREP apoya un papel de esta enzima en la diferenciación celular, como se ha publicado en experimentos previos en los que se ha sugerido su participación en el desarrollo temprano del cerebro de la rata (Matsubara y cols., 1998; Agirregoitia y cols., 2003a; Agirregoitia y cols., 2007; Hannula y cols., 2010), así como en las espermátidas en desarrollo en el testículo de ratón (Kimura y cols., 2002).

Al comparar los resultados procedentes de la medición de los niveles de actividad de PREP con los de la densidad relativa de las bandas

obtenidas mediante la electroinmunotransferencia se pudo observar, como se comenta más adelante, un cierto nivel de discrepancia entre los mismos. Una explicación podría ser que esto fuera debido a la presencia de un modulador endógeno o de modificaciones post-traduccionales de la peptidasa. Ambas posibilidades ya han sido anteriormente planteadas cuando se han comparado niveles de actividad y cantidades de proteína medidas mediante inmunohistoquímica (García-Horsman y cols., 2007a; Myöhänen y cols., 2007; Myöhänen y cols., 2008a).

Sin embargo, al margen de estas diferencias, estos datos sí dejan una fiel constancia de que PREP se encuentra en el interior del núcleo de las células granulares de cerebelo, especialmente en los primeros momentos de su diferenciación neuronal.

En las neuronas maduras PREP se encuentra distribuida homogéneamente en la neurona y en el interior de pequeñas vesículas, muy próximas entre sí, dando un aspecto de pequeños racimos brillantes. Un aspecto muy interesante encontrado en los experimentos realizados en esta tesis es el hecho de que la expresión de PREP en el citoplasma presenta picos de oscilación, lo que indica que la expresión de esta enzima se encuentra regulada y no se expresa de forma constitutiva, como se había mencionado anteriormente.

A medida que las células envejecen, PREP migra desde una localización no específica en el citoplasma hacia la envoltura nuclear, situándose a su alrededor.

Posteriormente, cuando las neuronas comienzan a morir, alrededor del DIV 42, se observa un aumento discreto pero significativo de la actividad de PREP en el citoplasma.

Por tanto, y a modo de resumen, a partir de los resultados obtenidos en este trabajo, se pueden distinguir dos patrones de expresión de PREP claramente diferenciables en las células granulares de cerebelo: un

aumento temprano y una localización nuclear, durante su diferenciación, y un aumento tardío y una localización citosólica, en el momento de su muerte. Este hecho está en concordancia con los datos previos de niveles de expresión encontrados en el cerebro de ratón. En algunos de los trabajos ya publicados, se han descrito niveles altos de la actividad en los primeros estadios del desarrollo, mientras que en la maduración se ha registrado un descenso de dichos niveles (Kato y cols., 1980a; Fuse y cols., 1990; Agirregoitia y cols., 2003b). Por otra parte, otros autores han encontrado un aumento de la expresión de PREP en ratones de edad avanzada (Jiang y cols., 2001; Agirregoitia y cols., 2003b). El hecho de que la expresión de PREP aumente durante el proceso de diferenciación neuronal y que el pico de actividad se alcance cuando las neuronas son maduras, sugiere que PREP podría estar implicada en el proceso de diferenciación, ejerciendo una función específica en el núcleo. Este evento está respaldado, por una parte, por haber detectado cantidades importantes de esta enzima en el interior de este compartimento, durante la diferenciación temprana de las células granulares de cerebelo y, por otra, por producirse un aumento de la actividad de PREP en las células SH-SY5Y tras la inducción de la diferenciación con ácido retinoico, tal y como se ha descrito en el apartado de resultados.

La hipótesis de que PREP estuviera implicada en la maquinaria nuclear ya ha sido considerada anteriormente. Hace casi 20 años, Ohtsuki y cols. (1994) sugirieron la implicación de PREP en la diferenciación de los discos imaginales de la mosca *Sarcophaga peregrina* (mosca de la carne), tras observar la inhibición de este proceso al utilizar el inhibidor específico de PREP N-benciloxycarbonil-tioprolil-tioprolinal-dimetilacetal (ZTTA). Este mismo grupo de investigadores, en un trabajo posterior, propusieron que PREP podría ejercer una función crucial en todo el desarrollo embrionario de este insecto. En primer lugar, el desarrollo embrionario era sensible al inhibidor ZTTA y, por

otra parte, mediante inmunofluorescencia, se pudo ver que PREP se hallaba en el núcleo de las células NIH-Sape-4 (Ohtsuki y cols., 1997). Sin embargo, resultó extraño que no apareciera ninguna banda tras realizar una electroinmunotransferencia en los núcleos aislados (Ohtsuki y cols., 1997). En un proyecto posterior llevado a cabo por este mismo grupo (Ishino y cols., 1998), se determinó que los inhibidores de PREP inhibían la síntesis proteica en células 3T3 de ratón y, mediante inmunofluorescencia, vieron que PREP se encontraba en el interior de los núcleos de estas células. No obstante, mediante el anticuerpo anti-PREP utilizado en la electroinmunotransferencia, se obtuvo una banda a 65 kDa, al compararla con la procedente de la proteína PREP de ratón (80 kDa).

En un estudio reciente realizado en la Universidad de Finlandia del Este (Moreno-Baylach y cols., 2011), se vio que la inhibición de PREP en cultivos de células de neuroblastoma produjo cambios en la expresión de diversos genes. Así, mediante micro-arreglos de ARNm se detectó un aumento significativo de proteínas con funciones en la expresión genética tras tratar las células con ZPP. Un número importante de dichas proteínas estaban involucradas en la traducción, como proteínas ribosomales y factores de traducción (ver tabla 8).

Estos datos sugieren que, probablemente, PREP se encuentre en los núcleos de las neuronas durante los primeros estadios de la diferenciación, participando en la regulación de la expresión de genes implicados en este proceso.

Resultados y desarrollo argumental

Tabla 8. Alteración del patrón de expresión génica tras la inhibición de PREP en células SH-SY5Y.

SONDA	GEN	SOLAPAMIENTO
Genes regulados al alza		
Traducción: p valor= $1,8 \cdot 10^{-12}$ Benjamini = $1,5 \cdot 10^{-9}$		
200908_s_at	Proteína ribosómica, grande, P2	3,98
213350_at	Proteína ribosómica S11	3,91
202648_at	Proteína ribosómica S19	3,84
214001_x_at	Proteína ribosómica S10	2,07
213642_at	Proteína ribosómica L27	2,05
212044_s_at	Proteína ribosómica L27a	2,02
219138_at	Proteína ribosómica L14	1,72
213087_s_at	Factor de elongación de la traducción eucariótica 1 delta (Proteína de intercambio de nucleótido guanina)	1,59
213757_at	Factor de iniciación de la traducción eucariótica 5A	1,56
214041_x_at	Proteína ribosómica L37a	1,41
216246_at	Proteína ribosómica S20	1,41
222487_s_at	Proteína ribosómica tipo S27	1,39
209972_s_at	Proteína 2 multifuncional de complejo interactivo aminoacil tRNA sintetasa	1,35
234225_at	Factor de inicio de traducción eucariótica 4H	1,34
221997_s_at	Proteína ribosómica mitocondrial L52	1,34
218808_at	Dominio 3 de unión al anticodón DALR	1,32

Transporte intracelular: p valor = $1,1 \cdot 10^{-3}$

Benjamini = $2,5 \cdot 10^{-1}$

M10098_M_at	Proteína G acoplada al receptor 34	2,59
213550_s_at	Dominios 6 enrollado y transmembranal	2,26
213757_at	Factor de inicio de traducción eucariótica 5A	1,56
213296_at	Retención RER1 en homólogo de retículo 1 endoplásmico	1,54
216962_at	Proteína de interacción RPA	1,46
206352_s_at	Factor 10 de biogénesis	1,46

	peroxisómica	
202211_at	Proteína 3 activadora de la GTPasa de factor de ribosilación de ADP	1,32
232210_at	CLL/linfoma 2 de célula B	1,32
1555895_at	Dinamina 2	1,31
221915_s_at	Proteína 1 de unión similar a RAN	1,3

Genes regulados a la baja

Cascada de proteínas quinasas: p valor = $2,4 \cdot 10^{-4}$

Benjamini = $2,1 \cdot 10^{-1}$

206943_at	Receptor 1 beta, factor de crecimiento transformante	-1,41
210973_s_at	Receptor 1 de factor de crecimiento de fibroblastos	-1,38
227812_at	Superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, miembro 19	-1,36
204633_s_at r	Proteína quinasa S6 ribosómica	-1,33
244486_at	Putativa quinasa 1 inducida por PTEN	-1,32
1552264_a_at	Proteína quinasa 1 activada por mitógenos	-1,32
204325_s_at	Neurofibromina 1	1,32
229114_at	Proteína 1 de unión asociada a GRB2	-1,31
211214_s_at	Proteína quinasa 1 asociada a muerte	-1,31
204036_at l	Receptor 1 de ácido isofosfatídico	-1,3

2.2. Patrón de la actividad de PREP en el citoplasma, en el núcleo y en las membranas durante el ciclo de vida de las células granulares de cerebelo.

Los niveles de la actividad descritos en los resultados de esta tesis no se ajustan a los niveles de fluorescencia procedentes de la unión de PREP al inhibidor fluorescente específico Fluo-JTP, observada en el microscopio confocal, especialmente en las regiones nucleares. Si bien la fluorescencia del Fluo-JTP observada en los núcleos es mayor que la observada en los citoplasmas (ver la figura 15), la actividad de PREP

medida en los núcleos es considerablemente más baja que la encontrada en los citoplasmas. Por otra parte, los niveles de proteína encontrados mediante electroinmunotransferencia se ajustan a las medidas encontradas de actividad. Se han tenido en cuenta numerosos controles, al objeto de asegurar la especificidad de los datos procedentes del análisis de las imágenes obtenidas con el microscopio confocal de las células tratadas con el inhibidor fluorescente. Mediante microscopía confocal se ha realizado un seguimiento del desplazamiento del Fluo-JTP con el compuesto original JTP-4819, que une PREP con una afinidad similar al del fluorescente, y esto blanquea, de forma específica, la etiqueta fluorescente de forma similar al mecanismo descrito previamente al utilizar la enzima purificada (Venäläinen y cols., 2005). También se ha utilizado un control sin células, a fin de estudiar la unión inespecífica del inhibidor a la placa, así como un control de células sin inhibidor para ver si alguno de los reactivos del proceso emitía fluorescencia en la misma región que el Fluo-JTP.

De igual modo, se han comparado los resultados obtenidos mediante el Fluo-JTP con los obtenidos mediante inmunocitoquímica- recurriendo para este último caso al anticuerpo anti-PREP específico, ya utilizado en experimentos previos para localizar PREP (Myöhänen y cols., 2007; Myöhänen y cols., 2008a)- encontrándose, cualitativamente, el mismo patrón de etiquetado (ver la figura 9). Además, se ha realizado un seguimiento del etiquetado del Fluo-JTP, antes de fijar las células y, a pesar de que la intensidad de fluorescencia resulta de cinco a diez veces menor en estas condiciones, se ha encontrado el mismo patrón de cambios al comparar con las imágenes del etiquetado del Fluo-JTP en las células fijadas (ver figura 10).

El que los niveles de PREP detectados mediante inmunofluorescencia no estén directamente correlacionados con los niveles de actividad, ni con los observados mediante inmunotransferencia, ya ha sido descrito

en estudios anteriores de inmunohistoquímica (Myöhänen y cols., 2007; Myöhänen y cols., 2008a). El hecho de que en los experimentos realizados en esta tesis se observe que los resultados obtenidos mediante el Fluo-JTP estén acordes con los obtenidos mediante inmunocitoquímica, más que con los niveles de actividad de PREP medidos, podría deberse a cambios en las propiedades de unión del anticuerpo o del sustrato/inhibidor inducidos por las condiciones celulares. El anticuerpo utilizado para la realización de los experimentos de inmunocitoquímica no se une ni al centro activo de la enzima, ni afecta a su actividad catalítica (Venäläinen y cols., observaciones no publicadas). Es muy probable que PREP interactúe con alguna otra proteína dentro de la célula (Schulz y cols., 2005), pudiendo ser esta unión la que afecte tanto a la actividad de la enzima como a la accesibilidad del anticuerpo a la misma. De hecho, existen informes de inhibidores endógenos, que podrían alterar la unión del sustrato y el inhibidor (ver García-Horsman y cols., 2007a y sus referencias; García-Horsman y cols., 2007b y sus referencias). Si PREP nuclear tiene algún efecto en la maquinaria nuclear, éste podría estar mediado por la interacción de la enzima con otras proteínas implicadas en la síntesis proteica- como se ha sugerido anteriormente (Ohtsuki y cols., 1997; Ishino y cols., 1998) y recientemente en microarreglos de ADN (Moreno-Baylach, y cols., 2011), afectando al etiquetado del inhibidor y del anticuerpo. Además, las condiciones del medio de cultivo también podrían afectar a la actividad de PREP; tales como la presencia de agentes oxidantes (Tsukahara y cols., 1990). Incluso cambios en el nivel plasmático o en la presión osmótica también se ha visto que afectan a la actividad de PREP (Irazusta y cols., 2001).

Por otra parte, los niveles relativamente importantes de PREP detectados en el citoplasma en el momento de la muerte de las células granulares de cerebelo apoya la implicación de PREP en el proceso de envejecimiento y muerte celular. Esto hace que se especule en torno al

posible efecto neuroprotector de algunos inhibidores de PREP. Sin embargo, en todos los experimentos realizados en esta tesis no se ha encontrado un enlentecimiento de la muerte celular en presencia de inhibidores de PREP, sugiriendo la participación de otras enzimas, además de PREP, en el proceso de la muerte neuronal.

La detección de la actividad de PREP en las membranas de diversas líneas celulares ya ha sido descrita anteriormente (Chappell y cols., 1990), así como en los sinaptosomas procedentes de extractos de cerebro bovino (O'Leary y O'Connor, 1995). El anclaje de PREP a las membranas podría producirse por un mecanismo de palmitoilación (Tenorio-Laranga y cols., 2008). Los resultados expuestos en esta tesis revelan, por primera vez, que el patrón de actividad de PREP en las membranas varía a lo largo de la vida de las células granulares de cerebelo. De este modo, se puede detectar un aumento de la misma durante las primeras fases del desarrollo de las neuronas y, una vez que éstas han alcanzado la madurez, se aprecia un descenso paulatino hasta alcanzar niveles indetectables. Al igual que otros autores, también se ha detectado que la actividad de PREP en la fracción membranal era considerablemente inferior a la detectada en la fracción citosólica, aunque dichos experimentos se han realizado en la placenta de ratón (Irazusta y cols., 2002; Agirregoitia y cols., 2005; Matsubara y cols., 2011).

2.3. Niveles de la actividad de PREP durante la proliferación y la diferenciación de la línea celular SH-SY5Y.

De acuerdo con los resultados previos obtenidos en las células granulares de cerebelo, PREP se encuentra principalmente en los núcleos de las células SH-SY5Y durante los primeros estadios del crecimiento proliferativo, si bien también hay ciertos niveles de

actividad en los citoplasmas (ver figura 19). Sin embargo, al inicio de la fase de crecimiento logarítmico, la actividad nuclear de PREP desciende drásticamente, mientras que la actividad en los citoplasmas permanece sin cambios hasta los DIV 20-30. Por otra parte, poco después de la adición del ácido retinoico, la actividad de PREP disminuye considerablemente en los núcleos y comienza a aumentar en los citoplasmas, como rasgos significativos que tuvieron lugar durante la diferenciación celular y de forma paralela a los cambios morfológicos observados (ver figura 19). Además, cuando las células están sometidas a diferenciación, se detecta un aumento de la actividad con el envejecimiento, es decir, una vez transcurridos varios días después de que las neuronas hayan madurado. Por todo ello, los resultados expuestos en esta tesis evidencian que la actividad de PREP en las células SH-SY5Y se encuentra regulada; ya que sus niveles en los núcleos y en los citoplasmas son diferentes durante el proceso de proliferación y el de diferenciación.

2.4. Variaciones en la transcripción del gen que codifica para PREP durante la diferenciación de las células SH-SY5Y inducida por el ácido retinoico.

El aumento de la actividad citoplasmática de PREP, después de añadir el ácido retinoico, se debe -al menos en parte- al aumento considerable de los niveles de ARNm que codifica para PREP, tras comparar con el control (ver figura 20). Además, este aumento remite después de eliminar el ácido retinoico, lo cual restaura el crecimiento proliferativo (ver figura 19C). Los cambios en la expresión de PREP también han sido validados mediante inmunoelectrotransferencia. Estos resultados indican, claramente y por primera vez, que la expresión de PREP está controlada por la señalización del ácido retinoico. Las variaciones en la expresión de PREP han sido estudiadas en roedores desde su estado

embrionario hasta su envejecimiento (Agirregoitia y cols., 2003a, Agirregoitia y cols., 2003b, Agirregoitia y cols., 2005, Agirregoitia y cols., 2007 y Agirregoitia y cols., 2010); viéndose que durante la etapa perinatal, momento que coincide con la migración y diferenciación neuronal, los niveles de ARNm que codifica para PREP aumentan, disminuyendo durante la fase de envejecimiento. Esto refuerza el papel tan importante que podría estar ejerciendo PREP en la diferenciación de las neuronas tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, los mecanismos implicados en el control de este fenómeno no han sido esclarecidos todavía.

Como se ha mencionado, en la Universidad del Este de Finlandia se ha llevado a cabo un estudio de micro-arreglos (Moreno-Baylach y cols., 2011) en el que se observó que la expresión de un número significativo de genes se ve modificada ante la presencia de un inhibidor de PREP. La mayoría de estos genes de expresión modificada codifican para proteínas citoplasmáticas o contenidas en organelas, a excepción de las mitocondrias, así como para proteínas nucleares (ver tabla 8). De este modo, se ha detectado un aumento de la expresión de genes que codifican para proteínas implicadas en la maquinaria de traducción de proteínas y en en la señalización intracelular. Por otra parte, la inhibición de PREP ha inducido una disminución de la expresión de otros genes, principalmente aquellos relacionados con la familia de las proteínas quinasas. Estos resultados indican que PREP parece estar implicada tanto en la señalización celular como en el control de la síntesis proteica. Son necesarios más estudios en el futuro que confirmen el papel de PREP en estos procesos.

2.5. PREP y el sistema de señalización en las células SH-SY5Y.

Con el fin de esclarecer qué papel juega PREP en la diferenciación de las neuronas, se han estudiado los cambios en los niveles de algunos intermediarios que participan en el sistema de señalización celular durante los procesos de proliferación y diferenciación, así como los cambios producidos ante la presencia de inhibidores de la enzima. Se han analizado aquellos intermediarios en los que hay constancia bibliográfica de ser modificados por la actividad de PREP o por el ácido retinoico, tal y como se ha comentado en la introducción.

2.5.1. Inositol trifosfato (IP₃)

Tras medir los niveles de IP₃, se ha encontrado que éstos son mayores en presencia de ácido retinoico que los registrados en los controles (ver figura 21). Este aumento del nivel de IP₃ fue más acusado en el DIV 7, momento en el que el crecimiento celular estuvo totalmente detenido por la acción del ácido retinoico (ver figura 19C). La diferenciación celular requiere una reestructuración del citoesqueleto, mediante un sistema dinámico que implica una reorganización subcelular y una señalización regional. Se ha visto que el metabolismo del inositol está implicado en el control de las transiciones arquitectónicas celulares, modulando las enzimas que median la cantidad y los niveles de fosforilación de los intermediarios del inositol (Bertagnolo y cols., 2004), entre las cuales PREP podría encontrarse implicada.

Contrariamente a lo esperado, la inhibición de PREP no ha inducido ningún cambio en los niveles de IP₃, ni en condiciones control (proliferación) ni durante la diferenciación inducida con ácido retinoico. Los resultados expuestos en esta tesis no están en consonancia con los trabajos previos publicados en los que la inhibición de PREP produce

un aumento de los niveles de IP_3 . Existen algunas evidencias experimentales de que PREP ejerce una acción inhibitoria sobre aquellas enzimas que incorporan IP_3 al ciclo (Harwood, 2003). Además, se ha publicado que los niveles de IP_3 en cultivos celulares se encuentran inversamente relacionados con los niveles de expresión de PREP, de modo que los inhibidores de la enzima producen un aumento de los niveles de este mediador de señal (Schulz y cols., 2002). Respecto a los niveles de IP_3 encontrados durante la diferenciación inducida por ácido retinoico existen datos controvertidos. En los experimentos realizados en esta tesis se ha encontrado un aumento de los niveles de IP_3 durante la diferenciación inducida con ácido retinoico, ajustándose a lo descrito por Martin y cols. (1999). Por otra parte, otros autores han observado una relación inversa entre los niveles de IP_3 y la diferenciación inducida con ácido retinoico en estas células (Murray e Iqwe, 2003).

La diferencia encontrada entre los resultados expuestos en esta tesis y los divulgados en estas publicaciones podrían atribuirse a disparidades en las condiciones experimentales. Asimismo, se ha publicado un trabajo, en el que los efectos de la actividad de PREP sobre el IP_3 son transitorios y no directos, y que a su vez, se encuentran mediados a través del control de la expresión de genes relacionados con el ciclo inositol; como es el caso del gen que codifica para la inositol monofosfatasa a través de la inositol polifosfato fosfatasa (King y cols., 2009). Como consecuencia, el hecho de que los niveles de IP_3 no se encuentren alterados ante la presencia de PREP inhibida podría deberse a la existencia de mecanismos compensadores. Es importante remarcar que cuando JTP-4819 estuvo presente, PREP se mantuvo inhibida a lo largo de todo el cultivo (ver figura 12).

2.5.2. Quinasas extracelulares reguladoras de señal (ERK 1/2).

Dado que se ha publicado que los efectos del ácido retinoico están mediados por la vía ERK (Lu y cols., 2009), en esta tesis se han estudiado los cambios de los niveles de las ERK 1/2 durante la proliferación y diferenciación de las células SH-SY5Y así como el efecto de la inhibición de PREP en dichos niveles durante ambos procesos. Como se expone en el apartado de resultados, durante el proceso de proliferación celular, los niveles de las ERK 1/2 son menores cuando PREP se encuentra inhibida. En los primeros estadios de la diferenciación inducida por el ácido retinoico, los niveles de las ERK 1/2 son más bajos que durante la proliferación, si bien aumentan en los estadios tardíos. Cuando PREP está inhibida sólo se aprecia un pequeño cambio en los niveles de las ERK 1/2 fosforiladas durante los primeros estadios de la diferenciación, no detectándose ningún efecto en estadios posteriores. Esto indica que el posible sitio de acción de PREP en la señalización celular mediada por el ácido retinoico tendría lugar antes de la activación de ERK 1/2 en los estadios tempranos de la diferenciación- lo que podría estar relacionado con la localización nuclear de PREP. De todas formas, antes de dar una conclusión firme acerca de esta teoría, es necesario realizar más experimentos en el futuro.

El aumento de los niveles de las ERK 1/2 detectado durante la diferenciación inducida por el ácido retinoico se encuentra en consonancia con los datos ya publicados anteriormente (Hellmann y cols., 2010). Sin embargo, dicho aumento sólo se observa en etapas tardías (DIV 9), a diferencia de otros trabajos en el que ha detectado un incremento inmediato y permanente (hasta las 240 h) de dichos niveles tras añadir el ácido retinoico (Kim y cols., 2007; Masiá y cols., 2007). Por otra parte, Miloso y cols. (2004) han detectado que el aumento de las ERK 1/2 fosforiladas tiene lugar hasta las 72 horas de añadir el

ácido retinoico, produciéndose una disminución de dichos niveles a las 96 y 120 h (DIV5), estando en consonancia con lo observado en esta tesis durante los primeros estadios de la diferenciación. Las diferencias encontradas podrían deberse a disimilitudes en el diseño experimental.

2.6. La inhibición de PREP induce cambios morfológicos en las células SH-SY5Y diferenciadas con ácido retinoico.

En consonancia a lo observado en los cultivos primarios de células granulares de cerebelo, tampoco se aprecian cambios en el patrón de crecimiento de las células SH-SY5Y tras incubarlas con inhibidores de PREP. Recientemente se ha publicado un trabajo en el que los inhibidores de PREP producen un arresto del ciclo celular, deteniendo así el crecimiento (Sakaguchi y cols., 2011). Las diferencias encontradas entre estos dos casos podrían deberse a diferencias experimentales en cuanto al tipo celular utilizado, especificidad de los inhibidores, etc. Sin embargo, en este mismo estudio, también se observa que los inhibidores de PREP no producen cambios en la viabilidad celular- hecho que está en correlación con los resultados obtenidos en esta tesis- si bien los estudios de Sakaguchi y cols. se limitan a las primeras 80 horas del cultivo, mientras que los expuestos en este trabajo se prolongan hasta las 144 horas.

En las condiciones en las que se llevan a cabo los experimentos no se detectan cambios en las curvas de crecimiento de las células tras la inhibición de PREP (ver figura 19C), tras un estudio más exhaustivo mediante el microscopio de campo claro en el que se induce la diferenciación con ácido retinoico en presencia de JTP-4819, sí se observa que la inhibición de PREP produce una diferenciación retardada (ver figuras 23 y 24). Bajo las condiciones descritas en el apartado de metodología, se ha visto que el ácido retinoico es capaz de

detener la proliferación de las células (ver figura 19C) e inducir cambios morfológicos como la formación de neuritas y de entramados de conexiones entre las neuronas. En presencia de JTP-4819 el número de células totalmente diferenciadas es menor, así como el número de neuritas, la longitud de las mismas y los puntos únicos o dobles de conexión entre dos neuronas. Sin embargo, la frecuencia de múltiples contactos (más de dos), entre más de dos neuronas, es considerablemente mayor en presencia del inhibidor (ver figura 24). Los resultados obtenidos mediante este experimento sugieren que PREP juega un papel importante en la formación de las neuritas y en la comunicación neurona-neurona.

1. Los inhibidores de PREP no protegen frente a la muerte inducida con diversos tóxicos.

Como ya se ha descrito en la introducción, en un principio la función fisiológica atribuida a PREP es la de participar en la proteólisis limitada de numerosas hormonas peptídicas, incluyendo los neuropéptidos (Mentlein, 1988; Welches y cols., 1993). Sin embargo, la administración de inhibidores específicos de PREP en un modelo isquémico de rata o en cultivos primarios de neuronas conduce a una protección frente a la muerte neuronal o a un aplazamiento del envejecimiento inducido por la apoptosis, respectivamente (Katsube y cols., 1999; Shishido y cols., 1999). También se ha descrito que las células T de ratón que tienen una alta actividad de PREP son más susceptibles a una muerte celular, proponiendo el papel de los inhibidores de PREP como posibles agentes protectores de la apoptosis celular (Odaka y cols., 2002).

La disminución de la viabilidad de las células granulares de cerebelo observada tras su exposición en un medio con una baja concentración

de K^+ (ver tabla 7) se corresponde con los trabajos previamente publicados (Gallo y cols., 1987a; Balázs y cols., 1988a; D'Mello y cols., 1993; Galli y cols., 1995; Ikonovic y cols., 1997; D'Mello y cols., 2000; Isaev y cols., 2000; Caballero-Benítez y Morán, 2003; Llansola, M y cols., 2003; Slagsvold y cols., 2003; Franco-Cea y cols., 2004; Subramaniam y cols., 2004; Yamagishi y cols., 2005; Bui y cols., 2006; Yeste-Velasco y cols., 2008; Barneda-Zahonero y cols., 2009; Jantas y Lason, 2009a; Jantas y Lason, 2009b; Hernández-Enríquez y cols., 2011).

En este trabajo, la viabilidad celular para una misma concentración de tóxico, resulta ser independiente del DIV de las células y del momento de adición del inhibidor (ver tabla 7). Jantas y Lason (2009a) describen que los cambios apoptóticos en las células granulares de cerebelo en cultivo son más evidentes en células jóvenes (DIV 7) que en las maduras (DIV 12). En esta tesis todas las células utilizadas para los ensayos de toxicidad no superan el DIV 6, por lo que su susceptibilidad a una determinada concentración de tóxico debe ser similar.

En las condiciones llevadas a cabo en los experimentos realizados en esta tesis no se ha observado que la inhibición de PREP prolongue la vida de los cultivos primarios de células granulares de cerebelo ni que tampoco proteja frente a la apoptosis inducida con una concentración baja de K^+ ni con diversos tóxicos como la 6-OHDA y el H_2O_2 (ver tabla 7). Del mismo modo, tampoco se ha detectado ningún efecto protector del inhibidor JTP-4819 en la supervivencia de las células SH-SY5Y a lo largo de su cultivo ni tras inducir su muerte con 6-OHDA (ver figura 25A). La diferencia encontrada en estos resultados respecto al poder protector de los inhibidores de PREP descrito en la bibliografía (Katsube y cols., 1996) podría deberse a diferencias en las condiciones experimentales llevadas a cabo. Se ha publicado que los inhibidores de PREP protegen frente a la muerte celular inducida

dependiendo del tipo celular utilizado y el tóxico inductor. En ese trabajo sí se ha observado que el inhibidor ZPP protege frente a la muerte inducida por el citosín arabinósido (Ara-C) en células SH-SY5Y, pero no en las células CV1-P; del mismo modo que ni el ZPP ni el JTP-4819 aumentan la viabilidad en ambos tipos celulares tras inducir la muerte con 6-OHDA (Puttonen y cols., 2006). Asimismo, el grupo de investigación encabezado por el Dr. Alexander Zharkovsky, de la universidad de Tartu (Estonia), ha estudiado el efecto de los inhibidores KYP-2047 y ZPP en varios modelos de muerte celular, incluyendo cultivos primarios de neuronas, utilizando el péptido β A 25-35 y la 6-OHDA como agentes inductores. Tras numerosos experimentos, tampoco han detectado cambios en la viabilidad de las células en presencia de estos inhibidores de PREP (comunicación personal).

CONCLUSIONES

“La vida es como una comedia; no se atiende a si es larga sino a si la han representado bien. Concluye donde quieras, con tal de que pongas un final”

Lucio Anneo Séneca (4 a.C.-65 d.C.), filósofo y político romano.

“La ciencia es maravillosa si uno no tiene que ganarse la vida con ella”

Albert Einstein (1879-1955), físico alemán.

Esta tesis ha permitido avanzar en los conocimientos de la función de PREP en el cerebro. Por una parte, mediante la investigación de la distribución y dinámica de PREP durante los procesos de diferenciación, maduración y envejecimiento neuronal y, por otra, mediante el estudio de la función de PREP en el proceso de neurodegeneración inducida por diversos tóxicos, así como el posible efecto protector de los inhibidores de esta enzima.

El conjunto de resultados expuestos en este trabajo ha permitido obtener las siguientes conclusiones:

1. PREP se encuentra regulada durante los procesos de diferenciación, maduración y muerte neuronal en las células granulares de cerebelo en cultivo, hecho que se refleja no sólo en términos de niveles de expresión sino también en cambios en su ubicación en la célula.
2. PREP se encuentra localizada, principalmente, en los núcleos de las células granulares de cerebelo en cultivo en los primeros estadios de su diferenciación, donde su actividad podría tener relación con la fosforilación de quinasas MAP.
3. PREP está implicada en la diferenciación de las células SH-SY5Y inducida con ácido retinoico dado que la inhibición de esta enzima altera ciertos rasgos morfológicos de las neuronas.
4. La expresión del gen que codifica para PREP está aumentada en las células SH-SY5Y durante su diferenciación con ácido retinoico, lo que sugiere, en estrecha relación con el punto anterior, que esta peptidasa sea requerida en los mecanismos de diferenciación inducidos por el ácido retinoico.
5. PREP no participa en la vía de señalización del IP_3 activada durante la diferenciación de las células SH-SY5Y con ácido retinoico, en las condiciones llevadas a cabo en este trabajo.

Conclusiones

6. La actividad de PREP altera los niveles de ERK 1/2 durante los primeros estadios de la diferenciación de las células SH-SY5Y con el ácido retinoico, mediante un mecanismo todavía por descubrir, con posibles implicaciones en la respuesta celular a la señalización.
7. PREP no parece tener influencia en los procesos de muerte celular cuando ésta es inducida por las bajas concentraciones de K^+ , o por los tóxicos 6-OHDA y H_2O_2 en las células granulares de cerebelo en cultivo, así como tampoco parece ejercer un papel relevante en la muerte inducida con 6-OHDA en las células SH-SY5Y.

BIBLIOGRAFÍA

“Los libros son, entre mis consejeros, los que más me agradan porque ni el temor ni la esperanza les impiden decirme lo que debo hacer”

Alfonso V “El Magnánimo” (1394-1458), rey de Aragón.

“En muchas ocasiones la lectura de un libro ha hecho la fortuna de un hombre, decidiendo el curso de su vida”

Ralph Waldo Emerson (1803-1882), poeta y filósofo estadounidense.

-
- Agirregoitia, N., Gil, J., Ruiz, F., Irazusta, J. y Casis, L. (2003a).** Effect of aging on rat tissue peptidase activities. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*; 58(9): B792-B797.
- Agirregoitia, N., Irazusta, A., Ruiz, F., Irazusta, J. y Gil, J. (2003b).** Ontogeny of soluble and particulate prolyl endopeptidase activity in several areas of the rat brain and in the pituitary gland. *Dev Neurosci*; 25(5): 316-323.
- Agirregoitia, N., Laiz-Carrion, R., Varona, A., Rio, M.P., Mancera, J.M. e Irazusta, J. (2005).** Distribution of peptidase activity in teleost and rat tissues. *J Comp Physiol B*; 175(6): 433-444.
- Agirregoitia, N., Casis, L., Gil, J., Ruiz, F. e Irazusta, J. (2007).** Ontogeny of prolyl endopeptidase and pyroglutamyl peptidase I in rat tissues. *Regul Pept*; 139(1-3): 52-58.
- Agirregoitia, N., Bizet, P., Agirregoitia, E., Boutelet, I., Peralta, L., Vaudry, H. y Jégou, S. (2010).** Prolyl endopeptidase mRNA expression in the central nervous system during rat development. *J Chem Neuroanat*; 40(1): 53-62.
- Ahmed, M.M., Arif, M., Chikuma, T. y Kato, T. (2005).** Pentylentetrazol-induced seizures affect the levels of prolyl oligopeptidase, thimet oligopeptidase and glial proteins in rat brain regions, and attenuation by MK-801 pretreatment. *Neurochem Int*; 47(4): 248-259.
- Alonso, M., Medina, J.H. y Pozzo-Miller, L. (2010).** ERK1/2 activation is necessary for BDNF to increase dendritic spine density in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Learn Mem*; 11(2): 172-178.
- Altman, J. (1972).** Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. 3. Maturation of the components of the granular layer. *J Comp Neurol*; 145(4): 465-513.

- Aoyagi, T., Wada, T., Nagai, M., Kojima, F., Harada, S., Takeuchi, T., Takahashi, H., Hirokawa, K. y Tsumita, T. (1990).** Deficiency of kallikrein-like enzyme activities in cerebral tissue of patients with Alzheimer's disease. *Experientia*; 46(1): 94-97.
- Arentz-Hansen, H., McAdam, S.N., Molberg, Ø., Fleckenstein, B., Lundin, K.E., Jørgensen, T.J., Jung, G., Roepstorff, P. y Sollid, L.M. (2002).** Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in proline residues. *Gastroenterology*; 123(3): 803-809.
- Arif, M., Chikuma, T., Ahmed, M.M., Yoshida, S. y Kato, T. (2007).** Suppressive effect of clozapine but not haloperidol on the increases of neuropeptide-degrading enzymes and glial cells in MK-801-treated rat brain regions. *Neurosci Res*; 57(2): 248-258.
- Arif, M., Chikuma, T., Ahmed, M.M., Nakazato, M., Smith, M.A. y Kato, T. (2010).** Effects of memantine on soluble Alphasyn (25-35)-induced changes in peptidergic and glial cells in Alzheimer's disease model rat brain regions. *Neuroscience*; 164(3): 1199-1209.
- Atack, J.R., Suman-Chauhan, N., Dawson, G. y Kulagowski, J.J. (1991).** *In vitro* and *in vivo* inhibition of prolyl endopeptidase. *Eur J Pharmacol*; 205(2): 157-163.
- Atwal, J.K., Singh, K.K., Tessier-Lavigne, M., Miller, F.D. y Kaplan, D.R. (2000).** Semaphorin 3F antagonizes neurotrophin-induced phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase signaling: a mechanism for growth cone collapse. *J Neurosci*; 23(20): 7602-7609.
- Bakker, A.V., Jung, S., Spencer, R.W., Vinick, F.J. y Faraci, W.S. (1990).** Slow tight-binding inhibition of prolyl endopeptidase by benzyloxycarbonyl-prolyl-prolinal. *Biochem J*; 271(2): 559-562.

-
- Balázs, R., Gallo, V. y Kingsbury, A. (1988a).** Effect of depolarization on the maturation of cerebellar granule cells in culture. *Brain Res*; 468(2): 269-276.
- Balázs, R., Hack, N. y Jørgensen, O.S. (1988b).** Stimulation of the N-methyl-D-aspartate receptor has a trophic effect on differentiating cerebellar granule cells. *Neurosci Lett*; 87(1-2): 80-86.
- Balázs, R., Jørgensen, O.S. y Hack, N. (1988c).** N-methyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells in culture. *Neuroscience*; 27(2): 437-451.
- Balázs, R. y Hack, N. (1990).** Trophic effects of excitatory amino acids in the developing nervous system. *Adv Exp Med Biol*; 268: 221-228.
- Barelli, H., Petit, A., Hirsch, E., Wilk, S., De Nanteuil, G., Morain, P. y Checler, F. (1999).** S 17092-1, a highly potent, specific and cell permeant inhibitor of human proline endopeptidase. *Biochem Biophys Res Commun*; 257(3): 657-661.
- Barneda-Zahonero, B., Miñano-Molina, A., Badiola, N., Fadó, R., Xifró, X., Saura, C.A., Rodríguez-Alvarez, J. (2009).** Bone morphogenetic protein-6 promotes cerebellar granule neurons survival by activation of the MEK/ERK/CREB pathway. *Mol Biol Cell*; 20(24): 5051-5063.
- Beier, C.P., Wischhusen, J., Gleichmann, M., Gerhardt, E., Pekanovic, A., Krueger, A., Taylor, V., Suter, U., Krammer, P.H., Endres, M., Weller, M. y Schulz, J.B. (2005).** FasL (CD95L/APO-1L) resistance of neurons mediated by phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/protein kinase B-dependent expression of lifeguard/neuronal membrane protein 35. *J Neurosci*; 25(29): 6765-6774.

- Bell, P.B. Jr., Rundquist, I., Svensson, I. y Collins, V.P. (1987).** Use of cytofluorometry to evaluate binding of antibodies to the cytoskeleton of cultured cells. *J Histochem Cytochem*; 35(12): 1381-1388.
- Bellemère, G., Morain, P., Vaudry, H. y Jégou, S. (2003).** Effect of S 17092, a novel prolyl endopeptidase inhibitor, on substance P and alpha-melanocyte-stimulating hormone breakdown in the rat brain. *J Neurochem*; 84(5): 919-929.
- Bellemère, G., Vaudry, H., Mounien, L., Boutelet, I. y Jégou, S. (2004).** Localization of the mRNA encoding prolyl endopeptidase in the rat brain and pituitary. *J Comp Neurol*; 471(2): 128-143.
- Bennett, G.W., Ballard, T.M., Watson, C.D. y Fone, K.C. (1997).** Effect of neuropeptides on cognitive function. *Exp Gerontol*; 32(4-5): 451-469.
- Berger, P.A., Watson, S.J., Akil, H. y Barchas, J.D. (1986).** Investigating opioid peptides in schizophrenia and depression. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis*; 64: 309-333.
- Bertagnolo, V., Brugnoli, F., Marchisio, M. y Capitani, S. (2004).** Inositide-modifying enzymes: a cooperative role in regulating nuclear morphology during differentiation of myeloid cells. *J Biol Regul Homeost Agents*; 18(3-4): 381-386.
- Birney, Y.A. y O'Connor, B.F. (2001).** Purification and characterization of a Z-pro-prolinal-insensitive Z-Gly-Pro-7-amino-4-methyl coumarin-hydrolyzing peptidase from bovineserum-a new proline-specific peptidase. *Protein Expr Purif*; 22(2): 286-298.
- Bolla, L. y Palmer, R.M. (1997).** Paraneoplastic cerebellar degeneration. Case report and literature review. *Arch Intern Med*; 157(11): 1258-1262.

-
- Bost, F., Caron, L., Marchetti, I., Dani, C., Le Marchand-Brustel, Y. y Binétruy, B. (2002).** Retinoic acid activation of the ERK pathway is required for embryonic stem cell commitment into the adipocyte lineage. *Biochem J*; 361(Pt 3): 621-627.
- Bradford, M.M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*; 72: 248-254.
- Brandt, I., Scharpé, S. y Lambeir, A.M. (2007).** Suggested functions for prolyl oligopeptidase: a puzzling paradox. *Clin Chim Acta*; 377(1-2): 50-61.
- Brandt, I., Gérard, M., Sergeant, K., Devreese, B., Baekelandt, V., Augustyns, K., Scharpé, S., Engelborghs, Y. y Lambeir, A.M. (2008).** Prolyl oligopeptidase stimulates the aggregation of alpha-synuclein. *Peptides*; 29(9): 1472-1478.
- Bui, C.J., McGann, A.C., Middleton, F.A., Beaman-Hall, C.M. y Vallano, M.L. (2006).** Transcriptional profiling of depolarization-dependent phenotypic alterations in primary cultures of developing granule neurons. *Brain Res*; 1119(1): 13-25.
- Burgoyne, R.D. y Cambray-Deakin, M.A. (1988).** The cellular neurobiology of neuronal development: the cerebellar granule cell. *Brain Res*; 472(1): 77-101.
- Caballero-Benítez, A. y Morán, J. (2003).** Caspase activation pathways induced by staurosporine and low potassium: role of caspase-2. *J Neurosci Res*; 71(3): 383-396.
- Camargo, A.C., Caldo, H. y Reis, M.L. (1979).** Susceptibility of a peptide derived from bradykinin to hydrolysis by brain endo-oligopeptidases and pancreatic proteinases. *J Biol Chem*; 254(12): 5304-5307.

- Cañón, E., Cosgaya, J.M., Scsucova, S. y Aranda, A. (2004).** Rapid effects of retinoic acid on CREB and ERK phosphorylation in neuronal cells. *Mol Biol Cell*; 15(12): 5583-5592.
- Carey, M.B. y Matsumoto, S.G. (1999).** Spontaneous calcium transients are required for neuronal differentiation of murine neural crest. *Dev Biol*; 215 (2): 298-313.
- Cavasin, M.A., Rhaleb, N.E., Yang, X.P. y Carretero, O.A. (2004).** Prolyl oligopeptidase is involved in release of the antifibrotic peptide Ac-SDKP. *Hypertension*; 43(5): 1140-1145.
- Cernaianu, G., Brandmaier, P., Scholz, G., Ackermann, O.P., Alt, R., Rothe, K., Cross, M., Witzigmann, H. y Tröbs, R.B. (2008).** All-trans retinoic acid arrests neuroblastoma cells in a dormant state. Subsequent nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor treatment adds modest benefit. *Pediatr Surg*; 43(7): 1284-1294.
- Chaïb-Oukadour, I., Gil, C. y Aguilera, J. (2004).** The C-terminal domain of the heavy chain of tetanus toxin rescues cerebellar granule neurones from apoptotic death: involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Neurochem*; 90(5): 1227-1236.
- Chappell, M.C., Tallant, E.A., Brosnihan, K.B. y Ferrario, C.M. (1990).** Processing of angiotensin peptides by NG108-15 neuroblastoma x glioma hybrid cell line. *Peptides*; 11(2): 375-380.
- Cheng, L., Lumb, M., Polgár, L. y Mudge, A.W. (2005).** How can the mood stabilizer VPA limit both mania and depression?. *Mol Cell Neurosci*; 29(2): 155-161.
- Cheung, Y.T., Lau, W.K., Yu, M.S., Lai, C.S., Yeung, S.C., So, K.F. y Chang, R.C. (2009).** Effects of all-trans-retinoic acid on human

SH-SY5Y neuroblastoma as *in vitro* model in neurotoxicity research. *Neurotoxicology*; 30(1): 127-135.

Ciccarone, V., Spengler, B.A., Meyers, M.B., Biedler, J.L. y Ross, R.A. (1989). Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest lineages. *Cancer Res*; 49(1): 219-225.

Constantinescu, R., Constantinescu, A.T., Reichmann, H. y Janetzky, B. (2007). Neuronal differentiation and long-term culture of the human neuroblastoma line SH-SY5Y. *J Neural Transm Suppl*; (72): 17-28.

Contestabile, A. (2002). Cerebellar granule cells as a model to study mechanisms of neuronal apoptosis or survival *in vivo* and *in vitro*. *Cerebellum*; 1(1): 41-55.

Cunningham, D.F. y O'Connor, B. (1997a). Identification and initial characterisation of a N-benzyloxycarbonyl-prolyl-prolinal (Z-Pro-prolinal)-insensitive 7-(N-benzyloxycarbonyl-glycyl-prolyl-amido)-4-methylcoumarin (Z-Gly-Pro-NH-Mec)-hydrolysing peptidase in bovine serum. *Eur J Biochem*; 244(3): 900-903.

Cunningham, D.F. y O'Connor, B. (1997b). Proline specific peptidases. *Biochim Biophys Acta*; 1343(2): 160-183.

Cunningham, D.F. y O'Connor, B. (1998). A study of prolyl endopeptidase in bovine serum and its relevance to the tissue enzyme. *Int J Biochem Cell Biol*; 30(1): 99-114.

Daly, D.J., Maskrey, P., Pennington, R.J. (1985). Characterization of proline endopeptidase from skeletal muscle. *Int J Biochem*; 17(4): 521-524.

- Dauch, P., Masuo, Y., Vincent, J.P. y Checler, F. (1993).** A survey of the cerebral regionalization and ontogeny of eight exo- and endopeptidases in murines. *Peptides*; 14(3): 593-599.
- De Bernardo, S., Canals, S., Casarejos, M.J., Solano, R.M., Menendez, J. y Mena, M.A. (2004).** Role of extracellular signal-regulated protein kinase in neuronal cell death induced by glutathione depletion in neuron/glia mesencephalic cultures. *J Neurochem*; 91(3): 667-682.
- Denizot, F. y Lang, R. (1986).** Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*; 89(2): 271-277.
- Dickson, D.W., Lin, W., Liu, W.K. y Yen, S.H. (1999).** Multiple system atrophy: a sporadic synucleinopathy. *Brain Pathol*; 9(4): 721-732.
- Di Daniel, E., White, J., Stevenson, H., Mudge, A.W. y Maycox, P.R. (2006).** 2nd Biennial Conference of the International Society for Bipolar Disorders, póster 170.
- Di Daniel, E., Glover, C.P., Grot, E., Chan, M.K., Sanderson, T.H., White, J.H., Ellis, C.L., Gallagher, K.T., Uney, J., Thomas, J., Maycox, P.R., y Mudge, A.W. (2009).** Prolyl oligopeptidase binds to GAP-43 and functions without its peptidase activity. *Mol Cell Neurosci*; 41(3): 373-382.
- D'Mello, S.R., Galli, C., Ciotti, T. y Calissano, P. (1993).** Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP. *Proc Natl Acad Sci USA*; 90(23):10989-10993.
- D'Mello, S.R., Kuan, C.Y., Flavell, R.A. y Rakic, P. (2000).** Caspase-3 is required for apoptosis-associated DNA fragmentation but not

for cell death in neurons deprived of potassium. *J Neurosci Res*; 59(1): 24-31.

Dresdner, K., Barker, L.A., Orlowski, M. y Wilk, S. (1982). Subcellular distribution of prolyl endopeptidase and cation-sensitive neutral endopeptidase in rabbit brain. *J Neurochem*; 38(4): 1151-1154.

Dupont, E., Stevens, L., Cochon, L., Falempin, M., Bastide, B. y Canu, M.H. (2011). ERK is involved in the reorganization of somatosensory cortical maps in adult rats submitted to hindlimb unloading. *PLoS One*; 6(3): e17564.

Enarsson, M., Erlandsson, A., Larsson, H. y Forsberg-Nilsson, K. (2002). Extracellular signal-regulated protein kinase signaling is uncoupled from initial differentiation of central nervous system stem cells to neurons. *Mol Cancer Res*; 1(2): 147-154.

Encinas, M., Iglesias, M., Liu, Y., Wang, H., Muhaisen, A., Ceña, V., Gallego, C. y Comella, J.X. (2000). Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J Neurochem*; 75(3): 991-1003.

Esumi, Y., Suzuki, Y., Itoh, Y., Uramoto, M., Kimura, K., Goto, M., Yoshihama, M. e Ichikawa, T. (2002). Propeptin, a new inhibitor of prolyl endopeptidase produced by microbispora II. Determination of chemical structure. *J Antibiot (Tokyo)*; 55(3): 296-300.

Fagerström, S., Pålman, S., Gestblom, C. y Nånberg, E. (1996). Protein kinase C-epsilon is implicated in neurite outgrowth in differentiating human neuroblastoma cells. *Cell Growth Differ*; 7(6): 775-785.

- Feng, G.J., Goodridge, H.S., Harnett, M.M., Wei, X.Q., Nikolaev, A.V., Higson, A.P. y Liew, F.Y. (1999).** Extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinases differentially regulate the lipopolysaccharide-mediated induction of inducible nitric oxide synthase and IL-12 in macrophages: *Leishmania phosphoglycans* subvert macrophage IL-12 production by targeting ERK MAP kinase. *J Immunol*; 163(12): 6403-6412.
- Fischer, G. (1982).** Cultivation of mouse cerebellar cells in serum free, hormonally defined media: survival of neurons. *Neurosci Lett*; 28(3): 325-329.
- Franco-Cea, A., Valencia, A., Sánchez-Armass, S., Domínguez, G. y Morán, J. (2004).** Role of ionic fluxes in the apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons. *Neurochem Res*; 29(1): 227-238.
- Fülöp, V., Böcskei, Z. y Polgár, L. (1998).** Prolyl oligopeptidase: an unusual beta-propeller domain regulates proteolysis. *Cell*; 94(2): 161-170.
- Fuse, Y., Polk, D.H., Lam, R.W., Reviczky, A.L. y Fisher, D.A. (1990).** Distribution and ontogeny of thyrotropin-releasing hormone degrading enzymes in rats. *Am J Physiol*; 259(6 Pt 1): E787-E791.
- Fuxreiter, M., Magyar, C., Juhász, T., Szeltner, Z., Polgár, L. y Simon, I. (2005).** Flexibility of prolyl oligopeptidase: molecular dynamics and molecular framework analysis of the potential substrate pathways. *Proteins*; 60(3): 504-512.
- Gaggar, A., Jackson, P.L., Noerager, B.D., O'Reilly, P.J., McQuaid, D.B., Rowe, S.M., Clancy, J.P. y Blalock, J.E. (2008).** A novel proteolytic cascade generates an extracellular matrix-derived

chemoattractant in chronic neutrophilic inflammation. *J Immunol*; 180(8): 5662-5669.

Galli, C., Meucci, O., Scorziello, A., Werge, T.M., Calissano, P. y Schettini, G. (1995). Apoptosis in cerebellar granule cells is blocked by high KCl, forskolin, and IGF-1 through distinct mechanisms of action: the involvement of intracellular calcium and RNA synthesis. *J Neurosci*; 15(2): 1172-1179.

Gallo, V., Kingsbury, A., Balázs, R. y Jørgensen, O.S. (1987a). The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J Neurosci*; 7(7): 2203-2213.

García-Horsman, J.A., Männistö, P.T. y Venäläinen, J.I. (2007a). On the role of prolyl oligopeptidase in health and disease. *Neuropeptides*; 41(1): 1-24.

García-Horsman, J.A., Venäläinen, J.I., Lohi, O., Auriola, I.S., Korponay-Szabo, I.R., Kaukinen, K., Mäki, M. y Männistö, P.T. (2007b). Deficient activity of mammalian prolyl oligopeptidase on the immunoactive peptide digestion in coeliac disease. *Scand J Gastroenterol*; 42(5): 562-571.

Gass, J., Ehren, J., Strohmeier, G., Isaacs, I. y Khosla, C. (2005). Fermentation, purification, formulation, and pharmacological evaluation of a prolyl endopeptidase from *Myxococcus xanthus*: implications for Celiac Sprue therapy. *Biotechnol Bioeng*; 92(6): 674-684.

Gass, J. y Khosla, C. (2007). Prolyl endopeptidases. *Cell Mol Life Sci*; 64(3): 345-355.

Garthwaite, J., Garthwaite, G. y Hajós, F. (1986). Amino acid neurotoxicity: relationship to neuronal depolarization in rat cerebellar slices. *Neuroscience*; 18(2): 449-460.

- Gavaldà, N., Pérez-Navarro, E., Gratacòs, E., Comella, J.X. y Alberch, J. (2004).** Differential involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and p42/p44 mitogen activated protein kinase pathways in brain-derived neurotrophic factor-induced trophic effects on cultured striatal neurons. *Mol Cell Neurosci*; 25(3): 460-468.
- Gelinas, J.N., Banko, J.L., Hou, L., Sonenberg, N., Weeber, E.J., Klann, E. y Nguyen, P.V. (2007).** ERK and mTOR signaling couple beta-adrenergic receptors to translation initiation machinery to gate induction of protein synthesis-dependent long-term potentiation. *J Biol Chem*; 282(37): 27527-27535.
- Gimenez-Cassina, A., Lim, F. y Diaz-Nido, J. (2006).** Differentiation of a human neuroblastoma into neuron-like cells increases their susceptibility to transduction by herpesviral vectors. *J Neurosci Res*; 84(4): 755-767.
- Giordano, G. y Costa, L.G. (2011).** Primary neurons in culture and neuronal cell lines for *in vitro* neurotoxicological studies. *Methods Mol Biol*; 758: 13-27.
- Goldin, M. y Segal, M. (2003).** Protein kinase C and ERK involvement in dendritic spine plasticity in cultured rodent hippocampal neurons. *Eur J Neurosci*; 17(12): 2529-2539.
- Gómez-Santos, C., Ferrer, I., Reiriz, J., Viñals, F., Barrachina, M. y Ambrosio, S. (2002).** MPP⁺ increases alpha-synuclein expression and ERK/MAP-kinase phosphorylation in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Brain Res*; 935(1-2): 32-39.
- Goossens, F., De Meester, I., Vanhoof, G. y Scharpé, S. (1996).** Distribution of prolyl oligopeptidase in human peripheral tissues and body fluids. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*; 34(1): 17-22.

-
- Guarnieri, S., Pilla, R., Morabito, C., Sacchetti, S., Mancinelli, R., Fanò, G. y Mariggìò, M.A. (2009).** Extracellular guanosine and GTP promote expression of differentiation markers and induce S-phase cell-cycle arrest in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Int J Dev Neurosci*; 27(2): 135-147.
- Hall, A.C., Lucas, F.R. y Salinas, P.C. (2000).** Axonal remodeling and synaptic differentiation in the cerebellum is regulated by WNT-7a signaling. *Cell*; 100(5): 525-535.
- Hannula, M.J., Männistö, P.T. y Myöhänen, T.T. (2010).** Sequential expression, activity and nuclear localization of prolyl oligopeptidase protein in the developing rat brain. *Dev Neurosci*; 33(1): 38-47.
- Harwood, A.J. (2003).** Neurodevelopment and mood stabilizers. *Curr Mol Med*; 3(5): 472-482.
- Harwood, A.J. y Agam, G. (2003).** Search for a common mechanism of mood stabilizers. *Biochem Pharmacol*; 66(2): 179-189.
- Hatten, M.E. y Heintz, N. (1995).** Mechanisms of neural patterning and specification in the developing cerebellum. *Annu Rev Neurosci*; 18: 385-408.
- Hausch, F., Shan, L., Santiago, N.A., Gray, G.M. y Khosla, C. (2002).** Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides. *Am J Physiol Gastrointest Physiol*; 283(4): G996-G1003.
- Hernández-Enríquez, B., Guemez-Gamboa, A. y Morán, J. (2011).** Reactive oxygen species are related to ionic fluxes and volume decrease in apoptotic cerebellar granule neurons: role of NOX enzymes. *J Neurochem*; 117 (4): 654-664.

- Hetman, M., Hsuan, S.L., Habas, A., Higgins, M.J. y Xia, Z. (2002).** ERK1/2 antagonizes glycogen synthase kinase-3 β -induced apoptosis in cortical neurons. *J Biol Chem*; 277(51): 49577-49584.
- Hill, D.P. y Robertson, K.A. (1997).** Characterization of the cholinergic neuronal differentiation of the human neuroblastoma cell line LA-N-5 after treatment with retinoic acid. *Brain Res Dev Brain Res*; 102(1): 53-67.
- Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F. y Cole, G. (1996).** Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*; 274(5284): 99-102.
- Ikonomovic, S., Kharlamov, E., Manev, H., Ikonomovic, M.D. y Grayson, D.R. (1997).** GABA and NMDA in the prevention of apoptotic-like cell death *in vitro*. *Neurochem Int*; 31(2): 283-290.
- Irazusta, J., Silveira, P.F., Gil, J., Varona, A. y Casis, L. (2001).** Effects of hydrosaline treatments on prolyl endopeptidase activity in rat tissues. *Regul Pept.*; 101(1-3): 141-147.
- Irazusta, J., Larrinaga, G., González-Maeso, J., Gil, J., Meana, J.J. y Casis, L. (2002).** Distribution of prolyl endopeptidase activities in rat and human brain. *Eurochem Int*; 40(4): 337-345.
- Isaev, N.K., Stelmashook, E.V., Halle, A., Harms, C., Lautenschlager, M., Weih, M., Dirnagl, U., Victorov, I.V. y Zorov, D.B. (2000).** Inhibition of Na (+), K (+)-ATPase activity in cultured rat cerebellar granule cells prevents the onset of apoptosis induced by low potassium. *Neurosci Lett*; 283(1): 41-44.
- Ishino, T., Ohtsuki, S., Homma, K. y Natori, S. (1998).** cDNA cloning of mouse prolyl endopeptidase and its involvement in DNA synthesis by Swiss 3T3 cells. *J. Biochem*; 123(3): 540-545.

-
- Ishiura, S., Tsukahara, T., Tabira, T., Shimizu, T., Arahata, K. y Sugita, H. (1990).** Identification of a putative amyloid A4-generating enzyme as a prolyl endopeptidase. *FEBS Lett*; 260(1): 131-134.
- Ito, M. (1984).** Granule cells, en *The Cerebellum and Neuronal Control* (Ito, M., ed.) pp. 74-85. Raven, Nueva York.
- IUBMB, 1992.** Enzyme Nomenclature 1992. International Union of Biochemistry and Molecular Biology, San Diego.
- Jalkanen, A.J., Puttonen, K.A., Venäläinen, J.I., Sinervä, V., Mannila, A., Ruotsalainen, S., Jarho, E.M., Wallén, E.A. y Männistö, P.T. (2007).** Beneficial effect of prolyl oligopeptidase inhibition on spatial memory in young but not in old scopolamine-treated rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*; 100(2): 132-138.
- Jantas, D. y Lason, W. (2009a).** Anti-apoptotic effect of memantine against staurosporine- and low-potassium-induced cell death in cerebellar granule cells: a development-dependent effect. *Pharmacol Rep*; 61(5): 827-937.
- Jantas, D. y Lason, W. (2009b).** Different mechanisms of NMDA-mediated protection against neuronal apoptosis: a stimuli-dependent effect. *Neurochem Res*; 34(11): 2040-2054.
- Jarho, E.M., Wallén, E.A., Christiaans, J.A., Forsberg, M.M., Venäläinen, J.I., Männistö, P.T., Gynther, J. y Poso, A. (2005).** Dicarboxylic acid azacycle 1-prolyl-pyrrolidine amides as prolyl oligopeptidase inhibitors and three-dimensional quantitative structure-activity relationship of the enzyme-inhibitor interactions. *J Med Chem*; 48(15): 4772-4782.
- Jarho, E.M., Venäläinen, J.I., Poutiainen, S., Leskinen, H., Vepsäläinen, J., Christiaans, J.A., Forsberg, M.M., Männistö, P.T. y Wallén, E.A. (2007).** 2(S)-(Cycloalk-1-enecarbonyl)-

- 1-(4-phenylbutanoyl) pyrrolidines and 2(S)-(aroyl)-1-(4-phenylbutanoyl) pyrrolidines as prolyl oligopeptidase inhibitors. *Bioorg Med Chem*; 15(5): 2024-2031.
- Jiang, C.H., Tsien, J.Z., Schultz, P.G. y Hu, Y. (2001).** The effects of aging on gene expression in the hypothalamus and cortex of mice. *Proc Natl Acad Sci USA*; 98(4): 1930-1934.
- Joshi, S., Guleria, R., Pan, J., DiPette, D. y Singh, U.S. (2006).** Retinoic acid receptors and tissue-transglutaminase mediate short-term effect of retinoic acid on migration and invasion of neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Oncogene*; 25(2): 240-247.
- Kaczmarek, L. y Kaminska, B. (1989).** Molecular biology of cell activation. *Exp Cell Res*; 183(1): 24-35.
- Kalwant, S. y Porter, A.G. (1991).** Purification and characterization of human brain prolyl endopeptidase. *Biochem J*; 276(Pt 1): 237-244.
- Kamei, H., Ueki, T., Obi, Y., Fukagawa, Y. y Oki, T. (1992).** Protective effect of eurystatins A and B, new prolyl endopeptidase inhibitors, on scopolamine-induced amnesia in rats. *Jpn J Pharmacol*; 60(4): 377-380.
- Kandel, E.S. y Hay, N. (1999).** The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res*; 253(1): 210-229.
- Kaplan, D.R. y Cooper, E. (2001).** PI-3 kinase and IP₃: partners in NT3-induced synaptic transmission. *Nat Neurosci*; 4(1): 5-7.
- Kazuba, K., Róg, T., Danne, R., Canning, P., Fülöp, V., Juhász, T., Szeltner, Z., St Pierre, J.F., García-Horsman, A., Männistö, P.T., Karttunen, M., Hokkanen, J. y Bunker, A. (2012).** Molecular dynamics, crystallography and mutagenesis studies on

the substrate gating mechanism of prolyl oligopeptidase. *Biochimie*; 94(6): 1398-141.

Kaszuba, K., Róg, T., St Pierre, J.F., Männistö, P.T., Karttunen, M. y Bunker, A. (2009). Molecular dynamics study of prolyl oligopeptidase with inhibitor in binding cavity. *SAR QSAR Environ Res*; 20(7-8): 595-609.

Kato, T., Nakano, T., Kojima, K., Nagatsu, T. y Sakakibara, S. (1980a). Changes in prolyl endopeptidase during maturation of rat brain and hydrolysis of substance P by the purified enzyme. *J Neurochem*; 35(3): 527-535.

Kato, T., Okada, M. y Nagatsu, T. (1980b). Distribution of post-proline cleaving enzyme in human brain and peripheral tissues. *Mol Cell Biochem*; 32(3): 117-121.

Kato, A., Fukunari, A., Sakai, Y. y Nakajima, T. (1997). Prevention of amyloid-like deposition by a selective prolyl endopeptidase inhibitor, Y-29794, in senescence-accelerated mouse. *J Pharmacol Exp Ther*; 283(1): 328-335.

Katsube, N., Sunaga, K., Chuang, D.M. e Ishitani, R. (1996). ONO-1603, a potential antidementia drug, shows neuroprotective effects and increases m3-muscarinic receptor mRNA levels in differentiating rat cerebellar granule neurons. *Neurosci Lett*; 214(2-3): 151-154.

Katsube, N., Sunaga, K., Aishita, H., Chuang, D.M. e Ishitani, R. (1999). ONO-1603, a potential antidementia drug, delays age-induced apoptosis and suppresses overexpression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in cultured central nervous system neurons. *J Pharmacol Exp Ther*; 288(1): 6-13.

- Kelleher, R.J. 3^o, Govindarajan, A., Jung, H.Y., Kang, H. y Tonegawa, S. (2004).** Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory. *Cell*; 116(3): 467-479.
- Khosla, C., Gray, G.M. y Sollid, L.M. (2005).** Putative efficacy and dosage of prolyl endopeptidase for digesting and detoxifying gliadin peptides. *Gastroenterology*; 129(4): 1362-1363.
- Kim, Y.J., Kim, Y.S., Kim, M.S. y Ryu, J.C. (2007).** The inhibitory mechanism of methylmercury on differentiation of human neuroblastoma cells. *Toxicology*; 234(1-2): 1-9.
- Kimura, A., Matsui, H. y Takahashi, T. (2002).** Expression and localization of prolyl oligopeptidase in mouse testis and its possible involvement in sperm motility. *Zoolog Sci*; 19(1): 93-102.
- King, J.S., Teo, R., Reddy, J.V., Peters, O., Orabi, B., Hoeller, O., Williams, R.S. y Harwood, A.J. (2009).** The mood stabilizer lithium suppresses PIP3 signalling in Dictyostelium and human cells. *Dis Model Mech*; 2(5-6): 306-312.
- Klegeris, A., Li, J., Bammler, T.K., Jin, J., Zhu, D., Kashima, D.T., Pan, S., Hashioka, S., Maguire, J., McGeer, P.L. y Zhang, J. (2008).** Prolyl endopeptidase is revealed following SILAC analysis to be a novel mediator of human microglial and THP-1 cell neurotoxicity. *Glia*; 56(6): 675-685.
- Koida, M. y Walter, R. (1976). Post-proline cleaving enzyme. Purification of this endopeptidase by affinity chromatography. *J Biol Chem*; 251(23):7593-7599.
- Komuro, H. y Rakic, P. (1998).** Orchestration of neuronal migration by activity of ion channels, neurotransmitter receptors, and intracellular Ca²⁺ fluctuations. *J Neurobiol*; 37(1): 110-130.

-
- Kulich, S.M. y Chu, C.T. (2001).** Sustained extracellular signal-regulated kinase activation by 6-hydroxydopamine: implications for Parkinson's disease. *J Neurochem*; 77(4): 1058-1066.
- Kume, T., Kawato, Y., Osakada, F., Izumi, Y., Katsuki, H., Nakagawa, T., Kaneko, S., Niidome, T., Takada-Takatori, Y. y Akaike, A. (2008).** Dibutyl cyclic AMP induces differentiation of human neuroblastoma SH-SY5Y cells into a noradrenergic phenotype. *Neurosci Lett*; 443(3): 199-203.
- Laitinen, K.S., van Groen, T., Tanila, H., Venäläinen, J., Männistö, P.T. y Alafuzoff, I. (2001).** Brain prolyl oligopeptidase activity is associated with neuronal damage rather than beta-amyloid accumulation. *Neuroreport*; 12(15): 3309-3312.
- Lasher, R.S. y Zagon, I.S. (1972).** The effect of potassium on neuronal differentiation in cultures of dissociated newborn rat cerebellum. *Brain Res*; 41(2): 482-488.
- Lawrence, A.C., Clark, I.J. y Campbell, D.J. (1992).** Increased angiotensin-(1-7) in hypophysial-portal plasma of conscious sheep. *Neuroendocrinology*; 55(1): 105-114.
- Lee, J.H., Lee, S.Y., Lee, K.S., Jang, H.J., Lee, K.H., Hahn, T.R. y Paik, Y.S. (2004).** Prolyl endopeptidase inhibitors from the leaves of Ginkgo biloba. *Planta Med*; 70(12): 1228-1230.
- Li, M., Chen, C., Davies, D.R. y Chiu, T.K. (2010).** An induced-fit mechanism for prolyl endopeptidase. *J Biol Chem*; 285(28): 21487-21495.
- Llansola, M., Boscá, L., Felipe, V. y Hortelano, S. (2003).** Ammonia prevents glutamate-induced but not low K(+)-induced apoptosis in cerebellar neurons in culture. *Neuroscience*; 117(4): 899-907.

- Lu, J., Tan, L., Li, P., Gao, H., Fang, B., Ye, S., Geng, Z., Zheng, P. y Song, H. (2009).** All-trans retinoic acid promotes neural lineage entry by pluripotent embryonic stem cells via multiple pathways. *BMC Cell Biol*; 10: 57.
- Ma, D., Zhang, M., Larsen, C.P., Xu, F., Hua, W., Yamashima, T., Mao, Y. y Zhou, L. (2010).** DHA promotes the neuronal differentiation of rat neural stem cells transfected with GPR40 gene. *Brain Res*; 1330: 1-8.
- Mackrill, J.J., Challiss, R.A., O'connell, D.A., Lai, F.A. y Nahorski, S.R. (1997).** Differential expression and regulation of ryanodine receptor and myo-inositol 1,4,5-trisphosphate receptor Ca²⁺ release channels in mammalian tissues and cell lines. *Biochem J.*; 327(Pt 1): 251-258.
- Maes, M., Goossens, F., Scharpé, S., Meltzer, H.Y., D'Hondt, P. y Cosyns, P. (1994).** Lower serum prolyl endopeptidase enzyme activity in major depression: further evidence that peptidases play a role in the pathophysiology of depression. *Biol Psychiatry*; 35(8): 545-552.
- Maes, M., Goossens, F., Scharpé, S., Calabrese, J., Desnyder, R. y Meltzer, H.Y. (1995).** Alterations in plasma prolyl endopeptidase activity in depression, mania, and schizophrenia: effects of antidepressants, mood stabilizers, and antipsychotic drugs. *Psychiatry Res*; 58(3): 217-225.
- Männistö, P.T., Venäläinen, J., Jalkanen, A. y García-Horsman, J.A. (2007).** Prolyl oligopeptidase: a potential target for the treatment of cognitive disorders. *Drug News Perspect*; 20(5): 293-305.
- Mantle, D., Falkous, G., Ishiura, S., Blanchard, P.J. y Perry, E.K. (1996).** Comparison of proline endopeptidase activity in brain

tissue from normal cases and cases with Alzheimer's disease, Lewy body dementia, Parkinson's disease and Huntington's disease. *Clin Chim Acta*; 249(1-2): 129-139.

Marques, M.R., Stüker, C., Kichik, N., Tarragó, T., Giralt, E., Morel, A.F. y Dalcol, I.I. (2010). Flavonoids with prolyl oligopeptidase inhibitory activity isolated from *Scutellaria racemosa* Pers. *Fitoterapia*; 81(6): 552-556.

Marti, T., Molberg, O., Li, Q., Gray, G.M., Khosla, C. y Sollid, L.M. (2005). Prolyl endopeptidase-mediated destruction of T cell epitopes in whole gluten: chemical and immunological characterization. *J Pharmacol Exp Ther*; 312(1): 19-26.

Martin, A.K., Nahorski, S.R. y Willars, G.B. (1999). Complex relationship between Ins(1,4,5)P₃ accumulation and Ca²⁺-signalling in a human neuroblastoma revealed by cellular differentiation. *Br J Pharmacol*; 126 (7): 1559-1566.

Masiá, S., Alvarez, S., De Lera, A.R. y Baretino, D. (2007). Rapid, nongenomic actions of retinoic acid on phosphatidylinositol-3-kinase signaling pathway mediated by the retinoic acid receptor. *Mol Endocrinol*; 21(10): 2391-2402.

Matsubara, Y., Ono, T., Tsubuki, S., Irie, S. y Kawashima, S. (1998). Transient up-regulation of a prolyl endopeptidase activity in the microsomal fraction of rat liver during postnatal development. *Eur J Biochem*; 252(1): 178-183.

Matsubara, S., Takahashi, T. y Kimura, A.P. (2011). Localization and subcellular distribution of prolyl oligopeptidase in the mouse placenta. *J Mol Histol*; 42(3): 251-264.

Matsuo, T. y Thiele, C.J. (1998). p27Kip1: a key mediator of retinoic acid induced growth arrest in the SMS-KCNR human neuroblastoma cell line. *Oncogene*; 16(25): 3337-3343.

- Matysiak-Budnik, T., Candalh, C., Cellier, C., Dugave, C., Namane, A., Vidal-Martinez, T., Cerf-Bensussan, N. y Heyman, M. (2005).** Limited efficiency of prolyl-endopeptidase in the detoxification of gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterology*; 129(3): 786-796.
- McCullagh, P. y Nelder, J.A. (1989).** Generalized Linear Models, ed. 2. London, Chapman & Hall.
- Melino, G., Piacentini, M., Patel, K., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Piredda, L. y Kemshead, J.T. (1991).** Retinoic acid and alpha-difluoromethylornithine induce different expression of neural-specific cell adhesion molecules in differentiating neuroblastoma cells. *Prog Clin Biol Res*; 366: 283-291.
- Mentlein, R. (1988).** Proline residues in the maturation and degradation of peptide hormones and neuropeptides. *FEBS Lett*; 234(2): 251-256.
- Miloso, M., Villa, D., Crimi, M., Galbiati, S., Donzelli, E., Nicolini, G. y Tredici, G. (2004).** Retinoic acid-induced neuritogenesis of human neuroblastoma SH-SY5Y cells is ERK independent and PKC dependent. *J Neurosci Res*; 75(2): 241-252.
- Miñana, M.D., Montoliu, C., Llansola, M., Grisolia, S., Felipo, V. (1998).** Nicotine prevents glutamate-induced proteolysis of the microtubule-associated protein MAP-2 and glutamate neurotoxicity in primary cultures of cerebellar neurons. *Neuropharmacology*; 37(7): 847-857.
- Miura, N., Shibata, S. y Watanabe, S. (1995).** Increase in the septal vasopressin content by prolyl endopeptidase inhibitors in rats. *Neurosci Lett*; 196(1-2): 128-130.
- Miura, N., Shibata, S. y Watanabe, S. (1997).** Z-321, a prolyl endopeptidase inhibitor, augments the potentiation of synaptic

transmission in rat hippocampal slices. *Behav Brain Res*; 83(1-2): 213-216.

Miyata, T., Maeda, T. y Lee, J.E. (1999). NeuroD is required for differentiation of the granule cells in the cerebellum and hippocampus. *Genes Dev*; 13(13): 1647-1652.

Miyazaki, A., Toide, K., Sasaki, Y., Ichitani, Y. e Iwasaki, T. (1998). Effect of a prolyl endopeptidase inhibitor, JTP-4819, on radial maze performance in hippocampal-lesioned rats. *Pharmacol Biochem Behav*; 59(2): 361-368.

Mollereau, C., Zajac, J.M. y Roumy, M. (2007). Staurosporine differentiation of NPFF2 receptor-transfected SH-SY5Y neuroblastoma cells induces selectivity of NPFF activity towards opioid receptors. *Peptides*; 28(5): 1125-1128.

Momeni, N.T., Yoshimoto, T., Ryberg, B., Sandberg-Wollheim, M. y Grubb, A. (2003). Factors influencing analysis of prolyl endopeptidase in human blood and cerebrospinal fluid: increase in assay sensitivity. *Scand J Clin Lab Invest*; 63(6): 387-395.

Morain, P., Robin, J.L., De Nanteuil, G., Jochemsen, R., Heidet, V. y Guez, D. (2000). Pharmacodynamic and pharmacokinetic profile of S 17092, a new orally active prolyl endopeptidase inhibitor, in elderly healthy volunteers. A phase I study. *Br J Clin Pharmacol*; 50(4): 350-359.

Morain, P., Lestage, P., De Nanteuil, G., Jochemsen, R., Robin, J.L., Guez, D. y Boyer, P.A. (2002). S 17092: a prolyl endopeptidase inhibitor as a potential therapeutic drug for memory impairment. *CNS Drug Rev*; 8(1): 31-52.

Moreno-Baylach, M.J., Puttonen, K.A., Tenorio-Laranga, J., Venäläinen, J.I., Storvik, M., Forsberg, M.M. y García-Horsman, J.A. (2011). Prolyl endopeptidase is involved in

Bibliografía

- cellular signaling in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurosignals*; 19(2): 97-109.
- Mosmann, T. (1983).** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*; 65(1-2): 55-63.
- Murray, B., Alessandrini, A., Cole, A.J., Yee, A.G. y Furshpan, E.J. (1998).** Inhibition of the p44/42 MAP kinase pathway protects hippocampal neurons in a cell-culture model of seizure activity. *Proc Natl Acad Sci USA*; 95(20): 11975-11980.
- Murray, J.N. e Igwe, O.J. (2003).** Regulation of beta-amyloid precursor protein and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor gene expression during differentiation of a human neuronal cell line. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*; 27(3):351-363.
- Myöhänen, T.T., Venäläinen, J.I., Tupala, E., García-Horsman, J.A., Miettinen, R. y Männistö, P.T. (2007).** Distribution of immunoreactive prolyl oligopeptidase in human and rat brain. *Neurochem Res*; 32(8): 1365-1374.
- Myöhänen, T.T., Venäläinen, J.I., García-Horsman, J.A., Piltonen, M. y Männistö, P.T. (2008a).** Cellular and subcellular distribution of rat brain prolyl oligopeptidase and its association with specific neuronal neurotransmitters. *J Comp Neurol*; 507(5): 1694-1708.
- Myöhänen, T.T., Venäläinen, J.I., García-Horsman, J.A., Piltonen, M. y Männistö, P.T. (2008b).** Distribution of prolyl oligopeptidase in the mouse whole-body sections and peripheral tissues. *Histochem Cell Biol*; 130(5): 993-1003.
- Myöhänen, T.T., Venäläinen, J.I., García-Horsman, J.A. y Männistö, P.T. (2008c).** Spatial association of prolyl oligopeptidase, inositol 1,4,5-triphosphate type 1 receptor, substance P and its neurokinin-1 receptor in the rat brain: an

immunohistochemical colocalization study. *Neuroscience*; 153(4): 1177-1189.

Myöhänen, T.T., Tenorio-Laranga, J., Jokinen, B., Vázquez-Sánchez, R., Moreno-Baylach, M.J., García-Horsman, J.A. y Männistö, P.T. (2011). Prolyl oligopeptidase induces angiogenesis both *in vitro* and *in vivo* in a novel regulatory manner. *Br J Pharmacol*; 163(8): 1666-1678.

Myöhänen, T.T., Hannula, M.J., Van Elzen, R., Gerard, M., Van Der Veken, P., García-Horsman, J.A., Baekelandt, V., Männistö, P.T. y Lambeir, A.M. (2012). A prolyl oligopeptidase inhibitor, KYP-2047, reduces α -synuclein protein levels and aggregates in cellular and animal models of Parkinson's disease. *Br J Pharmacol*; 166(3): 1097-1113.

Odaka, C., Mizuochi, T., Shirasawa, T., Morain, P. y Checler, F. (2002). Murine T cells expressing high activity of prolyl endopeptidase are susceptible to activation-induced cell death. *FEBS Lett*; 512 (1-3): 163-167.

Ogawa, M. (2004). Pharmacological treatments of cerebellar ataxia. *Cerebellum*; 3(2): 107-111.

Ohtsuki, S., Homma, K., Kurata, S., Komano, H. y Natori, S. (1994). A prolyl endopeptidase of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly): its purification and suggestion for its participation in the differentiation of the imaginal discs. *J Biochem*; 115(3): 449-453.

Ohtsuki, S., Homma, K., Kurata, S. y Natori, S. (1997). Nuclear localization and involvement in DNA synthesis of *Sarcophaga* prolyl endopeptidase. *J Biochem*; 121(6): 1176-1181.

O'Leary, R.M. y O'Connor, B. (1995). Identification and localisation of a synaptosomal membrane prolyl endopeptidase from bovine brain. *Eur J Biochem*; 227(1-2): 277-283.

- O'Leary, R.M., Gallagher, S.P. y O'Connor, B. (1996).** Purification and characterization of a novel membrane-bound form of prolyl endopeptidase from bovine brain. *Int J Biochem Cell Biol*; 28(4): 441-449.
- Olivo, Rdo. A., Teixeira, Cde. F. y Silveira, P.F. (2005).** Representative aminopeptidases and prolyl endopeptidase from murine macrophages: comparative activity levels in resident and elicited cells. *Biochem Pharmacol*; 69(10): 1441-1450.
- Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S.M., Harel, M., Remington, S.J., Silman, I., Schrag, J. y cols. (1992).** The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng*; 5(3): 197-211.
- Oyarce, A.M. y Fleming, P.J. (1991).** Multiple forms of human dopamine beta-hydroxylase in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Arch Biochem Biophys*; 290(2): 503-510.
- Påhlman, S., Odelstad, L., Larsson, E., Grotte, G. y Nilsson, K. (1981).** Phenotypic changes of human neuroblastoma cells in culture induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate. *Int J Cancer*; 28(5): 583-589.
- Påhlman, S., Hoehner, J.C., Nånbe, E., Hedborg, F., Fagerström, S., Gestblom, C., Johansson, I., Larsson, U., Lavenius, E., Ortoft, E. y cols. (1995).** Differentiation and survival influences of growth factors in human neuroblastoma. *Eur J Cancer*; 31A(4): 453-458.
- Park, D.H., Park, S.J., Kim, J.M., Jung, W.Y. y Ryu, J.H. (2010).** Subchronic administration of rosmarinic acid, a natural prolyl oligopeptidase inhibitor, enhances cognitive performances. *Fitoterapia*; 81(6): 644-648.
- Parrizas, M., Blakesley, V.A., Beitner-Johnson, D. y Le Roith, D. (1997).** The proto-oncogene Crk-II enhances apoptosis by a Ras-

dependent, Raf-1/MAP kinase-independent pathway. *Biochem Biophys Res Commun*; 234(3): 616-620.

Peltonen, I., Jalkanen, A.J., Sinervä, V., Puttonen, K.A. y Männistö, P.T. (2010). Different effects of scopolamine and inhibition of prolyl oligopeptidase on mnemonic and motility functions of young and 8- to 9-month-old rats in the radial-arm maze. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*; 106(4): 280-287.

Peng, H., Carretero, O.A., Rajj, L., Yang, F., Kapke, A. y Rhaleb, N.E. (2001). Antifibrotic effects of N-acetyl-seryl-aspartyl-Lysyl-proline on the heart and kidney in aldosterone-salt hypertensive rats. *Hypertension*; 37(2 parte 2): 794-800.

Perron, J.C. y Bixby, J.L. (1999). Distinct neurite outgrowth signaling pathways converge on ERK activation. *Mol Cell Neurosci*; 13(5): 362-378.

Perry, G., Roder, H., Nunomura, A., Takeda, A., Friedlich, A.L., Zhu, X., Raina, A.K., Holbrook, N., Siedlak, S.L., Harris, P.L. y Smith, M.A. (1999). Activation of neuronal extracellular receptor kinase (ERK) in Alzheimer disease links oxidative stress to abnormal phosphorylation. *Neuroreport*; 10(11): 2411-2415.

Petit, A., Barelhim, H., Morain, P. y Checler, F. (2000). Novel proline endopeptidase inhibitors do not modify Abeta40/42 formation and degradation by human cells expressing wild-type and swedish mutated beta-amyloid precursor protein. *Br J Pharmacol*; 130(7): 1613-1617.

Pfeiffer, B.E. y Huber, K.M. (2006). Current advances in local protein synthesis and synaptic plasticity. *J Neurosci*; 26(27): 7147-7150.

Piper, J.L., Gray, G.M. y Khosla, C. (2004). Effect of prolyl endopeptidase on digestive-resistant gliadin peptides *in vivo*. *J Pharmacol Exp Ther*; 311(1): 213-219.

- Polgár, L. (1992a).** Structural relationship between lipases and peptidases of the prolyl oligopeptidase family. *FEBS Lett*; 311(3): 281-284.
- Polgár, L. (1992b).** Prolyl endopeptidase catalysis. A physical rather than a chemical step is rate-limiting. *Biochem J*; 283(Pt3): 647-648.
- Polgár, L. (2002).** The prolyl oligopeptidase family. *Cell Mol Life Sci*; 59(2): 349-362.
- Portevin, B., Benoist, A., Rémond, G., Hervé, Y., Vincent, M., Lepagnol, J. y De Nanteuil, G. (1996).** New prolyl endopeptidase inhibitors: *in vitro* and *in vivo* activities of azabicyclo[2.2.2]octane, azabicyclo[2.2.1] heptane, and perhydroindole derivatives. *J Med Chem*; 39(12): 2379-2391.
- Prange, A.J. Jr., Garbutt, J.C., Loosen, P.T., Bissette, G. y Nemeroff, C.B. (1987).** The role of peptides in affective disorders: a review. *Prog Brain Res*; 72: 235-247.
- Puttonen, K.A., Lehtonen, S., Raasmaja, A. y Männistö, P.T. (2006).** A prolyl oligopeptidase inhibitor, Z-Pro-Prolinal, inhibits glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase translocation and production of reactive oxygen species in CV1-P cells exposed to 6-hydroxydopamine. *Toxicol In Vitro*; 20(8): 1446-1454.
- Puttonen, K.A., Lehtonen, S., Lampela, P., Männistö, P.T. y Raasmaja, A. (2008).** Different viabilities and toxicity types after 6-OHDA and Ara-C exposure evaluated by four assays in five cell lines. *Toxicol In Vitro*; 22(1): 182-189.
- Quinto, B.M., Juliano, M.A., Hirata, I., Carmona, A.K., Juliano, L. y Casarini, D.E. (2000).** Characterization of a prolyl endopeptidase (kininase) from human urine using fluorogenic

- quenched substrates. *Int J Biochem Cell Biol*; 32(11-12): 1161-1172.
- Rapoport, M. y Ferreira, A. (2000).** PD98059 prevents neurite degeneration induced by fibrillar beta-amyloid in mature hippocampal neurons. *J Neurochem*; 74(1): 125-133.
- Rhaleb, N.E., Peng, H., Harding, P., Tayeh, M., LaPointe, M.C. y Carretero, O.A. (2001a).** Effect of N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline on DNA and collagen synthesis in rat cardiac fibroblasts. *Hypertension*; 37(3): 827-832.
- Rhaleb, N.E., Peng, H., Yang, X.P., Liu, Y.H., Mehta, D., Ezan, E. y Carretero, O.A. (2001b).** Long-term effect of N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline on left ventricular collagen deposition in rats with 2-kidney, 1-clip hypertension. *Circulation*; 103(25): 3136-3141.
- Rampon, C., Jiang, C.H., Dong, H., Tang, Y.P., Lockhart, D.J., Schultz, P.G., Tsien, J.Z. y Hu, Y. (2000).** Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA*; 97(23): 12880-12884.
- Rawlings, N.D. y Barret, A.J. (1994).** Families of serine peptidases. *Methods Enzymol*; 244: 19-6.
- Rawlings, N.D., Tolle, D.P. y Barrett, A.J. (2004).** MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res*; 32(Database issue): D160-D164.
- Rawlings, N.D., Barret, A.J. y Bateman, A. (2010).** MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res*; 38(Database issue): D227-D233.
- Rennex, D., Hemmings, B.A., Hofsteenge, J. y Stone, S.R. (1991).** cDNA cloning of porcine brain prolyl endopeptidase and

- identification of the active-site seryl residue. *Biochemistry*; 30(8): 2195-2203.
- Reynolds, C.P. y Maples, J. (1985).** Modulation of cell surface antigens accompanies morphological differentiation of human neuroblastoma cell lines. *Prog Clin Biol Res*; 175: 13-37.
- Rea, D. y Fülöp, V. (2006).** Structure-function properties of prolyl oligopeptidase family enzymes. *Cell Biochem Biophys*; 44(3): 349-365.
- Ring, A. y Tanso, R. (2007).** Measurements with fluorescent probes in primary neural cultures; improved multiwell techniques. *J Pharmacol Toxicol Methods*; 56(3): 300-307.
- Rios, I., Álvarez-Rodríguez, R., Martí, E. y Pons, S. (2004).** Bmp2 antagonizes sonic hedgehog-mediated proliferation of cerebellar granule neurones through Smad5 signalling. *Development*; 131(13): 3159-3168.
- Rosenblum, J.S. y Kozarich, J.W. (2003).** Prolyl peptidases: a serine protease subfamily with high potential for drug discovery. *Urr Opin Chem Biol*; 7(4): 496-504.
- Ross, R.A., Spengler, B.A. y Biedler, J.L. (1983).** Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J Natl Cancer Inst*; 71(4): 741-747.
- Rossner, S., Schulz, I., Zeitschel, U., Schliebs, R., Bigl, V. y Demuth, H.U. (2005).** Brain prolyl endopeptidase expression in aging, APP transgenic mice and Alzheimer's disease. *Neurochem Res*; 30(6-7): 695-702.
- Ryder, E.F. y Cepko, C.L. (1994).** Migration patterns of clonally related granule cells and their progenitors in the developing chick cerebellum. *Neuron*; 12(5): 1011-1028.

-
- Sakaguchi, M., Matsuda, T., Matsumura, E., Yoshimoto, T. y Takaoka, M. (2011).** Prolyl oligopeptidase participates in cell cycle progression in a human neuroblastoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun*; 409(4): 693-698.
- Salers, P. (1994).** Evidence for the presence of prolyl oligopeptidase and its endogenous inhibitor in neonatal rat pancreatic beta-cells. *Regul Pept*; 50(3): 235-245.
- Savill, R.M., Scotting, P.J. y Coyle, B. (2005).** Strategies to investigate gene expression and function in granule cells. *Cerebellum*; 4(4): 271-278.
- Schaeffer, H.J. y Weber, M.J. (1999).** Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol*; 19(4): 2435-2444.
- Scheiffele, P., Fan, J., Choih, J., Fetter, R. y Serafini, T. (2000).** Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell*; 101(6): 657-669.
- Schneider, J.S., Giardiniere, M. y Morain, P. (2002).** Effects of the prolyl endopeptidase inhibitor S 17092 on cognitive deficits in chronic low dose MPTP-treated monkeys. *Neuropsychopharmacology*; 26(2): 176-182.
- Sei, Y., Fossum, L., Goping, G., Skolnick, P. y Basile, A.S. (1998).** Quinolinic acid protects rat cerebellar granule cells from glutamate-induced apoptosis. *Neurosci Lett*; 241(2-3): 180-184.
- Shinoda, M., Matsuo, A. y Toide, K. (1996).** Pharmacological studies of a novel prolyl endopeptidase inhibitor, JTP-4819, in rats with middle cerebral artery occlusion. *Eur J Pharmacol*; 305(1-3): 31-38.

- Shinoda, M., Toide, K., Ohsawa, I. y Kohsaka, S. (1997).** Specific inhibitor for prolyl endopeptidase suppresses the generation of amyloid beta protein in NG108-15 cells. *Biochem Biophys Res Commun*; 235(3): 641-645.
- Shinoda, M., Miyazaki, A., Toide, K. (1999).** Effect of a novel prolyl endopeptidase inhibitor, JTP-4819, on spatial memory and on cholinergic and peptidergic neurons in rats with ibotenate-induced lesions of the nucleus basalis magnocellularis. *Behav Brain Res*; 99(1): 17-25.
- Shishido, Y., Furushiro, M., Tanabe, S., Shibata, S., Hashimoto, S. y Yokokura, T. (1999).** Effects of prolyl endopeptidase inhibitors and neuropeptides on delayed neuronal death in rats. *Eur J Pharmacol*; 372(2): 135-142.
- Sidell, N., Altman, A., Haussler, M.R. y Seeger, R.C. (1983).** Effects of retinoic acid (RA) on the growth and phenotypic expression of several human neuroblastoma cell lines. *Exp Cell Res*; 148(1): 21-30.
- Siegel, M., Bethune, M.T., Gass, J., Ehren, J., Xia, J., Johannsen, A., Stuge, T.B., Gray, G.M., Lee, P.P. y Khosla, C. (2006).** Rational design of combination enzyme therapy for celiac sprue. *Chem Biol*; 13(6): 649-658.
- Singh, J. y Kaur, G. (2007).** Transcriptional regulation of polysialylated neural cell adhesion molecule expression by NMDA receptor activation in retinoic acid-differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cultures. *Brain Res*; 1154: 8-21.
- Siviter, R.J. y Cockle, S.M. (1995).** Peptides related to thyrotrophin-releasing hormone are degraded in seminal plasma by an enzyme similar to prolyl endopeptidase. *J Endocrinol*; 144(1): 61-66.

-
- Schulz, I., Gerhartz, B., Neubauer, A., Holloschi, A., Heiser, U., Hafner, M. y Demuth, H.U. (2002).** Modulation of inositol 1,4,5-triphosphate concentration by prolyl endopeptidase inhibition. *Eur J Biochem*; 269(23): 5813-5820.
- Schulz, I., Zeitschel, U., Rudolph, T., Ruiz-Carrillo, D., Rahfeld, J.U., Gerhartz, B., Bigl, V., Demuth, H.U. y Rossner, S. (2005).** Subcellular localization suggests novel functions for prolyl endopeptidase in protein secretion. *J Neurochem*; 94(4): 970-979.
- Slagsvold, H.H., Rosseland, C.M., Jacobs, C., Khuong, E., Kristoffersen, N., Gaarder, M., Fallgren, A.B., Huitfeldt, H.S. y Paulsen, R.E. (2003).** High molecular weight DNA fragments are processed by caspase sensitive or caspase independent pathways in cultures of cerebellar granule neurons. *Brain Res*; 984(1-2): 111-121.
- Solecki, D.J., Liu, X.L., Tomoda, T., Fang, Y., Hatten, M.E. (2001).** Activated Notch2 signaling inhibits differentiation of cerebellar granule neuron precursors by maintaining proliferation. *Neuron*; 31(4): 557-568.
- Soriano, S., Lu, D.C., Chandra, S., Pietrzik, C.U. y Koo, E.H. (2001).** The amyloidogenic pathway of amyloid precursor protein (APP) is independent of its cleavage by caspases. *J Biol Chem*; 276(31): 29045-29050.
- Stone, S.R., Rennex, D., Wikstrom, P., Shaw, E. y Hofsteenge, J. (1991).** Inactivation of prolyl endopeptidase by a peptidylchloromethane. Kinetics of inactivation and identification of sites of modification. *Biochem J*; 276(Pt 3): 837-840.
- Subramaniam, S., Zirrgiebel, U., von Bohlen Und Halbach, O., Strelau, J., Laliberté, C., Kaplan, D.R. y Unsicker, K. (2004).** ERK activation promotes neuronal degeneration predominantly

through plasma membrane damage and independently of caspase-3. *J Cell Biol*; 165(3): 357-369.

Sweatt, J.D. (2004). Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol*; 14(3): 311-317.

Szappanos, A.E., Lakics, V. y Erdö, S.L. (1994). Pronounced increase in prolyl endopeptidase activity in primary cultures of rat cerebral cortex during neuronal differentiation. *Neurobiology*; 2(3): 211-221.

Tai, K.K. y Truong, D.D. (2007). NMDA receptor-mediated excitotoxicity contributes to the cerebral hypoxic injury of a rat model of posthypoxic myoclonus. *Brain Res*; 1133(1): 209-215.

Takahashi, T., Deng, Y., Maruyama, W., Dostert, P., Kawai, M. y Naoi, M. (1994). Uptake of a neurotoxin-candidate, (R)-1,2-dimethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline into human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells by dopamine transport system. *J Neural Transm Gen Sect*; 98(2): 107-118.

Tanabe, S., Shishido, Y., Furushiro, M., Kado, K., Hashimoto, S., Yokokura, T. y Ohsawa, T. (1997). Facilitation of passive avoidance response by newly synthesized cationized arginine vasopressin fragment 4-9 in rats. *Pharmacol Biochem Behav*; 57(1-2): 251-256.

Tanabe, S., Shishido, Y., Nakayama, Y., Furushiro, M., Hashimoto, S., Terasaki, T., Tsujimoto, G., Yokokura, T. (1999). Effects of arginine-vasopressin fragment 4-9 on rodent cholinergic systems. *Pharmacol Biochem Behav*; 63(4): 549-553.

Tanaka, M., Duncan, R.S., McClung, N., Yannazzo, J.A., Hwang, S.Y., Marunouchi, T., Inokuchi, K. y Koulen, P. (2006). Homer proteins control neuronal differentiation through IP(3) receptor signaling. *FEBS Lett*; 580(26): 6145-6150.

-
- Tang, S.J. y Schuman, E.M. (2002).** Protein synthesis in the dendrite. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*; 357(1420): 521-529.
- Tenorio-Laranga, J., Venäläinen, J.I., Männistö, P.T. y García-Horsman, J.A. (2008).** Characterization of membrane-bound prolyl- endopeptidase from brain. *FEBS J*; 275 (17): 4415-4427.
- Tenorio-Laranga, J., Coret-Ferrer, F., Casanova-Estruch, B., Burgal, M. y García-Horsman, J.A. (2010).** Prolyl oligopeptidase is inhibited in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroinflammation*; 7(1): 23.
- Toide, K., Iwamoto, Y., Fujiwara, T. y Abe, H. (1995a).** JTP-4819: a novel prolyl endopeptidase inhibitor with potential as a cognitive enhancer. *J Pharmacol Exp Ther*; 274(3): 1370-1378.
- Toide, K., Okamiya, K., Iwamoto, Y. y Kato, T. (1995b).** Effect of a novel prolyl endopeptidase inhibitor, JTP-4819, on prolyl endopeptidase activity and substance P- and arginine-vasopressin-like immunoreactivity in the brains of aged rats. *J Neurochem*; 65(1): 234-240.
- Toide, K., Shinoda, M., Fujiwara, T. e Iwamoto, Y. (1997a).** Effect of a novel prolyl endopeptidase inhibitor, JTP-4819, on spatial memory and central cholinergic neurons in aged rats. *Pharmacol Biochem Behav*; 56(3): 427-434.
- Toide, K., Shinoda, M., Iwamoto, Y., Fujiwara, T., Okamiya, K. y Uemura A. (1997b).** A novel prolylendopeptidase inhibitor, JTP-4819, with potential for treating Alzheimer's disease. *Behav Brain Res*; 83 (1-2): 147-151.
- Truckenmiller, M.E., Vawter, M.P., Cheadle, C., Coggiano, M., Donovan, D.M., Freed, W.J. y Becker, K.G. (2001).** Gene expression profile in early stage of retinoic acid-induced

differentiation of human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Restor Neurol Neurosci*; 18(2-3): 67-80.

Tsokos, M., Scarpa, S., Ross, R.A. y Triche, T.J. (1987).

Differentiation of human neuroblastoma recapitulates neural crest development. Study of morphology, neurotransmitter enzymes, and extracellular matrix proteins. *Am J Pathol*; 128(3): 484-496.

Tsukahara, T., Ishiura, S. y Sugita, H. (1990).

Regulation of prolyl endopeptidase activity by the intracellular redox state. *J Biol Chem*; 265(35): 21448-21453.

Umemura, K., Kondo, K., Ikeda, Y., Kobayashi, T., Urata, Y. y

Nakashima, M. (1997). Pharmacokinetics and safety of JTP-4819, a novel specific orally active prolyl endopeptidase inhibitor, in healthy male volunteers. *Br J Clin Pharmacol*; 43(6): 613-618.

Valdivia, A., Irazusta, J., Fernández, D., Múgica, J., Ochoa, C. y

Casis, L. (2004). Pyroglutamyl peptidase I and prolylendopeptidase in human semen: increased activity in necrozoospermia. *Regul Pept*; 122(2): 79-84.

Vaudry, D., Falluel-Morel, A., Leuillet, S., Vaudry, H. y Gonzalez,

B.J. (2003). Regulators of cerebellar granule cell development act through specific signaling pathways. *Science*; 300(5625): 1532-1534.

Venäläinen, J.I., Juvonen, R.O. y Männistö, P.T. (2004a).

Evolutionary relationships of the prolyl oligopeptidase family enzymes. *Eur J Biochem*; 271(13): 2705-2715.

Venäläinen, J.I., Juvonen, R.O., García-Horsman, J.A., Wallén,

E.A., Christiaans, J.A., Jarho, E.M., Gynther, J. y Männistö, P.T. (2004b). Slow-binding inhibitors of prolyl oligopeptidase with different functional groups at the P1 site. *Biochem J*; 382(Pt 3): 1003-1008.

- Venäläinen, J.I., Wallén, E.A., Poso, A., García-Horsman, J.A. y Männistö, P.T. (2005).** Synthesis and characterization of the novel fluorescent prolyl oligopeptidase inhibitor 4-fluoresceinthiocarbamoyl-6-aminocaproyl-L-prolyl-2(S)-(hydroxyacetyl) pyrrolidine. *J Med Chem*; 48(23): 7093-7095.
- Venäläinen, J.I. (2005).** Characterization of Prolyl Oligopeptidase and its inhibition. Doctoral Thesis. Kuopio University Publications A. *Pharmaceutical Sciences*, 81.
- Venäläinen, J.I., García-Horsman, J.A., Forsberg, M.M., Jalkanen, A., Wallén, E.A., Jarho, E.M., Christiaans, J.A., Gynther, J. y Männistö, P.T. (2006).** Binding kinetics and duration of *in vivo* action of novel prolyl oligopeptidase inhibitors. *Biochem Pharmacol*; 71(5): 683-692.
- Wallén, E.A., Christiaans, J.A., Forsberg, M.M., Venäläinen, J.I., Männistö, P.T. y Gynther, J. (2002a).** Dicarboxylic acid bis(L-prolyl-pyrrolidine) amides as prolyl oligopeptidase inhibitors. *J Med Chem*; 45(20): 4581-4584.
- Wallén, E.A., Christiaans, J.A., Saario, S.M., Forsberg, M.M., Venäläinen, J.I., Paso, H.M., Männistö, P.T. y Gynther, J. (2002b).** 4-Phenylbutanoyl-2(S)-acylpyrrolidines and 4-phenylbutanoyl-L-prolyl-2(S)-acylpyrrolidines as prolyl oligopeptidase inhibitors. *Bioorg Med Chem*; 10(7): 2199-2206.
- Wallén, E.A., Christiaans, J.A., Saarinen, T.J., Jarho, E.M., Forsberg, M.M., Venäläinen, J.I., Männistö, P.T. y Gynther, J. (2003a).** Conformationally rigid N-acyl-5-alkyl-L-prolyl-pyrrolidines as prolyl oligopeptidase inhibitors. *Bioorg Med Chem*; 11(17): 3611-3619.
- Wallén, E.A., Christiaans, J.A., Jarho, E.M., Forsberg, M.M., Venäläinen, J.I., Männistö, P.T. y Gynther, J. (2003b).** New

Bibliografía

- prolyl oligopeptidase inhibitors developed from dicarboxylic acid bis(l-prolyl-pyrrolidine) amides. *J Med Chem*; 46(21): 4543-4551.
- Walter, R., Shlank, H., Glass, J.D., Schwartz, I.L. y Kerenyi, T.D. (1971).** Leucylglycinamide released from oxytocin by human uterine enzyme. *Science*; 173(999): 827-829.
- Weathington, N.M., van Houwelingen, A.H., Noerager, B.D., Jackson, P.L., Kraneveld, A.D., Galin, F.S., Folkerts, G., Nijkamp, F.P. y Blalock, J.E. (2006).** A novel peptide CXCR ligand derived from extracellular matrix degradation during airway inflammation. *Nat Med*; 12(3): 317-323.
- Wechsler-Reya, R.J. y Scott, M.P. (1999).** Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron*; 22(1): 103-114.
- Welches, W.R., Brosnihan, K.B. y Ferrario, C.M. (1993).** A comparison of the properties and enzymatic activities of three angiotensin processing enzymes: angiotensin converting enzyme, prolyl endopeptidase and neutral endopeptidase 24.11.. *Life Sci*; 52(18): 1461-1480.
- Wick, A., Wick, W., Hirrlinger, J., Gerhardt, E., Dringen, R., Dichgans, J., Weller, M. y Schulz, J.B. (2004).** Chemotherapy-induced cell death in primary cerebellar granule neurons but not in astrocytes: *in vitro* paradigm of differential neurotoxicity. *J Neurochem*; 91(5): 1067-1074.
- Widdess-Walsh, P., Tavee, J.O., Schuele, S. y Stevens, G.H. (2003).** Response to intravenous immunoglobulin in anti-Yo associated paraneoplastic cerebellar degeneration: case report and review of the literature. *J Neurooncol*; 63(2): 187-190.

-
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B. y Johnson, G.L. (1999).** Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev*; 79(1): 143-180.
- Wilk, S. (1983).** Prolyl endopeptidase. *Life Sci*; 33(22): 2149-2157.
- Williams, R.S., Eames, M., Ryves, W.J., Viggars, J. y Harwood, A.J. (1999).** Loss of a prolyl oligopeptidase confers resistance to lithium by elevation of inositol (1,4,5) trisphosphate. *EMBO J*; 18(10): 2734-2745.
- Williams, R.S. y Harwood, A.J. (2000).** Lithium therapy and signal transduction. *Trends Pharmacol Sci*; 21(2): 61-64.
- Williams, R.S., Cheng, L., Mudge, A.W. y Harwood, A.J. (2002).** A common mechanism of action for three mood-stabilizing drugs. *Nature*; 417(6886): 292-295.
- Williams, R.S. (2005).** Pharmacogenetics in model systems: defining a common mechanism of action for mood stabilisers. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*; 29(6): 1029-1037.
- Wood, K.A., Dipasquale, B. y Youle, R.J. (1993).** In situ labeling of granule cells for apoptosis-associated DNA fragmentation reveals different mechanisms of cell loss in developing cerebellum. *Neuron*; 11(4): 621-632.
- Wu, G.Y., Deisseroth, K. y Tsien, R.W. (2001).** Spaced stimuli stabilize MAPK pathway activation and its effects on dendritic morphology. *Nat Neurosci*; 4(2): 151-158.
- Xia, Y., Wu, Z., Su, B., Murray, B. y Karin, M. (1998).** JNKK1 organizes a MAP kinase module through specific and sequential interactions with upstream and downstream components mediated by its amino-terminal extension. *Genes Dev*; 12(21): 3369-3381.

- Xie H.R., Hu L.S. y Li, G.Y. (2010).** SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: *in vitro* cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin Med J*; 123(8): 1086-1092.
- Yamagishi, S., Matsumoto, T., Numakawa, T., Yokomaku, D., Adachi, N., Hatanaka, H., Yamada, M., Shimoke, K. e Ikeuchi, T. (2005).** ERK1/2 are involved in low potassium-induced apoptotic signaling downstream of ASK1-p38 MAPK pathway in cultured cerebellar granule neurons. *Brain Res*; 1038(2): 223-230.
- Yamakawa, N., Shimeno, H., Soeda, S. y Nagamatsu, A. (1994).** Regulation of prolyl oligopeptidase activity in regenerating rat liver. *Biochim Biophys Acta*; 1199(3): 279-284.
- Yan, G.M., Ni, B., Weller, M., Wood, K.A. y Paul, S.M. (1994).** Depolarization or glutamate receptor activation blocks apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons. *Brain Res*; 656(1): 43-51.
- Yan, G.M. y Paul, S.M. (1997).** Cultured Cerebellar Granule Neurons as a Model of Neuronal Apoptosis, en *Neuromethods* 29: Apoptosis Techniques and Protocols (ed.: J. Poirier), pp. 47-66. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Yanai, T., Suzuki, Y. y Sato, M. (2003).** Prolyl endopeptidase inhibitory peptides in wine. *Biosci Biotechnol Biochem*; 67(2): 380-382.
- Yen, A., Roberson, M.S., Varvayanis, S. y Lee, A.T. (1998).** Retinoic acid induced mitogen-activated protein (MAP)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) kinase-dependent MAP kinase activation needed to elicit HL-60 cell differentiation and growth arrest. *Cancer Res*; 58(14): 3163-3172.
- Yeste-Velasco, M., Folch, J., Jiménez, A., Rimbau, V., Pallàs, M. y Camins, A. (2008).** GSK-3 beta inhibition and prevention of

mitochondrial apoptosis inducing factor release are not involved in the antioxidant properties of SB-415286. *Eur J Pharmacol*; 588(2-3): 239-243.

Yoshimoto, T., Kado, K., Matsubara, F., Koriyama, N., Kaneto, H. y Tsura, D. (1987). Specific inhibitors for prolyl endopeptidase and their anti-amnesic effect. *J Pharmacobiodyn*; 10(12): 730-735.

Yu, Y.L., Chou, R.H., Chen, L.T., Shyu, W.C., Hsieh, S.C., Wu, C.S., Zeng, H.J., Yeh, S.P., Yang, D.M., Hung, S.C. y Hung, M.C. (2011). EZH2 regulates neuronal differentiation of mesenchymal stem cells through PIP5K1C-dependent calcium signaling. *J Biol Chem*; 286(11): 9657-9667.

Zhu, J.H., Kulich, S.M., Oury, T.D. y Chu, C.T. (2002). Cytoplasmic aggregates of phosphorylated extracellular signal-regulated protein kinases in Lewy body diseases. *Am J Pathol*; 161(6): 2087-2098.