

Unidad de Proteínas Líneas de investigación

Línea 1: Regulación de la traducción. Papel de los factores de iniciación en el daño neuronal isquémico.

En los países desarrollados la isquemia cerebral focal o global representan una de las causas más importantes de muerte y deterioro neurológico y el diseño de nuevos agentes terapéuticos depende de los avances en el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos desencadenados. Durante la fase de recirculación de un proceso isquémico se produce una inhibición de la síntesis de proteínas (fundamentalmente de la etapa de la iniciación de la traducción) que progresa de una forma mucho más lenta que el restablecimiento del metabolismo energético o la homeostasis iónica. Además dicho restablecimiento nunca llega a ocurrir en aquellas áreas cerebrales donde se produce muerte neuronal retardada (sensibles a isquemia), aunque si se recupera después de un preconditionamiento isquémico y en paralelo a la protección de la muerte neuronal observada. El objetivo de esta línea de investigación es avanzar en el conocimiento de los mecanismos implicados en la inhibición de traducción durante la reperfusión de un proceso isquémico para su posible utilización como diana terapéutica.

Palabras clave: Factores de iniciación, fosforilación de proteínas; isquemia cerebral; traducción; transducción de señales.

Técnicas empleadas (ver [PDF](#))

Publicaciones representativas:

Cristina Cid, Lidia Garcia-Bonilla, Emilio Camafeita, Jozef Burda, Matilde Salinas and Alberto Alcazar. Proteomic characterization of protein phosphatase 1 complexes in ischemia-reperfusion and ischemic tolerance. *Proteomics*. 2007 (En prensa).

Salinas M and Burda J. Regulation of translation in ischemia stress. In *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*, 3ª edición, vol. 7: Neural Protein Metabolism and Function, Abel Lajtha and Naren Banik edits,. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, 2006; 7:1-24. Disponible "on line" en Diciembre 2007.

García L, Burda J, Piñeiro D, Ayuso I, Gómez-Calcerrada M, and Salinas M. Calpain-induced proteolysis in ischemia and ischemic preconditioning. *Neurochem Res* 2006; 31, 1433-1441.

J. Burda, V. Danielisová, M. Némethová, M. Gottlieb, M. Matiašová, I. Domoráková, E. Mechírová, M. Feriková, M. Salinas and R. Burda. Delayed postconditioning initiates additive mechanism necessary for survival of selectively vulnerable neurons after transient ischemia in rat brain. *Cell Mol Neurobiol*. 2006; 26:1141-51.

Marciniak SJ, Garcia-Bonilla L, Hu J, Harding HP, Ron D. Activation-dependent substrate recruitment by the eukaryotic translation initiation factor 2 kinase PERK. *J Cell Biol* 2006; 172:201-9.

Burda J, Hrehorovská M, Gottlieb M, Danielisová V, Némethová M, Garcia L, Salinas M, Burda R. Second pathophysiological stress as a possible tool in the prevention of delayed neuronal death in the hippocampal CA1 region. *Neurochem Res* 2005; 30: 1397-1405.

García L, O'Loughlen A, Martín M.E, Burda J and Salinas M. Does the phosphorylation of eukaryotic elongation factor eEF2 regulate protein synthesis in ischemic preconditioning?. *J. Neurosci Res* 2004; 77:292-298.

García L, Burda J, Hrehorovská M, Burda R, Martín ME and Salinas M. Ischemic

preconditioning in the rat brain. Its effect on several initiation factors activity, akt and extracellular signal-regulated protein kinases phosphorylation and grp78 and gadd34 expression. *J Neurochem* 2004; 88:136-147.

Burda J, Hrehorovská, García Bonilla L, Danielisová V, Cížková D, Burda R, Némethová M, Fando JL, Salinas M. Role of protein synthesis in the ischemic tolerance acquisition induced by transient forebrain ischemia in the rat. *Neurochem Res* 2003; 28:1237-1243.

Martín de la Vega C., Jozef Burda, M.Val Toledo Lobo and Matilde Salinas. (2002) Cerebral postischemic reperfusion-induced demethylation of the protein phosphatase 2A catalytic subunit. *J. Neurosci. Res.* 69, 540-549.

Martín de la Vega C., J. Burda, C. Quevedo, A. Alcázar, M. E. Martín, J.L. Fando and M. Salinas. (2001) Possible mechanisms involved in the translation down-regulation during transient global ischemia in the rat brain. *Biochem. J.* 357, 819-826.

Martín de la Vega C., Jozef Burda and Matilde Salinas. (2001) Ischemia-induced inhibition of the initiation factor 2 α phosphatase activity in the rat brain. *NeuroReport* 12, 1021-1025.

Línea 2: Implicación de los factores de iniciación eIF2 y eIF2B en las señales de transducción de supervivencia y muerte neuronal.

La traducción, a través de su regulación por diferentes factores de iniciación (eIFs), desempeña un papel fundamental en la señalización celular que controla la fisiopatología celular. Así, la fosforilación de los factores eIF2 y eIF2B están asociadas con la inhibición de la traducción y la muerte celular. Además, factores de crecimiento como IGF1, NGF e insulina, que estimulan la supervivencia neuronal y la neurorregeneración, alteran el estado de fosforilación de dichos factores de iniciación. En nuestras investigaciones, nos proponemos avanzar en el conocimiento de los mecanismos básicos de los procesos de supervivencia neuronal a través del estudio de los factores de iniciación citados. Ello tiene el interés de su posible aplicación en la reversión de situaciones de daño neuronal y de enfermedades neurodegenerativas como la isquemia o la esclerosis múltiple.

Palabras clave: eIF2, eIF2B, IGF1, supervivencia neuronal, transducción de señales, cultivos neuronales.

Técnicas empleadas (ver [PDF](#))

Publicaciones representativas:

Quevedo C, Salinas M and Alcázar A. Initiation factor 2B activity is regulated by protein phosphatase 1, which is activated by the mitogen-activated protein kinase (MAPK)-dependent pathway in insulin-like growth factor 1-stimulated neuronal cells. *J Biol Chem* 2003; 278:16579-16586.

Quevedo C., M. Salinas, A. Alcázar (2002) Regulation of cap-dependent translation by insulin-like growth factor-1 in neuronal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 560-566.

Quevedo C., A. Alcázar, M. Salinas (2000) Two different signal transduction pathways are implicated in the regulation of initiation factor 2B activity in insulin-like growth factor-1-stimulated neuronal cells. *J. Biol. Chem.* 275, 19192-19197.

Línea 3: Estudio de la muerte de células precursoras de oligodendrocitos por anticuerpos anti-Hsp90. Implicaciones en la desmielinización.

La falta de remielinización es una de las causas de la pérdida progresiva de función neurológica en las enfermedades desmielinizantes, tales como la esclerosis múltiple (EM). neurológica en las enfermedades desmielinizantes, tales como la esclerosis múltiple. No existen medios efectivos para promover la remielinización del sistema

nervioso central (SNC) cuando ya ha sido afectado. Se ha observado que los oligodendrocitos supervivientes en un área de desmielinización no contribuyen a la remielinización, la cual sólo se lleva a cabo por las células precursoras de oligodendrocitos (OPC). Recientes investigaciones sugieren que estas células son extremadamente eficientes en la reparación de la mielina, tanto espontáneamente como después de un trasplante dentro del SNC. Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio utilizando cultivos de OPC, demuestran que la proteína heat shock protein 90 (Hsp90) se expresa en la superficie de estas células y que algunos LCR contienen anticuerpos que reconocen específicamente esta proteína. Los cultivos tratados con anticuerpos anti-Hsp90 inducen una muerte selectiva de OPC. La muerte de las OPCs inducida por los anticuerpos anti-Hsp90 podría limitar la remielinización en el SNC de los pacientes con dichos anticuerpos.

Palabras clave: apoptosis, desmielinización, neurodegeneración, oligodendrocitos, remielinización.

Técnicas empleadas (ver [PDF](#))

Publicaciones representativas:

C. Cid, M. García-Villanueva, M. Salinas, A. Alcázar. (2007). Detection of anti-heat shock protein 90 b (Hsp90b) antibodies in cerebrospinal fluid. *J. Immunol. Methods*, 318, 153-157.

C. Cid, I. Regidor, A. Alcázar. (2007) Anti-heat shock protein 90b antibodies are detected in patients with multiple sclerosis during remission *J. Neuroimmunol.* 184, 223-226.

Cid C, Álvarez-Cermeño JC, Salinas M, Alcázar A. Anti-heat shock protein 90 b antibodies decrease pre-oligodendrocyte population in perinatal and adult cell cultures. Implications for remyelination in multiple sclerosis. *J. Neurochem* 2005;95:349-360

Cid C, Álvarez-Cermeño JC, Camafeita E, Salinas M, Alcázar A. Antibodies reactive to heat shock protein 90 induce oligodendrocyte precursor cell death in culture. Implications for demyelination in multiple sclerosis. *FASEB J* 2004;18:409-411

Cid C, Álvarez-Cermeño JC, Regidor I, Plaza J, Salinas M, Alcázar A. Caspase inhibitors protect from neuronal apoptosis induced by cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 2003; 136: 119-124.

Cristina Cid, Alberto Alcázar, Ignacio Regidor, Jaime Masjuan, Matilde Salinas, José C. Álvarez-Cermeño (2002) Neuronal apoptosis induced by cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients correlates with hypointense lesions on T1 magnetic resonance imaging. *J. Neurol. Sci.* 193, 103-109.

Línea 4: Papel de la traducción en la supervivencia y muerte celular en situaciones de estrés oxidativo y en la apoptosis inducida por diferentes estímulos.

El estrés oxidativo generado en una gran variedad de enfermedades neurodegenerativas e isquemia parece estar implicado en la muerte neuronal (necrosis y/o apoptosis). El principal objetivo de esta línea de investigación es esclarecer el papel de la síntesis de proteínas en la muerte celular generada por el estrés oxidativo e identificar los mecanismos responsables de los cambios en la fosfo/defosforilación y por lo tanto en la actividad de los factores de iniciación de la traducción. Los mecanismos de supervivencia y muerte celular inducidos por isquemia cerebral, provocan una completa remodelación de la expresión génica que se regula a nivel de la transcripción y/o traducción. También se ha observado que proteínas implicadas en la muerte celular por apoptosis son responsables de la regulación de la actividad de factores de iniciación de la traducción (eIFs) mediante su procesamiento específico o degradación. Por otra parte, la expresión de proteínas que desempeñan un papel clave en apoptosis viene regulada por modificaciones en los niveles y/o actividad de algunos eIFs. Mediante arrays de proteínas o protocolos de proteómica, pretendemos identificar genes cuya expresión esté afectada durante la inhibición de la síntesis global de proteínas (apoptosis e isquemia) con objeto de caracterizar funcionalmente sus regiones

Palabras clave: Antioxidantes; apoptosis, expresión génica; estrés oxidativo; factores iniciación; fosforilación de proteínas; traducción; transducción de señales.

Técnicas empleadas (ver [PDF](#))

Publicaciones representativas:

Piñeiro D., Martín ME., Guerra N, Salinas M and González VM. Calpain modulates the apoptotic effect of taxol in NIH3/3 cells. *Exp Cell Res* 2007; 313:369-379.

A. O'Loghlen, M.I. Pérez-Morgado, M. Salinas, M.E. Martín. N-acetyl-cysteine abolishes hydrogen peroxide-induced modification of eukaryotic initiation factor 4F activity via distinct signalling pathways. *Cell Signal*. 2006; 18: 21-31.

Martín M.E, Muñoz FM, Dickinson DA, Forman HJ, Martín del Río R, Salinas M and Fando JL. Protective effect of L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylic acid preload against cell death induced by oxygen/glucose deprivation in differentiated PC12 cells. *J Neurosci Res* 2005; 82:93-102.

O'Loghlen A, González VM, Salinas M and Martín ME. Suppression of human Mnk1 by small interfering RNA increases the eukaryotic initiation factor 4F activity in HEK293T cells. *FEBS Lett* 2004; 578:31-35.

Imaizumi K, Benito A, Kiryu-Seo S, González VM, Inohara N, Leiberman AP, Kiyama H and Nunez G. (2004) Critical role for DP5/Harakiri, a Bcl-2 homology domain 3-only Bcl-2 family member, in axotomy-induced neuronal cell death. *J Neurosci*. 24, 3721-5.

O'Loghlen A, González VM, Piñeiro D, Pérez-Morgado MI, Salinas M and Martín ME Identification and molecular characterization of Mnk1b, a splice variant of human MAP kinase-interacting kinase Mnk1. *Exp Cell Res* 2004; 299:343-355.

O'Loghlen A, Pérez-Morgado MI, Salinas M, Martín ME. Reversible inhibition of the protein phosphatase 1 by hydrogen peroxide. Potential regulation of eIF2 α phosphorylation in differentiated PC12 cells. *Arch Biochem Biophys* 2003; 417: 194-202.

Muñoz F., M.E. Martín, M. Salinas and J.L. Fando. (2001) Carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) induces initiation factor 2 α phosphorylation and translation inhibition in PC12 cells. *FEBS Lett*. 492, 156-159.

Línea 5: Selección de nuevas moléculas (aptámeros) con potencial diagnóstico y/o terapéutico.

Una nueva línea de investigación del grupo está relacionada con la selección de nuevas moléculas (aptámeros) con potencial diagnóstico y/o terapéutico. Durante los últimos años se han puesto a punto una serie de sistemas de selección de aptámeros que nos han permitido obtener moléculas de ssDNA que reconocen de forma específica y con alta afinidad distintas proteínas de *Leishmania infantum* como KMP-11 o las histonas H2A y H3. Muchos de los aptámeros seleccionados podrían ser utilizados en el desarrollo de sistemas diagnósticos. En este momento, se están seleccionando aptámeros frente a distintas proteínas que juegan un papel relevante en diversos procesos celulares (infección, crecimiento y muerte celular, etc.).

Palabras clave: Aptámeros; apoptosis; Bcl-2; caspasas, estrés oxidativo; proteólisis; transducción de señales.

Técnicas empleadas (ver [PDF](#))

Publicaciones representativas:

Eduarne Ramos, David Piñeiro, Manuel Soto, Daniel R. Abanades, M. Elena Martín,

Matilde Salinas and Víctor M. González A DNA aptamer population specifically detects *Leishmania infantum* H2A antigen. Lab. Invest. 2007; 87:409-416.

Moreno M, Rincón E, Piñeiro D, Fenández G, Domingo A, Jiménez-Ruiz A, Salinas M and González VM. Selection of aptamers against KMP-11 using colloidal gold during the SELEX process. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 308:214-218.

Alvarez N, González VM, and Jimenez A. Be careful with the primers when screening your clones by PCR. *Anal Biochem* 2002; 308:89-191.

González V.M., Fuertes M.A., Alonso C. and Pérez J.M. Is Cisplatin-induced Cell Death Always Produced by Apoptosis?. *Mol Pharmacol.* 2001; 59:657-663.

Línea 6 : Identificación y caracterización de potenciales factores de iniciación de la traducción en *Leishmania*

Otra línea nueva de enorme interés para nosotros es el estudio del proceso de traducción en parásitos tripanosomátidos. En este momento, estamos caracterizando bioquímicamente y funcionalmente una serie de proteínas de *Leishmania* que muestra una elevada homología de secuencia con factores de iniciación de la traducción de mamíferos.

Palabras clave: apoptosis, Bcl-2, choque térmico, muerte celular programada, *Leishmania*.

Técnicas empleadas (ver [PDF](#))

Publicaciones representativas:

Alzate JF, Álvarez-Barrientos A, González VM and Jiménez-Ruiz A Heat-induced programmed cell death in *Leishmania infantum* is reverted by Bcl-XI expresión. *Apoptosis* 2006; 11:161-171.

Alzate JF, Ramírez-Pineda JR, González VM, Patiño E, Vélez ID and Jiménez-Ruiz A. *Leishmania (Viannia) panamensis*: Cloning of the Histone H1 genes by Representational Difference Analysis. *Experimental Parasitology* 2006; 112:126-129.

Línea 7: Estudio del valor pronóstico del factor de iniciación eIF4E y análisis de su expresión, fosforilación y localización subcelular en la progresión tumoral.

En los últimos años se ha confirmado el papel clave que el factor de iniciación de la traducción eIF4E juega en el control del crecimiento celular y la transformación neoplásica habiéndose demostrado que este factor aparece sobreexpresado en tumores humanos de mama, cuello y cabeza, colon, próstata, riñón, pulmón, etc. lo que se relaciona con la progresión de la enfermedad. Por otro lado, se ha mostrado que la reducción de los niveles de eIF4E, suprime la transformación celular, el crecimiento de los tumores, la invasión y la metástasis postulándose que eIF4E ejerce todos estos efectos aumentando la traducción de un grupo de mRNAs que codifican para proteínas relacionadas con el crecimiento y la transformación. Por otra parte, la fosforilación del eIF4E nuclear parece ser importante para el control del transporte del mRNA de la ciclina D1 y de las propiedades transformantes del factor. Las proteínas quinasas que interaccionan con las MAP quinasas 1 y 2 (Mnk1/2) son las encargadas de fosforilar eIF4E en condiciones fisiológicas. Nosotros hemos descrito recientemente una nueva isoforma de la eIF4E quinasa Mnk1 (Mnk1b) que muestra actividad eIF4E quinasa de manera constitutiva e independiente de la activación de las cascadas de señalización de las MAP quinasas y que, además, es capaz de entrar y permanecer en el núcleo. En este momento estamos estudiando la desregulación del eIF4E, por cambios en su expresión y/o en su actividad (fosforilación, regulación por 4E-BP1 o localización subcelular) principalmente en tumores cerebrales.

Palabras clave: eIF4E, Mnk1, 4E-BP1, tumores.

Técnicas empleadas (ver [PDF](#))

Publicaciones representativas:

Ana O'Loghlen, Víctor M. González, Teresa Jurado, Matilde Salinas and M. Elena Martín Characterisation of the activity of human MAPK-interacting kinase Mnk1b. BBA- Molecular Cell Research, 2007 (En prensa).

M.E. Martín, M.I. Pérez, C. Redondo, M.I. Álvarez, M. Salinas and J.L. Fando. 4E binding protein 1 expression is inversely correlated to the progression of gastrointestinal cancers. Int. J. Biochem. Cell Biol. 2000; 32: 633-642