

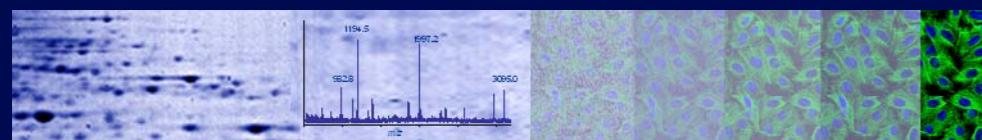


TESIS DOCTORAL

**Implicaciones funcionales de la modificación
postraduccional de proteínas en residuos de
cisteína por lípidos**



KONSTANTINOS STAMATAKIS



KONSTANTINOS STAMATAKIS

MADRID, 2006

KONSTANTINOS STAMATAKIS

2006

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Biología

Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular I

**Implicaciones funcionales de la modificación postraduccional de
proteínas en residuos de cisteína por lípidos**

Memoria presentada por

Konstantinos Stamatakis

para optar al título de Doctor

Trabajo realizado bajo la dirección de la **Dra. María Dolores Pérez-Sala Gozalo**,
en el Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC.

Konstantinos Stamatakis

Dra. M^a Dolores Pérez-Sala Gozalo

Directora

Dr. Manuel Guzmán Pastor

Tutor

Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC

Madrid 2006

Imagen de portada:

¡LA FUENTE DE LA VIDA! Escultura de Carlos Ferreira de la Torre (1913-1990).

Conocida también como “El hombre del CIB” por su localización en la fachada del edificio donde se ubicó originalmente (y hasta hace 3 años) el Centro de Investigaciones Biológicas en el número 144 de la calle Velázquez de Madrid. En la actualidad una copia de la obra se encuentra en el jardín del nuevo CIB en la Ciudad Universitaria.

“El hombre del CIB” fue en su origen una fuente y era la representación alegórica de “La lucha del hombre contra las enfermedades”: el agua que salía de la pared simbolizaba la vida humana que se escapa; el hombre científico ponía todo su esfuerzo en contener ese escape, aunque sus intentos resultaban finalmente infructuosos, puesto que el agua terminaba resbalando entre sus dedos.

Resumen

Muchas de las propiedades de las proteínas, como su localización, funcionalidad y actividad, entre otras, se regulan por medio de las modificaciones postraduccionales. Estas alteraciones en la composición química de los polipéptidos aumentan la complejidad del proteoma de las células y su regulación dinámica. Entre los diversos tipos de modificación postraduccional de proteínas se encuentran las modificaciones de cisteínas por lípidos, que tienen una especial importancia en la localización subcelular y en las interacciones proteína-proteína. En este trabajo hemos estudiado dos aspectos de estas modificaciones: hemos explorado el papel de la isoprenilación y palmitoilación de la GTPasa de bajo peso molecular RhoB sobre sus niveles de expresión y hemos desarrollado una metodología para la identificación proteómica de dianas de modificación por lípidos electrófilos, utilizando como modelo la 15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J₂. En relación con este segundo aspecto hemos estudiado los efectos del tratamiento de células con lípidos electrófilos sobre una de las dianas aquí identificadas.

A Laura y Katerina

Agradecimientos

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la financiación del programa de becas predoctorales I3P del CSIC, de Merck, Sharp & Dohme, España, y del Instituto “Reina Sofía” de Investigaciones Nefrológicas, para la financiación del doctorando, y a los proyectos de investigación SAF2000-0149 y SAF2003-03713 del Ministerio de Educación, Ciencia y Deportes, 08.4/0025.1/2003 de la Comunidad Autónoma de Madrid, y a la financiación de las Fundaciones Ramón Areces y la Caixa, y Merck, Sharp & Dohme, España.

Asimismo, ha sido posible gracias a la valiosa dirección y comprensión de la Dra. Dolores Pérez-Sala y la colaboración y amistad de todos los miembros del laboratorio. También se agradece a todo el personal del Centro de Investigaciones Biológicas su contribución o su interacción con el doctorando.

Ya que por suerte o por desgracia el desarrollo de una tesis requiere también implicación personal, quería manifestar mi agradecimiento a los que menos lo oyen: A Laura y Katerina, **por dar sentido a mi vida**. Mis palabras y mis acciones siempre quedarán demasiado insuficientes para lo que ellas merecen. A mi familia, por sus sacrificios de una vida, un gracias no parece bastante. A mis padres políticos, por lo que también les toca. A mis amigos, por seguir siéndolo con lo poco que les cuido.

Abreviaturas

15d-PGJ ₂	15desoxi- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandina J ₂
BAEC	Células endoteliales de aorta bovina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico codificante
CHX	Cicloheximida
COX	Ciclooxygenasa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FPP	Farnesil pirofosfato
FT	Farnesil transferasa
FTI	Inhibidor de la Farnesil transferasa
GAP	Proteína activadora de la hidrólisis de GTP por la GTPasa
GDP	Guanosina difosfato
GEF	Factor que estimula el intercambio de GDP con GTP
Gfp	Proteína fluorescente verde
GGPP	Geranilgeranil pirofosfato
GGT	Geranilgeranil transferasa
GGTI	Inhibidor de la geranilgeranil transferasa
GTP	Guanosina trifosfato
GTPasa	Enzima que hidroliza el GTP a GDP
HMG-coA	Hidroxi-metil-glutaril-coenzima A
IEF	Isoelectroenfoque
LPS	Lipopolisacárido
MALDI	Ionización/desorción mediante Láser, Asistida por Matriz
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAT	Transferasa de ácido palmítico
PPAR	Receptor activado por inductores de proliferación peroxisomal
PVDF	Polivinilideno de Fluoro
RMC	Células mesangiales de rata
RNA	Ácido ribonucleico
SB	Strep Blot: Proceso de transferencia de proteínas, analizadas por SDS-PAGE, a membrana de PVDF y detección de las proteínas biotiniladas con estreptavidina-peroxidasa mediante quimioluminiscencia.

SDS	Dodecil sulfato de sodio
Sv	Simvastatina
TOF	Tiempo de vuelo
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
wt	Proteína o DNA salvaje.

Índice

Introducción	21
1. Modificaciones Postraduccionales	24
2. Modificaciones postraduccionales lipídicas	26
2.1 Isoprenilación	27
2.1.1 Inhibición de la isoprenilación	29
Inhibidores específicos de la isoprenilación	29
Inhibición indirecta de la isoprenilación: las Estatinas	30
2.1.2 GTPasas de bajo peso molecular como sustratos de isoprenilación	32
La GTPasa RhoB	34
2.2 Palmitoilación (S-acilación)	35
2.3 Modificación por lípidos electrófilos	37
2.3.1 La 15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ -PGJ ₂	39
3. El citoesqueleto	41
3.1 La vimentina	42
Objetivos	45
Materiales y Métodos	49
Reactivos	51
Materiales de cultivos	51
Reactivos de electroforesis	51
Oligonucleótidos	51
Plásmidos	51
Otros reactivos	53
Métodos	54
Cultivos celulares	54
Tratamientos de células	55
Transfecciones transitorias	55
Fraccionamiento subcelular	56
Microscopía	56
Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), inmunoblot y Strep Blot	56
Electroforesis en dos dimensiones	57
Obtención de RNA y análisis por Northern Blot	58

Índice

Purificación de proteínas unidas a 15d-PGJ ₂ biotinilada mediante el uso de resina de avidina	58
Identificación de proteínas por espectrometría de masas	59
Análisis estadístico	59

Resultados 61

1. Isoprenilación y palmitoilación de proteínas	63
• Efectos de estatinas sobre GTPasas de bajo peso molecular	63
• Estudio del efecto de metabolitos de la ruta de biosíntesis del colesterol sobre el aumento de la proteína RhoB provocado por Sv.	65
• Estudio de los efectos de la Sv sobre los niveles de mRNA de RhoB.	67
• Estudio de la regulación de la expresión de RhoB por la modulación de la actividad de proteínas G.	67
• El tratamiento con Sv aumenta la estabilidad de la proteína RhoB.	69
• Efecto de la isoprenilación de RhoB en su estabilidad.	70
• Efectos de la inhibición de la palmitoilación sobre la estabilidad de RhoB	70
• La isoprenilación y la palmitoilación de RhoB determinan su localización.	72
• Estudio de mecanismos de proteólisis implicados en la degradación de RhoB.	74
• Estudio de la relación entre el proceso de endocitosis y la degradación de RhoB.	75
2. Modificación de proteínas por el lípido electrófilo 15-desoxi-$\Delta^{12,14}$-prostaglandina J₂	78
• Caracterización de los efectos biológicos de un análogo biotinilado de la 15d-PGJ ₂ en relación con el compuesto original.	78
• Caracterización de la unión de la 15d-PGJ ₂ biotinilada a proteínas en células intactas.	80
• Diseño y desarrollo experimental para la identificación de proteínas diana de la 15d-PGJ ₂ .	81
• Efectos del tratamiento con 15d-PGJ ₂ sobre las dianas identificadas.	87
• El colapso de los filamentos intermedios provocado por 15d-PGJ ₂ depende de la presencia de la cisteína 328 de la vimentina.	91

Discusión	95
1. Regulación de la expresión de proteínas G, y en particular de RhoB por la inhibición de la isoprenilación.	97
• Las estatinas inducen un marcado aumento de RhoB.	97
• Las estatinas modulan los niveles de proteína de RhoB inhibiendo la isoprenilación de proteínas.	98
• La inhibición de la actividad de GTPasas de bajo peso molecular modula los niveles de mRNA de RhoB.	99
• La inhibición de la isoprenilación confiere más estabilidad a la proteína RhoB.	100
• La palmitoilación de RhoB en la cisteína 192 es importante para su localización y degradación.	101
• La degradación de RhoB ocurre de manera independiente de la función del proteasoma y precisa tráfico y maduración vesicular.	103
2. Identificación de proteínas diana de modificación por lípidos electrófilos.	105
• Comprobación de los efectos biológicos de la 15d-PGJ ₂ biotinilada y de su capacidad de unión a proteínas en células.	105
• Identificación de proteínas diana de la 15d-PGJ ₂ biotinilada.	106
• Las proteínas del citoesqueleto son dianas de modificación por la 15d-PGJ ₂ biotinilada.	107
• Efecto del tratamiento con 15d-PGJ ₂ sobre las proteínas del citoesqueleto.	108
Conclusiones	113
Bibliografía	117
Anexo	129
Publicaciones derivadas de esta tesis	
Publicaciones relacionadas con este trabajo	

Introducción

Las proteínas, complejas moléculas orgánicas, están expuestas desde su traducción (síntesis) a los efectos de su entorno, tanto químico como enzimático. Desde los primeros estudios realizados sobre proteínas, se observaron alteraciones reproducibles en sus propiedades que se relacionaron con modificaciones de su composición química (revisado en Uy y Wold, 1977). Estas modificaciones se asocian con procesos dinámicos del entorno de la proteína y se recogen en el término modificaciones postraduccionales. Algunas son indispensables para el funcionamiento adecuado de las proteínas y forman parte del proceso de maduración que es necesario para su función o su localización en el compartimiento celular apropiado. En otros casos, la modificación postraduccional constituye un mecanismo esencial para la regulación dinámica de la actividad de ciertas enzimas en respuesta a estímulos del entorno celular. En los últimos años, la búsqueda de nuevos fármacos se está centrando en compuestos que afectan directa o indirectamente a modificaciones postraduccionales de proteínas clave en el desarrollo de diversas patologías.

Las modificaciones postraduccionales pueden ser de muy diferente naturaleza dependiendo del agente modificante y de la estructura química de los residuos afectados. Los residuos de cisteína son especialmente sensibles a la modificación por diversos agentes dada la reactividad del grupo tiol, y constituyen un elemento clave en la señalización por alteraciones del estado redox celular. La modificación de residuos de cisteína por lípidos, sea enzimática o no, y su relevancia fisiopatológica, ofrece un campo amplio para estudios de especificidad, intervención farmacológica y repercusión funcional.

En este trabajo hemos profundizado en el estudio de algunos aspectos de las modificaciones de cisteínas por lípidos, en concreto, de la isoprenilación de proteínas y de la palmitoilación, que en algunos casos, como en ciertas proteínas G de bajo peso molecular, ocurre en residuos de cisteína próximos a los residuos isoprenilados. También hemos explorado la modificación por lípidos electrófilos que pueden unirse a residuos de cisteína por mecanismos no enzimáticos. Para ello hemos utilizado como compuesto modelo la 15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J₂ (15d-PGJ₂). Dicha prostaglandina posee estructura ciclopentenona y se genera por deshidratación de productos del metabolismo del ácido araquidónico por la vía de las ciclooxigenasas.

En el caso de la isoprenilación y la palmitoilación hemos explorado sus con-

secuencias sobre los niveles de GTPasas de la superfamilia Ras, y en concreto, sobre la expresión, localización, funcionalidad y vida media de RhoB. En el caso de los prostanoides con estructura ciclopentenona, hemos desarrollado un método para la identificación de nuevas dianas de la 15d-PGJ₂, y hemos estudiado la repercusión funcional de la modificación en el caso de la vimentina, que es la proteína integrante de los filamentos intermedios y que resultó ser la diana mayoritaria de la 15d-PGJ₂ en células mesangiales de rata (RMC).

1. Modificaciones Postraduccionales

Cualquier cambio en la composición de la proteína en relación con su composición inicial, se puede definir como modificación postraduccional (Walsh, 2005; wikipedia.org, 2006). Las modificaciones postraduccionales constituyen el mecanismo más importante de regulación de la funcionalidad, actividad, localización y vida media de las proteínas. Pueden ocurrir espontáneamente o enzimáticamente, e incluyen la adición covalente o la alteración química de residuos de la proteína o la eliminación de aminoácidos por proteólisis controlada. La mayoría inducen cambios de conformación del polipéptido, que resultan en alteraciones en la actividad y/o función del mismo, o bien en exposición de residuos que a su vez podrían interactuar de modo distinto con su entorno. Otras modificaciones, generalmente por adición de moléculas, forman señales de reconocimiento o de localización, induciendo interacciones que serían poco probables sin ellas.

La mayoría de dichas modificaciones proteicas constituyen instrumentos de procesos dinámicos de las células, como la señalización intracelular. Incluso las modificaciones no enzimáticas generalmente son específicas para determinados residuos de grupos concretos de proteínas. Situaciones como el exceso de agentes oxidantes y alquilantes, o algunas mutaciones, pueden conducir a la modificación incontrolada de proteínas y provocar estados patológicos (Nystrom, 2005). Generalmente las células poseen mecanismos de defensa contra dichas situaciones y controles de calidad de proteínas.

Las modificaciones postraduccionales pueden clasificarse atendiendo a diversos criterios. En la tabla 1 se presenta una de las posibles clasificaciones de las modificaciones más estudiadas.

Modificación	Mecanismo	Estabilidad	Efecto sobre la proteína diana
Eliminación de aminoácidos			
Eliminación de la Metionina 1	Enzimático	Irreversible	Obligatorio para la mayoría de las proteínas de eucariotas
Proteólisis	Enzimático	Irreversible	Funcionalidad, maduración
Adición de grupos químicos			
Residuos inorgánicos			
Fosforilación	Enzimático	Reversible	Cambios de actividad, estructura o localización y en interacciones con otras moléculas
Nitrosilación	Espontáneo	Reversible	Funcionalidad
Nitración	Espontáneo	Irreversible	Funcionalidad
Hidroxilación	Enzimático	Irreversible	Funcionalidad, reconocimiento
Péptidos y macromoléculas			
Ubiquitinación	Enzimático	Irreversible	Localización, degradación, funcionalidad
Sumoilación	Enzimático	Irreversible	Localización, degradación, funcionalidad
Glutationilación	Espontáneo / Enzimático	Reversible	Funcionalidad
Formación puentes disulfuro	Espontáneo / Enzimático	Reversible	Plegamiento, funcionalidad
Glicosilación	Enzimático	Reversible	Funcionalidad, localización, secreción
Lípidos			
Miristoilación	Enzimático	Irreversible	Localización
Isoprenilación	Enzimático	Irreversible	Localización, funcionalidad e interacciones con otras proteínas
Adición de grupo de glicosil-fosfatidil-inositol (anclaje GPI)	Enzimático	Reversible	Secreción
Palmitoilación	Espontáneo / Enzimático	Reversible	Localización
Modificación por lípidos electrófilos	Espontáneo	Irreversible / Reversible	Funcionalidad, localización
Otros derivados metabólicos			
Adición de Michael	Espontáneo	Irreversible / Reversible	Funcionalidad
Metilación	Enzimático	Reversible	Funcionalidad
Acetilación	Enzimático	Reversible	Funcionalidad
Ribosilación por ADP	Enzimático	Irreversible	Actividad

Tabla 1: Algunas modificaciones postraduccionales, su mecanismo de acción y sus efectos. La distribución en grupos no es excluyente y algunas modificaciones podrían considerarse en varios grupos.

Modificaciones como la miristoilación, la glicosilación y la isoprenilación, entre otras, son imprescindibles para que la proteína diana desempeñe su función correctamente. Otras, especialmente las reversibles, juegan el papel de interruptores de la actividad de su diana. Modificaciones como la poliubiquitinación, son señales de degradación, en contraste con otras que alargan la vida media de la proteína o que facilitan la ocurrencia de nuevas modificaciones.

Además, se consideran modificaciones postraduccionales el plegamiento asistido de las proteínas y su ensamblaje en homo- o hetero-multímeros estables, aunque la composición inicial del polipéptido no cambie.

2. Modificaciones postraduccionales lipídicas

Como modificación lipídica se podría definir cualquier tipo de unión covalente de un lípido a un polipéptido. Existen uniones mediadas por enzimas, y también reacciones espontáneas dependientes de la naturaleza del lípido y del entorno del aminoácido diana.

Dos modificaciones enzimáticas muy importantes para el correcto funcionamiento celular pertenecen a este grupo: la miristoilación y la isoprenilación. Las dos contribuyen a la correcta localización de las proteínas diana en la fracción de membrana de las células, así como a su tráfico intracelular (revisado en Resh, 2004). En el caso de la primera, una molécula de ácido mirístico (ácido graso saturado de 14 carbonos) se une covalentemente a la glicina 1 (después de la eliminación de la metionina 1) por acción de la N-miristoil-transferasa, que reconoce una secuencia específica de aminoácidos. Proteínas tan importantes como la quinasa c-Src o la eNOS están sometidas a dicha modificación (Glover *et al.*, 1988; Liu y Sessa, 1994). Por el contrario, la isoprenilación, que se describirá ampliamente más adelante, ocurre en el carboxilo terminal de numerosas proteínas.

En el caso de las modificaciones lipídicas no enzimáticas existe una gran variedad tanto de dianas como de lípidos involucrados. El metabolismo celular y sobre todo las situaciones de estrés oxidativo pueden dar lugar a una amplia variedad de productos de peroxidación lipídica y productos de degradación de ácidos grasos que son compuestos electrófilos que pueden interaccionar con las proteínas por múltiples mecanismos (revisado en Rice-Evans y Burdon, 1993; Uchida, 2000). Es-

tos compuestos pueden formar aductos de Michael con residuos nucleófilos de las proteínas como las histidinas, lisinas y cisteínas, como se detallará posteriormente, o forman bases de Schiff uniéndose a grupos amino de las proteínas. En algunos casos, los lípidos responsables de estas modificaciones pueden causar alteraciones patológicas. El 4-hidroxinonenal, por ejemplo, que se genera en concentraciones elevadas en situaciones de estrés oxidativo, está implicado en patologías como el Alzheimer, por su capacidad de modificar una gran variedad de proteínas (Petersen y Doorn, 2004; Uchida, 2000), entre ellas la proteína tau, subunidades del neurofilamento (NFH y NFM), e histonas de las neuronas.

Por otra parte, una modificación de emergente importancia para la localización subcelular de proteínas, es la palmitoilación, que se describirá más adelante.

2.1 Isoprenilación

La isoprenilación es la unión de lípidos isoprenoides a cisteínas mediante un enlace tio-éter. Existen más de 300 proteínas isopreniladas diferentes en el proteoma humano (revisado en McTaggart, 2006). Según la naturaleza de los isoprenoides se define como farnesilación, si se trata de la unión de grupo farnesil, o geranilgeranilación, si se trata de la unión del grupo geranilgeranil (fig. 1). Es una modifica-

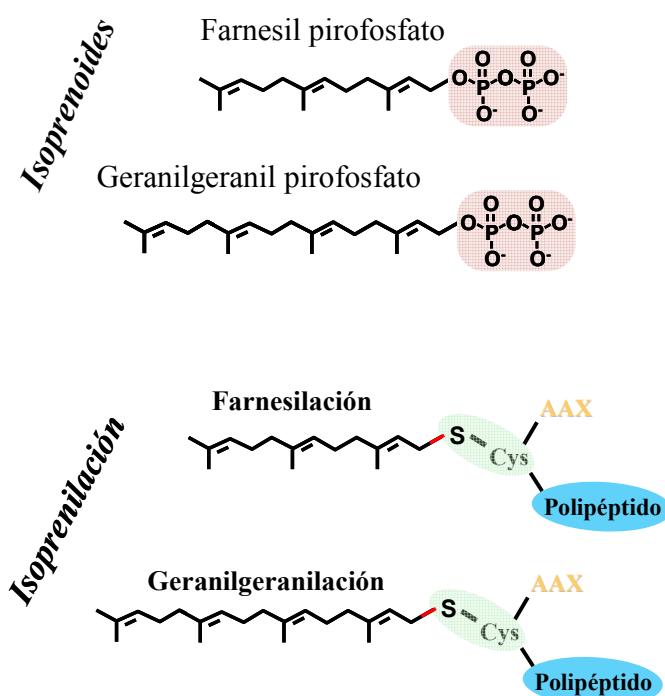


Figura 1: Los isoprenoides y su enlace con las proteínas

ción enzimática que ocurre a continuación de la traducción de la proteína, tras el reconocimiento de la proteína diana por la farnesil transferasa (FT) o las geranil-geranil transferasas (GGT) I y II.

La FT y la GGT I son responsables de la isoprenilación de la mayoría de las proteínas isopreniladas. Reconocen residuos de cisteína que se encuentran en la proximidad del extremo carboxilo terminal de determinadas proteínas formando parte de una secuencia llamada caja CAAX (“CAAX box” en inglés). La secuencia CAAX es clave para el reconocimiento y la modificación por la correspondiente transferasa. C, es la cisteína que resulta isoprenilada, los aminoácidos A pueden ser cualquier aminoácido alifático. El aminoácido X determina si la proteína va a ser modificada por la FT si se trata de serina, metionina, alanina, o glutamina, o por la GGT I si se trata de leucina (revisado en Sinensky, 2000). En los últimos años se ha observado que existen proteínas que pueden encontrarse tanto farnesiladas como geranilgeraniladas en distintas proporciones, aunque según la regla mencionada, sólo se deberían modificar por uno de los dos isoprenoides (Adamson *et al.*, 1992a; Armstrong *et al.*, 1995). Este fenómeno ocurre sobre todo en situaciones de escasez de isoprenoides, o tras el uso de inhibidores específicos de una de las dos transferasas. Así, por ejemplo, en células tratadas con un inhibidor de la FT, proteínas que normalmente se farnesilan pueden encontrarse modificadas con geranilgeranil, o no modificadas. Se ha propuesto que la posibilidad de modificación alternativa está relacionada con la naturaleza de los aminoácidos alifáticos (A) de la secuencia CAAX (Hartman *et al.*, 2005; Hicks *et al.*, 2005).

La GGT II actúa con la ayuda de la proteína REP (*Rab escort protein*) y reconoce sobre todo las secuencias carboxilo-terminales CAC, donde C es cisteína y A cualquier aminoácido alifático, y CC, pero también puede reconocer las secuencias CCX, CCXX, CCXXX y CXXX, dependiendo de la naturaleza de los aminoácidos X (Desnoyers *et al.*, 1996; Maurer-Stroh *et al.*, 2003). Esta GGT es específica de la familia de las RhoGTPasas de bajo peso molecular llamadas Rab, que está formada por alrededor de sesenta miembros. La GGT II es capaz de transferir una o dos moléculas de geranilgeranil en el caso de que haya dos cisteínas.

Una vez isopreniladas, las proteínas están sujetas a dos modificaciones

añadidas, necesarias para su maduración, que consisten en la proteólisis de los tres aminoácidos distales a la cisteína isoprenilada, que es mediada por una endoproteasa específica de proteínas isopreniladas, y finalmente, en la formación de un metil-éster en el grupo carboxilo de la cisteína que se ha convertido en el nuevo aminoácido terminal, que es llevada a cabo por una metiltransferasa de proteínas isopreniladas (Sinensky, 2000).

La incorporación del grupo farnesil o geranilgeranil en la cadena peptídica le confiere un aumento de hidrofobicidad. Dichos grupos, en sí, no consiguen anclar de manera estable la proteína a la bicapa lipídica, sino solamente aumentan la posibilidad de que ésta se encuentre en un entorno membranoso. Para un anclaje más estable, algunas proteínas contienen varios residuos básicos cerca de su carboxilo-terminal, mientras que otras contienen cisteínas que se pueden palmitoilar. Otras posibles funciones de la isoprenilación incluyen su influencia en interacciones proteína-proteína, su reconocimiento directo por otras proteínas, así como su papel en el procesamiento adicional de las proteínas isopreniladas (McTaggart, 2006).

2.1.1 Inhibición de la isoprenilación

Inhibidores específicos de las prenil-transferasas.

En los últimos años el desarrollo de inhibidores específicos de la FT y de la GGT ha cobrado interés por la implicación de proteínas isopreniladas en diversas patologías humanas, como el cáncer (revisado en Adjei *et al.*, 2000; Cohen *et al.*, 2000; Fritz y Kaina, 2006). Actualmente diversos inhibidores de la FT se encuentran en fases avanzadas de ensayos clínicos como agentes antineoplásicos. Estos inhibidores se pueden clasificar en dos grupos: los peptidomiméticos y los análogos de los isoprenoides. Los primeros simulan las secuencias CAAX y están modificados adecuadamente para poder entrar en las células y evitar la acción de proteasas. Así, se unen a las transferasas y bloquean la unión de las secuencias CAAX de proteínas o sirven de sustratos para la isoprenilación, disminuyendo así la disponibilidad de isoprenoides libres para la modificación de las proteínas celulares. Ejemplos de dichos inhibidores son los usados en este trabajo, FTI-277 y GGTI-286, y el peptidomimético inhibidor de la FT Lonafarnib, que se encuentra en la fase II de ensayos clínicos. Los análogos de isoprenoides se unen a las correspondientes prenil-transferasas con mayor afinidad que los isoprenoides evitando así la

modificación de las proteínas. Un fármaco de este tipo, análogo de FPP, denominado R115777, se encuentra en las últimas fases de ensayos clínicos. La mayoría de los inhibidores desarrollados muestran la capacidad de inhibir las dos preniltransferasas, aunque con diferente afinidad.

Inhibición indirecta de la isoprenilación: las estatinas

Las estatinas son fármacos ampliamente usados en el tratamiento de la hipercolesterolemia. Inhiben la síntesis de isoprenoïdes y por ello inhiben indirectamente la isoprenilación (Varughese *et al.*, 2006). En realidad, fue el uso de estos compuestos el que condujo al descubrimiento de la modificación de proteínas por isoprenoïdes (Maltese y Sheridan, 1987). Las estatinas son inhibidores competitivos y reversibles de la hidroxi-metil-glutaril-coenzima A reductasa, la enzima que cataliza la síntesis del mevalonato, que es el paso limitante en la ruta de biosíntesis del colesterol. Dicha ruta da lugar a numerosos productos intermedios muy importantes para el correcto funcionamiento de la célula, entre ellos los isoprenoïdes (Goldstein y Brown, 1990)(fig. 2). Así, por ejemplo, a partir del isopentenil pirofosfato, además del FPP, se produce isopentenil adenina, indispensable para la producción de tRNA. Los propios isoprenoïdes, son precursores de moléculas importantes: del FPP se deriva el hemo A y del GGPP el dolicol y la ubiquinona.

Cabe entender que los tratamientos tanto *in vitro* como *in vivo* con estatinas no suponen una inhibición total de la HMG-coA reductasa ni de la ruta biosintética del colesterol. En células, una inhibición total supondría la muerte celular por falta de tRNA para nueva síntesis de proteínas, o la desintegración de las membranas celulares por falta de colesterol. *In vivo*, la inhibición de la HMG-coA reductasa es parcial. Las dosis de estatinas usadas en clínica y la ingesta aseguran unos niveles mínimos de los productos intermedios y finales de dicha ruta biosintética. Las estatinas actúan principalmente en el hígado, el cual retiene la mayor parte de la dosis suministrada, y donde las estatinas son muy efectivas en la reducción de la producción del colesterol. Aun así, los niveles de estatinas que se han detectado en plasma serían suficientemente altos (0,1-1 μ M; Desager y Horsmans, 1996) para poder inhibir al menos parcialmente la actividad de la ruta del mevalonato en la mayoría de los tejidos. En una situación de inhibición parcial, la producción de unos productos u otros puede verse afectada en distinto grado dependiendo del tipo celular y de las necesidades de la célula en cada momento. Los isoprenoïdes, como productos

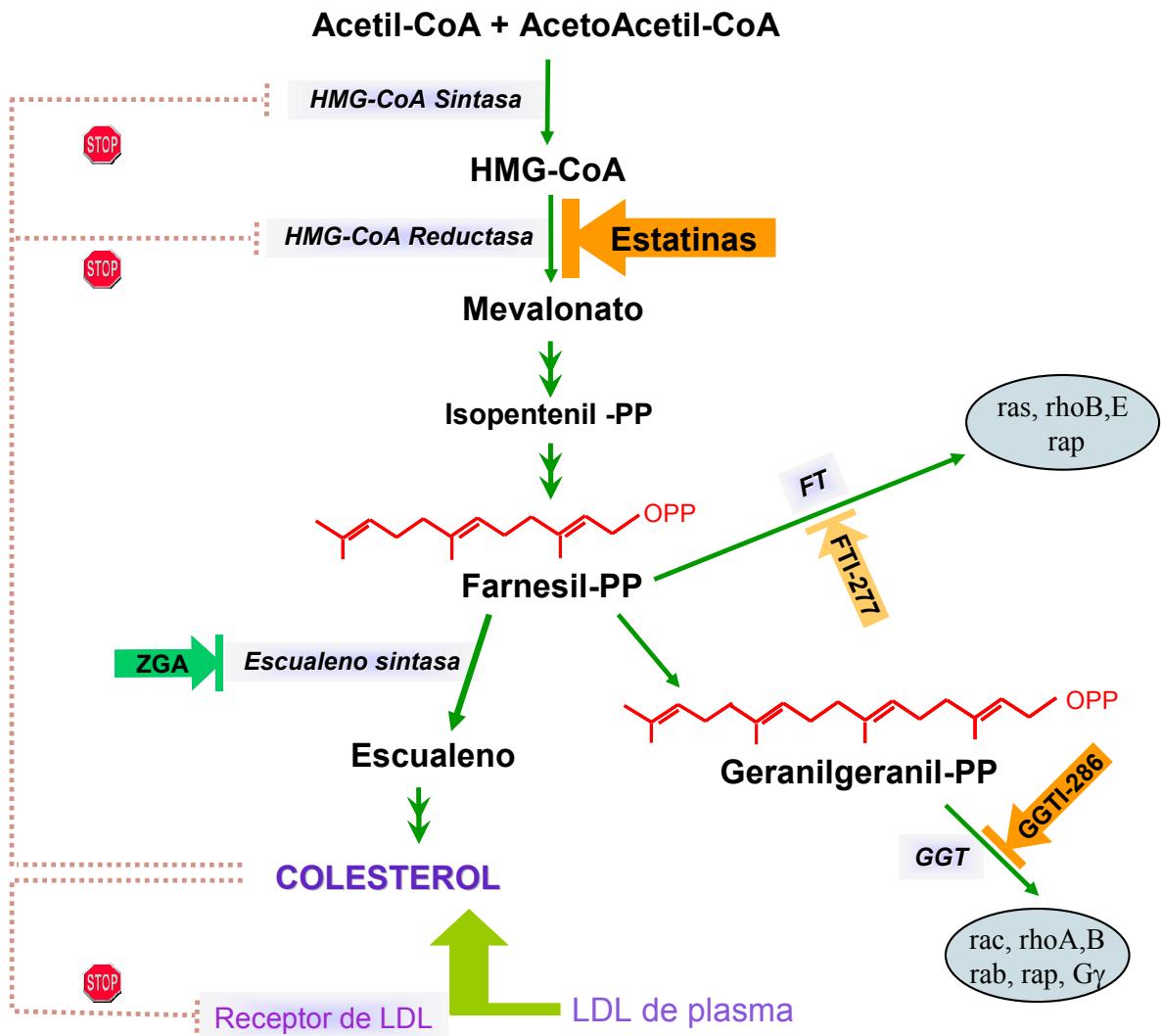


Figura 2: Esquema simplificado de la ruta de biosíntesis del colesterol. Se muestran algunos inhibidores de etapas de esta ruta, así como vías de regulación negativa. ZGA: ácido zaragózico; LDL: lipoproteína de baja densidad; PP: pirofosfato.

intermedios, podrían ver sus niveles severamente afectados por la necesidad de un producto final de la ruta. Sin embargo, se ha observado que sus niveles no disminuyen drásticamente (Tong *et al.*, 2005), y que la isoprenilación es menos sensible a la inhibición por estatinas que la síntesis de esteroles como el colesterol (Sinensky *et al.*, 1990). A pesar de ello, la acumulación de proteínas no isopreniladas se detecta de forma temprana después del inicio del tratamiento con estatinas (Repko y Maltese, 1989). La reducción de disponibilidad de isoprenoides podría afectar de este modo a la isoprenilación de algunas proteínas, como las proteínas G heterotriméricas que median la señalización de los receptores de siete hélices transmembrana, entre los que se encuentran el receptor β -adrenérgico y el receptor muscarínico de acetilcolina, y las GTPasas de bajo peso molecular, implicadas en rutas im-

portantes de señalización intracelular y en la organización del citoesqueleto (revisado en Hall, 2005; McTaggart, 2006).

El elevado gasto farmacéutico en estatinas (16.400 millones de dólares de ingresos generados por la atorvastatina y la simvastatina en 2003) (Thayer, 2004) refleja el intento de prevenir o tratar, con efectos adversos mínimos, patologías cardiovasculares asociadas con la hipercolesterolemia, que son las causas más frecuentes de morbi-mortalidad en las sociedades desarrolladas. En los últimos años, aparte de su eficacia en la reducción de los niveles del colesterol, se ha observado que las estatinas ejercen otros efectos beneficiosos para el organismo, independientes de dichos niveles. La reducción de la tensión arterial, los efectos antioxidantes, antiinflamatorios y antitumorales, e incluso la potencial prevención de la osteoporosis y del Alzheimer, todos en mayor o menor grado independientes de los niveles del colesterol, se han denominado efectos pleiotrópicos beneficiosos de las estatinas (Arnaud *et al.*, 2005; Dulak y Jozkowicz, 2005; Horiuchi y Maeda, 2006; Liao y Laufs, 2005; Miida *et al.*, 2004).

2.1.2 GTPasas de bajo peso molecular como sustratos de isoprenilación

La superfamilia de las GTPasas de bajo peso molecular se compone de un gran número de proteínas (más de sesenta distintas) con ciertas características similares (revisado en Takai *et al.*, 2001; Wennerberg y Der, 2004). Su tamaño oscila entre 20 y 40 kDa y tienen una baja capacidad intrínseca de hidrolizar el nucleótido GTP (revisado en). Asimismo se ha observado que la mayoría de ellas se isoprenilan y se pueden encontrar en fracciones de membrana. Desempeñan una función de “interruptores moleculares” mediante transiciones entre su forma activa, unida a GTP, y su forma inactiva, unida a GDP (Fig. 3) (Takai *et al.*, 2001). La mayoría de ellas se encuentran en su forma inactiva unidas a proteínas inhibidoras de la disociación de GDP (GDI) (Dovas y Couchman, 2005). En presencia de determinados estímulos, las proteínas estimuladoras del intercambio de GDP por GTP (GEF) inducen la activación de la GTPasa para participar a la transducción de determinadas señales (revisado en Geyer y Wittinghofer, 1997). La unión de GTP induce una serie de cambios conformacionales que capacitan a la GTPasa para activar a sus efectores, por ejemplo Raf en el caso de la GTPasa Ras, y desencadenar el proce-

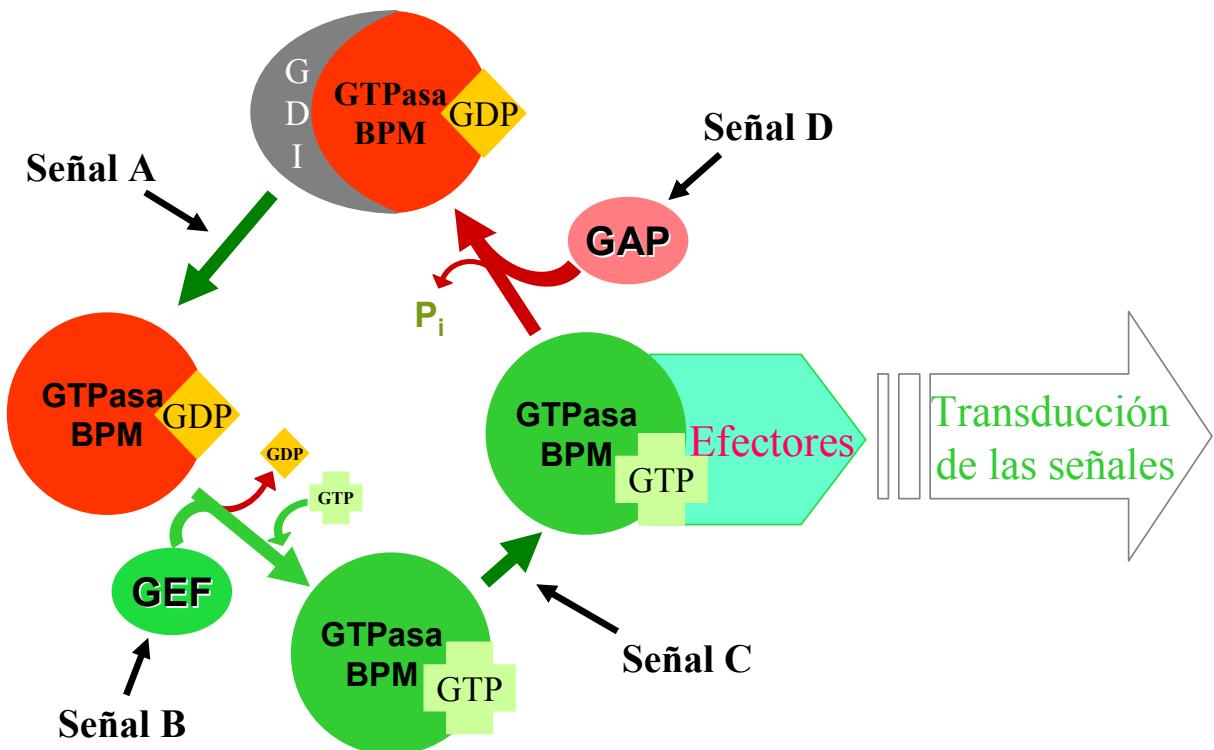


Figura 3: Esquema del ciclo de la activación-desactivación de la señalización de las GTPasas de bajo peso molecular. La forma inactiva de la proteína (en rojo) se encuentra unida a GDP. Para algunas GTPasas esta unión es estabilizada mediante la interacción con las proteínas GDI. La activación de la GTPasa de bajo peso molecular (en verde) por los GEF conduce a la transducción de señales por sus efectores. La activación de la hidrólisis enzimática del GTP a GDP, favorecida por las GAP, conduce a la inactivación de la GTPasa y al cese de la activación de sus efectores. Las señales A, B, C y D son indicativas de la complejidad de la regulación. BPM: bajo peso molecular; GAP: proteína activadora del hidrólisis de GTP; GEF: factor de intercambio de GDP por GTP.

so de transducción de la señal. La baja capacidad intrínseca de las GTPasas para hidrolizar el GTP se suple mediante la actuación de las proteínas GAP (inductoras de actividad enzimática de GTPasa) que devuelven a la GTPasa a su forma unida a GDP, es decir inactiva (revisado en Moon y Zheng, 2003). De todo ello se deduce que las GTPasas están muy estrechamente reguladas para desempeñar correctamente su función (Matozaki *et al.*, 2000).

La superfamilia de las GTPasas de bajo peso molecular se puede clasificar en varias familias relacionadas entre sí. Las GTPasas que se estudiaron en primer lugar fueron las proteínas Ras. Entre los miembros de esta familia se encuentran algunos de los primeros oncogenes identificados (revisado en Baracid, 1987). Son proteínas clave para la supervivencia y proliferación celular, e intervienen en numerosas rutas de señalización (revisado en Ridley, 2001; Schmitz *et al.*, 2000).

Las GTPasas Rho se definieron como proteínas homólogas de Ras (**Ras**

homolog) por su secuencia. Se han identificado más de 20 genes que codifican miembros de esta familia en mamíferos. Las tres isoformas de Rho, A, B y C; tres isoformas de Rac, 1, 2 y 3; y Cdc42 son las más estudiadas. Su función más conocida es la inducción de cambios en la organización del citoesqueleto: inducción de fibras de estrés de actina (RhoA), formación de lamelipodia (Rac) y filopodia (Cdc42). Mediante numerosos efectores, las proteínas Rho regulan distintas rutas de señalización intracelular, muchas veces interconectadas (revisado en Hall, 2005; Matozaki *et al.*, 2000).

La GTPasa RhoB

La proteína RhoB, guarda un alto grado de homología con el miembro más estudiado de su familia, la proteína RhoA (83% de identidad). *In vitro*, une los mismos efectores que RhoA con afinidad parecida, pero en células parece que cada proteína tiene distintas dianas, lo que justificaría sus diferentes funciones (revisado en Wheeler y Ridley, 2004). RhoB se encuentra en la fracción particulada de las células, concretamente en membrana plasmática y en la cara citoplásica de los endosomas, así como en el aparato de Golgi y en vesículas peri-Golgi (Adamson *et al.*, 1992b; Michaelson y Philips, 2006; Michaelson *et al.*, 2001). Se ha demostrado que RhoB regula el tráfico de endosomas (Ellis y Mellor, 2000; Fernandez-Borja *et al.*, 2005; Sandilands *et al.*, 2004). Así, por ejemplo, retrasa el transporte del receptor de EGF activo internalizado de los endosomas a los lisosomas, lo cual tiene un efecto positivo sobre la señalización por este factor (Wherlock *et al.*, 2004). Por otra parte, RhoB se ha visto implicada en la modulación de la inducción de muerte celular por estrés genotóxico (Fritz y Kaina, 2000; Liu *et al.*, 2001), así como en el tráfico y señalización de proteínas como la quinasa Akt (Adini *et al.*, 2003) y en el control de la estabilidad de c-myc (Huang *et al.*, 2006) y se considera un supresor tumoral (Mazieres *et al.*, 2004; Mazieres *et al.*, 2005). Se ha propuesto que RhoB es la proteína responsable de la inducción de apoptosis tras la inhibición de la función del oncogen Ras por FTI (Kamasani *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2000). RhoB está sujeta a una serie de modificaciones postraduccionales complejas que incluyen no sólo la isoprenilación de su carboxilo terminal, sino la palmitoilación de las dos cisteínas próximas a la cisteína isoprenilada (Adamson *et al.*, 1992a).

2.2 Palmitoilación (S-acilación)

La S-acilación es la adición de ácidos grasos, generalmente de palmito (palmitoilación), a cisteínas de proteínas, mediante un enlace tio-éster (revisado en Dietrich y Ungerma, 2004). Durante muchos años se ha mantenido el debate de si la palmitoilación es una modificación enzimática o espontánea. Las razones que apoyan la posibilidad de modificación espontánea incluyen la observación de que algunas proteínas pueden unir palmito *in vitro*, y el hecho que no se haya encontrado ninguna secuencia consenso de palmitoilación (revisado en Smotrys y Linder, 2004). Sin embargo, recientemente, se han clonado proteínas con actividad palmitoil-transferasa, primero en *Saccharomyces cerevisiae* y luego en *Drosophila* (Smotrys *et al.*, 2005; Veit *et al.*, 2003), lo que ha conducido a la identificación también de proteínas de mamíferos con la misma actividad (Swarthout *et al.*, 2005).

La palmitoilación, tanto espontánea como mediada por palmitoil-transferasas (PAT) supone el ataque nucleofílico del grupo sulfhidrilo desprotonado (tiolato) de la proteína al carbono α del palmitoil-CoA (fig. 4). Esta reacción puede ocurrir espontáneamente, a continuación de la desprotonación del grupo sulfhidrilo de la cisteína, lo cual depende del pK_a de la cisteína, que resulta afectado por su entorno intra y extramolecular. La reacción mediada por la PAT puede llegar a ser 100 veces más eficiente que la espontánea, debido a la agilización de la desprotonación de la cisteína diana por interacciones entre proteínas, así como por la aproximación obligada del palmitato a la proteína receptora, y la posibilidad de que ciertas cisteínas de las PAT puedan formar un tioéster intermediario (Dietrich y Ungerma, 2004; Smotrys y Linder, 2004; Smotrys *et al.*, 2005).

Tanto la actividad PAT como el palmitoil-CoA libre se encuentran en la fracc-

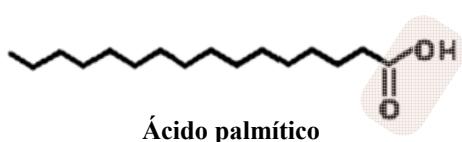
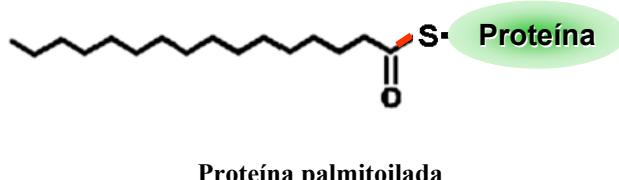


Figura 4: El ácido palmítico y su enlace con la proteína diana.



ción de membrana (Dunphy *et al.*, 1996). La mayoría de las PAT identificadas hasta el momento son proteínas integrales de membrana. Así, no es de extrañar que las proteínas diana de palmitoilación se modifiquen cuando se aproximan a entornos de membrana. La interacción con la membrana puede ocurrir porque dichas dianas sean proteínas de membrana, porque se modifiquen anteriormente por isoprenilación o miristoilación, porque interactúen con proteínas de membrana, o porque posean dominios que bajo determinadas condiciones puedan interactuar con la membrana (revisado en Smotrys y Linder, 2004; Smotrys *et al.*, 2005). Estas posibles interacciones constituyen un modo de modulación de la palmitoilación. Además, la palmitoilación puede ser revertida mediante la acción de diversas enzimas entre las que se incluyen las tioesterasas de proteínas palmitoiladas, enzimas lisosómicas, o la tioesterasa de proteínas aciladas 1 citoplásmica. La acción de las tioesterasas, que pueden ser constitutivas o inducidas, y las interacciones que favorecen la palmitoilación constituyen un equilibrio dinámico de palmitoilación-despalmitoilación que puede tener importantes repercusiones funcionales (Smotrys y Linder, 2004).

La importancia de la palmitoilación para el correcto funcionamiento de muchas proteínas y los datos que apuntan a que su inhibición puede tener efectos citotóxicos, están impulsando la investigación de inhibidores específicos de este proceso (Dunphy y Linder, 1998). De momento existen dos inhibidores comerciales, miméticos de la estructura del ácido palmítico, el 2-Br-palmitato y el 8-Br-palmitato, además de los ácidos grasos poliinsaturados endógenos que también pueden ejercer un efecto inhibidor (Webb *et al.*, 2000). Los dos compuestos mencionados poseen actividad inhibidora contra las PAT. El 2-Br-palmitato inhibe la unión del palmítico a las proteínas que unen ácidos grasos (FABP), encargadas de su transporte intracelular. Dado que sólo recientemente se han identificado enzimas PAT en mamíferos, el estudio de la especificidad de dichos compuestos, así como el diseño de nuevos inhibidores más específicos no ha avanzado mucho. Los múltiples efectos de estos agentes, y su alta toxicidad no permiten su uso más que como herramientas de investigación básica.

2.3 Modificación por lípidos electrófilos

Durante el metabolismo celular, así como en situaciones patológicas, se generan productos de peroxidación lipídica capaces de formar aductos estables con determinados residuos de proteínas (Bogatcheva *et al.*, 2005). Existe una gran variedad de dichos productos de estrés oxidativo y nitrosativo capaces de modificar proteínas (Berlett y Stadtman, 1997; Stadtman y Berlett, 1998). Entre los más estudiados se encuentra el 4-hidroxi-nonenal, un α,β aldehido insaturado, producto del metabolismo de los ácidos araquidónico o linoleico, capaz de reaccionar con grupos amino y sulfhidrilo de las proteínas. Estas modificaciones han sido implicadas en el daño oxidativo de proteínas asociado a numerosas patologías, entre ellas a enfermedades neurodegenerativas (revisado en Dianzani, 2003). Por otra parte, muchos de los efectos dañinos de la acumulación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas se deben a la reactividad de los lípidos oxidados que trasportan (Ceaser *et al.*, 2004).

Los lípidos electrófilos se pueden clasificar en distintos grupos, algunos de los cuales se exponen en la figura 5 junto con las estructuras químicas de miembros típicos de cada clase. Los lípidos electrófilos, que poseen carbonilos α,β insaturados, pueden reaccionar covalentemente con tioles libres de proteínas y con el glutatión y en algunos casos con lisinas e histidinas (revisado en Murphy y Zarini, 2002;

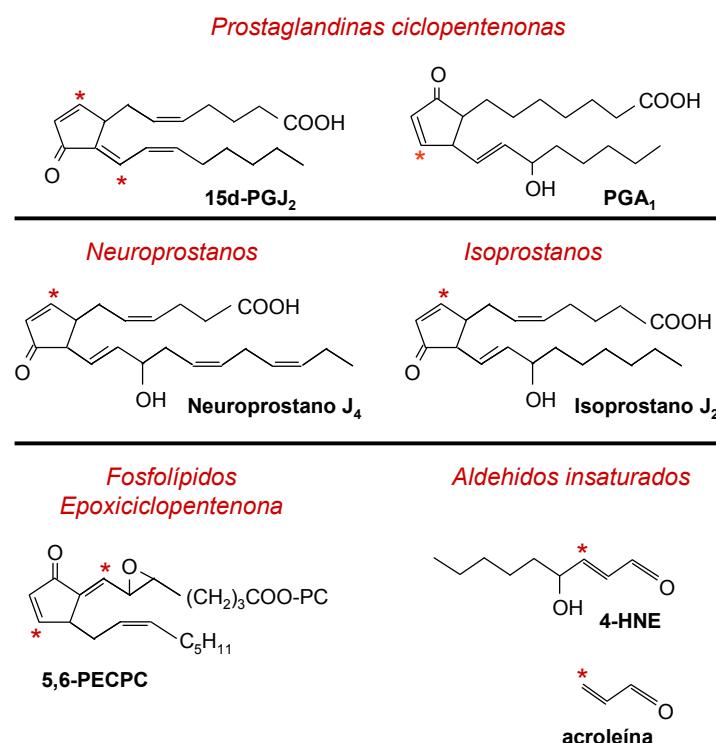


Figura 5: Lípidos electrófilos de diferentes estructuras. La clase de los aldehidos insaturados contiene el mayor número de lípidos electrófilos y sus miembros tienen gran diversidad estructural. Los asteriscos marcan los carbonos electrófilos.

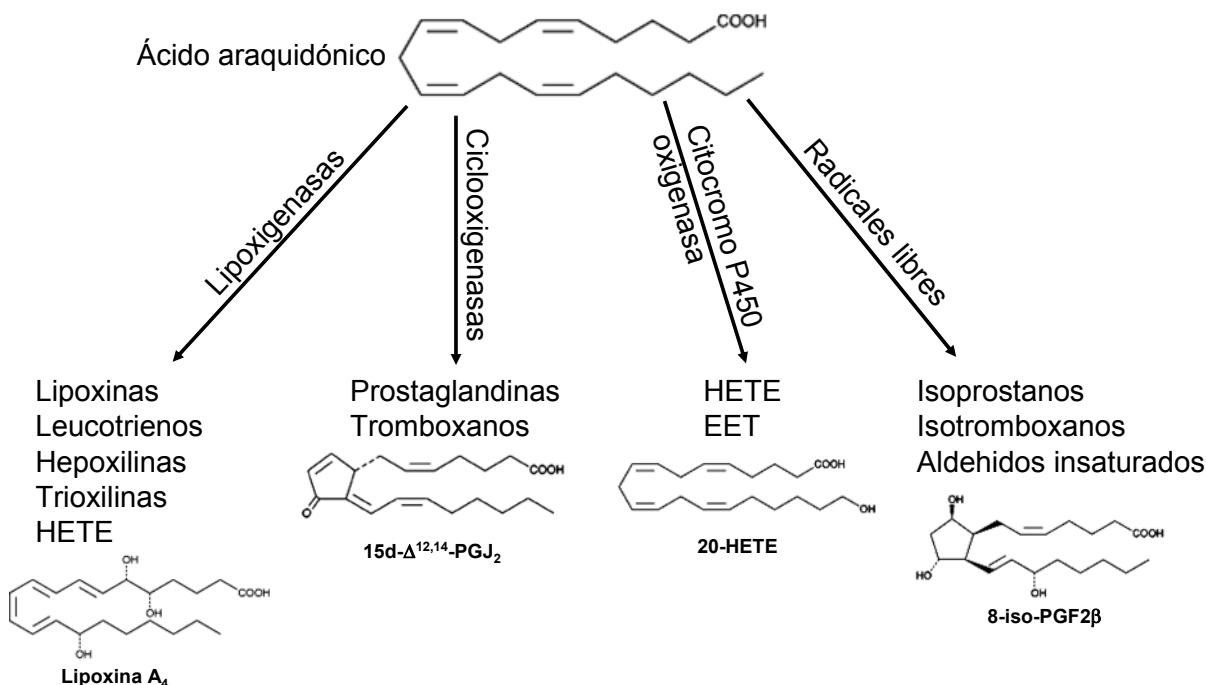


Figura 6: Los productos más importantes del metabolismo del ácido araquidónico y las enzimas que median sus vías principales de síntesis. HETE, ácidos hidroxieicosatetraenoicos; EET, ácidos epoxieicosatrienoicos; PG, prostaglandina

Zmijewski *et al.*, 2005). Dicha reacción, denominada adición de Michael, implica el ataque nucleófilo del azufre de la cisteína, o del nitrógeno de la lisina o de la histidina al carbono β del lípido electrófilo (Butterfield *et al.*, 2002; Noyori y Suzuki, 1993; Schaur, 2003). Por otra parte, los lípidos que poseen grupos aldehído pueden reaccionar con grupos amino de proteínas formando bases de Schiff (Requena *et al.*, 1996; Schaur, 2003; Uchida, 2000).

En este trabajo nos hemos centrado en el estudio de la modificación de proteínas por eicosanoides electrófilos con estructura ciclopentenona. Varias prostaglandinas e isoprostanos poseen dicha estructura ciclopentenona, que se caracteriza por la presencia de un grupo carbonilo α,β insaturado en el anillo de ciclopentano (Chen *et al.*, 1999; Kato *et al.*, 1986). Los isoprostanos son productos de la peroxidación no enzimática del ácido araquidónico, y pueden alcanzar altos niveles (más de 100 ng/g de isoprostanos con estructura ciclopentenona en hígado de rata sometida a tratamiento con CCl_4) en determinadas condiciones de estrés oxidativo (Chen *et al.*, 1999; Roberts y Morrow, 1994). Para las prostaglandinas, aunque algunas se pueden generar de manera no enzimática, la que se considera como la vía principal de su formación es la mediada por ciclooxygenasas (COX-1 y -2), a partir del ácido araquidónico (revisado en Funk, 2001)(fig. 6).

De las prostaglandinas con estructura ciclopentenona (cPG), la más estudiada y la que usaremos como compuesto modelo en este trabajo es la 15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂.

2.3.1 La 15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂

La 15d-PGJ₂, como se muestra en la fig. 7, es producto de varias deshidrataciones no enzimáticas de la PGD₂, la cual a su vez es producto del metabolismo del ácido araquidónico por ciclooxigenasas y PGD-sintetasas.

Los niveles que alcanza la generación de 15d-PGJ₂ *in vivo*, y de las prostaglandinas con estructura ciclopentenona en general, son difíciles de estimar debido a la alta reactividad del anillo ciclopentenona y a la tendencia de estos compuestos a acumularse en células más que en fluidos biológicos (Narumiya y Fukushima, 1986). Así, sus concentraciones en fluidos biológicos, como la orina, oscilan en el rango de concentraciones desde picomolar bajo hasta nanomolar (Bell-Parikh *et al.*, 2003; FitzGerald *et al.*, 1981; Thevenon *et al.*, 2001). Por otra parte, la administración exógena de la 15d-PGJ₂ tanto en células como *in vivo* ejerce diversos efectos

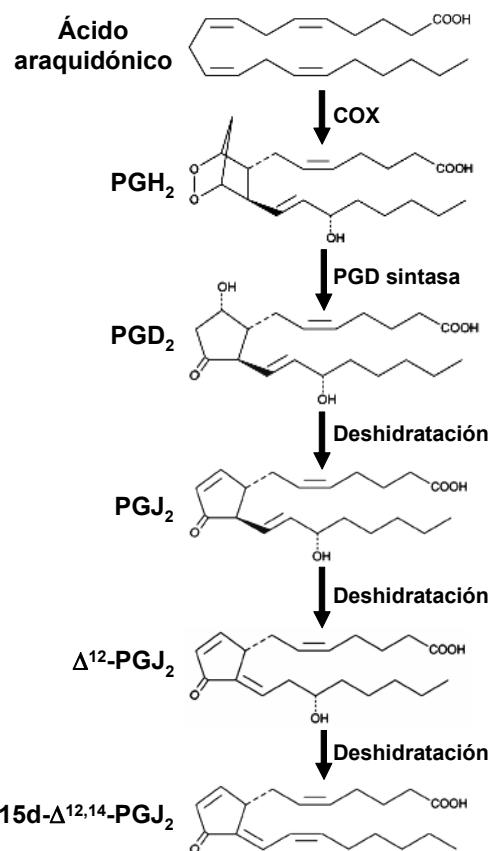


Figura 7: Producción de la 15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandina J₂ a partir de ácido araquidónico. PG: prostaglandina.

dependiendo de la dosis empleada. Los efectos más conocidos son los pro- y anti-inflamatorios, que en un principio se relacionaron con su propiedad de actuar como ligando del receptor activado por inductores de proliferación peroxisomal isoforma γ (PPAR γ), y más tarde se atribuyeron a su capacidad de inhibir el factor de transcripción NF κ B y la ruta de su activación (Castrillo *et al.*, 2000; Cernuda-Morollon *et al.*, 2001; Rossi *et al.*, 1997; Rossi *et al.*, 2000; Ward *et al.*, 2002). En los últimos años, muchos de los efectos de la 15d-PGJ₂ se han relacionado con su capacidad de modificar cisteínas de proteínas, y son, por tanto, independientes de PPAR (Oliva *et al.*, 2003; Pérez-Sala *et al.*, 2003; Sánchez-Gómez *et al.*, 2004). De las proteínas identificadas como dianas de la 15d-PGJ₂ no se ha podido deducir hasta el momento ninguna secuencia consenso necesaria para la modificación. La adición de Michael, es decir, la formación de un enlace covalente entre el carbono electrófilo de la prostaglandina y el grupo sulfhidrilo (nucleófilo) de la cisteína, no depende estrechamente de la secuencia peptídica, sino del contexto químico de su entorno, como la reactividad de la cisteína, su pKa, pero también de la accesibilidad del grupo sulfhidrilo y el pH, que son factores clave para la eficiencia de esta modificación. Varias de las proteínas identificadas como dianas de la 15d-PGJ₂, como H-Ras y c-jun, poseen varias cisteínas de las cuales generalmente sólo una se modifica, lo que implica la existencia de cierta selectividad en la modificación de estos residuos (Oliva *et al.*, 2003; Pérez-Sala *et al.*, 2003). Los efectos biológicos de la 15d-PGJ₂, así como su capacidad de modificar activando (por ejemplo H-Ras) o inhibiendo (NF κ B) determinadas proteínas importantes en procesos de inflamación o cáncer, confieren interés a su estudio con vistas a un potencial uso farmacológico de compuestos de este tipo. Tanto la 15d-PGJ₂ como otros lípidos con estructura ciclopentenona muestran efectos beneficiosos cuando se aplican en modelos animales para el estudio de diversas patologías humanas. La 15d-PGJ₂ por ejemplo, ha mostrado efectos protectores frente a choque séptico inducido en ratones, o frente al daño renal y cerebral inducido por isquemia-reperfusión (Chatterjee *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2006). También se han obtenido resultados prometedores al explorar sus propiedades antitumorales y antivirales en ratones (D'Onofrio *et al.*, 1992; Straus y Glass, 2001). Por sus efectos antitumorales, la ciclopentenona 13,14-dihidro-15-desoxi- Δ^7 -PGA₁ (Lipo TEI-9826) se encuentra en programa de ensayos pre-clínicos para el tratamiento de tumores resistentes a cisplatino (Fukushima *et al.*, 2000).

3. El citoesqueleto

La integridad, estructura, elasticidad, adhesión y migración, entre otras propiedades necesarias para el correcto funcionamiento de las células, dependen del citoesqueleto. Éste se compone de una amplia red de homo- o hetero-polímeros de proteínas unidas no covalentemente, que forman fibras, túbulos o filamentos de variable tamaño y organización. Dichas estructuras son dinámicas, y se ensamblan y se disocian continuamente para cumplir con la función del citoesqueleto en cada momento, según las necesidades de la célula. El citoesqueleto se compone todas las célula de tres tipos de fibras: los microfilamentos de actina, los filamentos intermedios y los microtúbulos (revisado en Alberts *et al.*, 2002).

Los microfilamentos son homopolímeros bien organizados de actina, una proteína de 43 kDa, de la que existen tres isotipos principales (α , β y γ), que presentan una alta homología de secuencia entre ellos pero que poseen distintas características biológicas y una expresión restringida dependiendo del tipo celular. Dichos microfilamentos, de un diámetro de 7-9 nm, controlan la estructura y posible polarización de la célula, actúan como soporte para la membrana y organelas celulares y son responsables del movimiento microscópico (filopodia, lamelipodia, migración) y macroscópico (contracción muscular). En los últimos años se están describiendo nuevas funciones de la actina, tanto en su forma monomérica como polimerizada, que están relacionadas con la señalización intracelular y la supervivencia o la apoptosis (revisado en Lodish *et al.*, 2000).

Los microtúbulos son cilindros de 24 nm de diámetro que están constituidos por láminas de protofilamentos, que a su vez están formados por heterodímeros de α y β tubulina. Dichos dímeros unen moléculas de GTP, necesarias para su polimerización. En las células existen centros de organización de los microtúbulos, de donde parten estas estructuras. Los microtúbulos están considerados como las estructuras más dinámicas del citoesqueleto por su alta tasa de polimerización-despolimerización y su polarización. Los microtúbulos son necesarios para el tráfico de vesículas, los movimientos celulares y el control de la división celular. Estas propiedades de los microtúbulos han constituido la base para el desarrollo de tratamientos antitumorales mediante el uso de fármacos estabilizadores de su estructura, como el Taxol, que interfieren con la división celular (revisado en Lodish *et al.*,

2000; Honore *et al.*, 2005).

Los filamentos intermedios, aproximadamente de 10 nm de diámetro, son estructuras cilíndricas compuestas de grupos asociados de homodímeros de proteínas de varias clases, específicas del tipo celular, y muy divergentes en su secuencia y sus características (Strelkov *et al.*, 2003). Así, las queratinas (más de 10 tipos) y las citoqueratinas (más de 20 isoformas) son típicas de los filamentos intermedios de células epiteliales, y cada tipo celular dispone de una combinación específica de dichas proteínas. Por otra parte, la vimentina es típica de células mesenquimales o no diferenciadas, y la desmina, de músculo. Otras proteínas como la GFAP (*Glia Fibrillary Acidic Protein*) y la periferina, se encuentran específicamente en células del sistema nervioso. Finalmente, una clase distinta de proteínas que forman filamentos intermedios es la de las laminas nucleares que configuran la red de filamentos que soporta la membrana nuclear. La principal función de los filamentos intermedios es la de conferir resistencia mecánica a las células, aunque se están describiendo nuevas funciones como la modulación de rutas de señalización (revisado en Lodish *et al.*, 2000; Paramio y Jorcano, 2002).

3.1 La Vimentina

El componente más distintivo de las células mesenquimales, como los fibroblastos y las células endoteliales, es la vimentina. Por su expresión característica en células poco diferenciadas se usa en la clínica como marcador de origen y malignidad de tumores. La inducción de la expresión de vimentina es una de las características más típicas de la transición epitelio-mesenquimal, que ocurre durante la malignización de un tumor de origen epitelial (revisado en Hendrix *et al.*, 1996). Por el contrario, la expresión de vimentina se pierde durante la diferenciación de determinados tipos celulares, como las células musculares y neuronales. La vimentina confiere a las células resistencia mecánica y funciona como adaptador perinuclear de la fosfolipasa A2 (Murakami *et al.*, 2000; Toivola *et al.*, 2005). Los ratones deficientes en vimentina pueden crecer y reproducirse, por lo que aparentemente la proteína no es necesaria para el desarrollo (Colucci-Guyon *et al.*, 1994), aunque presentan deficiencias en la cicatrización de heridas, lo cual sugiere un papel de la vimentina en la motilidad celular (Eckes *et al.*, 2000; Eckes *et al.*, 1998). Además, en adipocitos en cultivo que expresan un dominante negativo de la vimentina se

han observado deficiencias en el metabolismo de lípidos y lipoproteínas, algo que no se ha podido constatar todavía en los animales transgénicos deficientes en vimentina (Colucci-Guyon *et al.*, 1994; Lieber y Evans, 1996). Un creciente número de evidencias sugiere que la vimentina participa en varios procesos fisiológicos o patológicos, relacionados con señalización intra- e intercelular y en la adquisición de resistencia al estrés, aunque los mecanismos moleculares subyacentes son todavía poco conocidos (para revisión Paramio y Jorcano, 2002).

Objetivos

La función correcta de las proteínas desde su traducción está estrechamente ligada a las modificaciones postraduccionales a las que están sometidas. Los residuos de cisteína, muy reactivos por naturaleza, son diana de diversas modificaciones tanto programadas como espontáneas, muchas de las cuales resultan de la formación de enlaces covalentes con lípidos. En este trabajo hemos pretendido estudiar los efectos de la bien caracterizada isoprenilación, sobre un grupo delimitado de proteínas las GTPasas de bajo peso molecular. Por otra parte hemos puesto a punto la metodología para el estudio de las dianas de modificación por un lípido electrófilo, la ciclopentenona 15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandina J₂. Hasta el momento en que iniciamos este estudio no se disponía de procedimientos que permitieran la identificación a gran escala de las dianas de dicha molécula.

Tanto la isoprenilación como la modificación por lípidos electrófilos afectan a residuos de cisteína y alteran las propiedades físico-químicas, estructurales y funcionales de las proteínas diana. Por estas razones nos hemos propuesto los siguientes objetivos:

A. Estudiar las implicaciones de la modificación por isoprenoïdes en la regulación de las GTPasas de bajo peso molecular.

- Estudiar el efecto de la inhibición de la isoprenilación sobre los niveles de expresión de diversos miembros de la superfamilia de las GTPasas de bajo peso molecular.
- Analizar los mecanismos responsables de los efectos observados.

B. Explorar la modificación de proteínas por lípidos electrófilos

- Desarrollar una metodología apta para la identificación de dianas de modificación por la 15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂.
- Identificar dianas de dicha modificación y en su caso estudiar su repercusión funcional.

Materiales y Métodos

Reactivos

Materiales de cultivos

Los medios de cultivo RPMI 1640, DMEM, MEM y el medio de transfección Opti-MEM, así como el suero de ternera fetal, la penicilina/estreptomicina, la tripsina-EDTA y la glutamina se adquirieron de Invitrogen. El material de plástico para el cultivo de células fue suministrado por Falcon (Beckton Dickinson).

Reactivos de electroforesis

La acrilamida, la N,N'-metilén-bis-acrilamida, el persulfato amónico, la N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED), el SDS, la glicina y el Tris, todos de grado de pureza apto para electroforesis, fueron suministrados por Bio-Rad. En la separación de DNA y RNA en geles de agarosa, ésta fue de grado de biología molecular, adquirida de Pronadisa.

Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados a lo largo del trabajo se sintetizaron de manera automática en un sintetizador Oligo 1000M (Beckman) o en el sintetizador Applied Biosystems 3400 y se purificaron en columnas de Sephadex G25, NAPTM suministradas por Amersham, en el Servicio de Química de Proteínas del CIB.

Plásmidos

Las preparaciones de DNA plasmídico a pequeña escala se llevaron a cabo mediante el empleo del “*High Pure Plasmid Isolation Kit*” de Roche, para la obtención a pequeña escala, con el “*JetStar 1.0 plasmid Maxi kit*” de GENOMED, para obtención a gran escala, y en caso de necesidad de DNA libre de endotoxinas se utilizó con el “*EndoFree Plasmid Maxi Kit*” de Qiagen. Todas las enzimas de restricción utilizadas fueron de Promega. Los productos de digestión se separaron por electroforesis en geles de 1% de agarosa y 5 ng/ml de bromuro de etidio (SIGMA) en TAE, y se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta. Para la purificación de fragmentos de DNA a partir de los geles de agarosa, se utilizó el “*Geneclean II Kit*” de Q-BIOgene. Todas las construcciones fueron verificadas mediante secuenciación en el Servicio de Secuenciación Automática de ADN (actualmente SECUGEN S.A.) del CIB.

-*Vectores de expresión de RhoB y GFP-RhoB*

El plásmido pcDNA3-HARhoBwt, que contiene el cDNA completo de RhoB salvaje de rata, que codifica una proteína idéntica a la humana, en fusión con el epítopo de la hemaglutinina (HA) fue un regalo del Dr. Prendergast (The Wistar Institute, Philadelphia, PA). Las construcciones de pEGfp/HA-RhoB, pEGfp/HA-RhoB(C193S), y pEGfp/HA-RhoB(C192S) se obtuvieron mediante la incorporación por PCR tanto de sitios de restricción (BglII para el 5' y XbaI para el 3'), como de las mutaciones de interés, usando la polimerasa EcoTaq de ECOGEN, como DNA molde el pcDNA3-HA-RhoB wt y los siguientes oligonucleótidos como cebadores para la amplificación (en negrita, los extremos 5' añadidos para incorporar sitios de restricción; en rojo, los nucleótidos de sustitución para incorporar las mutaciones):

5'- **CCAGAGAGATCTATGTACCCATACGATGTGCCAGAC** ^{-3'} común para todas las construcciones (se anilla en la secuencia codificante del epítopo e incorpora un sitio BglII en el extremo 5' de modo que sigue el marco de lectura de Gfp);

5'- **CAGAGCTCTAGATCATAGCACCTTGAGCAGTTGATG** ^{-3'} para la wt;

5'- **CAGAGCTCTAGATCATAGCACCTT**CGA**GCAGTTGATG** ^{-3'} para la C193S;

5'- **GCTCTAGATCATAGCACCTTGCA**CGA**GTTGATGC** ^{-3'} para la C192S;

Los productos de PCR, se digirieron con la enzima BglII y se subclonaron en los sitios de restricción BglII y HindIII del plásmido pEGFP-C1. Para ello dicho plásmido había sido previamente digerido con estas enzimas y el sitio HindIII rellenoado usando el fragmento grande de la DNA polimerasa (Klenow) de Promega, una reacción denominada “Klenow fill-in”. Las construcciones de los mutantes de HA-RhoB generadas, se transfirieron también al plásmido pcDNA3.1 mediante clonaje entre los sitios BamHI y EcoRI.

-*Vectores de expresión de vimentina*

La construcción pCMV6-XL5/h_Vimentin se adquirió de Origene. Para su subclonación en el vector pEGfp-C1, en el marco de lectura de Gfp, eliminando las regiones no traducidas 5' del cDNA de la vimentina humana, se procedió a la incorporación de un sitio de restricción EcoRI antes del ATG de la vimentina, por mutagenesis dirigida, usando el *Site Directed Mutagenesis Kit II* de Stratagene, y los oligonucleótidos complementarios que contienen la mutación:

5'- CGCCACCCCTCCGCAG**AATT**CCATGTCCACCAGGTCC ^{-3'} y

5'- GGACCTGGTGGACATGG**AATT**CTGCGGAGGGTGGCG ^{-3'}.

Una vez incorporado el sitio EcoRI, la construcción se digirió con la enzima NotI, que corta después del 5' de la vimentina, y los extremos cohesivos se rellenan mediante *Klenow fill-in*. A continuación, el producto de esta reacción se purificó y se digirió con EcoRI, liberando así el DNA codificador de la vimentina. En paralelo, el vector pEGfp-C1 se digirió con las enzimas EcoRI y SmaI. Los productos de los dos procesos, una vez purificados, se unieron mediante la enzima T4 Ligasa de Promega. El producto final, pEGfp-Vimentina wt, es un vector de expresión de la vimentina humana en fusión con la proteína fluorescente verde.

Una vez obtenida dicha construcción se procedió a la generación del mutante C328S de la vimentina, utilizando el arriba mencionado kit de mutagénesis y los oligonucleótidos complementarios que contienen la mutación:

5'- GGGCATCCACTTCA**GAGGTGAGGGACTGCACC** -3' y

5'- GGTGCAGTCCCTCACCT**CTGAAGTGGATGCC** -3'

Otros reactivos

Los anticuerpos para inmunoblot fueron: anti-RhoB, anti-RhoA, anti-Cdc-42, anti-actina, anti-ubiquitina y anti-HA de Santa Cruz Biotechnology; anti-panRas-10 (pan Ras) de Oncogene Science; anti-Rac-1, anti-Rap-2 y anti-iNOS de BD-Transduction Labs; anti-Hsp90 y anti-Rab5 de Stressgen; anti-Hsp70/Hsc70 de SIGMA; anti-vimentina de Pharmacia (GE Healthcare), el anticuerpo anti-tubulina fue un generoso regalo de la Dra. Isabel Barasoain Blasco (Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC); anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de Dako; los anticuerpos secundarios “anti-rabbit Texas Red” y “anti-mouse Alexa 488” de Molecular Probes (Invitrogen). La estreptavidina conjugada con peroxidasa fue de Amersham Biosciences. La faloidina conjugada con Alexa 568 y el 4',6-diamidino-2-fenilindol dicloridrato (DAPI) fueron de Molecular Probes (Invitrogen). La deoxicitidina 5'-trifosfato-[α -³²P] (3000 Ci/mmol) se compró a Amersham. Los reactivos FTI-277, GTI-286, toxina B de *Clostridium difficile*, exoenzima C3 de *Clostridium botulinum*, y el inhibidor de la quinasa asociada a Rho, Y-27632 se adquirieron a Calbiochem-Novabiochem. Las tinciones con Coomassie coloidal se realizaron con el reactivo “GelCode Blue Satin Reagent” de Pierce. Las soluciones utilizadas (SSC, Denhardt, TAE, TBE, PBS, etc.) se prepararon según se ha descrito previamente (Sambrook y Russel, 2001) y los reactivos utilizados fueron de cali-

dad analítica de distintos proveedores (Merck y Sigma fundamentalmente). El agua empleada fue de grado reactivo MilliQ (Millipore).

Métodos

Cultivos celulares

Las células endoteliales de aorta bovina (BAEC), disponibles en el laboratorio (Hernández-Perera *et al.*, 1998), se utilizaron entre pases 3 y 10. Se mantuvieron en cultivo en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bovino. Para los experimentos aquí descritos se usaron células quiescentes, es decir, mantenidas en medio mínimo (RPMI 1640 sin suero) durante 24 h después de llegar a confluencia. Los tratamientos se llevaron a cabo también en medio mínimo, en condiciones en las que no se inducían efectos tóxicos según se evaluó mediante análisis del ciclo celular o el test de exclusión de azul de tripán.

El hibridoma de células endoteliales de cordón umbilical humano con la línea celular A549, EA.hy926 (Edgell *et al.*, 1983), se cultivó en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y los antibióticos penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml). La deprivación de suero y los tratamientos se realizaron a los dos días después de que los cultivos llegasen a confluencia.

Las células mesangiales de rata (RMC), disponibles en el laboratorio (Saura *et al.*, 1998), se utilizaron entre los pases 5 y 20. Se mantuvieron en cultivo en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, y los antibióticos penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml).

Las líneas celulares Mv1Lu (epiteliales de pulmón de visón), NIH 3T3 (fibroblastos de ratón) y C2C12 (mioblastos de ratón) se crecieron en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y antibióticos, evitando llegar a confluencia. La diferenciación de los mioblastos a miotubos se llevó a cabo mediante el tratamiento de cultivos de las C2C12 a 80-90% de confluencia con medio DMEM suplementado con 2% de suero de caballo, durante tres días.

Las células HeLa (epiteliales de adenocarcinoma de cervix) se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino.

Todos los tipos celulares se mantuvieron en atmósfera humidificada, con 5% CO₂ y a 37°C.

Los pases celulares se llevaron a cabo mediante tratamiento con tripsina-EDTA, lavado con medio completo y resuspensión en medio fresco.

Tratamientos de células

Todos los tratamientos se hicieron durante el tiempo indicado en medio mínimo. Los tratamientos de las BAEC y en algunos casos de las RMC se hicieron después de incubación de las células durante 24 h en medio mínimo, por lo que estas células se denominaron quiescentes.

- *Tratamientos de estimación de la estabilidad de proteína.*

Las células se trataron con 20 µg/ml del antibiótico cicloheximida (CHX) para inhibir la síntesis de proteínas durante los tiempos indicados. En los casos de pre-tratamientos o tratamientos conjuntos, como punto de 0 h se define el momento de añadido de la CHX.

- *Protocolo de depleción de potasio.*

Las células se someten a choque osmótico mediante su incubación en medio mínimo diluido al 50% con agua durante 5 minutos a 37°C. A continuación las células se incuban a 37°C durante el tiempo deseado en tampón isotónico (140 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7,4, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ y 1 mg/ml glucosa) con o sin 10 mM KCl.

Transfecciones transitorias

Los fibroblastos NIH-3T3 se transfecaron cuando se encontraban a un 80% de confluencia en placas de 35 mm o a un 50% de confluencia sobre cubreobjetos de vidrio estériles dispuestos en placas de 24 pocillos, con los plásmidos correspondientes usando el reactivo Lipofectamine 2000, según las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Tras la transfección las células se recuperaron en medio de crecimiento durante 24 horas para ser tratadas después, o bien se recuperaron durante 6 h, se tripsinizaron, se sembraron 3 alícuotas iguales en placas de 35 mm y se recuperaron durante 16 h, antes de los pretratamientos de 24 h, cuando fueron necesarios, y los ensayos de estabilidad de proteína.

Las RMC, en cubreobjetos de vidrio en placas p-24, se transfectaron a 70% de confluencia con los plásmidos correspondientes, libres de endotoxinas, usando Lipofectamina 2000 durante 3 horas. Tras la transfección se incubaron en medio completo durante 16 ó 48 horas antes de los tratamientos necesarios.

Fraccionamiento subcelular

Las células se homogeneizaron en 20 mM Tris, pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 250 mM sacarosa, 0,1 mM DTT, e inhibidores de proteasas. Los lisados se centrifugaron a 200.000 x g durante 30 minutos a 4°C en un rotor Beckman TLA100. El sobrenadante (fracción citosólica o S100) se recogió y se utilizó directamente para los siguientes pasos. La fracción insoluble (P100 o fracción de membrana) se resuspendió en el tampón arriba descrito con SDS al 0,5% (peso/volumen).

Microscopía

Las células sembradas en cubreobjetos de cristal, tratadas adecuadamente, se fijaron con 3,5% de formaldehído en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los cubres se montaron en portaobjetos usando Mowiol (SIGMA) como medio de montaje. Las muestras se observaron en el microscopio confocal de Leica (LEICA TCS-SP2-AOBS) o un sistema análogo de Bio-Rad (MCR 1024 sobre un microscopio óptico Axiovert 135 de Zeiss), o en un microscopio de fluorescencia acoplado a una cámara CCD (Zeiss Axioplan y CCD Leica DFC 350 FX), según se indica, del servicio de Microscopía de CIB.

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), inmunoblot y Strep Blot.

Para el análisis de la expresión de distintos genes, las células se homogeneizaron mediante pases a través de una aguja 26G1/2 en una solución 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 0,1 mM β-mercaptoetanol, 0,5% SDS, que contenía inhibidores de proteasas (leupeptina, pepstatina, antipaína a una concentración de 2 µg/ml cada uno, todos de SIGMA y 320 µg/ml Pefabloc SC de Roche). Los lisados (40 µg de proteína) se separaron en geles de SDS-poliacrilamida y se transfirieron a membranas de PVDF (Immobilon-P, Millipore) mediante un sistema de transferencia semiseco (BioRad), según las instrucciones del fabricante.

Las membranas se bloquearon mediante incubación en TBS con 0,05% Tween-20 (SIGMA) y 5% de leche desnatada (peso/volumen, leche en polvo de Nestlé) y se hibridaron con estreptavidina-peroxidasa (Strep Blot, SB) o se hibridaron con anticuerpos generados contra las proteínas de interés y a continuación con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa según se indica, todos ellos preparados en TBS con 2% (peso/volumen) albúmina sérica bovina (SIGMA). Los inmunocomplejos o los complejos biotina-estreptavidina se detectaron por quimioluminiscencia con los reactivos ECL de Amersham. Los niveles de las proteínas se estimaron mediante análisis densitométrico de las exposiciones para la proteína de interés y se corrigieron por los niveles de proteína total según la tinción de Coomassie o los niveles de una proteína no relacionada, con el uso de un escáner AGFA y el programa informático “*Scion Image*” de Scion corporation.

Electroforesis en dos dimensiones

Los lisados de células se obtuvieron con el método arriba descrito. La cantidad deseada de proteína se precipitó con 10% de TCA, se centrifugó a 15000 x g y se lavó consecutivamente con etanol al 80% (v/v) y dos veces con acetona pura. El precipitado se dejó secar toda la noche y se resuspendió en el tampón de muestra para el isoelectroenfoque: 2 M tiourea, 7 M urea, 4% CHAPS, 100 mM DTT y 0,4% anfolitos (Biolyte, BIO-RAD). Las muestras se cargaron por rehidratación activa en tiras *IPG ReadyStrip* de BIO-RAD y a continuación se sometieron a isoelectroenfoque en el aparato Protean IEF Cell de BIO-RAD, en las condiciones indicadas por el fabricante. Despues del isoelectroenfoque, las tiras se equilibraron en tampón con 6 M urea, 2% (peso/volumen) SDS, 0,375 M Tris pH 8,8, 20% glicerol, en dos pasos de 10 minutos. En el primer equilibrado el tampón contenía 130 mM DTT y en el segundo 135 mM iodoacetamida. Despues, las tiras se colocaron para la segunda dimensión (SDS-PAGE) sobre geles de poliacrilamida.

Una vez corridos los geles, se trasfirieron a membranas de PVDF, según lo indicado en la sección anterior, o se tiñeron con azul de Coomassie coloidal, *Gel-Code Blue* (Pierce), según las instrucciones del fabricante. En algunos casos, los geles teñidos, se destiñieron con una solución de 50 mM Tris, 40 mM Glicina, 0,1% SDS, 20% Metanol, y se transfirieron a membranas PVDF.

Obtención de RNA y análisis por Northern Blot

El RNA total se extrajo mediante un procedimiento de lisis celular con isotiocianato de guanidinio (Chomczynski y Sacchi, 1987; Sambrook y Russell, 2001). Alícuotas con 10 µg de RNA total se separaron por electroforesis en geles de 1% agarosa/0,66 M formaldehido, se transfirieron a membranas de hibridación de tipo Hybond (Amersham) y se fijaron mediante radiación ultravioleta. Para el análisis de la expresión del transcrito de RhoB se usó como sonda el cDNA completo de RhoB de rata, regalo del Dr. Prendergast (The Wistar Institute, Philadelphia, PA). Esta sonda se marcó con α -³²P-dCTP usando el kit Rediprime de Amersham. Las membranas se bloquearon mediante incubación con una solución de hibridación (50% formamida, 5x Denhardt's, 5x SSPE, 0,5% SDS, y 100-200 µg de DNA de esperma de salmón) a 42°C durante 4 horas y a continuación se hibridaron con la sonda radiactiva durante 16 horas. Posteriormente las membranas se lavaron con una solución de 2x SSC, 0,5% SDS y se expusieron a una película Kodak a -80°C usando pantallas amplificadoras. Para identificar los cambios en la expresión de los RNA específicos de los distintos genes, los blots fueron denudados e hibridados con una sonda para la β -actina. El análisis densitométrico se realizó usando un escáner Agfa y el programa informático “*Scion Image*”. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias como el cociente entre la expresión del gen de interés y los niveles de β -actina

Purificación de proteínas unidas a 15d-PGJ₂ biotinilada mediante el uso de resina de avidina.

Las RMC se incubaron en presencia de 5 µM 15d-PGJ₂ o 15d-PGJ₂ biotinilada durante dos horas en medio mínimo. Las células se homogeneizaron mediante pases a través de una aguja 26G1/2 en una solución 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 0,1 mM β -mercaptoetanol, 1% NP-40 (SIGMA), que contenía inhibidores de proteasas. Los lisados se centrifugaron a 12.000 x g y los sobrenadantes se separaron de los restos celulares. Las proteínas biotiniladas fueron purificadas por adsorción a Neutravidina-agarosa de Pierce según las especificaciones del producto. Brevemente, la resina equilibrada en el tampón de lisis se incubó con el lisado celular, en una proporción de 50 µl de 50% de resina para cada miligramo de proteína total, durante 1 h a 4°C con agitación continua. Después de varios lava-

dos de la resina en tampón de lisis las proteínas unidas se eluyeron con 50 µl de tampón Laemmli 2x. Las proteínas de interés del eluido fueron detectadas mediante Strep blot.

Identificación de proteínas por espectrometría de masas

La identificación de las proteínas se llevó a cabo en la Unidad de Proteómica del Parque Científico de Madrid. Brevemente, las “manchas” de interés se cortaron del gel y se digirieron con tripsina. Los péptidos resultantes se mezclaron con la matriz (ácido α -ciano-4-hidroxi-cinámico) y se analizaron mediante espectrometría de masas por MALDI-TOF (ionización/desorción mediante láser asistida por matriz-tiempo de vuelo) para la obtención de la huella peptídica, y en algunos casos mediante MALDI-TOF-TOF para la obtención de la secuencia de determinados péptidos. Los espectros resultantes se analizaron con el algoritmo de búsqueda MASCOT (Matrix Science) para identificar las correspondientes proteínas.

Análisis estadístico

Cada experimento se ha llevado a cabo al menos tres veces, a no ser que se indique lo contrario. Los datos se expresan como media de los datos \pm error estándar de la media. El nivel de significación estadística se definió como $p<0,05$ y la comparación entre condiciones se efectuó mediante el *test* de Student.

Resultados

1. Isoprenilación y palmitoilación de proteínas

Efectos de estatinas sobre GTPasas de bajo peso molecular

La superfamilia de las GTPasas monoméricas de bajo peso molecular, está constituida por proteínas en su mayoría isopreniladas, que desempeñan funciones muy variadas y de gran importancia para el correcto funcionamiento celular (revisado en McTaggart, 2006). Diversos estudios han relacionado la inhibición de la isoprenilación con alteraciones en la señalización, actividad y expresión de estas proteínas (Cordle *et al.*, 2005; Holstein *et al.*, 2002; Solski *et al.*, 2002). Además, se ha observado que la inhibición de la isoprenilación afecta a la movilidad electroforética de algunas de estas GTPasas y otras proteínas susceptibles de esta modificación, de manera que las formas no procesadas migran menos que las formas totalmente procesadas (Adjei *et al.*, 2000; Gutierrez *et al.*, 1989; Hancock *et al.*, 1989).

Nos hemos planteado estudiar los efectos de la inhibición de la isoprenilación sobre los niveles de expresión y la movilidad electroforética de varias representantes de las principales familias de las GTPasas de bajo peso molecular. Para llevar a cabo el estudio propuesto, hemos empleado células endoteliales de aorta bovina, BAEC, y el inhibidor de síntesis de mevalonato, la estatina Simvastatina (Sv) a una concentración de tratamiento de 10 μ M.

Como se puede observar en la fig. 8, el tratamiento con Sv no afectó de forma apreciable los niveles de proteína ni la movilidad electroforética de Ras o Rac.

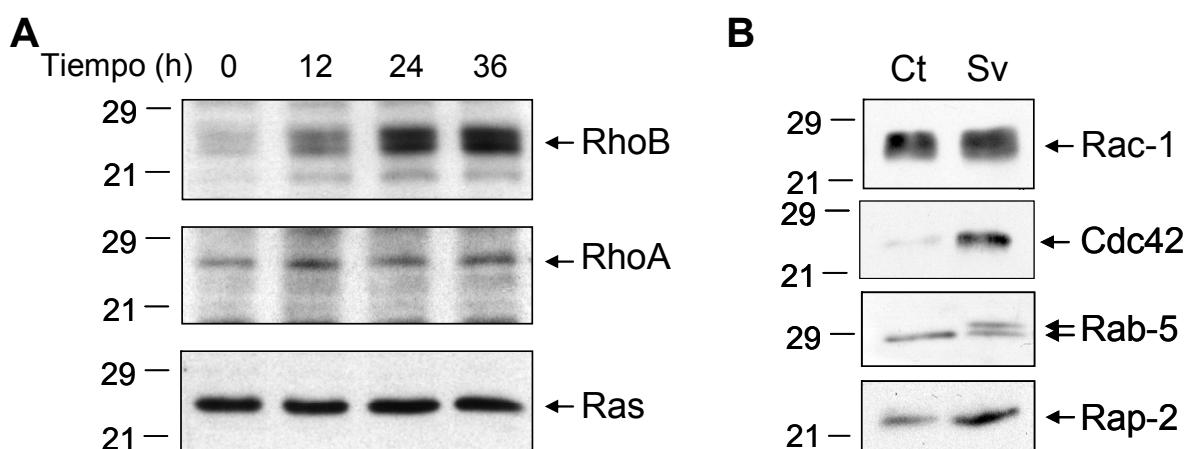


Figura 8: Efecto del tratamiento con Sv sobre los niveles de distintas GTPasas. Las BAEC quiescentes se trataron con 10 μ M de SV durante los tiempos indicados (A) o durante 24 h (B). Los niveles de las GTPasas de bajo peso molecular que se indican se estimaron mediante inmunoblot.

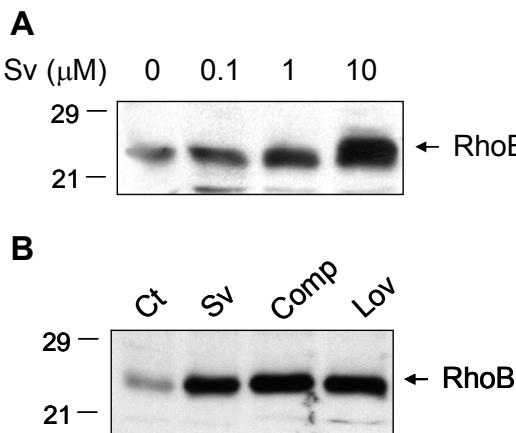


Figura 9: El aumento de los niveles de RhoB es dependiente de la dosis y es inducido por varias estatinas. Las BAEC quiescentes fueron tratadas con las dosis indicadas de Sv (A) o con varias estatinas a $10 \mu\text{M}$ (B), durante 24 h. Los niveles de RhoB se estimaron mediante inmuno-blot. Sv, Simvastatina; Comp, Compactina; Lov, Lovastatina.

La Sv indujo un leve incremento de los niveles de RhoA y Rap-2 sin alterar la movilidad electroforética de estas proteínas. En cambio, en el caso de Rab-5 se observó la aparición de una banda con un claro retraso de la movilidad electoforética en presencia de Sv, aunque los niveles de proteína no se alteraron. La Sv indujo un marcado aumento de los niveles de Cdc42 (de 5 a 8 veces) y de RhoB (superior a 10 veces). En el caso de RhoB se apreció un incremento en forma de una banda ancha o doblete que podría estar constituida en parte por la forma no procesada.

Basándonos en estos resultados, decidimos estudiar con mayor detalle la regulación de RhoB en respuesta al tratamiento con Sv, puesto que fue la proteína cuyos niveles sufrieron un mayor incremento. Comprobamos que este aumento era dependiente de la dosis de Sv (fig. 9A) y que se producía tras el tratamiento con

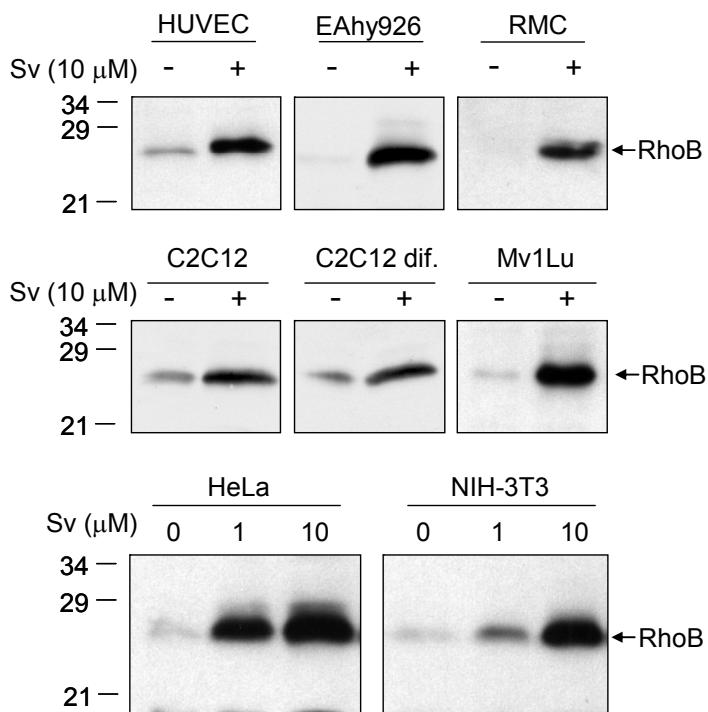


Figura 10: Efecto de tratamiento con Sv sobre los niveles de RhoB en varios tipos celulares. Las células primarias HUVEC, RMC y la línea celular de EAhy926, fueron tratadas con SV $10 \mu\text{M}$ en medio mínimo durante 24 h, después de 24 h de deprivación de suero. Las líneas celulares C2C12 y Mv1Lu se trataron durante 24 h con $10 \mu\text{M}$ de Sv en medio mínimo. El cultivo de C2C12 en diferenciación durante 3 días (C2C12 dif.) se trató con Sv $10 \mu\text{M}$ durante 24 h en medio de diferenciación. Las líneas celulares HeLa y NIH-3T3 se trataron en medio mínimo durante 24 h con las dosis indicadas de Sv. En estas últimas líneas celulares fue donde mayor aumento de RhoB se observó (hasta 40 veces).

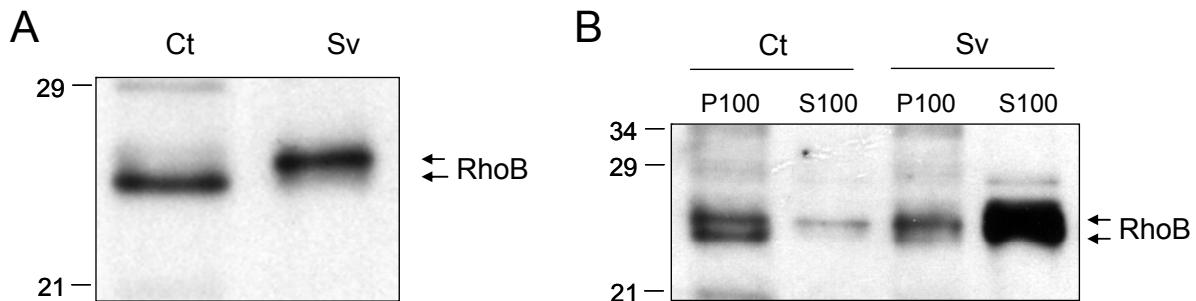


Figura 11: Alteraciones en la movilidad electroforética y la localización subcelular de RhoB provocadas por el tratamiento con Sv. (A) Proteínas de lisados de BAEC (Ct: 20 µg, Sv: 4 µg de proteína total, para conseguir niveles de RhoB similares), tratadas durante 24 h con 10 µM Sv o vehículo, fueron analizadas por SDS-PAGE para estimar la movilidad electroforética de RhoB. (B) Fracciones de membrana (P100) y citosol (S100) de BAEC tratadas como en (A) fueron aisladas por ultracentrifugación. Alícuotas con 10 µg de proteína fueron analizados por SDS-PAGE y sometidos a inmunoblot con anti-RhoB.

diversas estatinas (fig. 9B) así como en varios tipos celulares de diferente origen (fig. 10). Para poder apreciar el retardo en la movilidad electroforética de RhoB, que es indicativa de la inhibición de la isoprenilación, fue necesario analizar cantidades muy pequeñas de proteína en el caso de los lisados de células tratadas con Sv para evitar la pérdida de nitidez de la banda debida a la intensidad de la señal (fig. 11A). La inhibición de la isoprenilación se manifestó además en la disminución de la asociación de RhoB con membranas celulares, como se puede observar mediante fraccionamiento subcelular (fig. 11B). Ambos tipos de evidencias sugieren que la acumulación de RhoB ocurre a expensas de la forma no procesada, cuyos niveles aumentan fundamentalmente en la fracción soluble.

Estudio del efecto de metabolitos de la ruta de biosíntesis del colesterol sobre el aumento de la proteína RhoB provocado por Sv.

Ya que el efecto más importante de las estatinas es la disminución de la producción de colesterol, hemos examinado si el suplemento con colesterol durante el

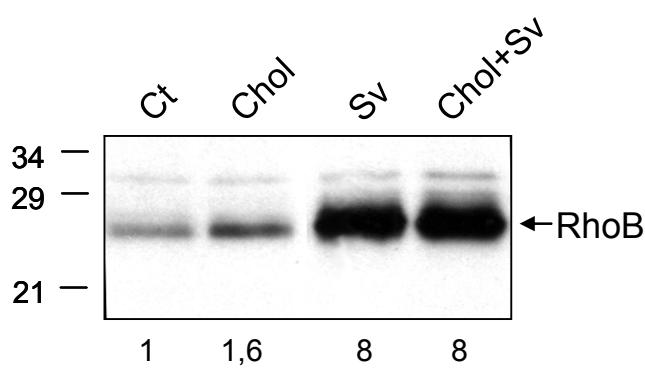


Figura 12: El suplemento con colesterol no revierte el aumento de RhoB provocado por Sv. Las BAEC quiescentes fueron tratadas con 10 µM Sv, 100 µg/ml colesterol, su combinación, o vehículo durante 24 h en medio mínimo y los niveles de RhoB se analizaron mediante inmunoblot. Se muestran estimaciones de la cantidad relativa de RhoB por densitometría que son valores medios de al menos 3 experimentos independientes.

tratamiento de células BAEC con Sv revertía el aumento de los niveles de RhoB. Como se puede observar en la figura 12, dicho co-tratamiento no redujo el aumento de RhoB, por el contrario, el suplemento de colesterol por sí solo incrementó moderadamente los niveles de RhoB. Por el contrario el suplemento con mevalonato, el producto directo de la HMG-coA reductasa, sí anuló el efecto de la Sv. De forma similar, la adición por separado de los isoprenoides farnesil pirofosfato (FPP) o geranilgeranil pirofosfato (GGPP), productos intermedios de la ruta de biosíntesis del colesterol y sustratos de las transferasas encargadas de la isoprenilación de proteínas, revirtió parcialmente dicho aumento (fig. 13A). El tratamiento conjunto con los dos isoprenoides no fue posible debido a su acción como detergentes. Estas observaciones sugieren que el aumento de los niveles de RhoB puede ser provocado por la inhibición de isoprenilación de proteínas de la célula. Para confirmar esta hipótesis tratamos células BAEC con inhibidores de la farnesil transferasa (FTI) y de la geranilgeranil transferasa (GGTI). El tratamiento de las células con FTI provocó un pequeño aumento en los niveles de RhoB, de 1,5 veces, mientras que el tratamiento con GGTI indujo aumento de 3,8 veces. La combinación de los dos inhibidores aumentó la cantidad de la proteína RhoB a niveles similares a los inducidos por el tratamiento con Sv (fig. 13B). Esto último, apuntaría a la implicación de proteínas

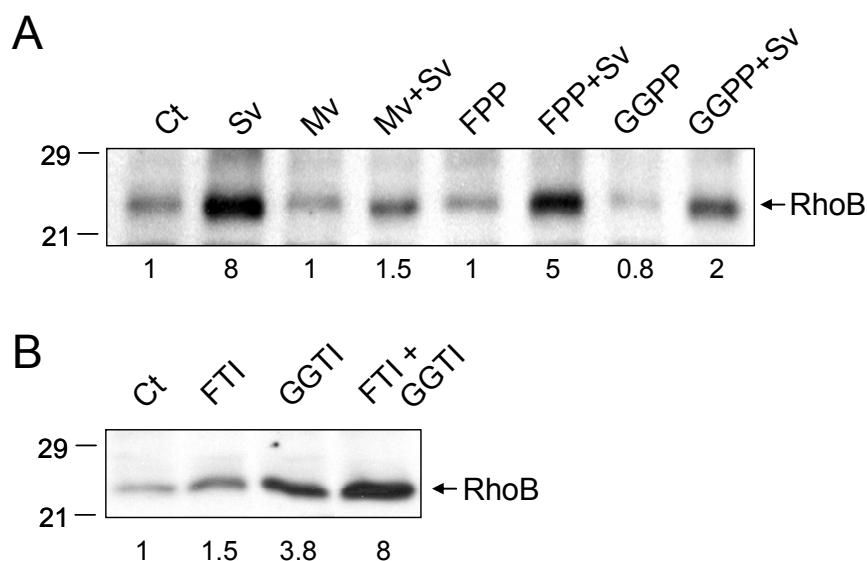


Figura 13: Efecto de metabolitos de la vía de síntesis de isoprenoides y de inhibidores de isoprenilación sobre los niveles de RhoB. (A) Las BAEC quiescentes fueron tratadas con vehículo o 10 μM Sv en ausencia o presencia de 100 μM ácido mevalónico (Mv), 5 μM farnesil pirofosfato (FPP), 5 μM geranilgeranil pirofosfato, durante 24 h en medio mínimo. (B) Las BAEC se trataron como en (A) con vehículo, 5 μM del inhibidor de la FT, FTI-277 (FTI), 5 μM del inhibidor de la GGT I, GGTI-286, o su combinación. Se muestran cuantificaciones de la cantidad relativa de RhoB después de inmunoblot, obtenidas como en la figura 12.

tanto farnesiladas como geranilgeraniladas en los mecanismos que afectan los niveles de RhoB, lo cual hace necesaria la inhibición de los dos tipos de modificación para conseguir el mismo efecto que con Sv.

Estudio de los efectos de la Sv sobre los niveles de mRNA de RhoB.

Para esclarecer el nivel al que la Sv regula la expresión de RhoB, hemos investigado su papel en la regulación de los niveles de RNA mensajero de RhoB. El tratamiento de células BAEC con Sv produjo un aumento de dos veces en los niveles de RNA de RhoB (fig. 14). Dicho aumento se pudo revertir parcialmente con el suplemento de mevalonato. Estas observaciones junto con las evidencias de que algunos miembros de la familia de las Rho GTPasas pueden regular el promotor de RhoB (Fritz y Kaina, 1997) podrían indicar la posible implicación de proteínas isopreniladas de dicha familia en la regulación de la transcripción del gen de RhoB por Sv. Por ello, decidimos explorar la influencia de la inhibición de las proteínas G sobre los niveles de RNA de RhoB.

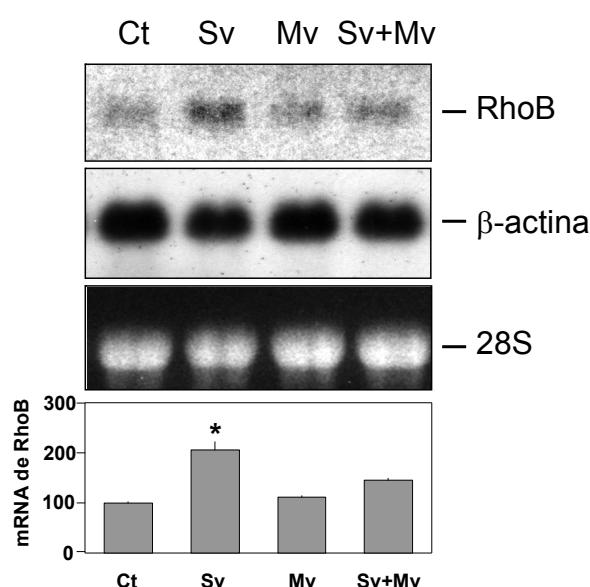


Figura 14: Efecto de Sv y Mv sobre los niveles de mRNA de RhoB. Las BAEC se trataron como en la figura 13. Los niveles de mRNA de RhoB y β -actina se determinaron mediante Northern blot usando como sondas los respectivos cDNA. También se muestra la cantidad de RNA de la subunidad 28S de los ribosomas mediante tinción con bromuro de etidio. El panel inferior muestra la cuantificación del nivel de mRNA de RhoB calculado mediante el cociente entre la intensidad de la señal de RhoB y la de la β -actina. Los resultados son valores medios \pm el error estándar de la media de, al menos, tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ en el test de Student.

Estudio de la regulación de la expresión de RhoB por la modulación de la actividad de proteínas G.

La superfamilia de las proteínas G incluye las familias de las GTPasas heterotriméricas y las GTPasas de bajo peso molecular. Numerosos miembros de las dos familias se encuentran isoprenilados, y dicha modificación y en consecuencia su actividad se ve afectada por la acción de las estatinas (Cordle *et al.*, 2005; Jacobson *et al.*, 2004; Kino *et al.*, 2005). Aprovechando la existencia de diversas toxinas

Toxina de Córrea	<i>Vibrio cholerae</i>	$G_{\alpha s}$	$G_{\alpha t}$	$G_{\alpha olf}$
Toxina de Pertusis	<i>Bordetella pertussis</i>	$G_{\alpha i}$	$G_{\alpha t}$	$G_{\alpha p}$
		$G_{\alpha o}$	$G_{\alpha o}$	$G_{\alpha g}$
		Rho	Rac	cdc42
Toxina B	<i>Clostridium difficile</i>	↓	↓	↓
Exoenzima C3	<i>Clostridium botulinum</i>	↓↓	~	~
		-	-	-
		Ras	R-RasTC-21	Ral
		-	-	-
		Rap	Rap	Rab
		-	-	-

Tabla 2: Especificidad de diversas toxinas bacterianas como moduladores de las proteínas G. La toxina de Córrea activa y la de Pertusis inactiva las proteínas G_{α} mostradas. La exoenzima C3 inactiva fundamentalmente las proteínas Rho.

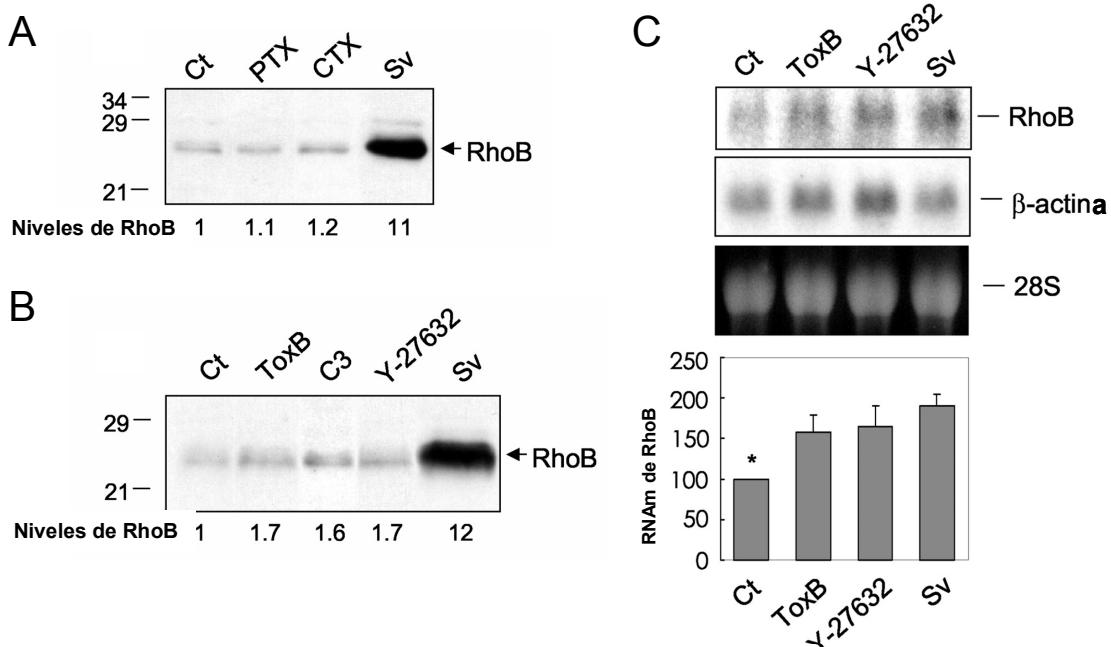


Figura 15: La inhibición de las proteínas Rho produce un modesto aumento en los niveles de RhoB. Las BAEC quiescentes fueron tratadas durante 24 h con vehículo, 10 μ M Sv, 0,5 μ g/ml de toxina de Colera (CTX), 0,5 μ g/ml de toxina de Tosferina (PTX), 0,5 ng/ml toxina B (ToxB), 50 μ g/ml exoenzima C3 o 5 μ M del inhibidor de la Rho quinasa, Y-27632. (A) El tratamiento con PTX y CTX no afectó significativamente a los niveles de proteína de RhoB como se puede observar por inmunoblot. Al contrario, la inhibición de las GTPasas de bajo peso molecular, así como la inhibición de un efecto de RhoA inducen un modesto aumento en los niveles de la proteína (B) y del mRNA (C) de RhoB. Mostradas las medias de cuantificaciones de tres experimentos independientes en cada caso, como se ha descrito en figuras anteriores.

bacterianas con capacidad de activar o inactivar selectivamente algunas de las proteínas G (tabla 2) (revisado por Aktories y Barbieri, 2005; Krueger y Barbieri, 1995), hemos decidido explorar la repercusión del tratamiento con dichas toxinas sobre la expresión de RhoB. De las toxinas ensayadas, sólo la toxina B y la exoenzima C3, las que afectan a la actividad de las GTPasas de bajo peso molecular y concretamente de las Rho tuvieron efecto significativo, aunque modesto, aumentando los niveles de la proteína RhoB. En concordancia con estas observaciones, el inhibidor

del efecto de RhoA, Rho-quinasa también indujo un moderado aumento de los niveles de RhoB (fig. 15A y B). Dichos moduladores también incrementaron los niveles del mRNA de RhoB en grado comparable al provocado por Sv (fig. 15C). El conjunto de estos resultados indicaría que solamente una parte del aumento de RhoB inducido por Sv se puede justificar por el aumento de sus niveles de RNA, que podría estar mediado por la inhibición de las proteínas Rho. Debido a esta falta de correlación entre la magnitud del efecto de la Sv sobre los niveles de mRNA y de proteína de RhoB, decidimos estudiar los efectos del tratamiento con Sv sobre la regulación postraduccional de RhoB.

El tratamiento con Sv aumenta la estabilidad de la proteína RhoB.

Se ha descrito que determinados factores pueden alterar los niveles de RhoB mediante la regulación de la estabilidad de la proteína (Engel *et al.*, 1998). Para explorar si el efecto de la Sv estaba relacionado con una alteración en la degradación de RhoB, estimamos la estabilidad de esta proteína empleando el antibiótico cicloheximida (CHX), un inhibidor de la síntesis de proteínas. Como se puede comprobar en la figura 16A, la proteína RhoB fue más estable en células BAEC pretratadas con Sv, ya que sus niveles, en ausencia de nueva síntesis de proteína, se mantu-

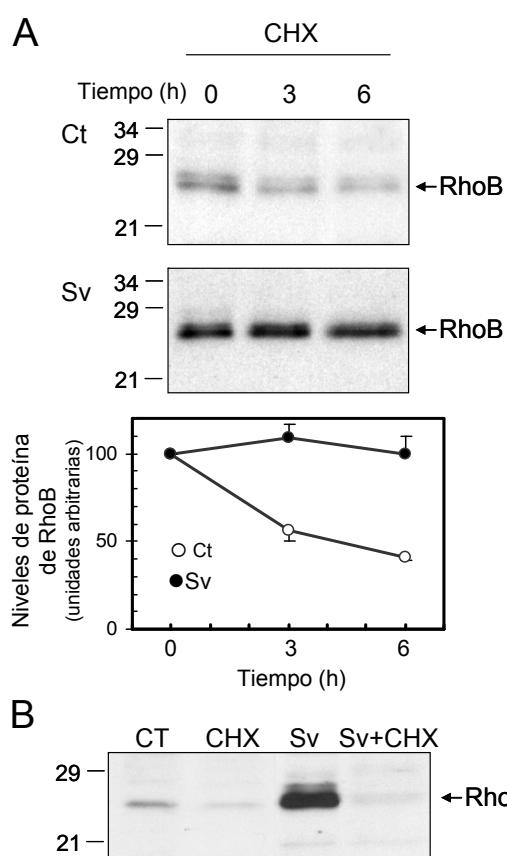


Figura 16: La Sv altera la tasa de degradación de RhoB. (A) Las BAEC quiescentes se trataron en medio mínimo con vehículo (Ct) o 10 μ M Sv durante 24 h y a continuación se boqueó la síntesis de proteínas con 20 μ g/ml cicloheximida (CHX) en presencia de vehículo y Sv respectivamente durante el tiempo indicado. La cantidad relativa de la proteína RhoB se estimó mediante inmunoblot y densitometría. El tiempo de exposición de quimioluminiscencia para las muestras de células Ct fue de 5 a 10 veces más largo que el de las tratadas con Sv. Los valores mostrados son medias \pm error estándar de tres experimentos independientes. (B) La síntesis de proteína es necesaria para el efecto de Sv. Las BAEC quiescentes se trataron durante 24 h con los mismos compuestos y concentraciones que en (A) y los niveles de RhoB se estimaron por inmunoblot.

vieron durante más tiempo, en comparación con la proteína de células control. El tratamiento con CHX redujo los niveles de RhoB y previno completamente el aumento inducido por Sv, indicando la necesidad de nueva síntesis de proteína para este aumento (fig. 16B). Estas observaciones confirmarían que Sv no afecta directamente a la actividad de proteasas celulares ya que no se ha observado aumento de los niveles de RhoB en cotratamientos de CHX y Sv. Estos resultados indican que la isoprenilación de proteínas puede influir sobre la estabilidad de la proteína RhoB y sugieren la posible existencia de un sistema de degradación de proteínas dependiente de dicha modificación.

Efecto de la isoprenilación de RhoB en su estabilidad.

El efecto de la isoprenilación de proteínas sobre la estabilidad de RhoB podría estar mediado por alguna proteína isoprenilada o bien estar relacionado con la modificación de la propia RhoB. Para estudiar si la inhibición de la isoprenilación de RhoB alarga su vida media hemos aprovechado que dicha modificación depende de la presencia de la cisteína 193 que forma parte de la caja CAAX de RhoB. Hemos generado vectores de expresión de RhoB salvaje y mutante en la cisteína mencionada (C193S) en fusión con el epítopo de Hemaglutinina (HA-RhoB) o con la proteína fluorescente verde (Gfp-RhoB). La expresión de HA-RhoB transfectada en fibroblastos NIH-3T3 fue baja y se reguló positivamente por el tratamiento con Sv de manera similar a la proteína endógena. Por el contrario, el mutante HA-RhoB C193S alcanzó unos niveles de proteína más altos, que no resultaron afectados por el tratamiento con Sv (fig. 17A). Con el uso de cicloheximida hemos comprobado que los niveles de la proteína salvaje que contiene la secuencia de isoprenilación, disminuyen más rápidamente que los de la proteína mutante (fig. 17B).

Estos resultados indicarían que la isoprenilación de RhoB afecta de manera directa a su estabilidad o a su degradación.

Efectos de la inhibición de la palmitoilación sobre la estabilidad de RhoB.

RhoB posee dos residuos de cisteína (en las posiciones 189 y 192 de su secuencia) próximos a la caja CAAX, que pueden estar palmitoilados, modificación que para RhoB depende de su previa isoprenilación (Adamson *et al.*, 1992a). En recientes estudios se ha observado que la palmitoilación de la cisteína 192 de

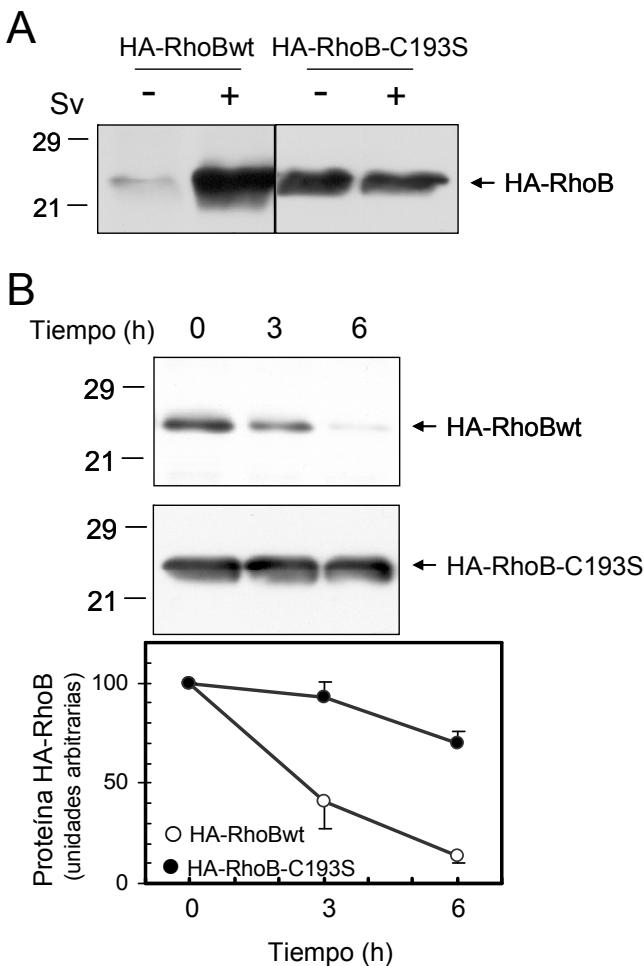


Figura 17: La proteína RhoB no isoprenilada es más estable que la proteína salvaje. (A) Fibroblastos NIH-3T3 transfectados con vectores de expresión de HA-RhoB salvaje (HA-RhoBwt) o del mutante que no se puede isoprenilar (HA-RhoB-C193S) se trataron en medio mínimo en ausencia (Ct) o presencia de Sv 10 μ M durante 24 h. Los niveles de la proteína HA-RhoB transfundida se estimaron mediante inmunoblot usando un anticuerpo específico contra el epítopo HA. (B) Estudio de la estabilidad de las proteínas de interés, en NIH-3T3 transfectadas como en (A), usando la metodología aplicada en la figura 16A.

RhoB es necesaria para su actividad antitumoral y proapoptótica (Wang y Sebti, 2005). Para evaluar la importancia de la palmitoilación de esta cisteína en la estabilidad de la proteína, hemos generado vectores de expresión de Gfp en fusión con RhoB en los que la cisteína 192 ha sido sustituida por serina. Como se pudo comprobar en experimentos de transfección y tratamientos con cicloheximida, la proteína mutante en la cisteína 192 es más estable que la proteína salvaje, de forma similar a la proteína mutante no isoprenilada (C193S) (fig. 18A). Todo ello indicaría que la presencia de la cisteína 192 es necesaria para la correcta degradación de RhoB. En consonancia con esta hipótesis hemos observado que el 2-Br-palmitato (2BP), un inhibidor de la síntesis de palmitoil-coA y de la palmitoilación, induce un aumento significativo de los niveles de la proteína RhoB endógena tanto en fibroblastos NIH-3T3 como en BAEC (fig. 18B). Los experimentos de estabilidad de proteína en presencia de 2BP no se pudieron realizar debido a la alta toxicidad de este compuesto. Estos datos sugieren que la palmitoilación de la cisteína 192 es importante para la regulación de la estabilidad de RhoB.

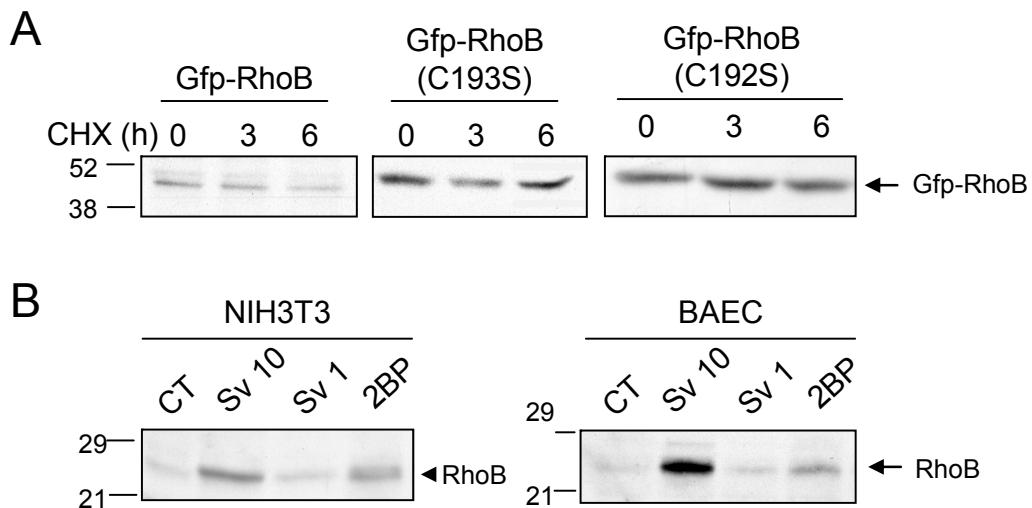


Figura 18: La inhibición de la palmitoilación de RhoB estabiliza la proteína. (A) Fibroblastos NIH-3T3 transfectados con las construcciones que se especifican fueron tratados durante los tiempos indicados con 20 µg/ml CHX en medio mínimo y los niveles de RhoB se estimaron mediante inmunoblot con anticuerpo anti-RhoB. Los mismos resultados se obtuvieron con el uso de un anticuerpo específico contra Gfp. (B) BAEC quiescentes y fibroblastos NIH-3T3 fueron tratados con vehículo, 1 ó 10 µM Sv ó 20 µM 2-Br-palmitato (2BP) en medio mínimo durante 24 h y los niveles de RhoB se estimaron mediante inmunoblot.

La isoprenilación y la palmitoilación de RhoB determinan su localización.

Las modificaciones postraduccionales de RhoB son determinantes importantes de su localización. Para evaluar la importancia relativa de la isoprenilación de RhoB y de la palmitoilación de la cisteína 192 en la correcta localización de la proteína, hemos utilizado microscopía confocal de fluorescencia, empleando los vectores de expresión de las proteínas de fusión con Gfp. En fibroblastos NIH-3T3 trans-

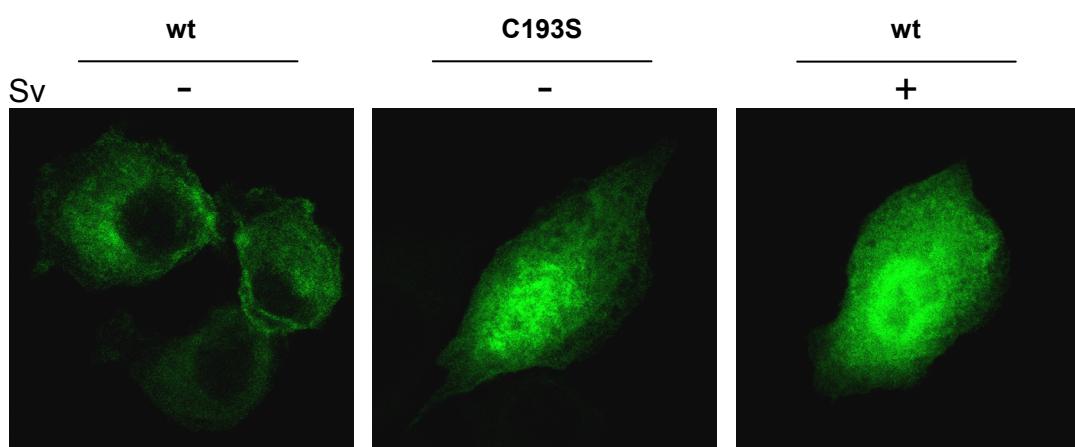


Figura 19: La inhibición de la isoprenilación de RhoB afecta a su localización subcelular. Fibroblastos NIH-3T3 transfectados con vectores de expresión de RhoBwt o RhoB-C193S en fusión con la proteína fluorescente Gfp (wt y C193S respectivamente) se trataron en medio mínimo con vehículo o 10 µM Sv durante 24 h. La localización de las proteínas quiméricas se observó mediante microscopía confocal. Se muestran las proyecciones máximas de todas las secciones ópticas (de 0,5 µm cada una) de las células.

fectados con estas construcciones, observamos que RhoB salvaje (wt), como era de esperar, mostraba una localización particulada asociada con la membrana celular y membranas intracelulares (fig. 19). Por el contrario, el mutante C193S mostró una distribución difusa, similar a la de la proteína salvaje en células tratadas con Sv.

La observación por microscopía confocal de fibroblastos transfectados con el vector de expresión de Gfp-RhoB-C192S (C192S) mostró una distribución difusa de dicho mutante en el citoplasma (fig. 20) con exclusión del núcleo probablemente debido a que se encuentra isoprenilado. Por otro lado, la homóloga de RhoB, RhoA, que no se palmitoila, mostró una localización citoplásmica en estas condiciones.

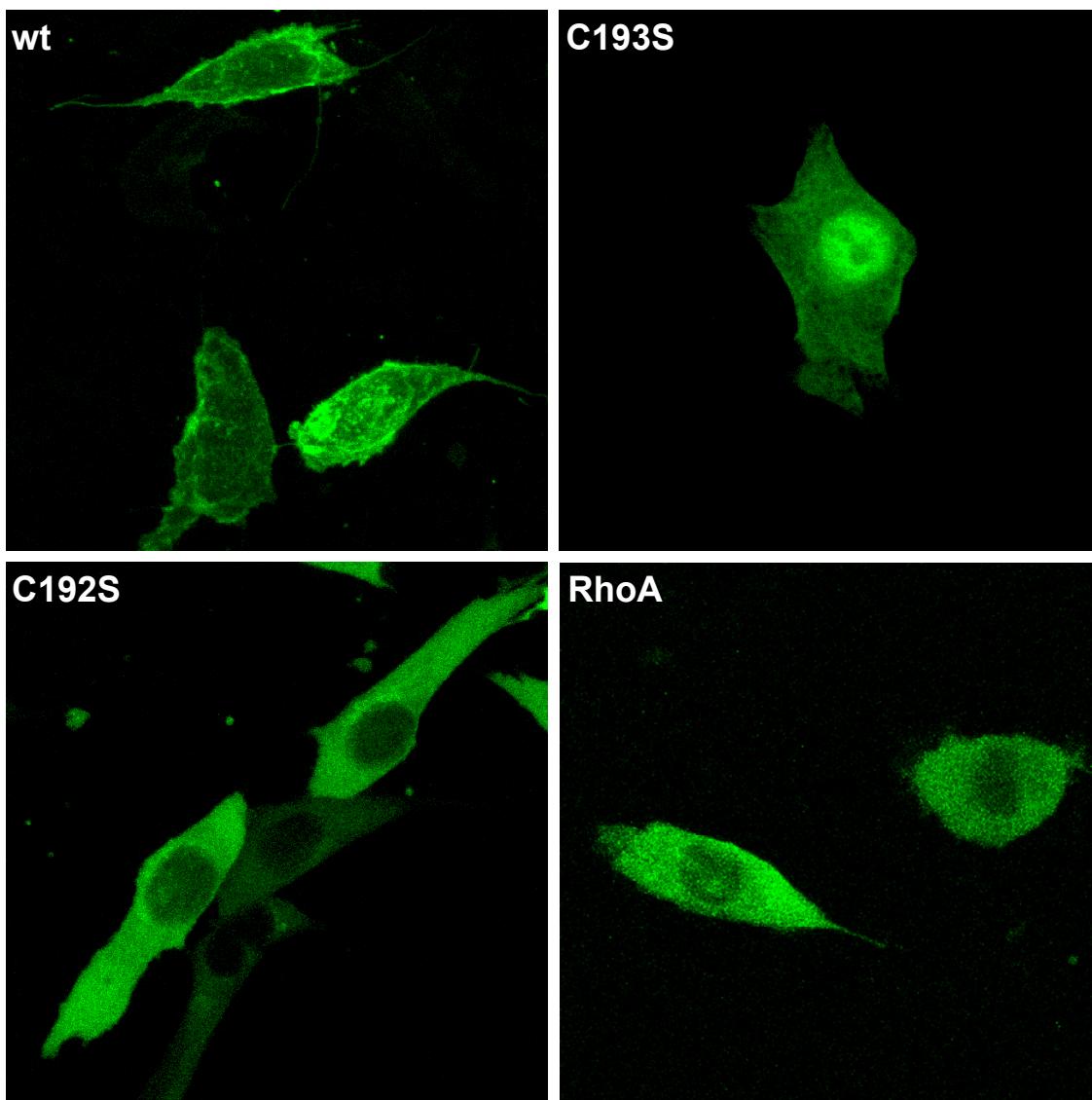


Figura 20: Las cisteínas 192 y 193 de RhoB son necesarias para su correcta localización. Imágenes de microscopía confocal de NIH-3T3 transfectadas con vectores de expresión de Gfp-RhoBwt (wt), Gfp-RhoB-C192S (C192S), Gfp-RhoB-C193S (C193S) y Gfp-RhoA (RhoA). Se muestran las proyecciones máximas como en la figura 19.

Estudio de mecanismos de proteólisis implicados en la degradación de RhoB.

Ya que la secuencia de la proteína RhoB madura no contiene patrones de reconocimiento de proteasas específicas de secuencia, nos hemos centrado en sistemas proteolíticos amplios. Existen evidencias de que RhoB puede ser degradada por el proteasoma, después de su ubiquitinación, proceso que se inhibe en respuesta a tratamiento de las células con TGF β (Engel *et al.*, 1998). Para estudiar la implicación de dicho sistema proteolítico en la degradación de RhoB en relación con su procesamiento, hemos utilizado inhibidores específicos del proteasoma, así como inhibidores con selectividad hacia diversos tipos de proteasas. La selectividad de cada inhibidor se muestra en la tabla 3. Los inhibidores específicos del proteasoma, lactacistina y Z-LLL-CHO, provocaron un modesto aumento, de 1,4 y 2 veces respectivamente, de los niveles de RhoB en BAEC, aunque los niveles de proteínas ubiquitinadas aumentaron 2 y 5 veces respectivamente en presencia de estos inhibidores (fig. 21). El tratamiento con Sv no tuvo efecto sobre la presencia de proteínas ubiquitinadas, lo cual indica que no interfiere con la actividad del proteasoma. El co-tratamiento de BAEC con Sv y el inhibidor que más aumento de proteínas ubiquitinadas provocó, el Z-LLL-CHO, ejerció un efecto potenciador con respecto al aumento de los niveles de RhoB provocado por dichos compuestos por separado, lo que podría indicar la existencia de vías independientes de degradación de RhoB. Por otra parte, el ALLM y la leupeptina, que inhiben una gama amplia de proteasas, provocaron mayor aumento en los niveles de RhoB. En particular, el aumento más intenso (de 3,7 veces) se observó tras el tratamiento con leupeptina, que actúa sobre proteasas de diversa procedencia y modo de acción. La leupeptina también provocó aumento de 1,7 veces del nivel de las proteínas ubiquitinadas, lo cual indica la

Inhibidor	Dianas
Lactacistina	Proteasoma 20S, subunidad X
MG-132 (Z-LLL-CHO)	Proteasoma 26S y cisteína proteasas como calpaínas y catepsinas.
Inhibidor de Calpaína II (ALLM)	Calpaínas, catepsinas B y L
Leupeptina	Proteasas de serina y de cisteína: tripsina, plasmina, catepsina B, calpaína

Tabla 3: Los inhibidores de proteasas utilizados y su especificidad

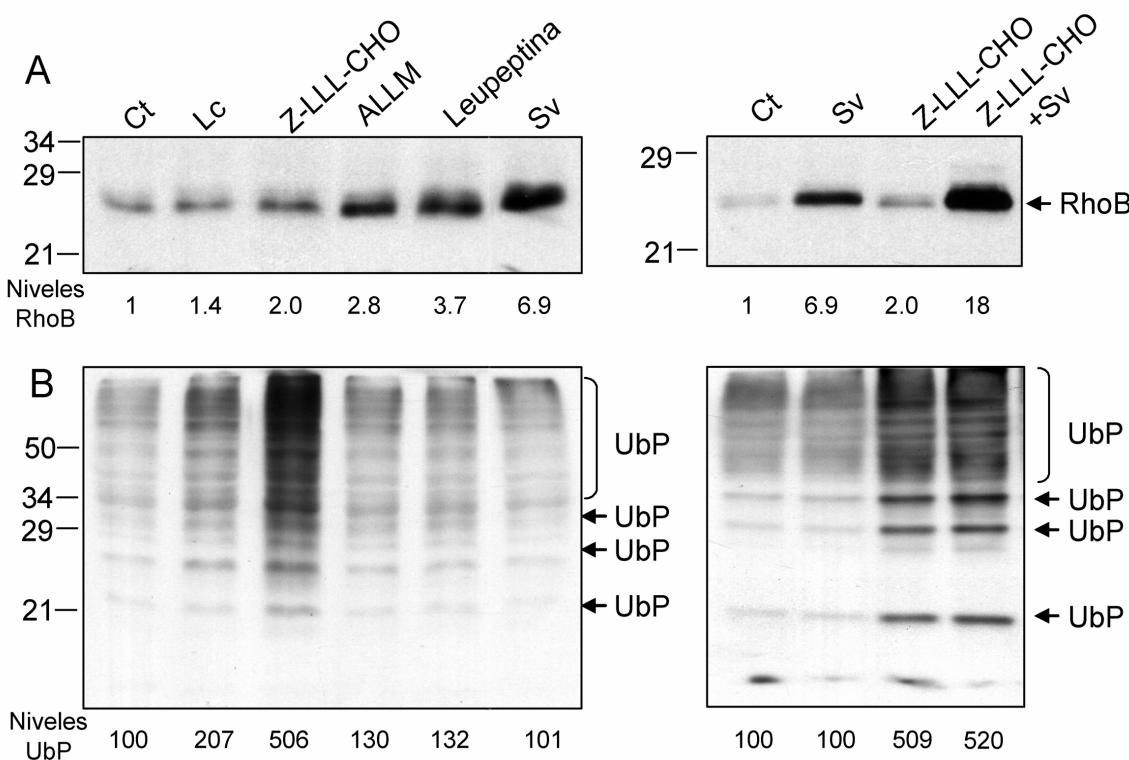


Figura 21: Efectos de diversos inhibidores de proteasas sobre los niveles de RhoB.

Células BAEC quiescentes se trataron durante 24 h en medio mínimo con DMSO (C_t), lactacistina (Lc) 10 μ M, Z-LLL-CHO 0,05 μ M, leupeptina 50 μ g/ml, simvastatina (Sv) 10 μ M, o con una combinación de Z-LLL-CHO y Sv. (A) Inmunoblot de RhoB. (B) Inmunoblot de proteínas ubiquitinadas (UbP) con anticuerpo anti-ubiquitina.

diversidad de dianas de este compuesto. Estas observaciones indican que el proteasoma no es la vía principal para la degradación de RhoB en estas células y apuntan hacia la potencial implicación de otras proteasas celulares. Sin embargo, la escasa especificidad de la mayor parte de los inhibidores de proteasas disponibles, hace que su utilidad como herramientas para la identificación del sistema proteolítico responsable de la degradación de RhoB sea limitada.

Estudio de la relación entre el proceso de endocitosis y la degradación de RhoB.

En diversos estudios se ha observado una localización endosomal de RhoB (Adamson *et al.*, 1992b; Wherlock *et al.*, 2004). En dichos estudios se menciona la desaparición de RhoB durante la maduración de los endosomas tardíos o cuerpos multivesiculares para convertirse en lisosomas. Aunque hasta el momento no está explorado el mecanismo de esta desaparición, los endosomas y sobre todo los lisosomas contienen numerosas proteasas encargadas de degradar los polipéptidos de

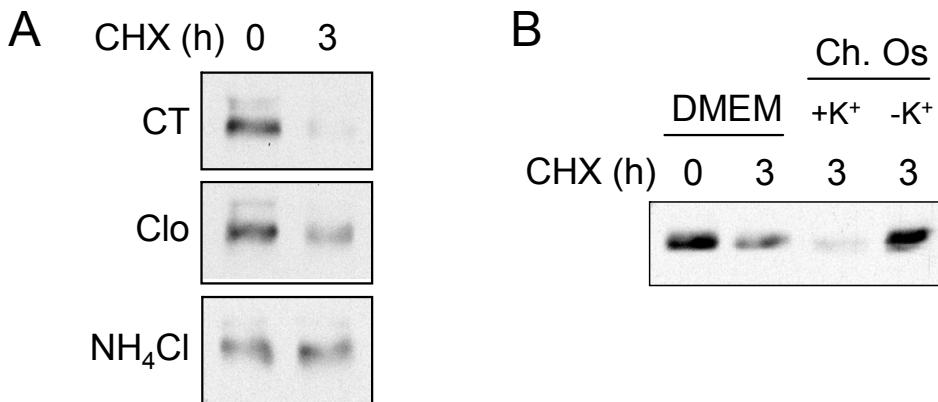


Fig. 22: La inhibición del proceso de endocitosis estabiliza RhoB. (A) Las BAEC se trataron en medio mínimo durante 3,5 h con vehículo, 10 μ M cloroquina (Clo), o 30 mM NH₄Cl, en presencia de 20 μ g/ml cicloheximida (CHX) durante las tres últimas horas. (B) Las BAEC se sometieron a choque osmótico (Ch. Os) durante 5 min y a continuación se incubaron durante 3 h en medio mínimo (DMEM) o en medio isotónico con (+ K⁺) o sin (- K⁺) potasio, en presencia de 20 μ g/ml CHX. En los dos casos los niveles de RhoB se estimaron mediante inmunoblot.

su entorno (revisado en Pillay *et al.*, 2002). Esto podría sugerir otra posible vía de degradación de la proteína RhoB. Tanto la endocitosis como el tráfico y maduración/fusión de los endosomas a lisosomas es un proceso mediado por sistemas multiproteicos, dependientes de K⁺ (revisado en Clague, 1998; Miaczynska y Zerial, 2002). Se ha descrito que la proteína RhoB está implicada en estos procesos, aunque los mecanismos son todavía desconocidos (Ellis y Mellor, 2000). La fusión de endosomas entre sí y entre endosomas y lisosomas, así como su acidificación, son pasos esenciales para completar su función y su reciclamiento hacia la membrana plasmática o hacia la red de Golgi. La inhibición de la acidificación de los lisosomas por bases débiles como la cloroquina y el cloruro de amonio (Dijkstra *et al.*, 1984, Gekle *et al.*, 1995), o la inhibición de la endocitosis mediada por clatrina mediante depleción de potasio (Hansen *et al.*, 1993), alteran el tráfico endo-lisosomal, la fusión de vesículas y la proteólisis lisosomal. Para inducir los efectos mencionados hemos utilizado cloroquina, NH₄Cl o un protocolo de depleción de K⁺, en combinación con CHX, y hemos evaluado la repercusión de estos tratamientos sobre los niveles de la proteína RhoB. Los tres tratamientos, en diferente grado cada uno, provocaron una inhibición de la degradación de RhoB (fig. 22), lo que apuntaría a la implicación de la vía endo-lisosomal en la degradación de RhoB.

En resumen, en este apartado hemos identificado nuevas implicaciones de la modificación postraduccional de proteínas por isoprenilación y palmitoilación. En el

caso concreto de RhoB hemos observado que estas modificaciones son necesarias para la correcta localización de la proteína y para su degradación, fenómenos que parecen estar vinculados, lo que sugiere que la degradación de RhoB probablemente ocurre en endosomas y lisosomas.

2. Modificación de proteínas por el lípido electrófilo 15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J₂

Las proteínas pueden incorporar estructuras lipídicas mediante la modificación no enzimática de ciertos aminoácidos por lípidos electrófilos. Dichos compuestos, generados en su mayoría por oxidación de otros lípidos, poseen la capacidad de reaccionar con grupos tioles o con grupos amino de proteínas y conferir así nuevas propiedades o alterar la estructura y función de las proteínas diana. Los prostanoïdes con estructura ciclopentenona reaccionan con grupos tioles de cisteínas. En este apartado hemos usado el lípido 15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J₂ (15d-PGJ₂) como compuesto modelo para estudiar la modificación de proteínas por prostanoïdes electrófilos, con el objetivo de desarrollar un método para la identificación de dianas potenciales de esta modificación y estudiar sus efectos sobre una de las dianas identificadas, para lo que hemos utilizado un análogo biotinilado de la 15d-PGJ₂ disponible en nuestro laboratorio (Cernuda-Morollón *et al.*, 2001).

Caracterización de los efectos biológicos de un análogo biotinilado de la 15d-PGJ₂ en relación con el compuesto original.

El análogo biotinilado de la 15d-PGJ₂, la 15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J₂-Biotinimida (fig. 23), se generó en nuestro laboratorio con el fin de monitorizar la unión de prostaglandinas ciclopentenonas a proteínas en células intactas. La adición de una molécula de biotina por medio de un espaciador de 5 átomos de carbono, se realizó mediante la amidación del grupo carboxilo del lípido, el grupo más

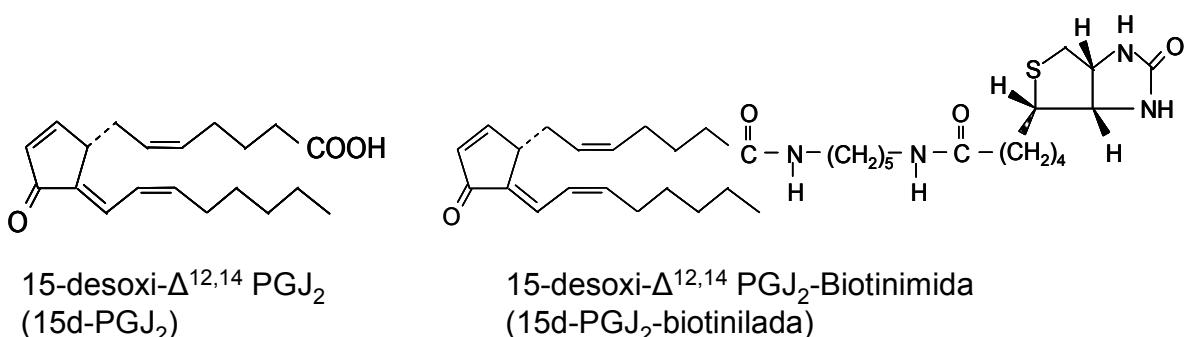


Figura 23: Estructura de la 15d-PGJ₂ y de su derivado biotinilado.

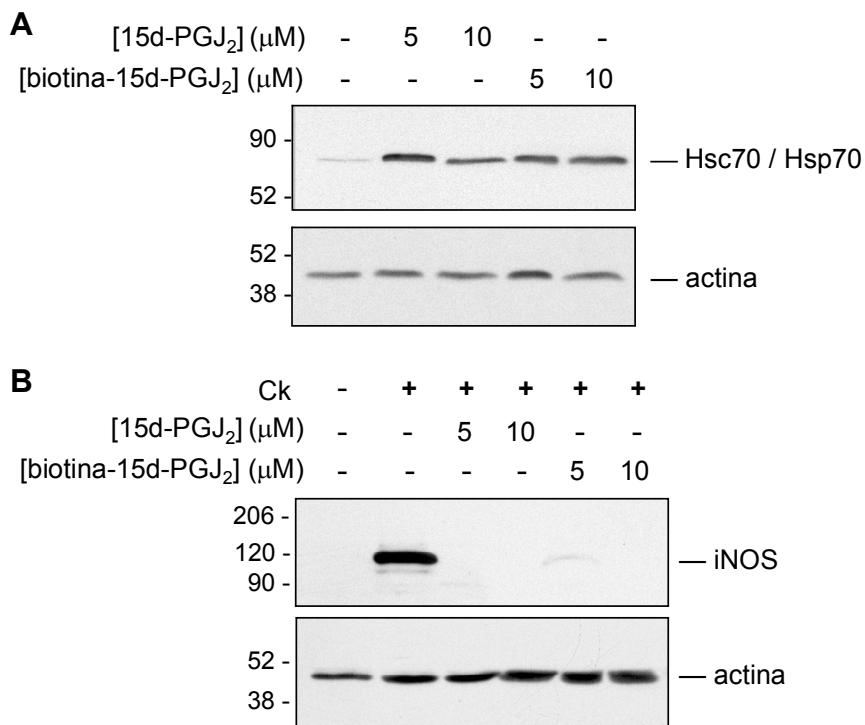


Figura 24: Efectos biológicos de la 15d-PGJ₂ biotinilada. (A) Las RMC se trataron durante 16 h con las concentraciones indicadas de 15d-PGJ₂ o 15d-PGJ₂ biotinilada y los niveles de las proteínas de choque térmico inducible y constitutiva, Hsc70 y Hsp70 se estimaron por inmunoblot. (B) Las RMC se pretrataron en ausencia o presencia de las concentraciones indicadas de 15d-PGJ₂ o 15d-PGJ₂ biotinilada durante 2 h. A continuación las células se estimularon con citoquinas (Ck: TNF-α, 37 ng/ml y IL-1β, 3 ng/ml), según se indica, durante 16 h y los niveles de la iNOS se monitorizaron mediante inmunoblot. Tanto en (A) como en (B) los niveles de carga se comprobaron con inmunoblot para β-actina.

alejado de los carbonos electrófilos (Cernuda-Morollón *et al.*, 2001). Este compuesto resultó ser una herramienta útil para el aislamiento de las proteínas modificadas en células. En varias proteínas aisladas se ha comprobado que este compuesto se une a los mismos residuos que la 15d-PGJ₂ (Cernuda-Morollón *et al.*, 2001; Oliva *et al.*, 2003; Pérez-Sala *et al.*, 2002). Por estas razones decidimos utilizarlo como herramienta para la identificación de nuevas dianas de la 15d-PGJ₂. En primer lugar comprobamos la capacidad de la 15d-PGJ₂ biotinilada de reproducir algunos de los efectos biológicos de la 15d-PGJ₂ relacionados con la modificación de cisteínas de proteínas. Así, el tratamiento de células mesangiales de rata (RMC) con 15d-PGJ₂ biotinilada, fue capaz de inducir la expresión de la chaperona Hsp70 de manera análoga a la del compuesto original (fig. 24)(Zhang *et al.*, 2004). La modificación de tiolas celulares es un proceso importante en la inhibición de la inducción de la proteína iNOS que ejerce la 15d-PGJ₂ en RMC (Sánchez-Gómez *et al.*, 2004). Comprobamos que la 15d-PGJ₂ biotinilada inhibió la inducción de la proteína iNOS en

RMC activadas por citoquinas con una potencia similar a la de la 15d-PGJ₂ (fig. 24). Estas observaciones indican que la 15d-PGJ₂ biotinilada es una herramienta válida para el estudio de algunos de los efectos biológicos y las posibles dianas de su compuesto original.

Caracterización de la unión de la 15d-PGJ₂ biotinilada a proteínas en células intactas.

Hemos aprovechado la propiedad de la biotina para unirse con alta afinidad a proteínas como la avidina y la estreptavidina para detectar las proteínas modificadas por 15d-PGJ₂ biotinilada mediante su análisis por SDS-PAGE, transferencia a membranas de PVDF, incubación con estreptavidina-peroxidasa y visualización por quimioluminiscencia. En adelante nos referiremos a este conjunto de procedimientos con el término Strep Blot (SB). De este modo, hemos confirmado que el enlace entre la prostaglandina y las cisteínas (adición de Michael) es estable en las condiciones de análisis, resistente a altas concentraciones de antioxidantes, e inestable

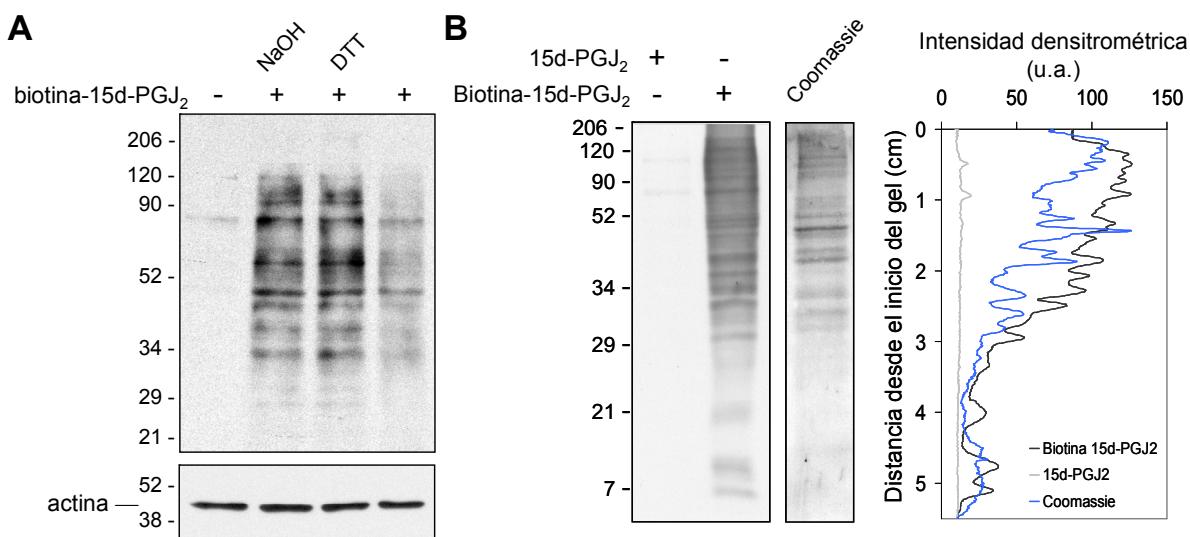


Figura 25: Unión de 15d-PGJ₂ biotinilada a proteínas celulares. (A) Extractos de RMC tratadas durante 2 h con 10 μ M 15d-PGJ₂ biotinilada o con vehículo (DMSO), se incubaron con 10 mM DTT, 0,1 N NaOH o la correspondiente cantidad de agua durante 30 min a temperatura ambiente. Después de desalación por filtración en gel las proteínas se analizaron por SDS-PAGE y las proteínas modificadas se visualizaron por SB: transferencia a membrana de PVDF, hibridación con estreptavidina-peroxidasa y quimioluminiscencia. El inmunoblot para actina se usó como control de carga. (B) Las RMC se trataron con 10 μ M 15d-PGJ₂ o 10 μ M 15d-PGJ₂ biotinilada durante 2 h en medio mínimo. Cantidad iguales de los lisados correspondientes se analizaron por SDS-PAGE por duplicado. Con uno de los duplicados de cada muestra se hizo SB, como en (A), mostrado en el panel de la izquierda, y el otro el gel se tiñó con azul de Coomassie para visualizar la proteína total (panel de la derecha). Para esto último se muestra solamente la calle de 15d-PGJ₂ biotinilada ya que no hubo diferencias entre los dos tratamientos. El gráfico muestra el análisis densitométrico de los patrones obtenidos. (u.a.: unidades arbitrarias)

en condiciones alcalinas (fig. 25A). Comparando el patrón generado por la 15d-PGJ₂ biotinilada con el generado por la tinción de proteína total, pudimos observar que la 15d-PGJ₂ biotinilada modifica selectivamente un conjunto definido aunque amplio de proteínas en nuestras condiciones experimentales (fig. 25B).

Diseño y desarrollo experimental para la identificación de proteínas diana de la 15d-PGJ₂.

Teniendo en cuenta los resultados arriba mencionados, hemos diseñado un protocolo experimental para la identificación y confirmación de posibles dianas de la

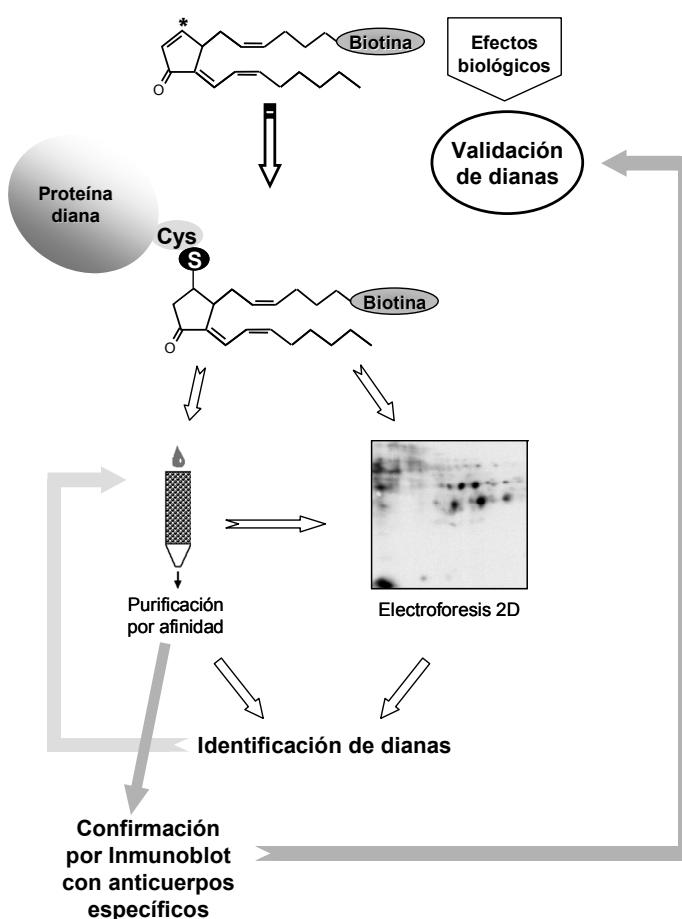


Figura 26: Diagrama del flujo del desarrollo experimental para la identificación de dianas de la 15d-PGJ₂ biotinilada. Las células se tratan con la prostaglandina biotinilada, la cual puede provocar ciertos efectos dependientes e independientes de la modificación de proteínas. Las proteínas modificadas se pueden analizar por electroforesis 2D, aislar, digerir con proteasas e identificar por huella peptídica generada por espectrometría de masas. Alternativamente las proteínas diana se pueden purificar por afinidad en resina de avidina e identificar analizando los péptidos resultantes de digestión proteolítica por cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas-masas que los secuenciaría. Una vez identificadas, las posibles dianas se confirmarían mediante purificación por afinidad de biotina/avidina e inmunoblot con anticuerpos específicos contra las proteínas de interés. También se podría realizar inmunoprecipitación con anticuerpos específicos y realizar SB con estreptavidina peroxidasa. Finalmente, se relacionaría la modificación de estas proteínas con efectos biológicos de la prostaglandina.

15d-PGJ₂ (Fig. 26).

Para este trabajo decidimos realizar un análisis mediante electroforesis en dos dimensiones (2D: isoelectroenfoque y SDS-PAGE) de proteínas de lisados de RMC tratadas con 15d-PGJ₂ biotinilada, por duplicado. Uno de los geles resultantes (gel 1) se sometió a tinción de proteína total y el gel duplicado (gel 2) se procesó mediante transferencia a membranas de PVDF y SB. La identificación de las “manchas” de proteínas modificadas se realizó por comparación de las dos

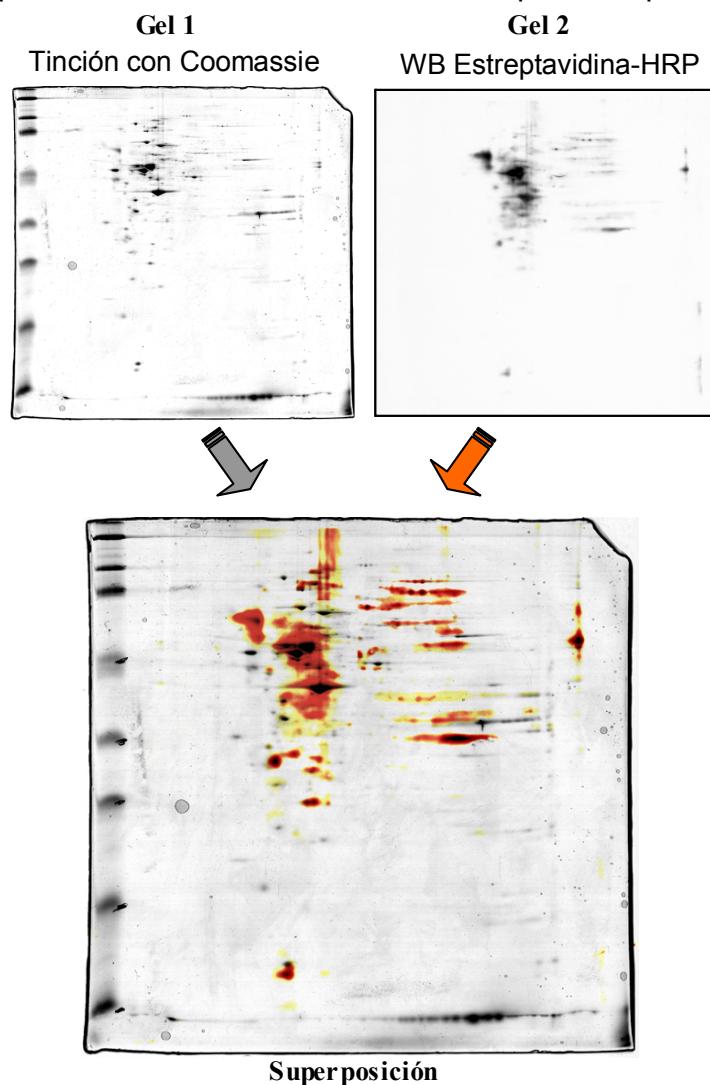


Figura 27: Análisis por electroforesis 2D de proteínas modificadas por 15d-PGJ₂ biotinilada. Lisados de RMC tratadas durante 2 horas en medio mínimo con 5 μ M de 15d-PGJ₂ biotinilada se analizaron por electroforesis 2D por duplicado. Uno de los duplicados se tiñó con Coomassie coloidal mientras el otro se transfirió a membrana de PVDF para realizar SB con estreptavidina-peroxidasa. Una vez obtenido un amplio rango de exposiciones en películas, la membrana se tiñó con Coomassie. Usando la membrana teñida como referencia, se procedió al solapamiento informático (usando Adobe Photoshop) de las imágenes del gel (en escala de grises) y de las exposiciones de quimioluminiscencia (convertidas en tonalidades de amarillo hasta rojo oscuro, según la intensidad densitrométrica y con 80% de opacidad), mediante transformación de escala y alineación de “manchas” reconocibles. Así, en la figura resultante, de dos capas, se puede relacionar la abundancia de la proteína que forma una “mancha” con la intensidad de su marcaje por 15d-PGJ₂ biotinilada y elegir “manchas” con una relación (intensidad de marcaje)/(abundancia) alta.

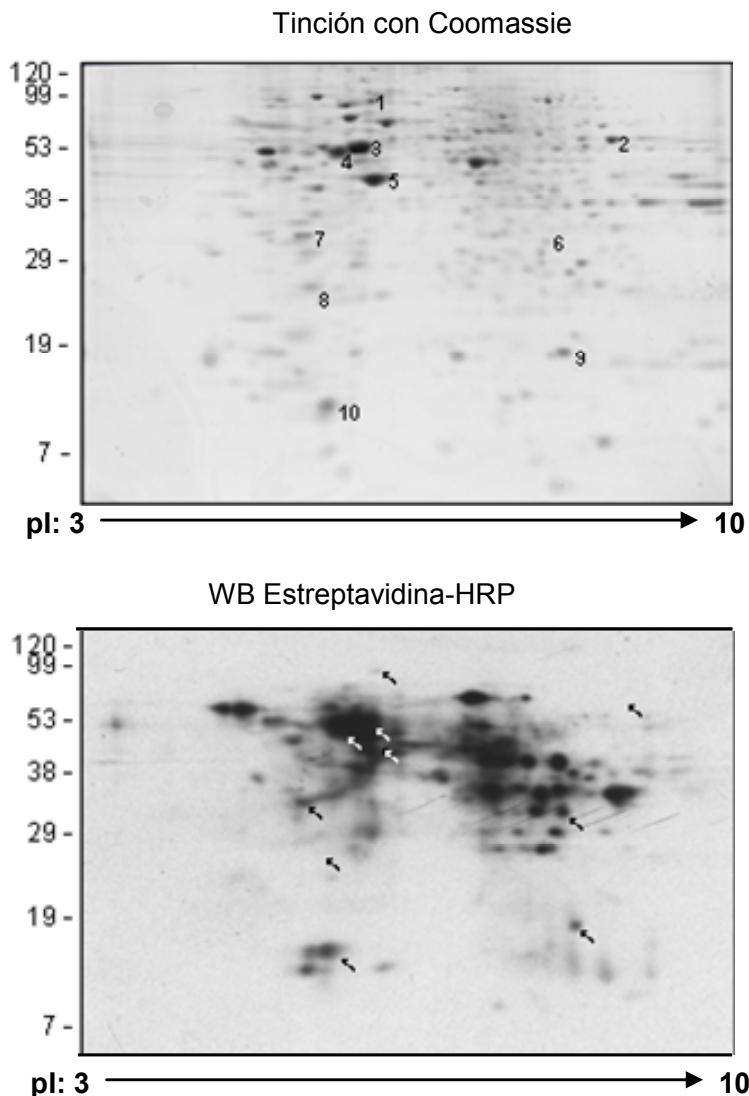
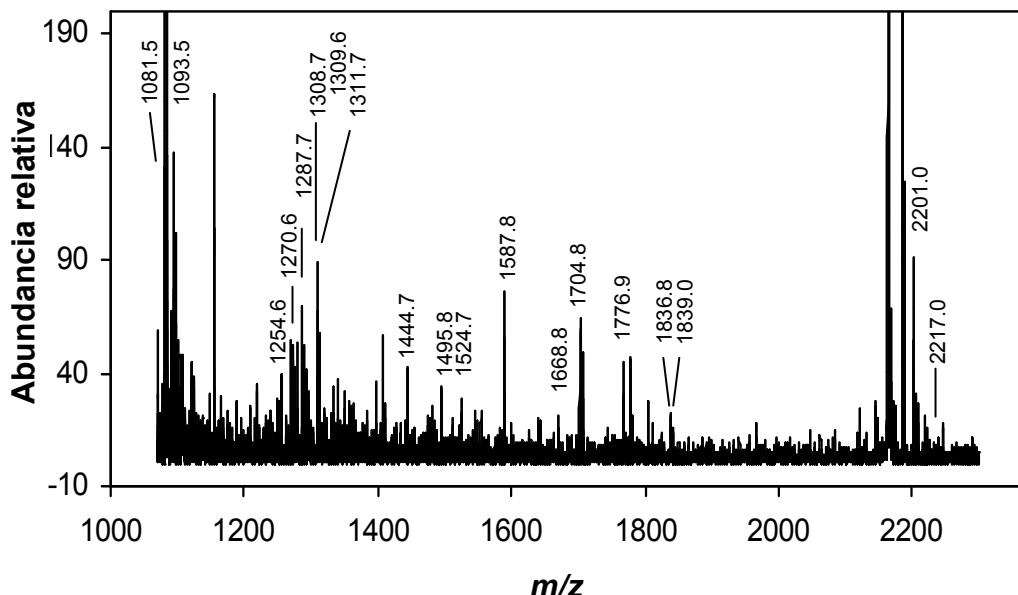


Figura 28: Escisión de “manchas” candidatas para la modificación por 15d-PGJ₂. Siguiendo la metodología descrita en la figura 26, se han identificado “manchas” del gel teñido con Coomassie que corresponderían a alta intensidad densitométrica en las exposiciones de quimioluminiscencia. De dichas “manchas”, se eligieron varias con suficiente cantidad de proteína para su análisis por espectrometría de masas. También se escogieron dos “manchas” negativas en marcaje para usar como control negativo (“manchas” 2 y 8). Una vez extraídas las “manchas”, el gel se destiñó, se transfirió a PVDF y se realizó SB para comprobar la ausencia o reducción de señal en los sitios de escisión (no mostrado).

tinciones (fig. 27).

Después de la escisión de las porciones del gel 1 que se correspondían con las “manchas” en el SB del gel 2 (fig. 28), éstas se validaron como positivas transfiriendo el gel 1 a membrana de PVDF y haciendo SB con estreptavidina-peroxidasa para comprobar que la “mancha” o parte de ella había desaparecido.

Una vez digeridas con tripsina las proteínas contenidas en las porciones del gel seleccionadas y confirmadas como positivas, se identificaron la huellas peptídicas de las proteínas diana por espectrometría de masas, mediante MALDI-TOF, de la cual un espectro típico se muestra en la figura 29. En algunos casos se procedió al análisis de la secuencia de uno de los péptidos mediante su fragmentación mediante espectrometría de masas-masas, MALDI-TOF-TOF. La figura 30 muestra un ejemplo de los espectros resultantes de dicho análisis. La tabla 4 muestra un resumen de los datos de las proteínas identificadas.



<i>m/z</i> experimental	<i>m/z</i> teórico	Posición	Secuencia
1081.5	1081.50	314-321	QESNEYRR
1093.5	1093.53	295-304	FADLSEAANR
1254.6	1254.56	146-155	LGDLYEEEMR
1270.6	1270.56	146-155	LGDLYEEEMR (MSO)
1287.7	1287.67	160-170	QVDQLTNDKAR
1308.7	1308.65	293-304	SKFADLSEAANR
1309.6	1309.60	283-292	NLQEAEEWYK
1311.7	1311.66	391-401	MALDIEIATYR (MSO)
1444.7	1444.71	51-64	SLYSSSPGGAYVTR
1495.8	1495.79	37-50	TYSLGSALRPSTSR
1524.7	1524.73	283-294	NLQEAEEWYKSK
1587.8	1587.80	101-113	TNEKVELQELNDR
1668.8	1668.79	146-158	LGDLYEEEMRELR (MSO)
1704.8	1704.82	171-184	VEVERDNLAEDIMR (MSO)
1776.9	1776.86	295-310	FADLSEAANRNNDALR
1836.8	1836.80	451-465	DGQVINETSQHHDDLE
1839.0	1838.96	425-440	ETNLESLPLVDTHSKR
2201.0	2200.98	346-364	EMEENFALEAANYQDTIGR
2217.0	2216.98	346-364	EMEENFALEAANYQDTIGR (MSO)

Figura 29: Identificación de las proteínas mediante espectrometría de masas. Espectro típico de análisis por MALDI-TOF de los péptidos resultantes de digestión con tripsina de la proteína extraída de la “mancha” número 3. Después de búsqueda en bases de datos (MASCOT) usando la “huella peptídica” resultante, se ha generado la presente lista de masas monoisotópicas experimentales y teóricas de los péptidos identificados, es decir su *m/z* (masa/carga) cuando la carga es igual a 1. Además, se muestra su posición en la proteína y su secuencia. La huella peptídica identificada corresponde a la de la proteína vimentina. MSO: masa compatible con la oxidación de metionina.

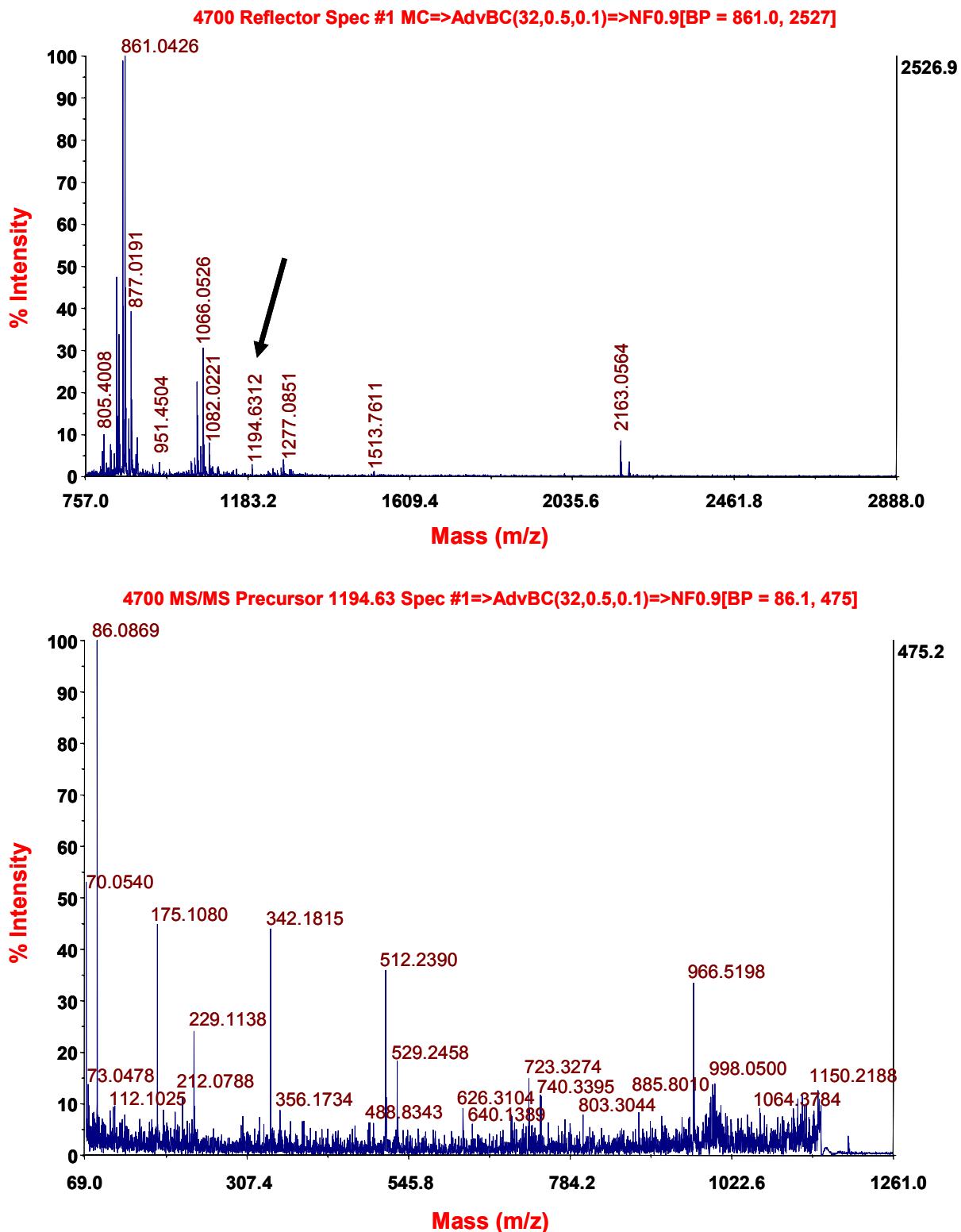


Figura 30: Identificación de proteínas por secuenciación por espectrometría de masas-masas. Espectro típico de análisis por MALDI-TOF de los péptidos resultantes de digestión con tripsina de la proteína extraída de la “mancha” número 1. Se eligió un péptido (indicado por la flecha) y se procedió a su secuenciación mediante fragmentación por MALDI-TOF-TOF. El análisis del espectro generado (abajo) mediante el uso de algoritmos específicos resulta en la identificación de la secuencia de dicho péptido. Combinando la huella peptídica obtenida anteriormente y la secuencia del péptido se realizaron búsquedas en las bases de datos que resultaron en la identificación de la proteína Hsp90. Se muestran los resultados directos del aparato; la secuencia del péptido secuenciado de esta manera fue: IDIIPNPQER.

Resultados

Nº de mancha	Proteína	Biotina	Nº de acceso de NCBI	Masa Molecular	pl teórico	Nº de péptidos identificados	Proporción de la secuencia identificada (%)	Péptido identificado por ms/ms
1	Hsp90	+	P34058	83475	5.06	9	9	1194.67
2	Piruvato quinasa M2	-	A26186	58183	7.40	15	27	1462.9
3	Vimentina	+	P31000	53626	5.06	51	78	-
4	Tubulina	+	A25113	50361	4.79	36	62	-
5	Actina	+	NP112406	41736	5.26	12	38	-
6	Metiltioadenosina fosforilasa	+	BAB23788	31612	6.71	11	44	-
7	Tropomiosina	+	S34124	29245	4.75	8	34	-
8	Factor liberador de Histamina dependiente de IgE	-	S00775	19564	4.76	7	26	1213.6
9	Nucleosido difosfato quinasa	+	A38369	17386	6.92	8	63	1175.6
10	Galectina-1	+	P11762	15058	5.14	7	48	-

Tabla 4: Lista de las “manchas” escindidas y de las respectivas proteínas identificadas.

Para confirmar la unión de la 15d-PGJ₂ biotinilada a las proteínas identificadas mediante el abordaje anterior comprobamos si se unían a una resina de neutravidina-agarosa. Como se observa en la figura 31, tanto la vimentina, que parece ser la diana mayoritaria, como la actina, tubulina y Hsp90, resultaron retenidas de forma selectiva cuando las células habían sido tratadas con 15d-PGJ₂ biotinilada, según se comprobó mediante análisis de la fracción retenida por SDS-PAGE e inmunoblot con anticuerpos específicos para las proteínas en cuestión, pero no se unieron a la columna de afinidad cuando las células habían sido tratadas con 15d-PGJ₂. Como control negativo de este ensayo hemos confirmado la ausencia de unión a la

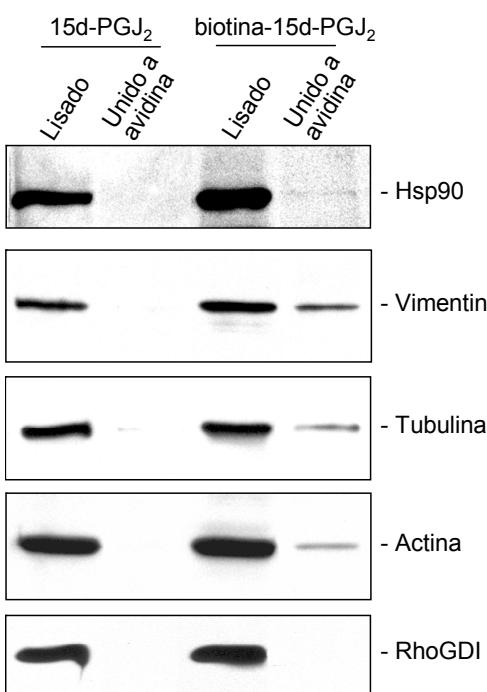


Figura 31: Confirmación de la modificación de algunas de las proteínas identificadas por espectrometría de masas. Las RMC tratadas con 5 μM de 15d-PGJ₂ o 15d-PGJ₂ biotinilada durante 2 h en medio mínimo, se lisaron en el tampón adecuado y las proteínas extraídas se purificaron por unión a avidina. Los niveles de las proteínas de interés presentes en los lisados totales y en las fracciones unidas a avidina se analizaron mediante inmunoblot con anticuerpos específicos. Se muestra inmunoblot para la proteína RhoGDI, como control de proteína que contiene una cisteína pero no se modifica.

resina de neutravidina de la proteína RhoGDI, proteína citoplásmica abundante, para la cual no se han descrito modificaciones por oxidación aunque contiene una cisteína y que habíamos comprobado con anterioridad que no se modifica por 15d-PGJ₂. Estos resultados indican que las proteínas identificadas son claros candidatos para la modificación por prostaglandinas ciclopentenonas sugiriendo que algunos efectos de estos lípidos pueden venir mediados por las dianas identificadas.

Efectos del tratamiento con 15d-PGJ₂ sobre las dianas identificadas.

Entre las dianas de la 15d-PGJ₂ biotinilada identificadas se encuentran tres proteínas del citoesqueleto: actina, tubulina y vimentina, cada una de las cuales es la proteína principal de los microfilamentos, microtúbulos y filamentos intermedios de las RMC, respectivamente. Ya que la función principal de estas proteínas es la de constituir de manera dinámica dichas estructuras, decidimos estudiar los posibles efectos del tratamiento con 15d-PGJ₂ sobre la disposición de las distintas estructuras del citoesqueleto mediante microscopía de fluorescencia. El tratamiento con 15d-PGJ₂ no produjo cambios detectables en los filamentos de actina en las condiciones empleadas. Por el contrario, la 15d-PGJ₂ indujo alteraciones apreciables en la red de microtúbulos, consistentes en una disminución de la densidad de estas estructuras. La alteración más llamativa afectó el citoesqueleto de vimentina (fig. 32). En este caso, la red de los filamentos intermedios, normalmente distribuida de manera homogénea en todo el citoplasma, presentó un colapso de estos filamentos alrededor del núcleo de las células tratadas con 15d-PGJ₂. Aunque los filamentos de vimentina tienen un papel estructural y de resistencia mecánica, dicho colapso ocurrió de manera significativa en la mayoría de las células, sin provocar grandes cambios en la extensión de las células, como se pudo contrastar mediante la tinción de la proteína citoplásmica RhoGDI.

Las alteraciones observadas, tanto en el caso de los microfilamentos como en el de los microtúbulos, no se debieron a cambios de expresión de las respectivas proteínas vimentina y tubulina (fig. 33A). Por otra parte estos efectos se pudieron reproducir con el tratamiento de RMC con 15d-PGJ₂ biotinilada (fig. 33C). Para investigar la posibilidad de que el efecto de la 15d-PGJ₂ se debiera a su capacidad de unirse y activar el receptor nuclear PPAR γ , utilizamos un análogo de la 15d-PGJ₂, la 9,10-dihidro-15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ (fig. 33B), que es un agonista de PPAR

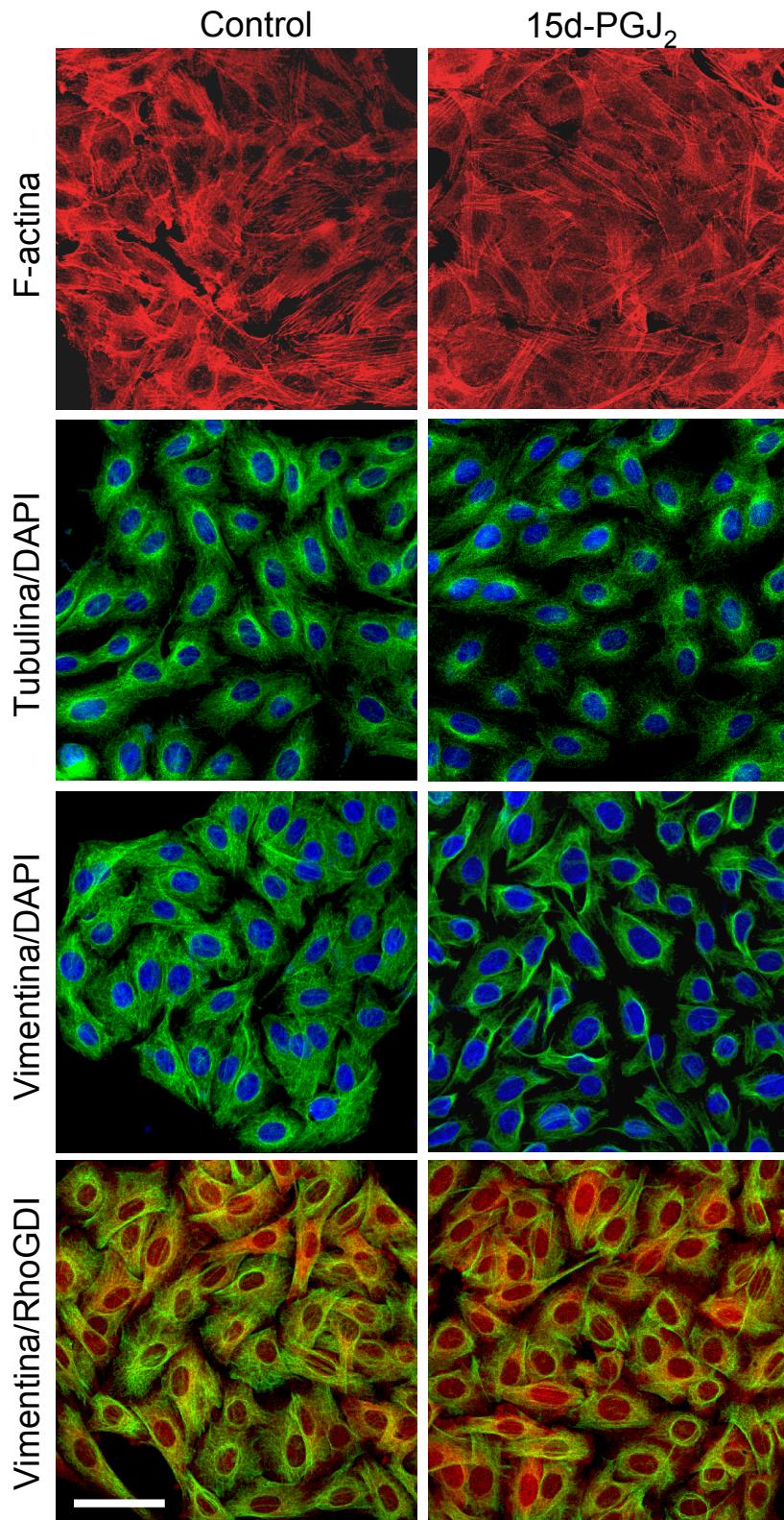
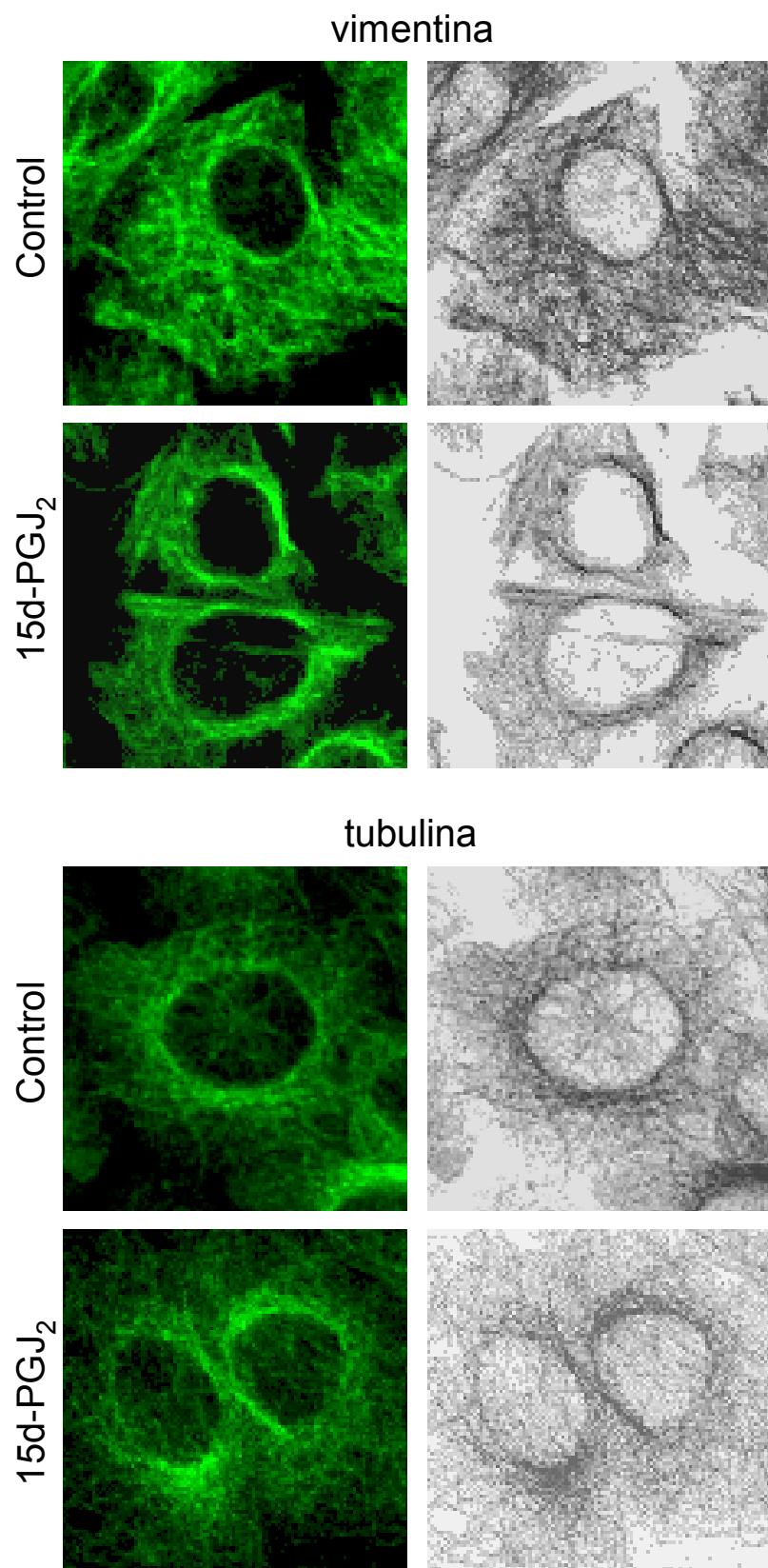


Figura 32: Efecto de la 15d-PGJ₂ sobre el citoesqueleto de RMC. (A) Imágenes de microscopía confocal (proyecciones máximas de las series de las secciones de las células tomadas a intervalos de 0,5 μm en el eje z) de RMC tratadas durante 2 h con 5 μM 15d-PGJ₂ o vehículo en medio mínimo. La tinción de filamentos de actina con faloidina-alexia fluor 568 se muestra en rojo. La tinción de vimentina y tubulina con anticuerpos específicos y secundario conjugado con Alexa fluor 488 aparece en verde, en combinación con tinción del núcleo (DAPI, azul) o citoplasma (anti-RhoGDI con secundario anti-conejo-Texas Red, que se muestra en rojo). Barra: 47,62 μm.
 (B) Ver página siguiente.



(B) Imágenes ampliadas (4x) de RMC tratadas como en (A). Para poder apreciar mejor los cambios en la distribución del citoesqueleto se muestran las mismas imágenes modificadas en Adobe Photoshop de la siguiente manera: Inversión del color; Filtro enfocar; Conversión a escala de grises; ajustes de brillo y contraste.

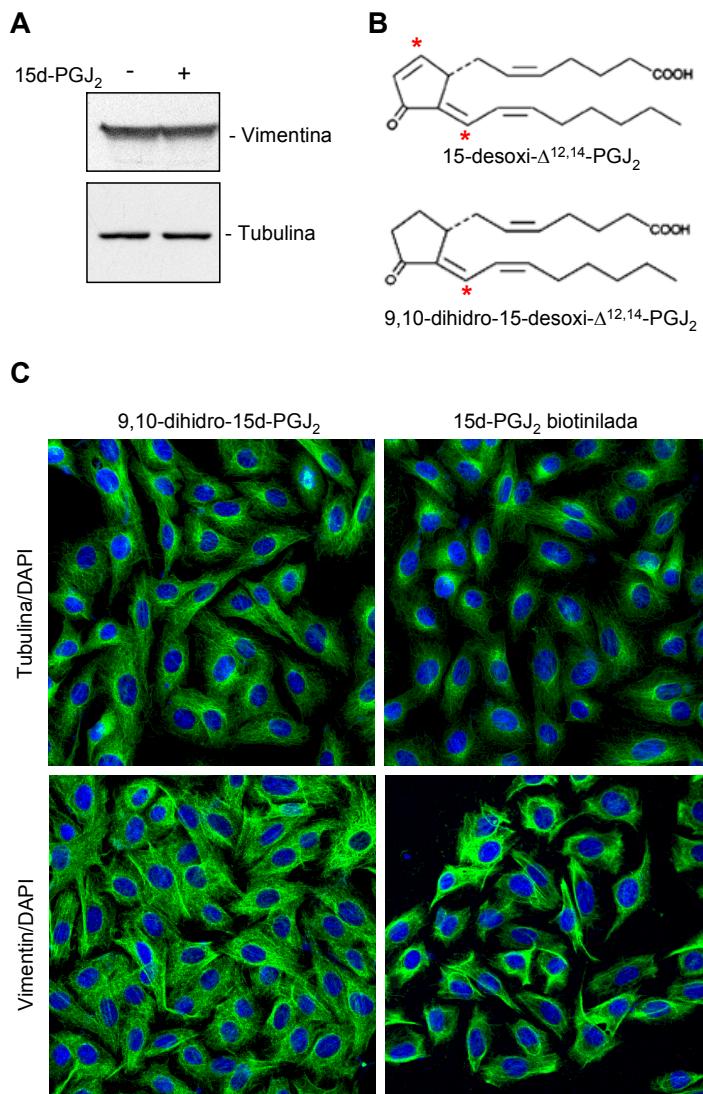


Figura 33: Efecto de derivados o análogos de la 15d-PGJ₂ sobre el citoesqueleto de vimentina y de tubulina de RMC. (A) Inmunoblot de vimentina y tubulina de RMC tratadas como en la figura 32. (B) Estructura de las 15d-PGJ₂ y 9,10-dihidro-15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ (9,10-dihidro-15d-PGJ₂). Con asteriscos están marcados los carbonos electrófilos de estos compuestos. (C) Imágenes de microscopía de fluorescencia de RMC tratadas durante 2 h con 5 μ M 9,10-dihidro-15d-PGJ₂ o 15d-PGJ₂ biotinilada en medio mínimo. Se muestran tinciones de las mencionadas proteínas del citoesqueleto (verde), en combinación, con tinción del núcleo (DAPI, azul). Se muestran las proyecciones máximas como en la fig. 32. En células tratadas con vehículo y 15d-PGJ₂ se pudieron observar los mismos patrones de distribución que en los respectivos tratamientos en la figura 32, por lo que no se muestran aquí.

con potencia similar a la de la 15d-PGJ₂, pero con una capacidad de modificar proteínas muy baja debido a la ausencia del doble enlace en el anillo de ciclopentano (Sánchez-Gómez *et al.*, 2004). Este análogo no indujo alteraciones en la estructura del citoesqueleto de vimentina ni de tubulina (fig. 33C). Esto último indicaría que el efecto del tratamiento con la 15d-PGJ₂ sobre el citoesqueleto no está relacionado con su capacidad de activar PPAR sino que probablemente es consecuencia de la modificación de proteínas por dicho compuesto.

El colapso de los filamentos intermedios provocado por la 15d-PGJ₂ depende de la presencia de la cisteína 328 de la vimentina.

Para profundizar en el efecto del tratamiento con 15d-PGJ₂ sobre el citoesqueleto, nos hemos centrado en la modificación de la vimentina, ya que los filamentos de vimentina son las estructuras que sufren un cambio más drástico. El efecto de la 15d-PGJ₂ sobre el citoesqueleto de vimentina podría ser debido a su capacidad de provocar estrés oxidativo en células (Kondo *et al.*, 2001), ya que se ha sugerido que el colapso de los filamentos de vimentina podría estar relacionado con su oxidación (Rogers *et al.*, 1989). Para explorar esta posibilidad hemos estudiado si el tratamiento de las células con agua oxigenada reproduce los efectos de la 15d-PGJ₂ sobre la distribución de los filamentos intermedios. Como se puede observar en la figura 34, el tratamiento con H₂O₂ no mimetizó el efecto de la 15d-PGJ₂. El

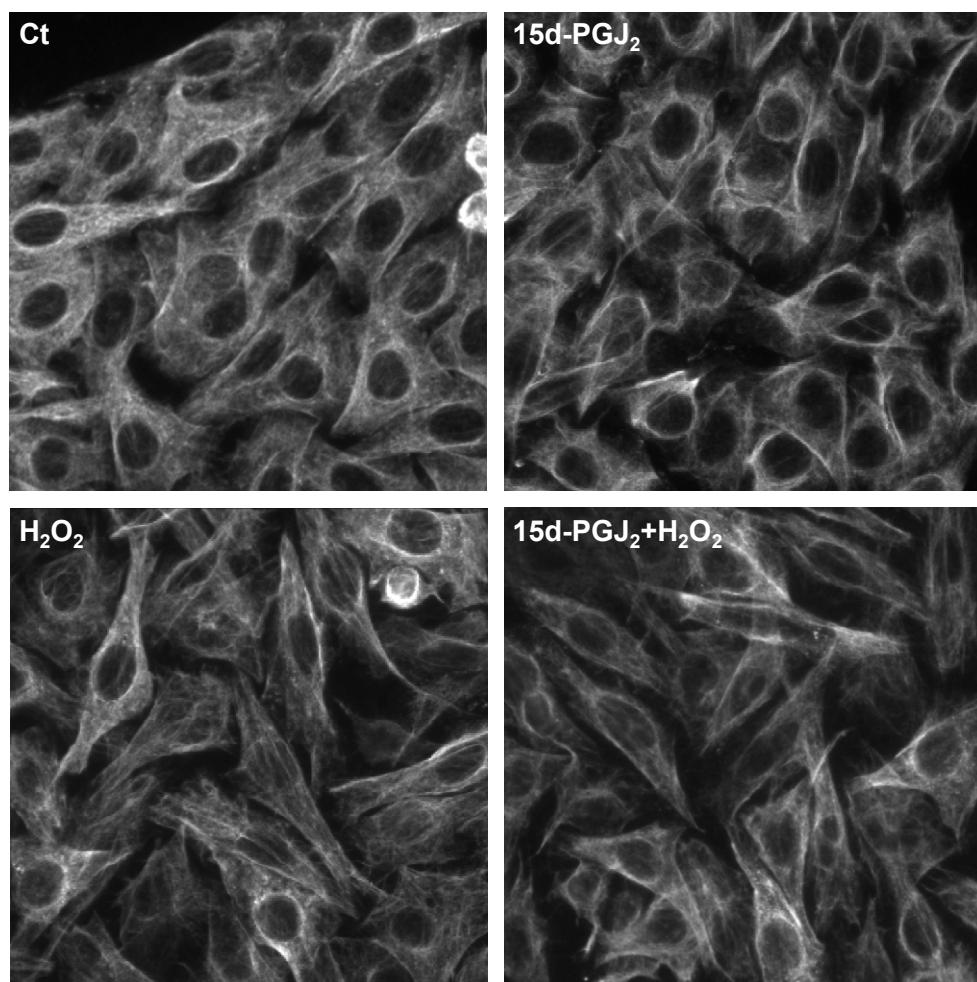


Figura 34: El efecto de la 15d-PGJ₂ sobre la vimentina no se debe sólo a la producción de estrés oxidativo. Imágenes de microscopía de fluorescencia de RMC tratadas con 5 μM 15d-PGJ₂, 200 μM H₂O₂, su combinación, o vehículo, en medio mínimo durante dos horas. Inmuno-fluorescencia con anti-vimentina.

H_2O_2 provocó una disminución en la densidad de los filamentos intermedios, sin alterar significativamente su extensión. Más aún, la combinación de H_2O_2 y 15d-PGJ₂ dio lugar a una distribución de la vimentina parecida a la inducida por el tratamiento con H_2O_2 por sí sólo, aunque se pudieron observar algunos indicios de colapso de sus filamentos. Estas observaciones sugieren que el efecto de la 15d-PGJ₂ no se debe a la inducción de estrés oxidativo, sino a la acción de otros mecanismos. La vimentina sólo contiene una cisteína que está conservada en todos los vertebrados. Hemos generado vectores de expresión de Gfp en fusión con la vimentina humana salvaje o vimentina mutante con la cisteína 328 sustituida por serina (C328S). Las dos construcciones se pudieron transfectar y expresar en RMC, en las que observamos y comparamos la localización de la Gfp-vimentina por microscopía de fluorescencia después de tratamientos con 15d-PGJ₂ o vehículo (fig. 35). La 15d-PGJ₂

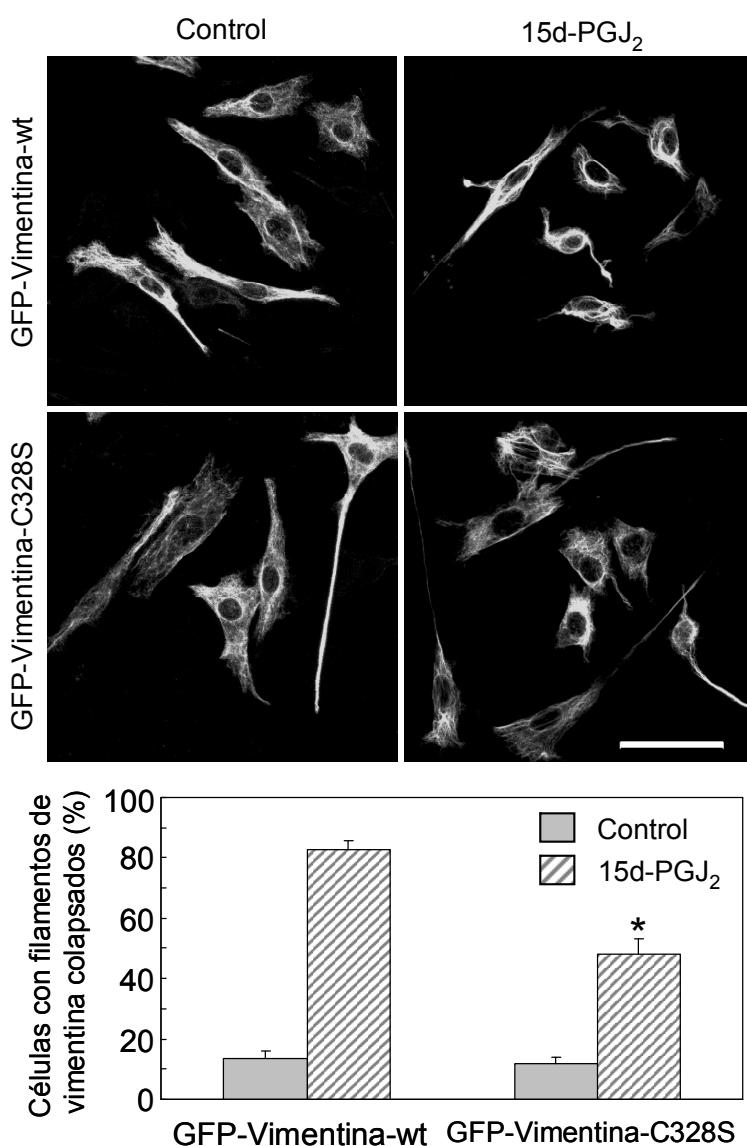


Figura 35: Efecto de la 15d-PGJ₂ sobre el citoesqueleto de vimentina salvaje o mutante. Imágenes de microscopía de fluorescencia (CCD) de RMC transfectadas con vectores de expresión de Gfp en fusión con vimentina salvaje (GFP-Vimentina-wt) o vimentina con la cisteína 328 sustituida por serina (GFP-Vimentina-C328S) y tratadas como en la figura 32. Barra: 50 μm . En el gráfico de abajo se muestra la cuantificación del porcentaje de células sometidas a dicho tratamiento que sufrieron el colapso de los filamentos de vimentina. Las cuantificaciones fueron realizadas por dos observadores independientes a partir de al menos 200 células procedentes de campos elegidos aleatoriamente para cada punto experimental. De la cuantificación se excluyeron aquellas células que por expresar niveles muy altos de Gfp-vimentina presentaban agregados. Se muestran medias \pm error estándar de tres experimentos independientes.

*: diferencia significativa estadísticamente ($P < 0,05$) en relación con el punto correspondiente de la vimentina salvaje.

indujo un colapso de los filamentos de Gfp-vimentina similar al colapso observado en la vimentina endógena. Este efecto fue dependiente, en gran parte, de la presencia de la cisteína de dicha proteína, ya que un número significativo de células transfectadas con la vimentina mutante no sufrió el colapso de dichos filamentos en respuesta al tratamiento con 15d-PGJ₂.

Discusión

1. Regulación de la expresión de proteínas G, y en particular de RhoB, por la inhibición de la isoprenilación.

Las estatinas inducen un marcado aumento de RhoB.

Las estatinas, fármacos ampliamente usados para regular los niveles del colesterol en la clínica, se usan también como herramientas para el estudio de las proteínas isopreniladas por su capacidad de inhibir la síntesis de isoprenoides y consiguientemente la isoprenilación. Existen varios estudios en los que se ha explorado la influencia de tratamientos con estatinas sobre la expresión y actividad de proteínas GTPasas de bajo peso molecular. En estos estudios se ha observado que el tratamiento con estatinas, así como con otros inhibidores de la isoprenilación, cambia el patrón de localización de la mayoría de las GTPasas de la membrana al citoplasma (para revisión ver Fritz, 2005). Dependiendo de la proteína estudiada, el tipo celular y las condiciones experimentales, la inhibición de la asociación a membrana puede conducir a la inactivación (Ghittoni *et al.*, 2005; Nakagami *et al.*, 2003; Narumiya *et al.*, 2004) o por el contrario a la activación de determinadas GTPasas (Cordle *et al.*, 2005; Dunford *et al.*, 2006). Esta discrepancia se puede explicar por la existencia de un gran número de reguladores y efectores de las GTPasas mencionadas, como se ha esquematizado en la figura 3. La inhibición del procesamiento — isoprenilación, eliminación de los tres últimos aminoácidos y metilación — de las GTPasas, puede afectar a su interacción con algunos de sus reguladores y sus efectores, mientras que otros seguirían desempeñando su papel con normalidad. Así por ejemplo, la inhibición de la isoprenilación de Rac-1 en células THP-1, induce la activación de esta GTPasa, posiblemente porque evita su asociación con la proteína inhibidora RhoGDI, que reconoce sólo Rac geranilgeranilado (Cordle *et al.*, 2005). Por el contrario, en la mayoría de los modelos experimentales, la actividad de las GTPasas de las familias Rho y Ras resulta reducida por la inhibición de su isoprenilación (Fernández-Hernando *et al.*, 2005; Swanson y Hohl, 2006). Además, la actividad de las GTPasas puede ser modificada por las alteraciones de sus niveles de expresión que podrían perturbar dicha regulación.

Por estas razones, decidimos estudiar las consecuencias de la inhibición de la isoprenilación por estatinas, sobre los niveles de proteína de las GTPasas de bajo peso molecular. En particular, nos ha interesado estudiar este efecto de las estati-

nas en células relevantes para las propiedades beneficiosas de estos fármacos, como son las células endoteliales. El modelo experimental de células endoteliales primarias de aorta bovina (BAEC), está bien caracterizado y es ampliamente utilizado para el estudio de las respuestas del endotelio a diversos estímulos (Ganz *et al.*, 1986).

En este trabajo hemos observado que el tratamiento de células BAEC quiescentes con estatinas no altera significativamente los niveles de proteína de la mayoría de las GTPasas de bajo peso molecular estudiadas. Las proteínas Rap2, Cdc42, y RhoB sufrieron un incremento, aunque sólo en el caso de RhoB este aumento fue de más de diez veces. Este efecto se pudo detectar de forma temprana tras la adición de estatinas y con concentraciones de S_v similares a las que se pueden encontrar en plasma de individuos tratados con este fármaco (Desager y Horsmans, 1996). El incremento en los niveles de RhoB se pudo observar en todos los tipos celulares estudiados y tras la incubación con diversas estatinas, lo que sugiere un mecanismo de regulación ubicuo. Ya que RhoB se ha relacionado con funciones celulares importantes, como la endocitosis y la señalización de receptores de factores de crecimiento, así como con la inducción de muerte celular, decidimos investigar con mayor profundidad la regulación de su expresión por isoprenilación.

Por otra parte, de las proteínas estudiadas, sólo en los casos de RhoB y Rab5 se observaron cambios en su movilidad electroforética, algo que indicaría la baja sensibilidad de la isoprenilación de otras proteínas a este tratamiento, y/o la implicación de otros determinantes, como por ejemplo de la palmitoilación.

Las estatinas modulan los niveles de proteína de RhoB inhibiendo la isoprenilación de proteínas.

Las estatinas inhiben toda la ruta de biosíntesis del colesterol puesto que bloquean la producción de mevalonato. Incluso una inhibición parcial de la HMG-CoA reductasa, alteraría la producción de uno o más de los numerosos productos finales de esta vía. Dependiendo de las necesidades de cada tipo celular por cada metabolito, la producción de otros podría resultar alterada. Concentraciones no tóxicas de las estatinas, como las usadas en este trabajo, permitirían la producción de las cantidades necesarias de metabolitos indispensables para la supervivencia celular, como el tRNA (en cuya síntesis interviene el isopentenil pirofosfato), la ubiqui-

nona (para cuya síntesis se requiere GGPP) o el propio colesterol entre otros, aunque la disponibilidad de productos intermedios como los isoprenoides podría disminuir hasta el nivel de afectar a la isoprenilación de determinadas proteínas.

En este trabajo hemos observado que, como era de esperar, el suplemento de mevalonato revirtió el aumento de RhoB provocado por Sv, ya que restaura toda la ruta biosintética. Sin embargo, el suplemento de colesterol no tuvo ningún efecto sobre el aumento de RhoB, indicando que éste no se produjo por la eventual alteración de la estructura de las membranas y la consiguiente alteración de la función celular causada por la posible disminución de los niveles de colesterol. La observación de que los isoprenoides que son sustratos de las preniltransferasas, FPP y GGPP, revirtieron el efecto de Sv, y que por el contrario, inhibidores de estas enzimas lo mimetizaron, indica que la inhibición de la isoprenilación juega un papel importante en la modulación de los niveles de RhoB.

Por el contrario, datos preliminares obtenidos en nuestro laboratorio muestran un comportamiento distinto de los niveles de Cdc42 en respuesta a estos tratamientos. La inhibición de la isoprenilación por FTI y GGTI no mimetizó el aumento de Cdc42 inducido por de Sv, mientras que el suplemento de GGPP así como el de colesterol revirtieron parcialmente el efecto de Sv. Esto último sugeriría la implicación del colesterol u otros esteroles en la regulación de los niveles de esta proteína, algo que se está estudiando más a fondo en la actualidad en nuestro laboratorio.

La inhibición de la isoprenilación puede afectar directa o indirectamente a un gran número de proteínas con diversas funciones que podrían estar implicadas en la regulación de los niveles de RhoB mediante múltiples mecanismos, como la modulación de la transcripción del gen, la estabilidad de su RNA, su traducción y/o la estabilidad de la proteína (Engel *et al.*, 1998; Holstein *et al.*, 2002; Jahner y Hunter, 1991; Jiang *et al.*, 2004; Tovar *et al.*, 2003; Westmark *et al.*, 2005).

La inhibición de la actividad de GTPasas de bajo peso molecular modula los niveles de mRNA de RhoB.

Hemos observado que el tratamiento con Sv induce un aumento de dos veces de los niveles del RNA mensajero de RhoB, efecto que contribuiría al aumento de los niveles de proteína. Como ya se conoce, la transcripción del gen de RhoB, así

como la estabilidad del tránsrito se regula por diversos factores como el estrés genotóxico (Fritz *et al.*, 1995; Westmark *et al.*, 2005). Se ha descrito que en la regulación de su transcripción juegan un papel importante miembros de la familia de las Rho GTPasas, entre ellos la propia RhoB (Fritz y Kaina, 1997). La inhibición de la isoprenilación por estatinas altera la actividad de las proteínas Rho. Hemos observado que la modulación de esta actividad mediante toxinas bacterianas mimetiza el efecto del tratamiento con Sv sobre los niveles de mRNA de RhoB y que un inhibidor específico de la Rho quinasa, efector de RhoA, también produjo este efecto. Con estos resultados podríamos proponer que en células BAEC la inhibición de la isoprenilación induce la pérdida de la señalización de RhoA hacia Rho quinasa y eso eliminaría cierta regulación negativa sobre los niveles del mRNA de RhoB como se ha propuesto anteriormente. Es este sentido, se podría considerar la posible influencia de la proteína RhoB en la regulación de los niveles de su mRNA.

La inhibición de la isoprenilación confiere más estabilidad a la proteína RhoB.

La modulación de los niveles de mRNA de RhoB por la inhibición de la isoprenilación, aunque significativa, no parece suficiente para justificar el aumento de los niveles de proteína inducido. Por ello estudiamos a continuación posibles mecanismos de regulación postraduccional. RhoB es una proteína de vida media muy corta. Este fenómeno puede estar relacionado con la necesidad de mantener una regulación estrecha de esta proteína. Se ha descrito que el factor de crecimiento TGF β induce una marcada estabilización de RhoB a expensas de la forma isoprenilada de la proteína (Engel *et al.*, 1998). Nosotros observamos que el tratamiento con Sv alarga la vida media de la proteína RhoB. Esto podría indicar que el componente mas importante del aumento de los niveles de RhoB provocado por Sv podría ser debido a un aumento de la estabilidad de la proteína que en este caso ocurre a expensas de la forma no procesada.

El aumento de la estabilidad de RhoB inducido por la inhibición de la isoprenilación podría ser un efecto directo o indirecto de dicha modificación. La inhibición directa de la isoprenilación de RhoB mediante la mutación de la cisteína de la caja CAAX resultó en una marcada estabilización de la proteína, lo cual indica que el propio procesamiento postraduccional de RhoB es necesario para la regulación de su estabilidad.

Hasta el momento no existen evidencias de este tipo de regulación en otras proteínas, aunque no se puede descartar que varias proteínas pudieran estar sujetas a esta regulación. Estos resultados ponen de manifiesto una nueva modo en el que la isoprenilación regula ciertas GTPasas.

La palmitoilación de RhoB en la cisteína 192 es importante para su localización y degradación.

Un aspecto importante que es preciso tener en cuenta es que la isoprenilación es sólo la primera de una serie de modificaciones que afectan al carboxilo-terminal de las GTPasas de bajo peso molecular y que dependen de la presencia del isoprenoide, en concreto la proteólisis de los tres últimos aminoácidos y la esterificación del grupo carboxilo de la cisteína (fig. 35).

En general, la región de las GTPasas adyacente a la caja CAAX, la denominada región hipervariable, contiene elementos estructurales muy importantes para la localización de dichas proteínas, su asociación estable con membranas, así como su asociación con otras proteínas como la RhoGDI (Michaelson *et al.*, 2001). Como se muestra en la figura 36, la alineación de las regiones carboxilo-terminal de varias GTPasas permite apreciar que cada proteína posee secuencias con distintas características. Algunas, como K-Ras y RhoA, contienen aminoácidos básicos en sitios cercanos a la caja CAAX, que por su carga interaccionarían con las cabezas polares de los fosfolípidos, estabilizando así la interacción de la proteína con la membrana. Otras, entre ellas RhoB y H-Ras, contienen residuos de cisteína, que se ha demostrado que pueden ser modificados por palmitoilación (Adamson *et al.*, 1992a; Wang y Sefti, 2005). La adición de un lípido de cadena larga en esta región

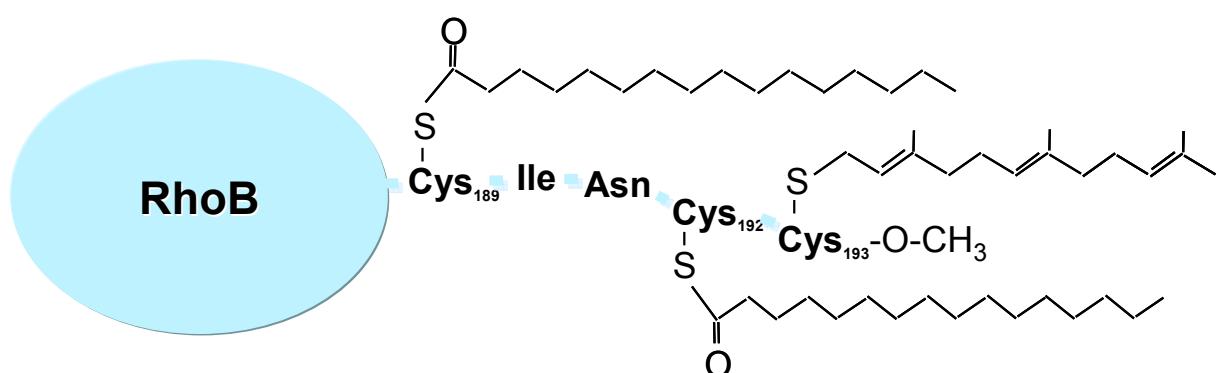


Figura 35: Representación esquematizada de la proteína RhoB farnesilada, carboxil-metilada y palmitoilada. Alternativamente la proteína podría estar geranilgeranilada (no mostrado).

RhoB	MAVRIQAYD-YLECSA-KTKEGVREVF-ETATRAALQ-----KRYGSQNGCINCCKV	
TC10	LA-KEIGACCYVECSALTQK-GLKTVFDEAIAILTP-----KKHTVKKRIGSRCINCOLIT	68%
H-Ras	LA-RSYG-IPYIETSA-KTRQGVEDAFTLV-REIRQHQLRKLNPP-DESGPGCMSCKCVLS	50%
Rap2B	ALAEEWS-CPFMETSA-KNKASVDELFAEIV-RQMNY-----AAQSNGDEGCCSACVIL	47%
N-Ras	LA-KSYG-IPFIELTSA-KTRQGVEDAFTLV-REIRQYRMKKLNSS-DDGTQGCMGLPCVVMM	49%
RhoA	MANRIGAFG-YMECSA-KTKDGVREVF-EMATRAALQA-----RRGKKKSG-----CLVL	92%
Rap1A	LA-RQWCNCALLESSA-KSKINVNEIFYDLV-RQINRKTPVE-----KKPKKKS-----CLLL	50%
K-Ras	LA-RSYG-IPFIELTSA-KTRQGVDDAFYTLV-REIRKHKEKMSKDGGKKKKSKTK-----CVIM	51%
Cdc42	LA-RDLKAVKYVECSALTQK-GLKNVFDEAILAALEPPEP-----KKSRR-----CVLL	70%
Rac1	AMAKEIGAVKYLECSALTQR-GLKTVFDEAI-RAVLCPPPV-----KKRKRK-----CLL	70%

ACÍDICOS: DE
 BÁSICOS: KRH
 POLARES: NCQSTYW
 HIDROFÓBICOS: MAILFVP
 NEUTROS: G

Figura 36: Alineación de las secuencias de aminoácidos de las regiones carboxilo-terminal de varias GTPasas de bajo peso molecular. En fondo rojo se muestran las cisteínas diana de isoprenilación. Se muestran también los porcentajes de homología de la secuencia de RhoB con las secuencias de estas GTPasas.

puede estabilizar la interacción de la proteína con la membrana.

En algunos casos se ha observado que esta acilación secundaria puede ser un factor dinámico, que influye en la regulación de la actividad de la proteína y en su localización en compartimentos de membrana específicos.

Las cisteínas 189 y 192 de RhoB pueden encontrarse palmitoiladas, aunque se ha descrito que la palmitoilación de la cisteína 192 es cuantitativa y funcionalmente más importante (Adamson *et al.*, 1992a; Wang y Sefti, 2005). La palmitoilación de RhoB contribuye a determinar su localización específica en membrana plasmática y membranas intracelulares (Michaelson *et al.*, 2001).

Nuestros resultados demuestran que la sustitución de la cisteína 192 por serina estabiliza la proteína RhoB y resulta en una distribución difusa de la proteína por el citoplasma de las células. Es importante destacar que RhoB(C192S) conserva la cisteína 193 y se encuentra por tanto potencialmente isoprenilada. Esto implica que el bloqueo de la palmitoilación es suficiente para estabilizar la proteína. En concordancia con esta conclusión, el tratamiento con 2BP, inhibidor de la palmitoilación de proteínas, indujo un incremento de los niveles de RhoB. Estas observaciones constituyen la primera evidencia de que la palmitoilación es importante para la degradación de una proteína. Desde el punto de vista funcional, se ha descrito que la sustitución de la cisteína 192 impide la actividad pro-apoptótica de RhoB (Wang y Sefti, 2005).

Estas evidencias garantizan el interés de futuros estudios en los que se ex-

plore con detalle la importancia de la palmitoilación en la función de RhoB, así como las implicaciones de la posible palmitoilación de la cisteína 189.

Es interesante resaltar que en todas las condiciones experimentales mencionadas se ha observado una correlación entre la estabilidad incrementada y la alteración de la localización subcelular de RhoB. Esto podría sugerir que la degradación de RhoB ocurre en un compartimento celular concreto.

La degradación de RhoB ocurre de manera independiente de la función del proteasoma y precisa tráfico y maduración vesicular.

Se ha descrito que la rápida degradación de RhoB está mediada por el proteasoma (Engel *et al.*, 1998). Sin embargo, en nuestras condiciones, los inhibidores del proteasoma provocaron sólo un modesto aumento en los niveles de RhoB. Por otra parte, el tratamiento con Sv no incrementó los niveles de proteínas ubiquitinadas, lo cual sugiere que la Sv no interfiere con la función o actividad del proteasoma. Además, la combinación de Sv con Z-LLL-CHO, que fue el inhibidor que más aumentó los niveles de proteínas ubiquitinadas, produjo un aumento en los niveles de RhoB mayor que la suma de los dos por separado, sin incrementar más los niveles de las proteínas ubiquitinadas. Esto podría indicar la existencia de otra vía independiente de degradación de RhoB, que funcionaría en paralelo con la del proteasoma.

Así, se podría proponer la hipótesis de que la ubiquitinación de RhoB se inhibiría en presencia de ciertos factores de crecimiento (Engel *et al.*, 1998) y en contraste la segunda vía proteolítica actuaría de forma constitutiva, controlando los niveles de RhoB isoprenilada y palmitoilada. En este contexto, observamos que los tratamientos con compuestos capaces de inhibir un amplio espectro de proteasas fueron los más eficaces en aumentar los niveles de RhoB, indicando la posible acción cooperativa de diversas enzimas en su degradación.

RhoB se localiza en la superficie de endosomas tempranos y regula el tráfico y señalización del receptor de EGF en dichas vesículas (fig. 37) (Ellis y Mellor, 2000; Gampel *et al.*, 1999; Wherlock *et al.*, 2004). La desaparición de RhoB de los endosomas tardíos y los lisosomas podría ser indicativa de su degradación ya que dichas vesículas constituyen otro sistema de proteólisis, encargado de la degradación de receptores, factores de crecimiento y proteínas incorrectamente plegadas, así como del reciclamiento de aminoácidos en condiciones de falta de nutrientes

(revisado en Clague, 1998; Pillay *et al.*, 2002). Nuestros resultados indican que la inhibición del tráfico endosomal así como de la acidificación de los endosomas y lisosomas inducen un aumento de la estabilidad de la proteína RhoB.

Una hipótesis interesante para explicar estos fenómenos, sería que la proteína RhoB se trasloca al interior de los endosomas o lisosomas, donde existe una gran cantidad de proteasas, como las catepsinas que la podrían degradar. Recientemente se ha descrito un mecanismo encargado de la degradación de proteínas de la membrana plasmática reconocidas como incorrectamente plegadas o que contengan mutaciones (Conn *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2004). Este proceso incluye el marcaje/ligación de dichas proteínas con ubiquitina para ser reconocidas por las proteínas encargadas de introducirlas en los lisosomas. Por otra parte, la palmitoilación/despalmítoilación de RhoB podría ser un mecanismo hipotético de regulación de esta vía de degradación de la proteína.

Los hallazgos de este estudio plantean la posibilidad de explorar las posibles interacciones entre la ubiquitinación, la plausible localización intralisosomal de RhoB y su estabilidad, así como el papel de la palmitoilación en estos procesos.

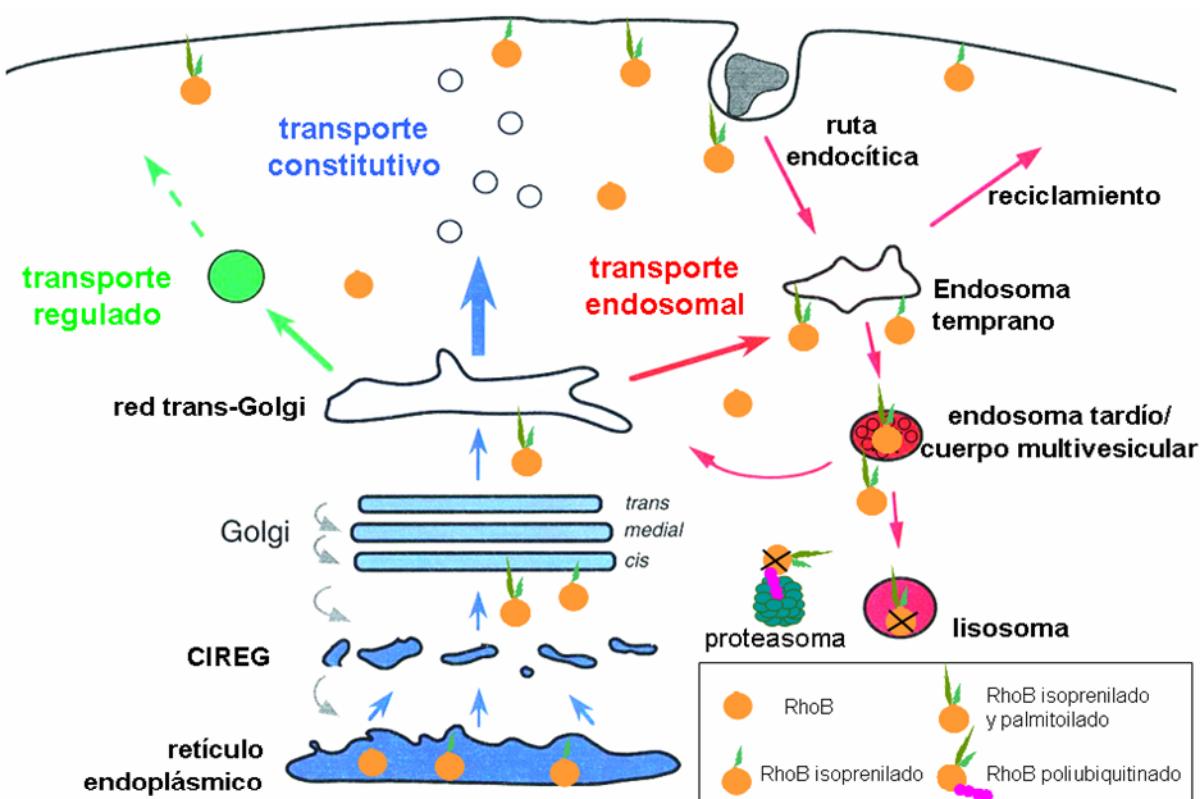


Figura 37: Esquema hipotético de posibles vías de degradación de RhoB dependientes de modificaciones lipídicas. CIREG: compartimiento intermedio entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi.

En conjunto, este apartado de nuestros resultados pone de manifiesto nuevas implicaciones de la isoprenilación y palmitoilación de proteínas. Dichas modificaciones lipídicas, hasta el momento consideradas como determinantes de localización, pueden contribuir a los mecanismos de regulación de la función de las proteínas. Especialmente en el caso de RhoB, estas modificaciones contribuyen de manera dinámica a la estrecha regulación de sus niveles, así como a la localización en el compartimiento celular en el que desempeña su función.

2. Identificación de proteínas diana de modificación por lípidos electrófilos.

La modificación de proteínas por lípidos electrófilos es un tema de estudio emergente que está cobrando interés por su implicación en procesos tanto fisiológicos como patológicos (Ceaser *et al.*, 2004; Zmijewski *et al.*, 2005). La identificación de las proteínas diana de cada uno de estos lípidos puede proporcionar información sobre sus efectos específicos así como sobre la selectividad de la modificación para el posible diseño de fármacos. Por estas razones hemos desarrollado una metodología de identificación de dianas de uno de los lípidos modelo de estudio, la prostaglandina 15d-PGJ₂, basada en el uso de un derivado biotinilado de la prostaglandina disponible en nuestro laboratorio. Dicha metodología se podría aplicar al estudio de otros lípidos electrófilos, e incluso adaptarse a tecnologías de alto rendimiento.

Comprobación de los efectos biológicos de la 15d-PGJ₂ biotinilada y de su capacidad de unión a proteínas en células.

El primer paso de este proceso sería la confirmación de que el análogo biotinilado de la 15d-PGJ₂ o en su caso de otro lípido electrófilo, modifica las mismas dianas y ejerce efectos biológicos similares a los del compuesto original. En el caso de la 15d-PGJ₂ biotinilada, se había comprobado que se unía a diversas dianas conocidas de la 15d-PGJ₂, como c-jun o p50, en los mismos residuos y con simila-

res consecuencias funcionales (Pérez-Sala *et al.*, 2003). Además, comprobamos que el análogo biotinilado mostraba la misma capacidad que la 15d-PGJ₂ de inducir determinadas respuestas celulares dependientes de la modificación de proteínas, como la inhibición de la inducción de la iNOS en respuesta a citoquinas o la inducción de Hsp70 en células mesangiales (Sánchez-Gómez *et al.*, 2004).

Cabe entender que, debido a la presencia de la molécula de biotina, es posible que no haya coincidencia en todas las dianas y efectos biológicos de la 15d-PGJ₂ biotinilada y de la prostaglandina original, algo que se podría comprobar para cada una de las dianas identificadas, con estudios de competición de los dos lípidos o espectrometría de masas, entre otros métodos. Ya que el derivado biotinilado mimetiza los efectos biológicos de la 15d-PGJ₂ en nuestro sistema, asumimos que al menos existe coincidencia en las dianas implicadas en estos efectos.

A continuación comprobamos que la 15d-PGJ₂ biotinilada modificaba un gran número de proteínas en células. Las proteínas susceptibles de ser modificadas forman un grupo delimitado que no se corresponde con el patrón de la tinción de proteína total, como hemos demostrado. Además, hemos comprobado que la unión de la 15d-PGJ₂ biotinilada a las proteínas es estable en las condiciones de los análisis realizados, al igual que la unión del compuesto original. De acuerdo con las propiedades de los enlaces generados entre carbonos electrófilos y ci-steínas por adición de Michael, la unión se puede revertir en condiciones alcalinas (Narumiya *et al.*, 1987).

Identificación de proteínas diana de la 15d-PGJ₂ biotinilada.

Utilizando la metodología descrita en el apartado de Resultados y esquematizada en la figura 33, hemos identificado “manchas” de proteínas en geles de electroforesis 2D que son positivas para la unión de la 15d-PGJ₂ biotinilada. Asumimos que, como hemos comprobado en algunos casos concretos (fig. 31) (Cernuda-Morollón *et al.*, 2001; Pérez-Sala *et al.*, 2003; Pérez-Sala *et al.*, 2002), solamente una pequeña parte de la cantidad total de cada proteína está modificada y que la modificación por dicho compuesto no altera el punto isoeléctrico ni el peso molecular de la proteína significativamente ya que la 15d-PGJ₂ biotinilada no posee cargas libres y tiene un peso molecular de aproximadamente 600 Dalton. Dichas “manchas”/proteínas, después de su extracción y digestión, se analizaron por

espectrometría de masas y algunas de ellas se identificaron.

La cromatografía de afinidad en avidina y detección con anticuerpos específicos permitió obtener evidencias confirmatorias de la modificación de algunas proteínas de interés. Además, hemos confirmado posteriormente la modificación de algunas de las dianas identificadas, concretamente de la actina y la vimentina, por prostaglandinas ciclopentenonas en ensayos *in vitro* (resultados pendientes de publicación).

Todas las proteínas identificadas como dianas de la 15d-PGJ₂ biotinilada, contienen cisteínas en su secuencia. Algunas de estas proteínas se han identificado en estudios recientes como dianas de tiolación en condiciones de estrés oxidativo o como dianas de alquilación o modificaciones por otros agentes como el óxido nítrico (Cumming *et al.*, 2004; Eaton *et al.*, 2002; Eaton *et al.*, 2003). Esta circunstancia es probablemente consecuencia de que la adición de Michael afecta a cisteínas altamente reactivas y posiblemente implicadas en la respuesta celular a estrés oxidativo y a agentes alquilantes. Así, este método podría servir también para identificar nuevas funciones de proteínas como sensores del estado redox celular.

Es importante resaltar que las proteínas identificadas eran detectables con la tinción de Coomassie coloidal y consecuentemente se trata de proteínas abundantes en estas células. Numerosas “manchas” extraídas de los geles no pudieron ser identificadas en los procedimientos habituales de proteómica. En este sentido, trabajo reciente de nuestro grupo ha mostrado que el uso de procedimientos más sensibles así como el enriquecimiento de las muestras en proteínas modificadas previo al análisis puede contribuir a identificar proteínas menos abundantes.

Las proteínas del citoesqueleto son dianas de modificación por la 15d-PGJ₂ biotinilada.

Entre las proteínas identificadas como dianas de modificación por 15d-PGJ₂ biotinilada se encontraron las tres principales proteínas integrantes del citoesqueleto de las células RMC, actina, tubulina y vimentina. Además, se identificó la tropomiosina, implicada en contracción del citoesqueleto y de la célula. En el caso de la vimentina, estimamos la proporción de la proteína retenida en avidina en un 30% de la vimentina total, lo cual en nuestra experiencia, podría suponer un porcentaje muy alto de la proteína modificada.

Teniendo en cuenta que la molécula encargada de unirse a los lípidos electrófilos para proteger las células de sus efectos tóxicos, el glutatión, lleva a cabo una misión suicida, no se puede descartar que también las proteínas mencionadas no cumplan una función protectora frente a agentes oxidantes. Esto se ha propuesto también para otras proteínas implicadas en detoxificación, como la glutatión-S-transferasa (GST) (Hayes *et al.*, 2005).

Por otra parte, la modificación de cisteínas de proteínas del citoesqueleto podría tener consecuencias en la regulación de la formación de filamentos o en su despolimerización. La tubulina por ejemplo contiene un gran número de cisteínas en su secuencia y es sensible al estado redox de la célula (Landino *et al.*, 2004). La alquilación de cisteínas funcionales de dicha proteína puede alterar la polimerización de los microtúbulos afectando así procesos importantes en los que está implicada, como la división celular. Esta propiedad ha constituido la base para el desarrollo de fármacos antitumorales (Scozzafava *et al.*, 2002; Shan *et al.*, 1999). En este aspecto, la modificación de la tubulina por 15d-PGJ₂ podría proporcionar una posible explicación para algunos de los efectos antiproliferativos de este lípido.

La vimentina por otro lado, contiene solamente una cisteína, conservada en todos los vertebrados (fig. 37), lo que sugiere un papel importante de dicho residuo. Además, la proteína GFAP y la desmina, que comparten la estructura de la vimentina y pueden, al menos *in vitro*, formar filamentos junto con la vimentina, también contienen una cisteína en el mismo dominio. En el caso de la vimentina, la cisteína se ha descrito que se modifica oxidación (Rogers *et al.*, 1991) o por glutationilación en condiciones de estrés oxidativo (Fratelli *et al.*, 2002). La función de esta cisteína así como el significado funcional de su oxidación no se conoce todavía. Se ha sugerido que la oxidación de la cisteína 328 de la vimentina podría estar involucrada en el colapso de los filamentos intermedios, observado en sinoviocitos expuestos a estrés oxidativo (Rogers *et al.*, 1989).

Efecto del tratamiento con 15d-PGJ₂ sobre las proteínas del citoesqueleto.

Nuestros resultados muestran que la 15d-PGJ₂ induce cambios en la distribución de los filamentos intermedios y de los microtúbulos. Especialmente en el caso de los filamentos de vimentina observamos su colapso alrededor del núcleo. Las dos redes de estructuras, filamentos intermedios y microtúbulos, se encuentran en

constante interacción en condiciones fisiológicas. Las redistribuciones observadas no han tenido el mismo alcance, indicando la posible pérdida parcial de dicha interacción. La interdependencia de la distribución y estructura de estas redes se debe estudiar más a fondo para esclarecer este fenómeno.

El colapso de los filamentos intermedios ha sido relacionado con respuestas celulares a choque térmico (Lee *et al.*, 2001). Existe la posibilidad de que en el caso del tratamiento con 15d-PGJ₂ las células respondan de la misma manera. Hemos observado que la 15d-PGJ₂ induce una respuesta análoga a la del choque térmico en células mesangiales en términos de la inducción de la chaperona Hsp70. Además, también la chaperona Hsp90 es diana de la 15d-PGJ₂. Se ha descrito que la modificación de cisteínas críticas en Hsp90, por ejemplo por nitrosilación, inactiva esta proteína y que este mecanismo puede estar implicado en la activación de Hsf1 y la inducción de una respuesta de choque térmico (Martínez-Ruiz *et al.*, 2005). Por todo ello, no se puede descartar que las alteraciones en la distribución de los filamentos intermedios y de los microtúbulos inducida por 15d-PGJ₂ sean provocadas por mecanismos indirectos, consecuencia de una respuesta análoga a la respuesta a choque térmico. Además, ante el gran número de dianas de la 15d-PGJ₂, ésta podría modificar y afectar a la función de proteínas reguladoras del citoesqueleto, alterando así su organización. Así, por ejemplo, la regulación directa o indirecta de la actividad de quinasas y fosfatases capaces de actuar sobre las proteínas del citoesqueleto, como las quinasas PKC o la p70 S6, y la fosfatasa PP2A, o la modulación de la actividad de las Rho GTPasas podría provocar la redistribución del citoesqueleto. En este sentido, se ha descrito que la hiperfosforilación de la vimentina, en respuesta a diversos estímulos, provoca su colapso alrededor del núcleo (Coca-Prados, 1985).

Nuestros resultados indican que el colapso de los filamentos de vimentina no se debe a la producción de estrés oxidativo. Por una parte el estrés oxidativo provocado por H₂O₂ indujo un efecto diferente al de la 15d-PGJ₂ sobre la distribución de los filamentos intermedios y además este efecto prevaleció cuando se realizaron cotratamientos con ambos agentes.

Al menos en el caso de la vimentina, hemos demostrado que la única cisteína que la proteína posee es importante para la inducción del colapso provocado por el tratamiento con 15d-PGJ₂. La transfección de un mutante de la vimentina en el cual

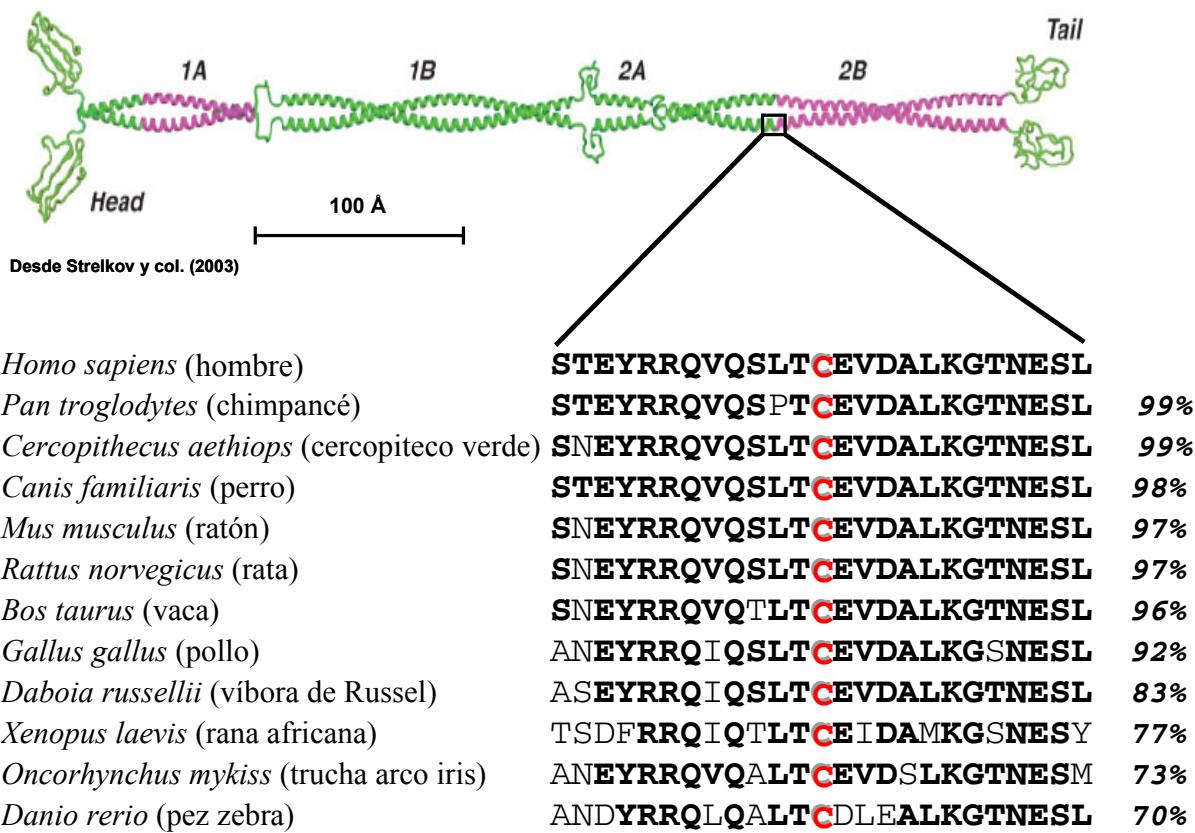


Figura 38: Estructura del dímero de la vimentina y alineación de las secuencias en el entorno de la cisteína de las vimentinas de diversas especies. Se muestran los porcentajes de homología de las secuencias de las distintas vimentinas con la de la humana.

la cisteína 328 había sido sustituida por serina, evitó parcialmente el colapso observado, lo cual indicaría que este residuo es diana para modificaciones inducidas por este lípido. Es necesario considerar también la posibilidad de que esta cisteína esté implicada en interacciones con otras proteínas, las cuales podrían contribuir al colapso de los filamentos intermedios. El efecto de la sustitución de la cisteína 328 por serina fue parcial probablemente debido a la existencia de filamentos de vimentina endógena (salvaje), que seguirían siendo sensibles a este tratamiento. Además, la proteína endógena tiene una expresión elevada, parecida a la conseguida por la transfección del mutante, por lo que ambas podrían contribuir en una proporción significativa a la formación de los filamentos intermedios.

En conclusión, hemos descrito un nuevo abordaje experimental para la identificación de proteínas diana de modificación por lípidos electrófilos. Esta metodología ha permitido la identificación de varias dianas de la 15d-PGJ₂ en células RMC, entre

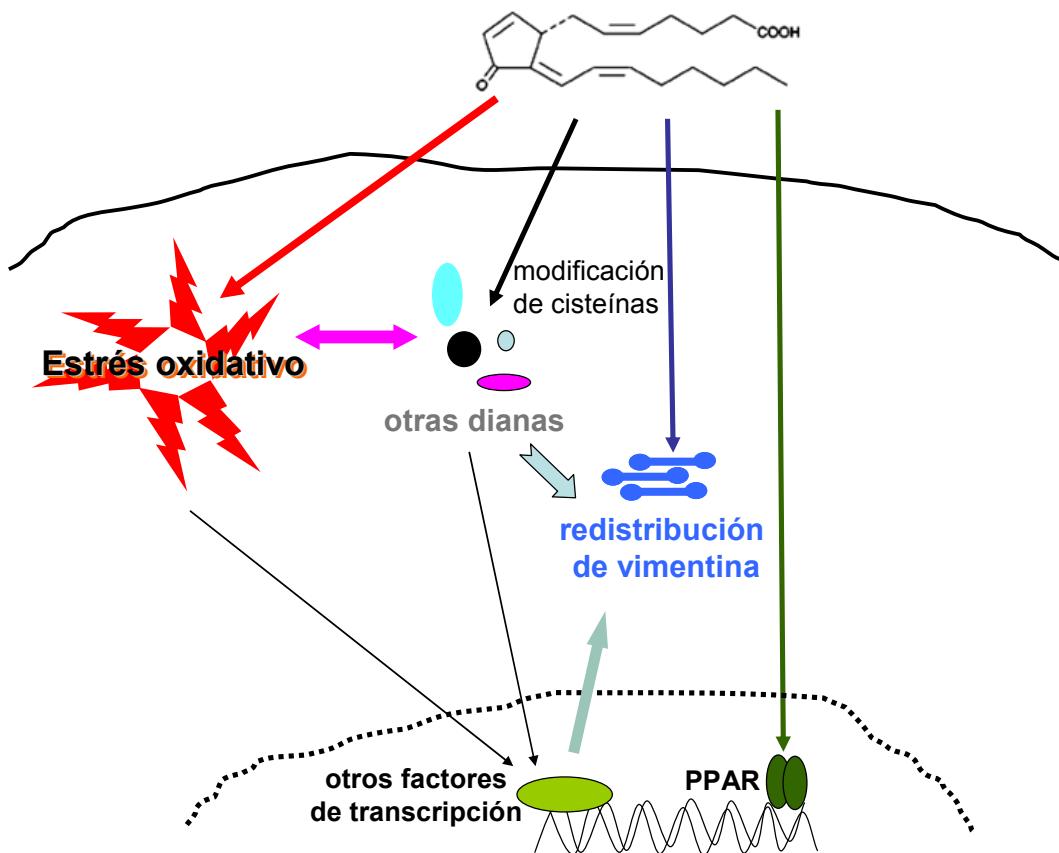


Figura 39: Las posibles vías de actuación de la 15d-PGJ₂ para provocar el colapso de la vimentina.

ellas los principales componentes del citoesqueleto, y hemos observado la redistribución las redes de los filamentos intermedios y de los microtúbulos provocada por el tratamiento con este lípido. Al menos para una de sus dianas, la vimentina, la presencia de la cisteína diana de dicha modificación es importante para el efecto de la 15d-PGJ₂.

El estudio de los tipos de modificaciones lipídicas abordados en este trabajo nos ha permitido desvelar nuevas implicaciones de estos procesos.

Un aspecto importante que puede derivarse de estos hallazgos es el de la posible interacción entre las modificaciones estudiadas. Tanto la isoprenilación-palmitoilación como la adición de lípidos electrófilos tienen lugar en cisteínas accesibles y reactivas de las proteínas, que en algunos casos pueden ser sensibles también a modificaciones por otros agentes oxidantes. Existen evidencias de que para algunas proteínas las interacciones entre las diversas modificaciones podrían ser especialmente significativas, como es el caso de la proteína H-Ras. Dicha proteína, se isoprenila y se palmitoila (Willumsen *et al.*, 1996). Además, se ha descrito la

nitrosilación, glutationilación, y modificación por 15d-PGJ₂ de H-Ras en distintas cisteínas (Mallis *et al.*, 2001; Oliva *et al.*, 2003). Se ha comprobado que la modificación por prostaglandinas con estructura ciclopentenona puede tener lugar en alguna de las cisteínas implicadas en la palmitoilación. Este podría ser el caso también de RhoB, que contiene dos cisteínas accesibles y susceptibles de palmitoilación, que podrían ser modificadas por lípidos electrófilos. Debido a la gran variedad de lípidos electrófilos, no se puede descartar que algunos de ellos, que poseen una larga cola hidrofóbica, pudieran facilitar la localización de proteínas en membranas, mediante la unión covalente de estos lípidos a sus dianas. El estudio de estas posibles interacciones y sus consecuencias biológicas podría ser el objetivo de futuros trabajos que se beneficiarán de los métodos desarrollados en esta tesis.

Conclusiones

Del desarrollo de este trabajo, en el que hemos estudiado los efectos de modificaciones lipídicas en residuos de cisteína de proteínas diana, hemos obtenido las siguientes conclusiones:

- 1.1** La inhibición de la isoprenilación induce un aumento de los niveles de la proteína RhoB que ocurre en varios tipos celulares y está relacionado con un aumento en su estabilidad.
 - 1.2** La inhibición de la palmitoilación de RhoB también conlleva un aumento en la estabilidad de la proteína.
 - 1.3** La inhibición de la isoprenilación o palmitoilación de RhoB, provoca una marcada alteración en la localización subcelular de RhoB.
 - 1.4** La degradación de RhoB, que depende del procesamiento de su extremo carboxilo terminal, resulta retardada por la inhibición del tráfico endocítico y de la acidificación de los endosomas/lisosomas.
 - 1.5** El conjunto de estas observaciones sugiere que existe una interrelación entre el procesamiento postraduccional de RhoB por lípidos (isoprenilación y palmitoilación), su localización intracelular y su degradación relacionada con el tráfico vesicular intracelular.
- 2.1** La 15d-PGJ₂ biotinilada mimetiza algunos de los efectos biológicos del compuesto original, y se une covalentemente a un conjunto definido y amplio de proteínas.
 - 2.2** Las proteínas del citoesqueleto, vimentina, tubulina y actina, son dianas importantes para la modificación por el lípido 15d-PGJ₂ en RMC. La distribución de la red de microtúbulos y sobre todo de la red de filamentos intermedios se afecta por el tratamiento con la 15d-PGJ₂.
 - 2.3** La presencia de la cisteína 328 en la vimentina es importante para el colapso de la red de filamentos intermedios por la 15d-PGJ₂.
 - 2.4** El conjunto de estas observaciones sugiere que el uso de derivados biotinilados de prostaglandinas con estructura ciclopentenona, en combinación con técnicas de proteómica, puede constituir un método eficaz para la identificación de nuevas proteínas diana de estos compuestos, y permite el estudio de los mecanismos implicados en sus efectos biológicos.

Bibliografía

- Adamson P, Marshall CJ, Hall A and Tilbrook PA (1992a) Post-translational modifications of p21rho proteins. *J Biol Chem* **267**(28):20033-20038.
- Adamson P, Paterson HF and Hall A (1992b) Intracellular localization of the P21rho proteins. *J Cell Biol* **119**(3):617-627.
- Adini I, Rabinovitz I, Sun JF, Prendergast GC and Benjamin LE (2003) RhoB controls Akt trafficking and stage-specific survival of endothelial cells during vascular development. *Genes Dev* **17**(21):2721-2732.
- Adjei AA, Davis JN, Erlichman C, Svingen PA and Kaufmann SH (2000) Comparison of potential markers of farnesyltransferase inhibition. *Clin Cancer Res* **6**(6):2318-2325.
- Aktories K, Barbieri JT. (2005) Bacterial cytotoxins: targeting eukaryotic switches. *Nat Rev Microbiol* **3**(5):397-410.
- Alberts B, Lewis J, Raff M, Roberts K, and Walter P. (2002) *Molecular Biology of the Cell* (fourth edition) Garland Science Publishing, Oxford.
- Armstrong SA, Hannah VC, Goldstein JL and Brown MS (1995) CAAX geranylgeranyl transferase transfers farnesyl as efficiently as geranylgeranyl to RhoB. *J Biol Chem* **270**(14):7864-7868.
- Arnaud C, Veillard NR and Mach F (2005) Cholesterol-independent effects of statins in inflammation, immuno-modulation and atherosclerosis. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* **5**(2):127-134.
- Barbacid, M. (1987) ras genes. *Annu Rev Biochem*. **56**:779-827.
- Baron R, Fourcade E, Lajoie-Mazenc I, Allal C, Couderc B, Barbasas R, Favre G, Faye JC and Pradines A (2000) RhoB prenylation is driven by the three carboxyl-terminal amino acids of the protein: evidenced in vivo by an anti-farnesyl cysteine antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(21):11626-11631.
- Bell-Parikh LC, Ide T, Lawson JA, McNamara P, Reilly M and Fitzgerald GA (2003) Biosynthesis of 15-deoxy-delta12,14-PGJ2 and the ligation of PPARgamma. *J Clin Invest* **112**(6):945-955.
- Berlett BS and Stadtman ER (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* **272**(33):20313-20316.
- Bogatcheva NV, Sergeeva MG, Dudek SM and Verin AD (2005) Arachidonic acid cascade in endothelial pathobiology. *Microvasc Res* **69**(3):107-127.
- Butterfield DA, Castegna A, Lauderback CM and Drake J (2002) Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiol Aging* **23**(5):655-664.
- Castrillo A, Díaz-Guerra MJ, Hortelano S, Martín-Sanz P and Bosca L (2000) Inhibition of IkappaB kinase and IkappaB phosphorylation by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) in activated murine macrophages. *Mol Cell Biol* **20**(5):1692-1698.
- Ceaser EK, Moellering DR, Shiva S, Ramachandran A, Landar A, Venkartraman A, Crawford J, Patel R, Dickinson DA, Ulasova E, Ji S and Darley-Usmar VM (2004) Mechanisms of signal transduction mediated by oxidized lipids: the role of the electrophile-responsive proteome. *Biochem Soc Trans* **32**(Pt 1):151-155.
- Cernuda-Morollón E, Pineda-Molina E, Cañada FJ and Pérez-Sala D (2001) 15-Deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2 inhibition of NF-kappaB-DNA binding through covalent modification of the p50 subunit. *J Biol Chem* **276**(38):35530-35536.
- Chatterjee PK, Patel NS, Cuzzocrea S, Brown PA, Stewart KN, Mota-Filipe H, Britti D, Eberhardt W, Pfeilschifter J and Thiemermann C (2004) The cyclopentenone prostaglandin 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2 ameliorates ischemic acute renal failure. *Cardiovasc Res* **61**(3):630-643.
- Chen Y, Morrow JD, Roberts LJ 2nd. (1999) Formation of reactive cyclopentenone compounds in vivo as products of the isoprostane pathway. *J Biol Chem* **274**(16):10863-8.
- Chen Z, Sun J, Pradines A, Favre G, Adnane J and Sebti SM (2000) Both farnesylated and geranylgeranylated

Bibliografía

- RhoB inhibit malignant transformation and suppress human tumor growth in nude mice. *J Biol Chem* **275**(24):17974-17978.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156-159
- Clague MJ (1998) Molecular aspects of the endocytic pathway. *Biochem J* **336** (Pt 2):271-282.
- Coca-Prados, M (1985) Regulation of protein phosphorylation of the intermediate-sized filament vimentina in the ciliary epithelium of the mammalian eye. *J Biol Chem* **280**(18):10332-10338.
- Cohen LH, Pieterman E, van Leeuwen RE, Overhand M, Burn BE, van der Marel GA and van Boom JH (2000) Inhibitors of prenylation of Ras and other G-proteins and their application as therapeutics. *Biochem Pharmacol* **60**(8):1061-1068.
- Colucci-Guyon E, Portier MM, Dunia I, Paulin D, Pournin S and Babinet C (1994) Mice lacking vimentin develop and reproduce without an obvious phenotype. *Cell* **79**(4):679-694.
- Conn PM, Knollman PE, Brothers SP and Janovick JA (2006) Protein Folding as Post-translational Regulation: Evolution of a Mechanism for Controlled Plasma Membrane Expression of a GPCR. *Mol Endocrinol En* prensa
- Cordle A, Koenigsknecht-Talbo J, Wilkinson B, Limpert A and Landreth G (2005) Mechanisms of statin-mediated inhibition of small G-protein function. *J Biol Chem* **280**(40):34202-34209.
- Cumming RC, Andon NL, Haynes PA, Park M, Fischer WH and Schubert D (2004) Protein disulfide bond formation in the cytoplasm during oxidative stress. *J Biol Chem* **279**(21):21749-21758.
- Dijkstra J, Van Galen M, Scherphof GL. (1984) Effects of ammonium chloride and chloroquine on endocytic uptake of liposomes by Kupffer cells in vitro. *Biochim Biophys Acta* **804**(1):58-67.
- D'Onofrio C, Amici C, Puglianelli A, Faraoni I, Lanzilli G, Santoro MG and Bonmassar E (1992) Comparative anti-viral and anti-proliferative activity of PGA1 and PGJ2 against HTLV-I-infected MT-2 cells. *Int J Cancer* **51**(3):481-488.
- Desager JP and Horsmans Y (1996) Clinical pharmacokinetics of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors. *Clin Pharmacokinet* **31**(5):348-371.
- Desnoyers L, Anant JS and Seabra MC (1996) Geranylgeranylation of Rab proteins. *Biochem Soc Trans* **24** (3):699-703.
- Dianzani MU (2003) 4-hydroxynonenal from pathology to physiology. *Mol Aspects Med* **24**(4-5):263-272.
- Dietrich LE and Ungermann C (2004) On the mechanism of protein palmitoylation. *EMBO Rep* **5**(11):1053-1057.
- Dovas A and Couchman JR (2005) RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. *Biochem J* **390**(Pt 1):1-9.
- Dulak J and Jozkowicz A (2005) Anti-angiogenic and anti-inflammatory effects of statins: relevance to anti-cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* **5**(8):579-594.
- Dunford JE, Rogers MJ, Ebetino FH, Phipps RJ and Coxon FP (2006) Inhibition of Protein Prenylation by Bisphosphonates Causes Sustained Activation of Rac, Cdc42, and Rho GTPases. *Journal of Bone and Mineral Research* **21**(5):684-694.
- Dunphy JT, Greentree WK, Manahan CL and Linder ME (1996) G-protein palmitoyltransferase activity is enriched in plasma membranes. *J Biol Chem* **271**(12):7154-7159.
- Dunphy JT and Linder ME (1998) Signalling functions of protein palmitoylation. *Biochim Biophys Acta* **1436**(1-2):245-261.
- Eaton P, Byers HL, Leeds N, Ward MA and Shattock MJ (2002) Detection, quantitation, purification, and identification of cardiac proteins S-thiolated during ischemia and reperfusion. *J Biol Chem* **277**(12):9806-9811.
- Eaton P, Jones ME, McGregor E, Dunn MJ, Leeds N, Byers HL, Leung KY, Ward MA, Pratt JR and Shattock MJ

- (2003) Reversible cysteine-targeted oxidation of proteins during renal oxidative stress. *J Am Soc Nephrol* **14**(8 Suppl 3):S290-296.
- Eckes B, Colucci-Guyon E, Smola H, Nodder S, Babinet C, Krieg T and Martin P (2000) Impaired wound healing in embryonic and adult mice lacking vimentin. *J Cell Sci* **113** (Pt 13):2455-2462.
- Eckes B, Dogic D, Colucci-Guyon E, Wang N, Maniotis A, Ingber D, Merckling A, Langa F, Aumailley M, Delouvee A, Koteliansky V, Babinet C and Krieg T (1998) Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts. *J Cell Sci* **111** (Pt 13):1897-1907.
- Edgell CJS, McDonald CC, Graham JB. (1983) Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**:3734-3737.
- Ellis S and Mellor H (2000) Regulation of endocytic traffic by rho family GTPases. *Trends Cell Biol* **10**(3):85-88.
- Engel ME, Datta PK and Moses HL (1998) RhoB is stabilized by transforming growth factor beta and antagonizes transcriptional activation. *J Biol Chem* **273**(16):9921-9926.
- Fernández-Borja M, Janssen L, Verwoerd D, Hordijk P and Neefjes J (2005) RhoB regulates endosome transport by promoting actin assembly on endosomal membranes through Dia1. *J Cell Sci* **118**(Pt 12):2661-2670.
- Fernández-Hernando C, Suárez Y and Lasunción MA (2005) Lovastatin-induced PC-12 cell differentiation is associated with RhoA/RhoA kinase pathway inactivation. *Mol Cell Neurosci* **29**(4):591-602.
- FitzGerald GA, Brash AR, Falardeau P and Oates JA (1981) Estimated rate of prostacyclin secretion into the circulation of normal man. *J Clin Invest* **68**(5):1272-1276.
- Fratelli M, Demol H, Puype M, Casagrande S, Eberini I, Salmona M, Bonetto V, Mengozzi M, Duffieux F, Miclet E, Bachi A, Vandekerckhove J, Gianazza E and Ghezzi P (2002) Identification by redox proteomics of glutathionylated proteins in oxidatively stressed human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** (6):3505-3510.
- Fritz G (2005) HMG-CoA reductase inhibitors (statins) as anticancer drugs (review). *Int J Oncol* **27**(5):1401-1409.
- Fritz G and Kaina B (1997) rhoB Encoding a UV-inducible Ras-related Small GTP-binding Protein Is Regulated by GTPases of the Rho Family and Independent of JNK, ERK, and p38 MAP Kinase. *J Biol Chem* **272** (49):30637-30644.
- Fritz G and Kaina B (2000) Ras-related GTPase RhoB forces alkylation-induced apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* **268**(3):784-789.
- Fritz G and Kaina B (2006) Rho GTPases: promising cellular targets for novel anticancer drugs. *Curr Cancer Drug Targets* **6**(1):1-14.
- Fritz G, Kaina B and Aktories K (1995) The ras-related small GTP-binding protein RhoB is immediate-early inducible by DNA damaging treatments. *J Biol Chem* **270**(42):25172-25177.
- Fukushima S, Kishimoto S, Takeuchi Y and Fukushima M (2000) Preparation and evaluation of o/w type emulsions containing antitumor prostaglandin. *Adv Drug Deliv Rev* **45**(1):65-75.
- Funk CD (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* **294**(5548):1871-1875.
- Gampel A, Parker PJ and Mellor H (1999) Regulation of epidermal growth factor receptor traffic by the small GTPase rhoB. *Curr Biol* **9**(17):955-958.
- Ganz P, Davies PF, Leopold JA, Gimbrone MA Jr, Alexander RW. (1986) Short- and long-term interactions of endothelium and vascular smooth muscle in coculture: effects on cyclic GMP production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(10):3552-6.
- Gekle M, Mildenberger S, Freudinger R and Silbernagl S (1995) Endosomal alkalinization reduces Jmax and Km

Bibliografía

- of albumin receptor-mediated endocytosis in OK cells. *Am J Physiol* **268**(5 Pt 2):F899-906.
- Geyer M and Wittinghofer A (1997) GEFs, GAPs, GDIs and effectors: taking a closer (3D) look at the regulation of Ras-related GTP-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol* **7**(6):786-792.
- Ghittoni R, Patrucci L, Pirozzi K, Pellegrini M, Lazzerini PE, Capecchi PL, Pasini FL and Baldari CT (2005) Simvastatin inhibits T-cell activation by selectively impairing the function of Ras superfamily GTPases. *Faseb J* **19**(6):605-607.
- Glover CJ, Goddard C, Felsted RL. (1988) N-myristoylation of p60src. Identification of a myristoyl-CoA:glycylpeptide N-myristoyltransferase in rat tissues. *Biochem J* **250**(2):485-91.
- Goldstein JL and Brown MS (1990) Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* **343**(6257):425-430.
- Gutierrez L, Magee AI, Marshall CJ, Hancock JF. (1989) Post-translational processing of p21ras is two-step and involves carboxyl-methylation and carboxy-terminal proteolysis. *EMBO J* **8**(4):1093-8.
- Hall A (2005) Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 5):891-895.
- Hancock JF, Magee AI, Childs JE, Marshall CJ. (1989) All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell* **57**(7):1167-77.
- Hansen SH, Sandvig K and van Deurs B. (1993) Clathrin and HA2 adaptors: effects of potassium depletion, hypertonic medium, and cytosol acidification. *J Cell Biol* **121**: 61-72
- Hartman HL, Hicks KA and Fierke CA (2005) Peptide specificity of protein prenyltransferases is determined mainly by reactivity rather than binding affinity. *Biochemistry* **44**(46):15314-15324.
- Hayes JD, Flanagan JU and Jowsey IR (2005) Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**:51-88.
- Hendrix MJ, Seftor EA, Chu YW, Trevor KT and Seftor RE (1996) Role of intermediate filaments in migration, invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* **15**(4):507-525.
- Hernández-Perera O, Pérez-Sala D, Navarro-Antolin J, Sánchez-Pascuala R, Hernández G, Díaz C and Lamas S (1998) Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Clin Invest* **101**(12):2711-2719.
- Hicks KA, Hartman HL and Fierke CA (2005) Upstream polybasic region in peptides enhances dual specificity for prenylation by both farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase type I. *Biochemistry* **44**(46):15325-15333.
- Holstein SA, Wohlford-Lenane CL and Hohl RJ (2002) Consequences of Mevalonate Depletion. DIFFERENTIAL TRANSCRIPTIONAL, TRANSLATIONAL, AND POST-TRANSLATIONAL UP-REGULATION OF Ras, Rap1a, RhoA, AND RhoB. *J Biol Chem* **277**(12):10678-10682.
- Honore S, Pasquier E and Braguer D (2005) Understanding microtubule dynamics for improved cancer therapy. *Cell Mol Life Sci* **62**(24):3039-3056.
- Horiuchi N and Maeda T (2006) Statins and bone metabolism. *Oral Dis* **12**(2):85-101.
- Huang M, Kamasani U and Prendergast GC (2006) RhoB facilitates c-Myc turnover by supporting efficient nuclear accumulation of GSK-3. *Oncogene* **25**(9):1281-1289.
- Jacobson JR, Dudek SM, Birukov KG, Ye SQ, Grigoryev DN, Girgis RE and Garcia JGN (2004) Cytoskeletal Activation and Altered Gene Expression in Endothelial Barrier Regulation by Simvastatin. *Am J Respir Cell Mol Biol* **30**(5):662-670.
- Jahner D and Hunter T (1991) The ras-related gene rhoB is an immediate-early gene inducible by v-Fps, epidermal growth factor, and platelet-derived growth factor in rat fibroblasts. *Mol Cell Biol* **11**(7):3682-3690.
- Jiang K, Sun J, Cheng J, Djeu JY, Wei S and Sefti S (2004) Akt mediates Ras downregulation of RhoB, a suppressor of transformation, invasion, and metastasis. *Mol Cell Biol* **24**(12):5565-5576.
- Kamasani U, Huang M, Duhadaway JB, Prochownik EV, Donover PS and Prendergast GC (2004) Cyclin B1 is a

- critical target of RhoB in the cell suicide program triggered by farnesyl transferase inhibition. *Cancer Res* **64**(22):8389-8396.
- Kato T, Fukushima M, Kurozumi S and Noyori R (1986) Antitumor activity of delta 7-prostaglandin A1 and delta 12-prostaglandin J2 in vitro and in vivo. *Cancer Res* **46**(7):3538-3542.
- Kino T, Kozasa T and Chrousos GP (2005) Statin-induced blockade of prenylation alters nucleocytoplasmic shuttling of GTP-binding proteins gamma2 and beta2 and enhances their suppressive effect on glucocorticoid receptor transcriptional activity. *Eur J Clin Invest* **35**(8):508-513.
- Kondo, M., Oya-Ito, T., Kumagai, T., Osawa, T., and Uchida, K. (2001) Cyclopentenone Prostaglandins as Potential Inducers of Intracellular Oxidative Stress. *J Biol Chem* **276**:12076-12083
- Krueger KM, Barbieri JT (1995) The family of bacterial ADP-ribosylating exotoxins. *Clin Microbiol Rev* **8**(1):34-47.
- Landino LM, Moynihan KL, Todd JV and Kennett KL (2004) Modulation of the redox state of tubulin by the glutathione/glutaredoxin reductase system. *Biochem Biophys Res Commun* **314**(2):555-560.
- Lee SY, Song EJ, Kim HJ, Kang HJ, Kim JH and Lee KJ (2001) Rac1 regulates heat shock responses by reorganization of vimentin filaments: identification using MALDI-TOF MS. *Cell Death Differ* **8**(11):1093-1102.
- Liao JK and Laufs U (2005) Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**:89-118.
- Lieber JG and Evans RM (1996) Disruption of the vimentin intermediate filament system during adipose conversion of 3T3-L1 cells inhibits lipid droplet accumulation. *J Cell Sci* **109** (Pt 13):3047-3058.
- Lin TN, Cheung WM, Wu JS, Chen JJ, Lin H, Chen JJ, Liou JY, Shyue SK and Wu KK (2006) 15d-prostaglandin J2 protects brain from ischemia-reperfusion injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**(3):481-487.
- Liu A, Cerniglia GJ, Bernhard EJ and Prendergast GC (2001) RhoB is required to mediate apoptosis in neoplastically transformed cells after DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(11):6192-6197.
- Liu A, Du W, Liu JP, Jessell TM and Prendergast GC (2000) RhoB alteration is necessary for apoptotic and anti-neoplastic responses to farnesyltransferase inhibitors. *Mol Cell Biol* **20**(16):6105-6113.
- Liu J, Sessa WC. (1994) Identification of covalently bound amino-terminal myristic acid in endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* **269**(16):11691-4.
- Lodish H, Zipursky L, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. (2000) *Molecular Cell Biology* (fourth edition) W. H. Freeman and Company, New York.
- Maltese WA and Sheridan KM (1987) Isoprenylated proteins in cultured cells: subcellular distribution and changes related to altered morphology and growth arrest induced by mevalonate deprivation. *J Cell Physiol* **133**(3):471-481.
- Mallis RJ, Buss JE and Thomas JA (2001) Oxidative modification of H-ras: S-thiolation and S-nitrosylation of reactive cysteines. *Biochem J* **355**(Pt 1):145-153.
- Martínez-Ruiz A, Villanueva L, Gonzalez de Orduna C, López-Ferrer D, Higueras MA, Tarin C, Rodríguez-Crespo I, Vázquez J and Lamas S (2005) S-nitrosylation of Hsp90 promotes the inhibition of its ATPase and endothelial nitric oxide synthase regulatory activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(24):8525-8530.
- Matozaki T, Nakanishi H and Takai Y (2000) Small G-protein networks: their crosstalk and signal cascades. *Cell Signal* **12**(8):515-524.
- Maurer-Stroh S, Washietl S and Eisenhaber F (2003) Protein prenyltransferases. *Genome Biol* **4**(4):212.
- Mazieres J, Antonia T, Daste G, Muro-Cacho C, Berchery D, Tillement V, Pradines A, Sebti S and Favre G (2004) Loss of RhoB expression in human lung cancer progression. *Clin Cancer Res* **10**(8):2742-2750.
- Mazieres J, Tillement V, Allal C, Clanet C, Bobin L, Chen Z, Sebti SM, Favre G and Pradines A (2005) Geranyl-

Bibliografia

- geranylated, but not farnesylated, RhoB suppresses Ras transformation of NIH-3T3 cells. *Exp Cell Res* **304**(2):354-364.
- McTaggart SJ (2006) Isoprenylated proteins. *Cell Mol Life Sci* **63**(3):255-267.
- Miaczynska M and Zerial M (2002) Mosaic organization of the endocytic pathway. *Exp Cell Res* **272**(1):8-14.
- Michaelson D and Philips M (2006) The use of GFP to localize Rho GTPases in living cells. *Methods Enzymol* **406**:296-315.
- Michaelson D, Silletti J, Murphy G, D'Eustachio P, Rush M and Philips MR (2001) Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding. *J Cell Biol* **152**(1):111-126.
- Miida T, Hirayama S and Nakamura Y (2004) Cholesterol-independent effects of statins and new therapeutic targets: ischemic stroke and dementia. *J Atheroscler Thromb* **11**(5):253-264.
- Moon SY and Zheng Y (2003) Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol* **13**(1):13-22.
- Murakami M, Nakatani Y, Kuwata H and Kudo I (2000) Cellular components that functionally interact with signaling phospholipase A(2)s. *Biochim Biophys Acta* **1488**(1-2):159-166.
- Murphy RC and Zarini S (2002) Glutathione adducts of oxyeicosanoids. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**:471-482.
- Nakagami H, Jensen KS and Liao JK (2003) A novel pleiotropic effect of statins: prevention of cardiac hypertrophy by cholesterol-independent mechanisms. *Ann Med* **35**(6):398-403.
- Narumiya H, Sasaki S, Kuwahara N, Irie H, Kusaba T, Kameyama H, Tamagaki K, Hatta T, Takeda K and Matsubara H (2004) HMG-CoA reductase inhibitors up-regulate anti-aging klotho mRNA via RhoA inactivation in IMCD3 cells. *Cardiovasc Res* **64**(2):331-336.
- Narumiya S and Fukushima M (1986) Site and mechanism of growth inhibition by prostaglandins. I. Active transport and intracellular accumulation of cyclopentenone prostaglandins, a reaction leading to growth inhibition. *J Pharmacol Exp Ther* **239**(2):500-505.
- Narumiya S, Ohno K, Fukushima M and Fujiwara M (1987) Site and mechanism of growth inhibition by prostaglandins. III. Distribution and binding of prostaglandin A2 and delta 12-prostaglandin J2 in nuclei. *J Pharmacol Exp Ther* **242**(1):306-311.
- Noyori R and Suzuki M (1993) Organic synthesis of prostaglandins: advancing biology. *Science* **259**(5091):44-45.
- Nystrom T (2005) Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *Embo J* **24**(7):1311-1317.
- Oliva JL, Pérez-Sala D, Castrillo A, Martínez N, Cañada FJ, Bosca L and Rojas JM (2003) The cyclopentenone 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 binds to and activates H-Ras. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(8):4772-4777.
- Osman H, Mazet JL, Maume G and Maume BF (1997) Geranylgeranyl as well as farnesyl moiety is transferred to Ras p21 overproduced in adrenocortical cells transformed by c-Ha-rasEJ oncogene. *Biochem Biophys Res Commun* **231**(3):789-792.
- Paramio JM and Jorcano JL (2002) Beyond structure: do intermediate filaments modulate cell signalling? *Biosays* **24**(9):836-844.
- Pérez-Sala D, Cernuda-Morollón E and Cañada FJ (2003) Molecular basis for the direct inhibition of AP-1 DNA binding by 15-deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2. *J Biol Chem* **278**(51):51251-51260.
- Pérez-Sala D, Cernuda-Morollón E, Pineda-Molina E and Cañada FJ (2002) Contribution of covalent protein modification to the antiinflammatory effects of cyclopentenone prostaglandins. *Ann N Y Acad Sci* **973**:533-536.

- Petersen DR and Doorn JA (2004) Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets. *Free Radic Biol Med* **37**(7):937-945.
- Piconi L, Quagliaro L and Ceriello A (2003) Oxidative stress in diabetes. *Clin Chem Lab Med* **41**(9):1144-1149.
- Pillay CS, Elliott E and Dennison C (2002) Endolysosomal proteolysis and its regulation. *Biochem J* **363**(Pt 3):417-429.
- Repko EM and Maltese WA (1989) Post-translational isoprenylation of cellular proteins is altered in response to mevalonate availability. *J Biol Chem* **264**(17):9945-9952.
- Requena JR, Fu MX, Ahmed MU, Jenkins AJ, Lyons TJ and Thorpe SR (1996) Lipoxidation products as biomarkers of oxidative damage to proteins during lipid peroxidation reactions. *Nephrol Dial Transplant* **11 Suppl**:48-53.
- Resh MD (2004) Membrane targeting of lipid modified signal transduction proteins. *Subcell Biochem* **37**:217-232.
- Rice-Evans C, Burdon R. (1993) Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Prog Lipid Res* **32**(1):71-110.
- Ridley AJ (2001) Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol* **11**(12):471-477.
- Roberts LJ, 2nd and Morrow JD (1994) Isoprostanes. Novel markers of endogenous lipid peroxidation and potential mediators of oxidant injury. *Ann N Y Acad Sci* **744**:237-242.
- Rodríguez-Crespo I, Moenne-Loccoz P, Loehr TM and Ortiz de Montellano PR (1997) Endothelial nitric oxide synthase: modulations of the distal heme site produced by progressive N-terminal deletions. *Biochemistry* **36**(28):8530-8538.
- Rogers KR, Morris CJ, Blake DR. (1989) Cytoskeletal rearrangement by oxidative stress. *Int J Tissue React* **11**(6):309-14.
- Rogers KR, Morris CJ, Blake DR. (1991) Oxidation of thiol in the vimentin cytoskeleton. *Biochem J* **275**(Pt 3):789-91.
- Rossi A, Elia G and Santoro MG (1997) Inhibition of nuclear factor kappa B by prostaglandin A1: an effect associated with heat shock transcription factor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(2):746-750.
- Rossi A, Kapahi P, Natoli G, Takahashi T, Chen Y, Karin M and Santoro MG (2000) Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of IkappaB kinase. *Nature* **403**(6765):103-108.
- Sambrook J and Russel DW. (2001) *Molecular Cloning, a laboratory manual* (third edition) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sánchez-Gómez FJ, Cernuda-Morollón E, Stamatakis K and Pérez-Sala D (2004) Protein thiol modification by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 addition in mesangial cells: role in the inhibition of pro-inflammatory genes. *Mol Pharmacol* **66**(5):1349-1358.
- Sandilands E, Cans C, Fincham VJ, Brunton VG, Mellor H, Prendergast GC, Norman JC, Superti-Furga G and Frame MC (2004) RhoB and actin polymerization coordinate Src activation with endosome-mediated delivery to the membrane. *Dev Cell* **7**(6):855-869.
- Saura M, Zaragoza C, Diaz-Cazorla M, Hernandez-Perera O, Eng E, Lowenstein CJ, Pérez-Sala D and Lamas S (1998) Involvement of transcriptional mechanisms in the inhibition of NOS2 expression by dexamethasone in rat mesangial cells. *Kidney Int* **53**(1):38-49.
- Schaur RJ (2003) Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. *Mol Aspects Med* **24**(4-5):149-159.
- Schmitz AA, Govek EE, Bottner B and Van Aelst L (2000) Rho GTPases: signaling, migration, and invasion. *Exp Cell Res* **261**(1):1-12.
- Scozzafava A, Casini A and Supuran CT (2002) Targeting cysteine residues of biomolecules: new approaches

Bibliografía

- for the design of antiviral and anticancer drugs. *Curr Med Chem* **9**(12):1167-1185.
- Shan B, Medina JC, Santha E, Frankmoelle WP, Chou TC, Learned RM, Narbut MR, Stott D, Wu P, Jaen JC, Rosen T, Timmermans PB and Beckmann H (1999) Selective, covalent modification of beta-tubulin residue Cys-239 by T138067, an antitumor agent with in vivo efficacy against multidrug-resistant tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(10):5686-5691.
- Sharma M, Pampinella F, Nemes C, Benharouga M, So J, Du K, Bache KG, Papsin B, Zerangue N, Stenmark H and Lukacs GL (2004) Misfolding diverts CFTR from recycling to degradation: quality control at early endosomes. *J Cell Biol* **164**(6):923-933.
- Sinensky M (2000) Recent advances in the study of prenylated proteins. *Biochim Biophys Acta* **1484**(2-3):93-106.
- Sinensky M, Beck LA, Leonard S and Evans R (1990) Differential inhibitory effects of lovastatin on protein isoprenylation and sterol synthesis. *J Biol Chem* **265**(32):19937-19941.
- Smotrys JE and Linder ME (2004) Palmitoylation of intracellular signaling proteins: regulation and function. *Annu Rev Biochem* **73**:559-587.
- Smotrys JE, Schoenfish MJ, Stutz MA and Linder ME (2005) The vacuolar DHHC-CRD protein Pfa3p is a protein acyltransferase for Vac8p. *J Cell Biol* **170**(7):1091-1099.
- Solski PA, Helms W, Keely PJ, Su L, Der CJ. (2002) RhoA biological activity is dependent on prenylation but independent of specific isoprenoid modification. *Cell Growth Differ* **13**(8):363-73.
- Stadtman ER and Berlett BS (1998) Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metab Rev* **30**(2):225-243.
- Straus DS and Glass CK (2001) Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets. *Med Res Rev* **21**(3):185-210.
- Strelkov SV, Herrmann H and Aebi U (2003) Molecular architecture of intermediate filaments. *Bioessays* **25**(3):243-251.
- Swanson KM and Hohl RJ (2006) Anti-cancer therapy: targeting the mevalonate pathway. *Curr Cancer Drug Targets* **6**(1):15-37.
- Swarthout JT, Lobo S, Farh L, Croke MR, Greentree WK, Deschenes RJ and Linder ME (2005) DHHC9 and GCP16 constitute a human protein fatty acyltransferase with specificity for H- and N-Ras. *J Biol Chem* **280**(35):31141-31148.
- Takai Y, Sasaki T and Matozaki T (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* **81**(1):153-208.
- Thayer AM (2004) Blockbuster model breaking down. Pharma industry reaches new sales peak, despite rising costs and bigger challenges for drug R&D. *Modern Drug Discovery* **7**(6):23-24.
- Thevenon C, Guichardant M and Lagarde M (2001) Gas chromatographic-mass spectrometric measurement of 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2), the peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand, in urine. *Clin Chem* **47**(4):768-770.
- Toivola DM, Tao GZ, Habtezion A, Liao J and Omary MB (2005) Cellular integrity plus: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments. *Trends Cell Biol* **15**(11):608-617.
- Tong H, Holstein SA and Hohl RJ (2005) Simultaneous determination of farnesyl and geranylgeranyl pyrophosphate levels in cultured cells. *Anal Biochem* **336**(1):51-59.
- Tovar D, Faye JC and Favre G (2003) Cloning of the human RHOB gene promoter: characterization of a VNTR sequence that affects transcriptional activity. *Genomics* **81**(5):525-530.
- Uchida K. (2000) Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med.* **28**(12):1685-96.
- Uy R and Wold F (1977) Posttranslational covalent modification of proteins. *Science* **198**(4320):890-6.
- Varughese GI, Patel JV, Lip GY and Varma C (2006) Novel concepts of statin therapy for cardiovascular risk

- reduction in hypertension. *Curr Pharm Des* **12**(13):1593-1609.
- Veit M, Dietrich LE and Ungermann C (2003) Biochemical characterization of the vacuolar palmitoyl acyltransferase. *FEBS Lett* **540**(1-3):101-105.
- Walsh CT (2006) *Posttranslational Modification of Proteins*: Expanding nature's inventory. Roberts & Co. publishers, Greenwood Village.
- Wang DA and Sefti SM (2005) Palmitoylated cysteine 192 is required for RhoB tumor-suppressive and apoptotic activities. *J Biol Chem* **280**(19):19243-19249.
- Ward C, Dransfield I, Murray J, Farrow SN, Haslett C and Rossi AG (2002) Prostaglandin D2 and its metabolites induce caspase-dependent granulocyte apoptosis that is mediated via inhibition of I kappa B alpha degradation using a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-independent mechanism. *J Immunol* **168**(12):6232-6243.
- Webb Y, Hermida-Matsumoto L and Resh MD (2000) Inhibition of protein palmitoylation, raft localization, and T cell signaling by 2-bromopalmitate and polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem* **275**(1):261-270.
- Wennerberg K and Der CJ (2004) Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci* **117** (Pt 8):1301-1312.
- Westmark CJ, Bartleson VB and Malter JS (2005) RhoB mRNA is stabilized by HuR after UV light. *Oncogene* **24** (3):502-511.
- Wheeler AP and Ridley AJ (2004) Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Exp Cell Res* **301**(1):43-49.
- Wherlock M, Gampel A, Futter C and Mellor H (2004) Farnesyltransferase inhibitors disrupt EGF receptor traffic through modulation of the RhoB GTPase. *J Cell Sci* **117**(Pt 15):3221-3231.
- Whyte DB, Kirschmeier P, Hockenberry TN, Nunez-Oliva I, James L, Catino JJ, Bishop WR and Pai JK (1997) K- and N-Ras are geranylgeranylated in cells treated with farnesyl protein transferase inhibitors. *J Biol Chem* **272**(22):14459-14464.
- wikipedia.org (2006) "Posttranslational modifications".
- Willumsen BM, Cox AD, Solski PA, Der CJ and Buss JE (1996) Novel determinants of H-Ras plasma membrane localization and transformation. *Oncogene* **13**(9):1901-1909.
- Zeng PY, Rane N, Du W, Chintapalli J and Prendergast GC (2003) Role for RhoB and PRK in the suppression of epithelial cell transformation by farnesyltransferase inhibitors. *Oncogene* **22**(8):1124-1134.
- Zhang FL, Kirschmeier P, Carr D, James L, Bond RW, Wang L, Patton R, Windsor WT, Syto R, Zhang R and Bishop WR (1997) Characterization of Ha-ras, N-ras, Ki-Ras4A, and Ki-Ras4B as in vitro substrates for farnesyl protein transferase and geranylgeranyl protein transferase type I. *J Biol Chem* **272**(15):10232-10239.
- Zhang X, Lu L, Dixon C, Wilmer W, Song H, Chen X and Rovin BH (2004) Stress protein activation by the cyclopentenone prostaglandin 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 in human mesangial cells. *Kidney Int* **65**(3):798-810.
- Zmijewski JW, Landar A, Watanabe N, Dickinson DA, Noguchi N and Darley-Usmar VM (2005) Cell signalling by oxidized lipids and the role of reactive oxygen species in the endothelium. *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 6):1385-1389.

ANEXO

Publicaciones derivadas de esta tesis

Identification of Novel Protein Targets for Modification by 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂ in Mesangial Cells Reveals Multiple Interactions with the Cytoskeleton

Konstantinos Stamatakis, Francisco J. Sánchez-Gómez, and Dolores Pérez-Sala

Departamento de Estructura y Función de Proteínas, Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid, Spain

The cyclopentenone prostaglandin 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ (15d-PGJ₂) has been shown to display protective effects against renal injury or inflammation. In cultured mesangial cells (MC), 15d-PGJ₂ inhibits the expression of proinflammatory genes and modulates cell proliferation. Therefore, cyclopentenone prostaglandins (cyPG) have been envisaged as a promise in the treatment of renal disease. The effects of 15d-PGJ₂ may be dependent on or independent from its role as a peroxisome proliferator-activated receptor agonist. It was shown recently that an important determinant for the peroxisome proliferator-activated receptor-independent effects of 15d-PGJ₂ is the capacity to modify proteins covalently and alter their function. However, a limited number of protein targets have been identified to date. Herein is shown that a biotinylated derivative of 15d-PGJ₂ recapitulates the effects of 15d-PGJ₂ on the stress response and inhibition of inducible nitric oxide synthase levels and forms stable adducts with proteins in intact MC. Biotinylated 15d-PGJ₂ was then used to identify proteins that potentially are involved in cyPG biologic effects. Extracts from biotinylated 15d-PGJ₂-treated MC were separated by two-dimensional electrophoresis, and the spots of interest were analyzed by mass spectrometry. Identified targets include proteins that are regulated by oxidative stress, such as heat-shock protein 90 and nucleoside diphosphate kinase, as well as proteins that are involved in cytoskeletal organization, such as actin, tubulin, vimentin, and tropomyosin. Biotinylated 15d-PGJ₂ binding to several targets was confirmed by avidin pull-down. Consistent with these findings, 15d-PGJ₂ induced early reorganization of vimentin and tubulin in MC. The cyclopentenone moiety and the presence of cysteine were important for vimentin rearrangement. These studies may contribute to the understanding of the mechanism of action and therapeutic potential of cyPG.

J Am Soc Nephrol 17: 89–98, 2006. doi: 10.1681/ASN.2005030329

Prostaglandins with cyclopentenone structure are endogenous eicosanoids that are generated by nonenzymatic dehydration of arachidonic acid metabolites. Cyclopentenone prostaglandins (cyPG) exert varied biologic actions, including inhibition of cell proliferation in several cancer cell lines and anti-inflammatory and antiviral activities. The molecular basis for these varied effects is multiple. The common feature of these prostaglandins is the presence of an unsaturated carbonyl group in the cyclopentane ring (cyclopentenone; see Figure 1). This structure was found early to be an important requirement for the antitumoral and antiviral effects of cyPG (1). This moiety confers cyPG the capacity to form covalent adducts with thiol groups in glutathione or in proteins by Michael addition (Figure 1). Modification of critical cysteine residues in signaling proteins can modulate cell function. Moreover, some cyPG, such as 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ (15d-PGJ₂), may act as ligands for the transcription factors of the nuclear receptor superfamily known as peroxisome proliferator-activated

receptors (PPAR), which have been reported to play important roles in the regulation of lipid metabolism (2) and in cardiovascular and renal pathophysiology (3,4). For these reasons, the potential use of cyPG as therapeutic agents has been explored in numerous studies using cellular and animal models of inflammation or injury. Protective effects of micromolar concentrations of 15d-PGJ₂ against ischemia-reperfusion injury and multiple-organ failure caused by endotoxic shock have been reported (5–7). These beneficial effects were associated with an inhibition of the inflammatory response and of the activation of transcription factors NF- κ B and activator protein 1 (AP-1). Anti-inflammatory effects of 15d-PGJ₂ have also been evidenced in cultured cells. In mesangial cells (MC), 15d-PGJ₂ inhibited cytokine-elicited induction of cyclo-oxygenase-2 (8) and monocyte chemoattractant protein-1 (9). By using an analog of 15d-PGJ₂ that retains full PPAR agonist activity but lacks the cyclopentenone structure, we showed recently that the capacity of 15d-PGJ₂ to modify covalently cellular thiols plays a key role in the inhibition of proinflammatory genes such as inducible nitric oxide (iNOS), cyclo-oxygenase-2, and ICAM-1 in MC (10). Several proteins that are involved in the activation of NF- κ B and AP-1, as well as components of the transcription factors themselves, have been identified as targets for modification by 15d-PGJ₂. Modification of IKK reduces NF- κ B activation (11,12), whereas 15d-PGJ₂ addition to critical cysteines in the

Received March 30, 2005. Accepted October 1, 2005.

Published online ahead of print. Publication date available at www.jasn.org.

Address correspondence to: Dr. Dolores Pérez-Sala, Departamento de Estructura y Función de Proteínas, Centro de Investigaciones Biológicas, C.S.I.C., Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain. Phone: +34-91-5346623; Fax: +34-91-5360432; E-mail: dperezsala@cib.csic.es

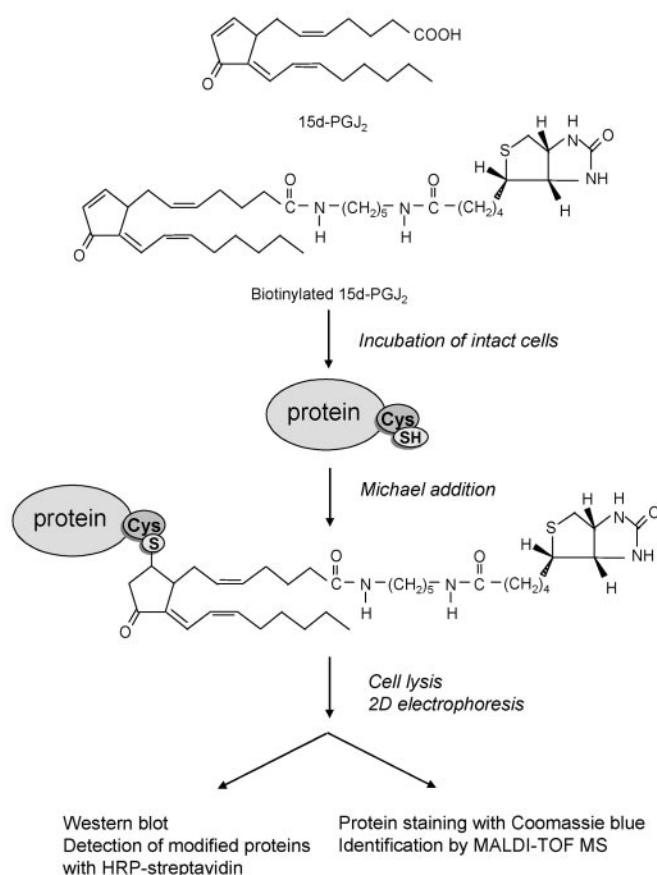


Figure 1. Strategy for the detection and identification of proteins that were modified by biotinylated 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ (15d-PGJ₂). Intact mesangial cells (MC) are incubated with the biotinylated analog of 15d-PGJ₂. This analog binds to cysteine residues in certain proteins by Michael addition. Duplicate samples from cell lysates that contained modified proteins are analyzed in parallel by two-dimensional (2D) electrophoresis followed by Western blot or total protein staining. Biotin-positive spots are analyzed by mass spectrometry techniques.

DNA binding domains of NF- κ B and AP-1 proteins results in inhibition of DNA binding (13,14). CyPG also modulate cell proliferation. In MC, a biphasic effect of 15d-PGJ₂ has been reported, with low concentrations promoting cell proliferation and higher concentrations inducing cell death (15). On this basis, a potential for the use of cyPG in the restoration of glomerular architecture in progressive glomerular disease has been postulated (15). Another important feature of the effect of 15d-PGJ₂ is the induction of a heat-shock response in many cell types, including MC (16,17). This stress response, which requires the cyclopentenone moiety, could contribute to the beneficial effects of 15d-PGJ₂ in renal cell injury during inflammation or ischemia (17). Therefore, the modification of protein thiols by cyPG, which could be referred to as protein prostanylation, seems to play an important role in 15d-PGJ₂ protective effects. Nevertheless, the potential for cytotoxic effects of 15d-PGJ₂ should also be considered. The identification of proteins that are susceptible to be modified by cyPG addition could help define novel targets for therapeutic intervention and identify

potential adverse effects. In a previous study, we observed the presence of multiple targets for modification by biotinylated 15d-PGJ₂ in MC (10). Here we address the identification of the modified proteins by proteomic approaches (Figure 1) and report the binding of biotinylated 15d-PGJ₂ to several previously unknown targets. In addition, we provide evidence for the potential involvement of protein prostanylation in the regulation of MC cytoskeletal organization.

Materials and Methods

Materials

15d-PGJ₂ was from Calbiochem-Novabiochem (San Diego, CA) or from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). 15d-PGJ₂ biotinylated at the carboxyl group was provided by Dr. F.J. Cañada (Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid, Spain). Recombinant human IL-1 β (5×10^7 U/mg) was from Roche Diagnostics S.L. (Barcelona, Spain). TNF- α was from Serotec (Oxford, UK). Polyclonal anti-iNOS (sc-651) and anti-RhoGDI (sc-360) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit Ig were from Dako (Glostrup, Denmark). Anti-vimentin, HRP-conjugated streptavidin, and enhanced chemiluminescence reagents were from Amersham Biosciences (Barcelona, Spain). Anti-heat-shock protein 90 (anti-Hsp90) was from Stressgen (Victoria, BC, Canada). The monoclonal anti-tubulin antibody was the gift of Dr. I. Barasoain (Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid, Spain). Secondary antibodies for immunofluorescence anti-rabbit-Texas Red, anti-mouse-Alexa488, and Phalloidin-Alexa546 were from Molecular Probes (Invitrogen Life Technologies S.A., Barcelona, Spain). All other reagents were of the highest purity available from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Cell Culture

Cell culture media and supplements were from Invitrogen. Rat MC were obtained as reported earlier (18). Cells were grown in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin. Throughout this study, passages 7 to 18 were used. Cell treatments were performed in serum-free medium. CyPG were added in DMSO. Final DMSO concentration was 0.1% (vol/vol). Control cells received an equivalent amount of DMSO. For cytokine stimulation, confluent MC were incubated in serum-free medium for 24 h before the addition of a combination of 3 ng/ml IL-1 β plus 37 ng/ml TNF- α .

Incorporation of Biotinylated 15d-PGJ₂ into MC Proteins

MC were incubated with biotinylated 15d-PGJ₂ for 2 h in serum-free medium. These conditions were found to yield maximal protein labeling. Lysates were obtained by disrupting cells in 50 mM Tris (pH 7.5); 0.1 mM EDTA; 0.1 mM EGTA; 0.1 mM β -mercaptoethanol; 0.5% SDS that contained 2 μ g/ml of each of the protease inhibitors leupeptin, pepstatin A, and aprotinin; and 1.3 mM Pefablock (Roche). Biotin incorporation was assessed by Western blot.

Protein Electrophoresis and Identification

For two-dimensional electrophoresis, cells were lysed in 20 mM Hepes (pH 7.2), 50 mM NaCl, 1% NP-40, 0.3% sodium deoxycholate, and 0.1% SDS plus protease inhibitors. Aliquots of cell lysates that contained 600 μ g of protein were precipitated with 10% TCA, resuspended in 260 μ l of IEF sample buffer (4% CHAPS, 2 M thiourea, 7 M urea, 100 mM dithiothreitol, and 0.5% Bio-lute ampholytes), split in two aliquots and loaded on ReadyStrip IPG Strips (pH 3 to 10; Bio-Rad, Hercules, CA) for isoelectric focusing on a Protean IEF cell (Bio-Rad),

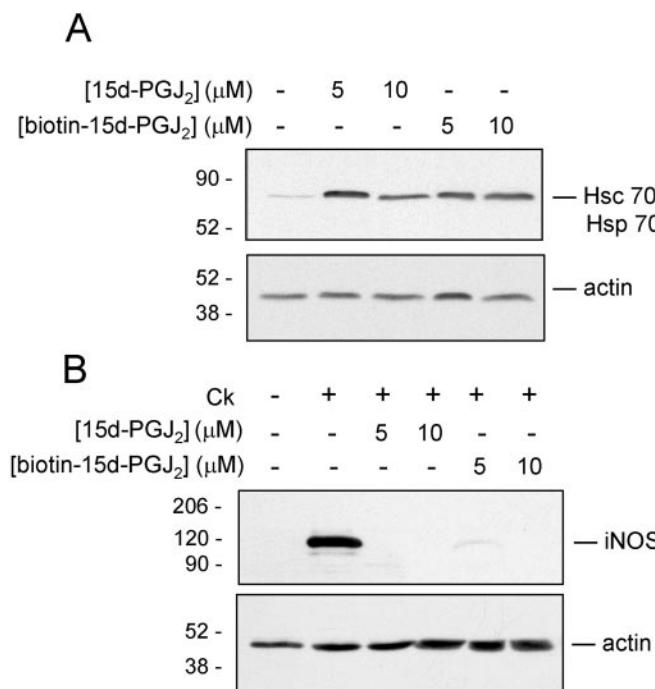


Figure 2. Effects of biotinylated 15d-PGJ₂ in MC. (A) MC were incubated in the presence of the indicated concentrations of cyclopentenone prostaglandins (cyPG) or vehicle for 16 h and the levels of constitutive and inducible heat-shock protein 70 (HSC70/Hsp70) were assessed by Western blot. (B) The induction of inducible nitric oxide synthase (iNOS) was elicited by treatment of MC with a cytokine mixture (Ck) for 16 h. CyPG were added to the medium 2 h before the addition of cytokines. Levels of iNOS were detected by Western blot. The levels of actin were used as a control for intersample variability. Results shown are representative of three experiments with similar results.

following the instructions of the manufacturer. For the second dimension, strips were loaded on duplicate 15% polyacrylamide SDS gels. Gels were stained with GelCode Blue (Pierce, Rockford, IL). One of the gels was subsequently transferred to Immobilon P membrane (Millipore, Bedford, MA) and used for localization of biotinylated 15d-PGJ₂-labeled spots by Western blot (10). The Coomassie-stained spots that co-migrated with the biotin-positive proteins were excised from the duplicate gel. The accuracy of the procedure was confirmed by the disappearance of the biotin signal in the Western blot of the gel used for picking. The confirmed spots were subjected to in-gel digestion with trypsin (19) and analysis by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) using α-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid as the matrix. Mass spectra were calibrated internally using the peptide mix resulting from trypsin autolysis. Proteins were identified with the MASCOT (Matrix Science, London, UK) searching algorithms using the monoisotopic peptide masses and a peptide mass tolerance of ±50 ppm. When indicated, protein identity was confirmed by MALDI-TOF MS-MS analysis of selected peptides using the MALDI-tandem TOF mass spectrometer 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, Framingham, MA).

Avidin Pull-Down Assays

MC were incubated in the presence of 5 μM 15d-PGJ₂ or biotinylated 15d-PGJ₂. Cells were lysed, and biotinylated proteins were purified by

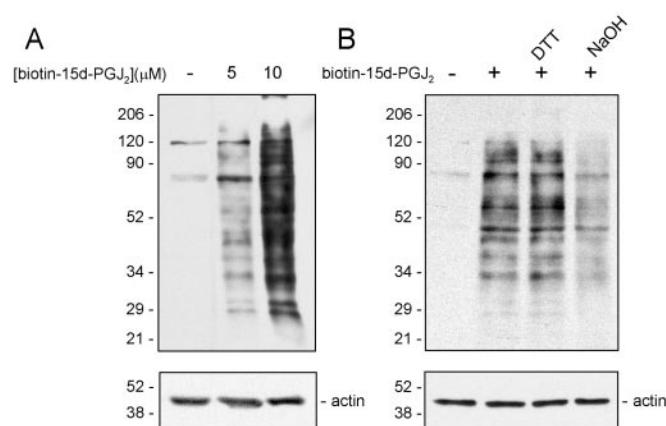


Figure 3. Labeling of MC proteins with biotinylated 15d-PGJ₂. (A) MC were incubated with biotinylated 15d-PGJ₂ as above, and the incorporation of the biotin label into MC proteins was assessed by Western blot and detection with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated streptavidin using enhanced chemiluminescence. (B) Lysates from control or biotinylated 15d-PGJ₂-treated cells were incubated in the presence of 10 mM dithiothreitol or 0.1 N NaOH for 30 min at room temperature. After desalting by gel filtration, lysates were analyzed by SDS-PAGE and Western blot, as above. To ensure even protein loading, membranes were stripped and rehybridized with anti-actin antibody. Results shown are representative of three assays.

adsorption onto Neutravidin beads (Pierce) following the manufacturer's instructions. Proteins of interest were detected in the eluate by Western blot.

Fluorescence Microscopy

Cells that were grown on glass coverslips were treated with various agents for 2 h. For immunofluorescence, cells were fixed with 3.5% formaldehyde and permeabilized with 0.1% Triton X-100. After blocking with 1% BSA, they were incubated with primary antibodies at 1:200 dilution. Subsequently, coverslips were washed with PBS and incubated with secondary antibodies at 1:200 dilution and/or with DAPI for 1 h. Coverslips were mounted with Fluorsafe (Calbiochem) and images were obtained with a Leica TCS-SP2-AOBS-UV confocal inverted microscope, using a ×63/1.4 objective.

Plasmids and Transfections

Full-length human cDNA vimentin (Origene, Rockville, MD) was cloned into the EcoRI, SmaI sites of the pEGFP-C1 vector (Clontech, Palo Alto, CA) to obtain GFP-vimentin-wt. Cysteine 328 was mutated to serine using the Quickchange XL site-directed mutagenesis kit from Stratagene (La Jolla, CA) and primers forward 5'-GGTCAGTCCTCACCTCTGAAGTGATGCC-3' and reverse 5'-GGGCATCCACTTCAGAGGTGAGGGACTGCACC-3' to obtain GFP-vimentin-C328S. Cells that were grown on glass coverslips were transfected with constructs that were purified with Endofree plasmid kit (Qiagen, Valencia, CA) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). After 24 h, cells were treated as described above.

Results

Effects of Biotinylated 15d-PGJ₂ on the Stress and Inflammatory Responses of MC

The protective effects of cyPG have been attributed to their ability to induce a cell stress response and attenuate the inflam-

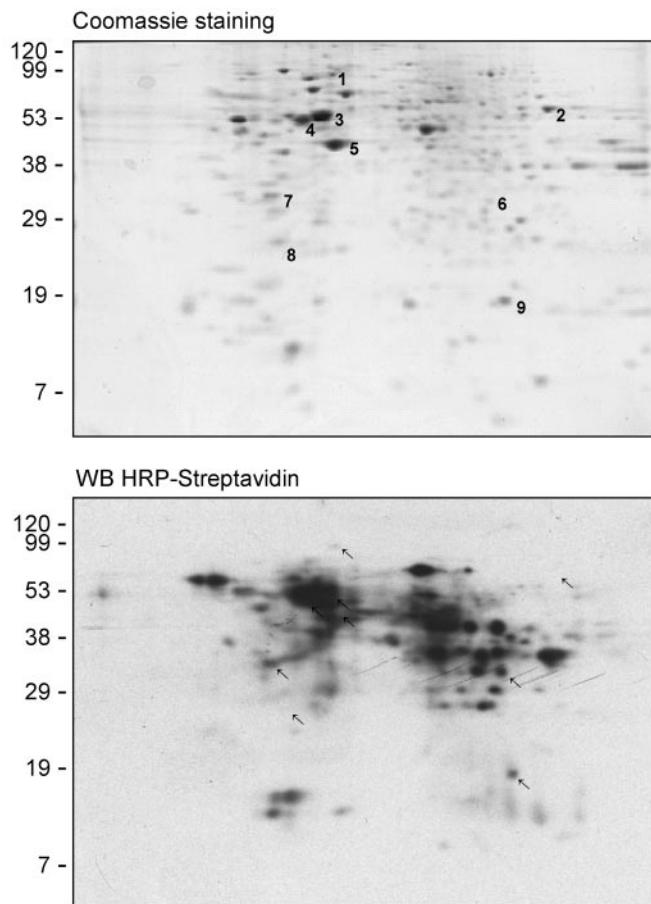


Figure 4. Analysis of biotinylated 15d-PGJ₂-modified proteins by 2D electrophoresis. Cell lysates from MC incubated with 5 μ M biotinylated 15d-PGJ₂ for 2 h were analyzed by 2D electrophoresis as described in Materials and Methods. (Upper panel) Total protein staining with colloidal Coomassie blue. (Lower panel) Western blot and detection of modified proteins by incubation with HRP-streptavidin. Spots that were excised are indicated by numbers in the upper panel and the position of the co-migrating spots in the lower panel is indicated by arrowheads. A similar pattern of biotin staining was obtained in five independent experiments.

matory response. Covalent protein modification is important for these effects (10,20). To substantiate the use of biotinylated 15d-PGJ₂ as a tool to identify potential targets for cyPG action, we assessed its ability to mimic the effects of 15d-PGJ₂. The induction of Hsp70 is a hallmark of the heat-shock response. Therefore, we assessed Hsp70 protein levels in cyPG-treated MC. As previously reported (17), micromolar concentrations of 15d-PGJ₂ potently elicited Hsp70 expression. This effect was mimicked by the biotinylated analog (Figure 2A). We have previously shown that micromolar concentrations of 15d-PGJ₂ abolish cytokine-elicited iNOS induction in MC (10). Treatment of MC with biotinylated 15d-PGJ₂ also provoked a marked inhibition of iNOS levels (95% reduction with 5 μ M and undetectable levels with 10 μ M biotinylated 15d-PGJ₂, respectively; Figure 2B). These observations show that the biotinylated ana-

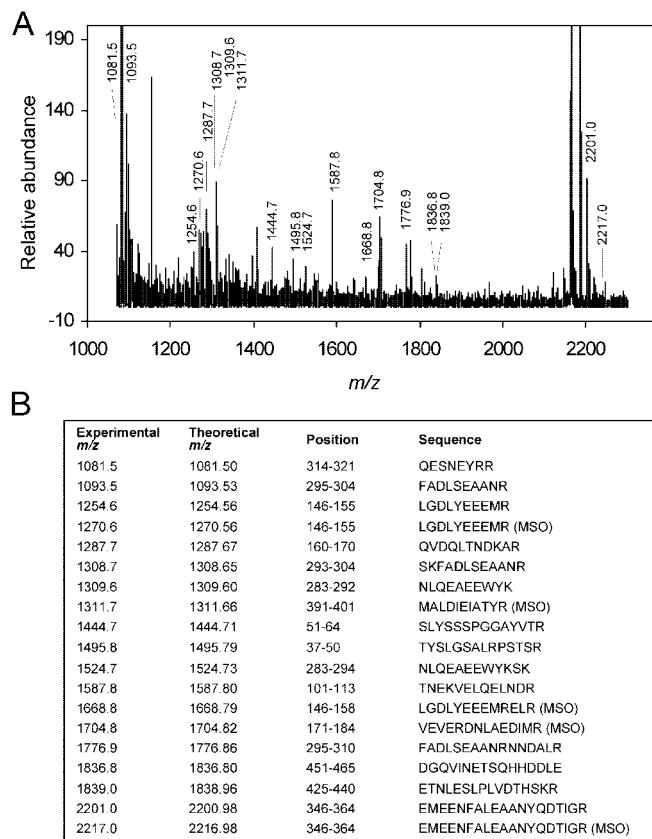


Figure 5. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) analysis of spot 3. Spot 3 from Figure 4 was digested in gel with trypsin, and the resulting peptides were analyzed by MALDI-TOF MS as detailed in the experimental section. (A) Typical mass spectrum from a representative experiment. (B) List of the monoisotopic masses of some of the peptides identified showing their position in the vimentin sequence (MSO, compatible with oxidation of methionine residues).

log recapitulates the anti-inflammatory and stress-inducing effects of 15d-PGJ₂ in MC.

Binding of Biotinylated 15d-PGJ₂ to Cellular Proteins in Intact MC

The effects of biotinylated 15d-PGJ₂ on MC responses were associated with the modification of cellular proteins (Figure 3A). Binding of cyPG to cellular proteins occurs through the formation of adducts with free cysteine residues by Michael addition (Figure 1). Using radioactively labeled cyPG, this binding has been shown to be stable under reducing conditions; however, it can be hydrolyzed by alkali (21). As shown in Figure 3B, binding of biotinylated 15d-PGJ₂ to proteins in MC lysates was resistant to treatment with 10 mM dithiothreitol, but it was clearly reduced after treatment with 0.1 N NaOH, thus showing the same susceptibility as the binding of non-modified cyPG. Taken together, these results support the use of biotinylated 15d-PGJ₂ as a tool to identify protein targets for

covalent modification potentially involved in the biologic effects of cyPG.

Identification of Biotinylated 15d-PGJ₂-Modified MC Proteins

To identify the proteins that are modified by 15d-PGJ₂ in MC, we analyzed lysates from biotinylated 15d-PGJ₂-treated cells by two-dimensional electrophoresis. The patterns that were given by Coomassie staining and detection of biotin with HRP-streptavidin are shown in Figure 4. After superimposition of both patterns, the Coomassie-stained proteins that coincided with the biotin-positive spots were excised and analyzed by tryptic digestion and MALDI-TOF MS. Figure 5 shows a representative MALDI-TOF mass spectrum and peptide mass fingerprinting analysis that corresponds to spot 3 from Figure 4, identified as vimentin. Table 1 displays a list of the proteins identified along with a summary of the identification data. As control for the selectivity of cyPG addition, we analyzed several spots that were clearly detected with Coomassie but gave no signal with HRP-streptavidin. However, several biotin-positive spots were detected by Western blot and could not be matched to any of the Coomassie-stained spots and may represent less abundant proteins that get modified in a high proportion.

The binding of biotinylated 15d-PGJ₂ to some of the proteins identified was confirmed by pull-down assays using Neutravidin-agarose. Figure 6 shows that Hsp90, vimentin, tubulin, and actin, present in lysates from MC that were treated with biotinylated 15d-PGJ₂, were selectively retained on avidin beads. In contrast, the abundant cytosolic protein RhoGDI was not detected in the avidin-binding fraction, thus suggesting that this protein is not a target for modification by cyPG. The various proteins that were found in the avidin-binding fraction were present in different proportions with respect to their

levels in total lysates. Vimentin and tubulin were the proteins retained in a higher proportion, whereas only a minor fraction of total Hsp90 was retained on avidin beads. This may reflect the different degree of modification of these targets by biotinylated 15d-PGJ₂.

Interactions of 15d-PGJ₂ with Cytoskeletal Proteins in MC

Several of the biotinylated 15d-PGJ₂-modified proteins identified are constituents of microfilaments, microtubules, or intermediate filaments and are involved in cell architecture and dynamics. Therefore, we explored the effect of 15d-PGJ₂ on MC cytoskeletal organization by immunofluorescence (Figure 7). Incubation of MC with 15d-PGJ₂ induced marked morphologic changes in the vimentin filament network. Control MC showed a typical vimentin pattern characterized by abundant fine filaments extending from the nuclear periphery toward the plasma membrane (Figure 7A). The position and the integrity of cell nuclei were shown by DAPI staining. Treatment with 15d-PGJ₂ resulted in the disappearance of vimentin filaments from the cell periphery and accumulation in the perinuclear region. For better evidencing this effect, cells were stained with an antibody against the cytosolic protein RhoGDI. This clearly showed the loss of vimentin staining from extensive areas of the cytoplasm. The organization of tubulin also showed early changes after treatment with 15d-PGJ₂, consisting of a reduction in the density and the length of microtubules, compatible with a disruption of the tubulin network. In contrast, actin fibers were not appreciably affected by 15d-PGJ₂ treatment under these conditions. The reorganization of vimentin and tubulin networks was not accompanied by changes in the levels of these proteins as assessed by Western blot (Figure 7B). It is interesting that 9,10-dihydro-15d-PGJ₂, an analog of 15d-PGJ₂ that

Table 1. Proteins identified by trypsin digestion and mass spectrometry^a

Spot	Protein	Biotin	Accession No.	Molecular Mass	Calculated pI	No. of Peptides Matched	Sequence Coverage (%)	Peptide Identified by msms
1	Hsp90	+	P34058	83475	5.06	9	9	—
2	Pyruvate kinase M2	—	A26186	58183	7.40	15	27	1462.9
3	Vimentin	+	P31000	53626	5.06	51	78	—
4	Tubulin	+	A25113	50361	4.79	36	62	—
5	Actin	+	NP112406	41736	5.26	12	38	—
6	Methylthioadenosine phosphorylase	+	BAB23788	31612	6.71	11	44	—
7	Tropomyosin	+	S34124	29245	4.75	8	34	—
8	IgE-dependent histamine releasing factor	—	S00775	19564	4.76	7	26	1213.6
9	Nucleoside diphosphate kinase	+	A38369	17386	6.92	8	63	1175.6

^aSpots that were excised from the gel shown in Figure 4 were identified by tryptic digestion and matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Shown are the spot number, name of the identified protein, whether it showed positive biotin staining, the accession number for the protein in the NCBI database, the theoretical molecular mass and isoelectric point, the number of peptides matched according to the Mascot database, the percentage of the protein sequence that is covered by the identified peptides, and the mass of some peptides, the sequence of which was confirmed by MALDI-TOF-TOF MS (msms) analysis.

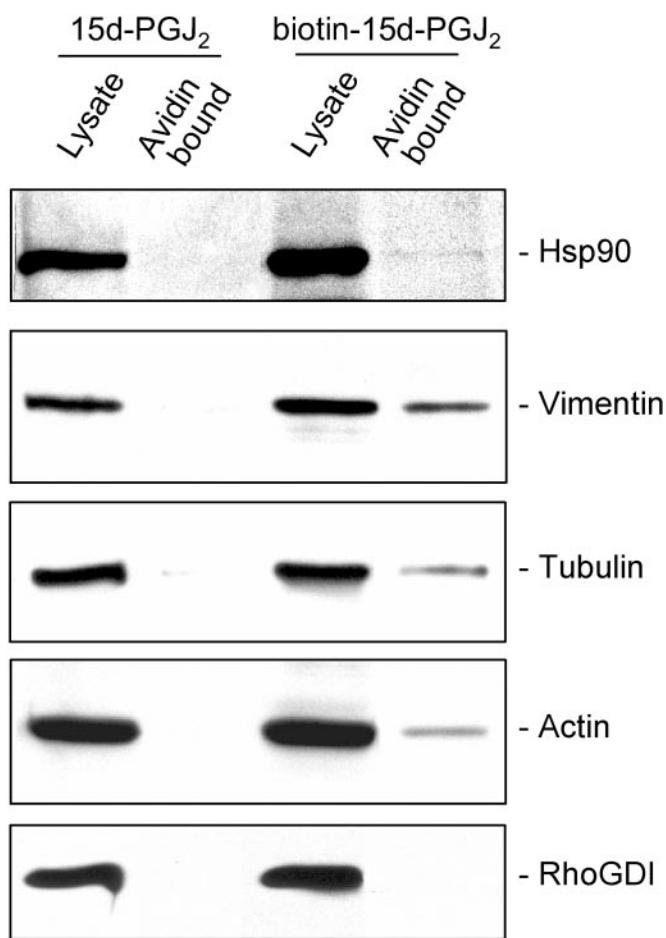


Figure 6. Retention of biotinylated 15d-PGJ₂-modified proteins on avidin beads. Cell lysates from MC incubated with 5 μ M 15d-PGJ₂ or biotinylated 15d-PGJ₂ for 2 h were subjected to pull-down assays with neutravidin agarose beads. The levels of the proteins of interest in total cell lysates and in the avidin-binding fractions were assessed by Western blot. Results shown are representative of at least three assays for every protein.

lacks the cyclopentenone moiety and displays reduced ability to bind to proteins (10), did not induce vimentin or tubulin redistribution, thus suggesting that thiol modification is important for the effects of 15d-PGJ₂ on MC cytoskeletal organization. Consistent with this, biotinylated 15d-PGJ₂ induced a marked redistribution of intermediate vimentin filaments and microtubules that resembled the effects of nonmodified 15d-PGJ₂ (Figure 7C).

To confirm the importance of cysteine modification in the effects of cyPG, GFP-vimentin-wt and C328S mutant constructs were transfected in MC. GFP-vimentin was incorporated into the endogenous intermediate filament network, as it has been characterized previously (22). Cells that were transfected with GFP-vimentin-wt showed marked vimentin collapse in response to 15d-PGJ₂ treatment (Figure 8). It is interesting that the proportion of cells that underwent vimentin reorganization was significantly lower in cells that were transfected with the GFP-vimentin-C328S mutant. These results indicate that muta-

tion of this cysteine residue partially protects the vimentin network against 15d-PGJ₂-elicited disruption.

Discussion

CyPG have been reported to exert anti-inflammatory, anti-proliferative, and antiviral effects in several experimental systems. The ability of these compounds to covalently modify cellular proteins is an important mechanism for these effects. Biotinylated analogs of cyPG have been used as probes to explore these interactions. Here we have shown that biotinylated 15d-PGJ₂ mimics the effects of 15d-PGJ₂ on the heat-shock and inflammatory responses of MC in culture and forms stable adducts with proteins that display resistance to treatment with reducing agents but are disrupted under alkaline conditions, as expected of Michael adducts between proteins and cyPG.

CyPG can bind to a broad but defined set of cellular proteins. Work from several laboratories, including ours, has led to the identification of several targets for prostanylation. Among these targets are the transcription factors NF- κ B and AP-1 (12–14); IKK (11,23); proteins involved in cellular redox status regulation, such as thioredoxin and thioredoxin reductase (24,25); the protein Keap-1, a sensor of electrophilic stress and regulator of the transcription factor Nrf-2 (26,27); and H-Ras proteins (28). In this work, we used a proteomic approach to identify protein targets for cyPG addition. Using biotinylated 15d-PGJ₂, we detected at least 50 biotin-positive spots in extracts from MC. The total number of potential targets for cyPG action may be higher because some minor proteins may not be detected by this assay. Also, the biotin moiety may preclude access of the biotinylated cyPG to cysteine residues in some proteins or interactions for which the presence of the carboxyl group of the cyPG is important, as it has been proposed for PPAR- γ (29). In this study, we identified several important regulatory proteins. Hsp90 regulates proteins that are implicated in apoptotic, survival, and growth pathways (30). Hsp90 has been shown to undergo reversible cysteine-targeted oxidation during renal oxidative stress (31). Several reactive cysteine residues at Hsp90 C-terminus seem to be important for function (32,33). Therefore, it would be interesting to explore the implications of cyPG addition to Hsp90 for chaperone function or heat-shock response.

Other proteins detected include nucleoside diphosphate kinase, a multifunctional enzyme involved in the maintenance of the cellular pools of nucleoside triphosphate and in transcriptional regulation (34). Nucleoside diphosphate kinase has been shown to undergo S-thiolation or disulfide cross-linking under conditions of oxidative stress, which could have implications in function switching (34–36). The enzyme methylthioadenosine phosphorylase is involved in the synthesis of methionine and in the regulation of polyamine synthesis (37). On the basis of previous evidence, modification of methylthioadenosine phosphorylase by cyPG could have implications for cell proliferation or apoptosis (38).

The major targets of biotinylated 15d-PGJ₂ in MC seem to be vimentin, tubulin, and actin. These results shed light on the cellular fate of cyPG by showing that an important proportion of the cellular PG-protein adducts is constituted by cytoskeletal

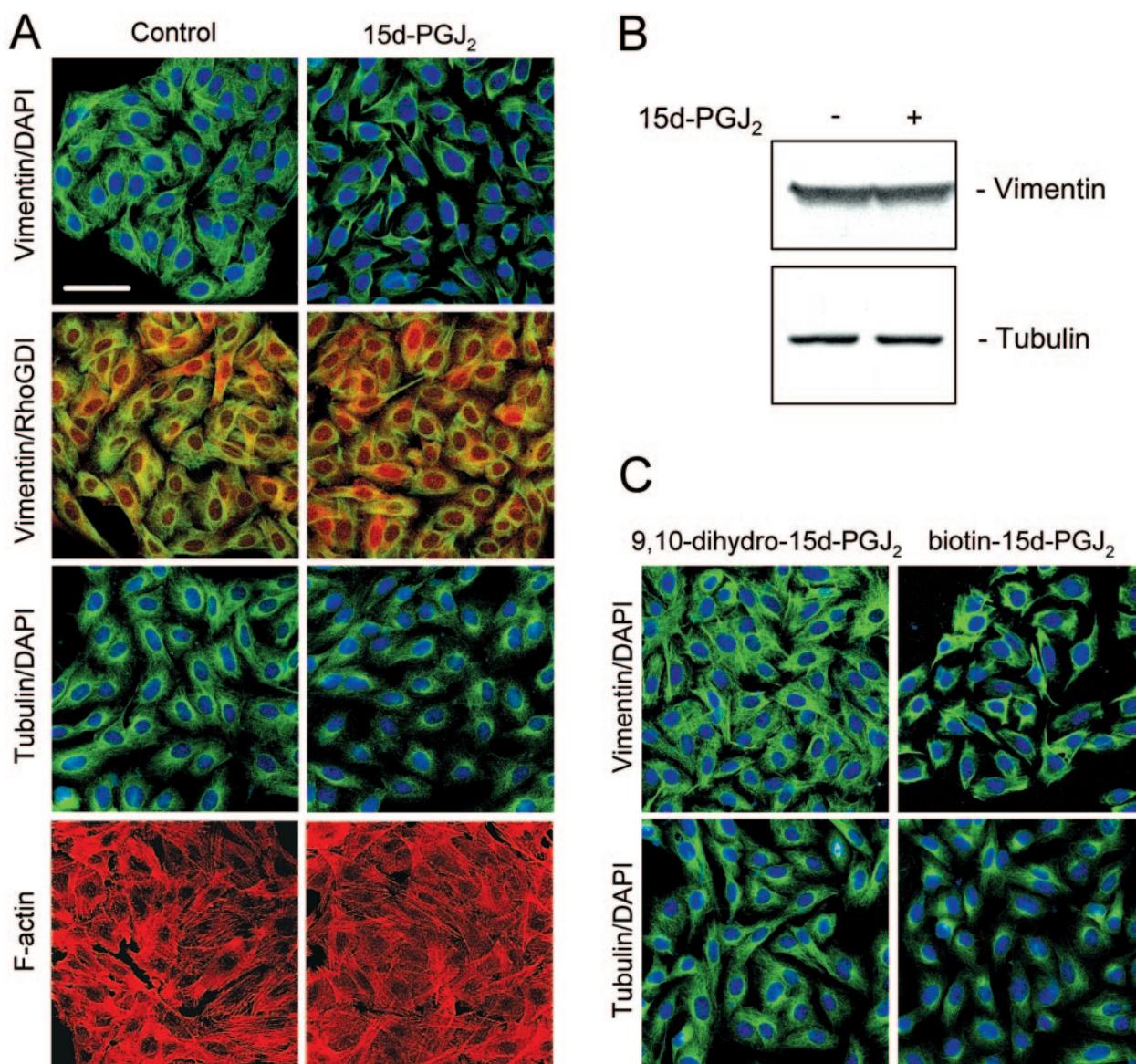


Figure 7. Effects of 15d-PGJ₂ on cytoskeletal organization in MC. (A) MC were treated for 2 h in the absence or presence of 5 μ M 15d-PGJ₂, as indicated, and stained with antibodies against vimentin (green), tubulin (green), or RhoGDI (red) or with phalloidin to visualize filamentous actin (orange). Nuclei were stained with DAPI (blue). (B) Levels of total vimentin and tubulin were assessed by Western blot. (C) MC were treated for 2 h with 5 μ M 9,10-dihydro-15d-PGJ₂ or biotinylated 15d-PGJ₂. After fixation, cells were stained with antibodies against vimentin or tubulin, as indicated, and DAPI. Bar = 47.62 μ m. Confocal fluorescence images shown are maximum projections of series acquired at 0.5- μ m intervals and are representative of three experiments with similar results.

proteins. In addition, we found the contractile protein tropomyosin. The results presented here show extensive reorganization of the intermediate filament network, consisting in a perinuclear collapse of vimentin filaments. It is interesting that a similar collapse of the vimentin network has been reported in several cell types that underwent a heat-shock response (39,40); however, this is the first report of this kind of reorganization in MC. These changes could constitute part of the defense mechanisms triggered by 15d-PGJ₂ in MC. We also observed a fading of the microtubule network in MC at early times of treatment with 15d-PGJ₂. In contrast, the distribution of the actin cytoskel-

eton did not show significant changes within the time frame explored.

The effects of 15d-PGJ₂ on MC cytoskeletal distribution could be mediated by the direct modification of cytoskeletal proteins. All proteins that were identified in this study possess cysteine residues that are susceptible to oxidative modifications, and some of them have been reported recently to undergo thiolation under oxidative stress (35,36,41). The modification of exposed sulfhydryl groups in cytoskeletal proteins may play a regulatory role, thus transducing oxidative stress signals into cytoskeletal changes. Tubulin is a cysteine-rich redox-sensitive

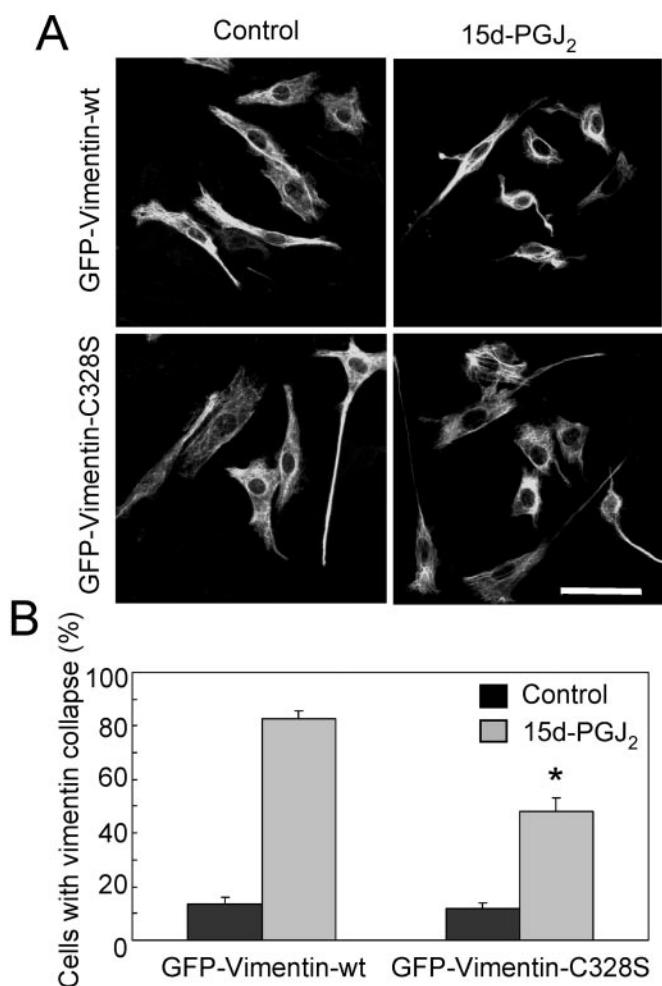


Figure 8. Effect of 15d-PGJ₂ on the reorganization of wild-type and mutant GFP-vimentin. MC transfected with plasmids GFP-vimentin-wt or GFP-vimentin-C328S were treated in the absence or presence of 5 μ M 15d-PGJ₂ and observed by confocal fluorescence microscopy. (A) Images were acquired as in Figure 7 and are representative of four experiments with similar results. Bar = 50 μ m. (B) The proportion of cells that showed vimentin collapse was quantified by examination by two independent observers of at least 200 cells from randomly acquired fields per experimental point. Results shown are average values of three independent experiments \pm SEM. * $P < 0.05$ by *t* test versus GFP-vimentin-wt-transfected cells that were treated with 15d-PGJ₂.

protein that plays a crucial function in cell division. Modification of tubulin redox state or alkylation of functional sulfhydryl groups may lead to impairment of microtubule polymerization and inhibition of cellular proliferation (42). This feature has been exploited for the development of anticancer agents (43,44). Thus, it could be hypothesized that modification of tubulin by cyPG may be involved in the antiproliferative effects of these compounds. Vimentin contains a single cysteine residue that is highly conserved among vertebrates. Vimentin glutathionylation has been detected in oxidatively stressed T lymphocytes (41). However, the consequences of this modification for cytoskeletal organization have not been explored. Using a C328S

vimentin mutant, we observed that the presence of this cysteine residue is important for the full effect of 15d-PGJ₂ on vimentin reorganization. Our results suggest that modification of this residue could have important consequences for the organization of intermediate filaments.

The possibility should also be considered that 15d-PGJ₂ could alter cytoskeletal organization by indirect mechanisms, including modification of proteins that are involved in the regulation of redox status, chaperones, G-proteins, or microtubule-interacting proteins. It has been reported that 15d-PGJ₂ can bind to the CRTH2 chemoattractant G-protein-coupled receptor at nanomolar concentrations (45). However, involvement of this pathway in the effects herein reported is unlikely because nanomolar concentrations of 15d-PGJ₂ or of the CRTH2 agonist indomethacin did not elicit Hsp70 induction, iNOS inhibition, or cytoskeletal remodeling (unpublished observations). At micromolar concentrations, 15d-PGJ₂ can also activate PPAR. Nevertheless, the compound 9,10-dihydro-15d-PGJ₂, a potent PPAR- γ agonist that lacks the cyclopentenone moiety, failed to induce cytoskeletal reorganization in MC. This observation also supports the hypothesis that covalent modification of cellular thiols plays an important role in the effects of 15d-PGJ₂ on intermediate filament and microtubule networks. The precise concentrations of 15d-PGJ₂ in biologic systems are still a matter of debate, as it has been discussed previously (14,25). However, this issue does not preclude the interest of the protective effects of cyPG and of their use as model compounds to explore the biologic effects and targets of endogenous cyclopentenone eicosanoids with similar chemical reactivity that have been detected in various biologic systems (46,47).

In summary, we have identified physiologically relevant targets for modification by cyPG. These findings may open new avenues for the understanding of the pleiotropic effects of cyPG and may help to define their potential use as therapeutic agents.

Acknowledgments

This work was supported by grants SAF2003-03713 from MEyC and 04/179-01 from Fundación La Caixa. K.S. and F.S.-G. are recipients of fellowships from C.S.I.C. and MEyC, respectively.

We thank Dr. Isabel Barasoain from Centro de Investigaciones Biológicas (Madrid, Spain) for the generous gift of anti-tubulin antibody and Dr. F.J. Cañada (Centro de Investigaciones Biológicas) for the gift of biotinylated 15d-PGJ₂. We are indebted to Dolores Gutiérrez (Unidad de Proteómica, Parque Científico de Madrid) for expert assistance with protein identification by mass spectrometry and to M. Teresa Seisdedos (Centro de Investigaciones Biológicas) for valuable help with confocal microscopy. The technical assistance of M. Jesús Carrasco is gratefully acknowledged.

References

- Honn KV, Marnett LJ: Requirement of a reactive alpha, beta-unsaturated carbonyl for inhibition of tumor growth and induction of differentiation by "A" series prostaglandins. *Biochem Biophys Res Commun* 129: 34–40, 1985
- Schoonjans K, Staels B, Auwerx J: The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on

- lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1302: 93–109, 1996
3. Schiffrin EL, Amiri F, Benkirane K, Iglarz M, Diep QN: Peroxisome proliferator-activated receptors: Vascular and cardiac effects in hypertension. *Hypertension* 42: 664–668, 2003
 4. Guan Y, Breyer MD: Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): Novel therapeutic targets in renal disease. *Kidney Int* 60: 14–30, 2001
 5. Chatterjee PK, Patel NS, Cuzzocrea S, Brown PA, Stewart KN, Mota-Filipe H, Britti D, Eberhardt W, Pfeilschifter J, Thiemermann C: The cyclopentenone prostaglandin 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 ameliorates ischemic acute renal failure. *Cardiovasc Res* 61: 630–643, 2004
 6. Dugo L, Collin M, Cuzzocrea S, Thiemermann C: 15-Deoxy-prostaglandin J2 reduces multiple organ failure caused by wall-fragment of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Eur J Pharmacol* 498: 295–301, 2004
 7. Zingarelli B, Sheehan M, Hake PW, O'Connor M, Denenberg A, Cook A: Peroxisome proliferator activator receptor-gamma ligands, 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 and ciglitazone, reduce systemic inflammation in polymicrobial sepsis by modulation of signal transduction pathways. *J Immunol* 171: 6827–6837, 2003
 8. Sawano H, Haneda M, Sugimoto T, Inoki K, Koya D, Kikkawa R: 15-Deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 inhibits IL-1beta-induced cyclooxygenase-2 expression in mesangial cells. *Kidney Int* 61: 1957–1967, 2002
 9. Rovin BH, Lu L, Cosio A: Cyclopentenone prostaglandins inhibit cytokine-induced NF-kappaB activation and chemokine production by human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 12: 1659–1667, 2001
 10. Sánchez-Gómez FJ, Cernuda-Morollón E, Stamatakis K, Pérez-Sala D: Protein thiol modification by 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 addition in mesangial cells: Role in the inhibition of pro-inflammatory genes. *Mol Pharmacol* 66: 1349–1358, 2004
 11. Castrillo A, Diaz-Guerra MJ, Hortelano S, Martin-Sanz P, Bosca L: Inhibition of IkappaB kinase and IkappaB phosphorylation by 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 in activated murine macrophages. *Mol Cell Biol* 20: 1692–1698, 2000
 12. Straus DS, Pascual G, Li M, Welch JS, Ricote M, Hsiang CH, Sengchanthalangsry LL, Ghosh G, Glass CK: 15-Deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappaB signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 4844–4849, 2000
 13. Cernuda-Morollón E, Pineda-Molina E, Cañada FJ, Pérez-Sala D: 15-Deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 inhibition of NF-kappaB DNA binding through covalent modification of the p50 subunit. *J Biol Chem* 276: 35530–35536, 2001
 14. Pérez-Sala D, Cernuda-Morollón E, Cañada FJ: Molecular basis for the inhibition of AP-1 DNA binding by 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2. *J Biol Chem* 278: 51251–51260, 2003
 15. Rovin BH, Wilmer WA, Lu L, Doseff AI, Dixon C, Kotur M, Hilbelink T: 15-Deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 regulates mesangial cell proliferation and death. *Kidney Int* 61: 1293–1302, 2002
 16. Santoro MG: Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochem Pharmacol* 59: 55–63, 2000
 17. Zhang X, Lu L, Dixon C, Wilmer W, Song H, Chen X, Rovin BH: Stress protein activation by the cyclopentenone prostaglandin 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 in human mesangial cells. *Kidney Int* 65: 798–810, 2004
 18. Cernuda-Morollón E, Rodríguez-Pascual F, Klatt P, Lamas S, Pérez-Sala D: PPAR agonists amplify iNOS expression while inhibiting NF-kappaB: Implications for mesangial cell activation by cytokines. *J Am Soc Nephrol* 13: 2223–2231, 2002
 19. Sechi S, Chait BT: Modification of cysteine residues by alkylation. A tool in peptide mapping and protein identification. *Anal Chem* 70: 5150–5158, 1998
 20. Ianaro A, Ialenti A, Maffia P, Di Meglio P, Di Rosa M, Santoro MG: Anti-inflammatory activity of 15-deoxy-delta12,14-PGJ2 and 2-cyclopenten-1-one: Role of the heat shock response. *Mol Pharmacol* 64: 85–93, 2003
 21. Narumiya S, Ohno K, Fukushima M, Fujiwara M: Site and mechanism of growth inhibition by prostaglandins. III. Distribution and binding of prostaglandin A2 and delta12-prostaglandin J2 in nuclei. *J Pharmacol Exp Ther* 242: 306–311, 1987
 22. Yoon M, Moir RD, Prahlad V, Goldman R: Motile properties of vimentin intermediate filament networks in living cells. *J Cell Biol* 143: 147–157, 1998
 23. Rossi A, Kapahi P, Natoli G, Takahashi T, Chen Y, Karin M, Santoro MG: Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of IkappaB kinase. *Nature* 403: 103–108, 2000
 24. Shibata T, Yamada T, Ishii T, Kumazawa S, Nakamura H, Masutani H, Yodoi J, Uchida K: Thioredoxin as a molecular target of cyclopentenone prostaglandins. *J Biol Chem* 278: 26046–26054, 2003
 25. Moos PJ, Edes K, Cassidy P, Massuda E, Fitzpatrick FA: Electrophilic prostaglandins and lipid aldehydes repress redox-sensitive transcription factors p53 and hypoxia-inducible factor by impairing the selenoprotein thioredoxin reductase. *J Biol Chem* 278: 745–750, 2003
 26. Levonen AL, Landar A, Ramachandran A, Ceaser EK, Dickinson DA, Zanoni G, Morrow JD, Darley-Usmar VM: Cellular mechanisms of redox cell signaling: The role of cysteine modification in controlling antioxidant defenses in response to electrophilic lipid oxidation products. *Biochem J* 378: 373–382, 2004
 27. Itoh K, Mochizuki M, Ishii Y, Ishii T, Shibata T, Kawamoto Y, Kelly V, Sekizawa K, Uchida K, Yamamoto M: Transcription factor Nrf2 regulates inflammation by mediating the effect of 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2. *Mol Cell Biol* 24: 36–45, 2004
 28. Oliva JL, Pérez-Sala D, Castrillo A, Martínez N, Cañada FJ, Bosca L, Rojas JM: The cyclopentenone 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 binds to and activates H-Ras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 4772–4777, 2003
 29. Shiraki T, Kamiya N, Shiki S, Kodama TS, Kakizuka A, Jingami H: alpha,beta-Unsaturated ketone is a core moiety of natural ligands for covalent binding to peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem* 280: 14145–14153, 2005
 30. Chiosis G, Vilenchik M, Kim J, Solit D: Hsp90: The vulnerable chaperone. *Drug Discov Today* 9: 881–888, 2004
 31. Eaton P, Jones ME, McGregor E, Dunn MJ, Leeds N, Byers HL, Leung KY, Ward MA, Pratt JR, Shattock MJ: Reversible cysteine-targeted oxidation of proteins during renal oxidative stress. *J Am Soc Nephrol* 14: S290–S296, 2003

32. Nardai G, Sass B, Eber J, Orosz G, Csermely P: Reactive cysteines of the 90-kDa heat shock protein, Hsp90. *Arch Biochem Biophys* 384: 59–67, 2000
33. Martinez-Ruiz A, Villanueva L, Gonzalez de Orduna C, Lopez-Ferrer D, Higueras MA, Tarin C, Rodriguez-Crespo I, Vazquez J, Lamas S: S-nitrosylation of Hsp90 promotes the inhibition of its ATPase and endothelial nitric oxide synthase regulatory activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 8525–8530, 2005
34. Song EJ, Kim YS, Chung JY, Kim E, Chae SK, Lee KJ: Oxidative modification of nucleoside diphosphate kinase and its identification by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Biochemistry* 39: 10090–10097, 2000
35. Eaton P, Byers HL, Leeds N, Ward MA, Shattock MJ: Detection, quantitation, purification, and identification of cardiac proteins S-thiolated during ischemia and reperfusion. *J Biol Chem* 277: 9806–9811, 2002
36. Cumming RC, Andon NL, Haynes PA, Park M, Fischer WH, Schubert D: Protein disulfide bond formation in the cytoplasm during oxidative stress. *J Biol Chem* 279: 21749–21758, 2004
37. Subhi AL, Diegeman P, Porter CW, Tang B, Lu ZJ, Markham GD, Kruger WD: Methylthioadenosine phosphorylase regulates ornithine decarboxylase by production of downstream metabolites. *J Biol Chem* 278: 49868–49873, 2003
38. Della Ragione F, Carteni-Farina M, Gragnaniello V, Schettino MI, Zappia V: Purification and characterization of 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine phosphorylase from human placenta. *J Biol Chem* 261: 12324–12329, 1986
39. Collier NC, Sheetz MP, Schlesinger MJ: Concomitant changes in mitochondria and intermediate filaments during heat shock and recovery of chicken embryo fibroblasts. *J Cell Biochem* 52: 297–307, 1993
40. Lee S-Y, Song EJ, Kim H-J, Kang H-J, Kim J-H, Lee K-J: Rac1 regulates heat shock responses by reorganization of vimentin filaments: Identification using MALDI-TOF MS. *Cell Death Differ* 8: 1093–1102, 2001
41. Fratelli M, Demol H, Puyype M, Casagrande S, Eberini I, Salmona M, Bonetto V, Mengozzi M, Duffieux F, Miclet E, Bach A, Vandekerckhove J, Gianazza E, Ghezzi P: Identification by redox proteomics of glutathionylated proteins in oxidatively stressed human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 3505–3510, 2002
42. Landino LM, Moynihan KL, Todd JV, Kennett KL: Modulation of the redox state of tubulin by the glutathione/glutaredoxin reductase system. *Biochem Biophys Res Commun* 314: 555–560, 2004
43. Shan B, Medina JC, Santha E, Frankmoelle WP, Chou TC, Learned RM, Narbut MR, Stott D, Wu P, Jaen JC, Rosen T, Timmermans PB, Beckmann H: Selective, covalent modification of beta-tubulin residue Cys-239 by T138067, an antitumor agent with in vivo efficacy against multidrug-resistant tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 5686–5691, 1999
44. Legault J, Gaulin JF, Mounetou E, Bolduc S, Lacroix J, Poyet P, Gaudreault RC: Microtubule disruption induced in vivo by alkylation of beta-tubulin by 1-aryl-3-(2-chloroethyl)ureas, a novel class of soft alkylating agents. *Cancer Res* 60: 985–992, 2000
45. Hata AN, Zent R, Breyer MD, Breyer RM: Expression and molecular pharmacology of the mouse CRTH2 receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 306: 463–470, 2003
46. Chen Y, Morrow JD, Roberts LJ 2nd: Formation of reactive cyclopentenone compounds in vivo as products of the isoprostane pathway. *J Biol Chem* 274: 10863–10868, 1999
47. Watson AD, Leitinger N, Navab M, Faull KF, Horkko S, Witztum JL, Palinski W, Schwenke D, Salomon RG, Sha W, Subbanagounder G, Fogelman AM, Berliner JA: Structural identification by mass spectrometry of oxidized phospholipids in minimally oxidized low density lipoprotein that induce monocyte/endothelial interactions and evidence for their presence in vivo. *J Biol Chem* 272: 13597–13607, 1997

Differential selectivity of protein modification by the cyclopentenone prostaglandins PGA₁ and 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂: Role of glutathione

Javier Gayarre, Konstantinos Stamatakis, Marta Renedo, Dolores Pérez-Sala*

Departamento de Estructura y Función de Proteínas, Centro de Investigaciones Biológicas, C.S.I.C., Ramiro de Maeztu, 9, 28040 Madrid, Spain

Received 2 August 2005; revised 20 September 2005; accepted 29 September 2005

Available online 6 October 2005

Edited by Vladimir Skulachev

Abstract Cyclopentenone prostaglandins (cyPG) with anti-inflammatory and antiproliferative properties have been envisaged as leads for the development of therapeutic agents. Because cyPG effects are mediated in part by the formation of covalent adducts with critical signaling proteins, it is important to assess the specificity of this interaction. By using biotinylated derivatives of 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ (15d-PGJ₂-B) and PGA₁ (PGA₁-B) we herein provide novel evidence for the differential selectivity of protein modification by distinct cyPG. The marked quantitative and qualitative differences in the binding of 15d-PGJ₂-B and PGA₁-B to cellular proteins were related to a differential reactivity in the presence of glutathione (GSH), both *in vitro* and in intact cells. Therefore GSH levels may influence not only the intensity but also the specificity of cyPG action.

© 2005 Published by Elsevier B.V. on behalf of the Federation of European Biochemical Societies.

Keywords: Prostaglandin; Posttranslational modification; Michael addition; Glutathione

1. Introduction

Cyclopentenone prostaglandins (cyPG) are eicosanoids which display varied biological activities, ranging from anti-inflammatory effects to inhibition of cell proliferation and viral replication. Recently, these compounds have been the subject of considerable interest due to their potential use as therapeutic agents [1,2]. In vivo studies have shown beneficial effects of cyPG in several models of inflammation and tissue injury [3,4]. These eicosanoids exert their actions through complex mechanisms not completely elucidated. Some cyPG can act as agonists of the PPAR transcription factors [5]. In addition, cyPG can form covalent adducts with cellular thiols, both in glutathione (GSH) and in proteins, due to the presence of an unsaturated carbonyl group in the cyclopentenone moiety which confers a strong electrophilicity to neighboring carbons. Several protein targets for cyPG addition have been identified. Modification of functionally important sulphydryl groups in

these proteins contributes to the biological effects of these prostanooids. Binding of cyPG to transcription factors NF- κ B and AP-1 [6,7] inhibits DNA binding. Modification of cysteine residues in IKK [8], thioredoxin and thioredoxin reductase [9,10] also leads to inhibitory effects. In contrast, modification of H-Ras proteins correlates with activation of Ras-dependent pathways [11] and binding of cyPG to the protein Keap-1 results in activation of the transcription factor Nrf-2 and induction of genes involved in antioxidant defense [12].

Although the structure–activity relationship of cyPG has been addressed in several studies, little is known about the specificity of protein modification by these compounds. We and others have reported that protein modification by cyPG does not occur randomly, but affects defined cysteine residues within certain proteins [12,13]. It has been proposed that a low pH in the vicinity of the adduct may contribute to stabilize the C–S bond [1,14]. The reactivity of thiols can also be affected by steric factors. Therefore, structural determinants of either the protein or the cyPG may be important for the specificity of protein modification. We hypothesized that cyPG with diverse structure could selectively modify distinct protein targets in cells and/or modify some common targets with different potency. Characterization of the selectivity of protein modification by cyPG with different structure could then provide valuable information on the mechanism of action of these compounds and potentially aid in the design of cyPG targeting specific proteins. In this work we show the existence of common and selective targets for modification by biotinylated 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂-B) and biotinylated prostaglandin A₁ (PGA₁-B) in NIH-3T3 fibroblasts and explore the factors involved in differential selectivity.

2. Materials and methods

2.1. Materials

15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ was from Calbiochem-Novabiochem (San Diego, CA) and from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). Biotinylated 15d-PGJ₂ was the generous gift of Dr. F. J. Cañada (Madrid, Spain). Biotinylated PGA₁ (*N*-9-oxo-15*S*-hydroxy-prosta-10,13*E*-1-dien-1-oyl-*N*-biotinoyl-1,5-diaminohexane) was from Cayman Chemical.

2.2. Incorporation of biotinylated cyPG into NIH-3T3 proteins

NIH-3T3 cells were grown in DMEM (Invitrogen) containing 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin. For treatments, cells were incubated with biotinylated cyPG for 2 h in serum-free medium. Cell lysates were obtained

*Corresponding author. Fax: +34 915360432.

E-mail address: dperezsala@cib.csic.es (D. Pérez-Sala).

Abbreviations: cyPG, cyclopentenone prostaglandin; 15d-PGJ₂-B, biotinylated 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂; PGA₁-B, biotinylated prostaglandin A₁; GSH, glutathione; BSO, buthionine sulfoximine

by disrupting cells in 50 mM Tris, pH 7.5, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.1 mM β -mercaptoethanol, 0.5% SDS, 0.2 mM sodium vanadate, 50 mM FNa containing 2 μ g/ml of each of the protease inhibitors: leupeptin, pepstatin A, and aprotinin and 1.3 mM Pefablock (Boehringer), as described [13]. Protein concentration was determined by the BCA assay (Pierce). Fifteen μ g of protein from each experimental condition were electrophoresed on 12.5% polyacrylamide gels and transferred to Immobilon-P membranes (Millipore, Bedford, MA). In addition, 100 μ g of protein were analyzed by 2D-electrophoresis as described [13]. Incorporation of biotinylated cyPG into proteins was assessed by Western blot and detection with horseradish peroxidase-conjugated streptavidin and ECL, as described [7].

2.3. Binding of biotinylated cyPG to proteins in vitro

Formation of covalent adducts of biotinylated cyPG with proteins in vitro was explored by using total lysates from NIH-3T3. Aliquots from cell lysates containing 6 μ g of protein were incubated with biotinylated cyPG for 1 h at r.t. and analyzed by Western blot.

3. Results

3.1. Modification of NIH-3T3 proteins by 15d-PGJ₂-B and PGA₁-B

The dienone 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂) and the single enone PGA₁ are the most widely used cyPG in biological studies. Both eicosanoids have been reported to exert antiinflammatory and antiproliferative effects [6,8,15]. Here we have used biotinylated derivatives of 15d-PGJ₂ (15d-PGJ₂-B) and PGA₁ (PGA₁-B) (see Fig. 1A) to explore the existence of protein targets that could be selectively modified by either cyPG. Both compounds were cell permeable and formed adducts with proteins which were resistant to electrophoresis under reducing conditions (Fig. 1B). Interestingly, we noticed important quantitative and qualitative differences in the modification of cellular polypeptides by either cyPG. Incorporation of 15d-PGJ₂-B was more efficient (Fig. 1B, lower panel). In addition, the labeling patterns obtained with the two biotinylated prostanoids were not identical, as evidenced in the densitometric profiles of the corresponding gel lanes (Fig. 2A). Some of the bands showing more prominent differences are marked by arrowheads. To verify these differences we performed 2D-electrophoresis (Fig. 2B). This analysis clearly showed the presence of biotin-positive spots common to 15d-PGJ₂-B and PGA₁-B-treated cells (marked by arrowheads), along with spots selective of either condition. Some of the spots which consistently showed selectivity or were labeled with different intensity are highlighted in boxes. These observations indicate that the efficiency and the selectivity of protein modification by PGA₁-B and 15d-PGJ₂-B in intact cells display important differences.

3.2. Binding of 15d-PGJ₂-B and PGA₁-B to NIH-3T3 proteins in cell-free extracts

The differences shown above could be due to several factors including disparities in the reactivity of the two prostanoids towards cellular thiols or in their intracellular accumulation. To explore these possibilities we first performed a labeling assay using cell-free extracts. As shown in Fig. 3, both the quantitative and qualitative differences in protein labeling observed in intact cells were markedly reduced when cell lysates were treated with 15d-PGJ₂-B or with PGA₁-B. These observations suggest that factors determined by cell integrity are important for the differential modification of proteins by cyPG.

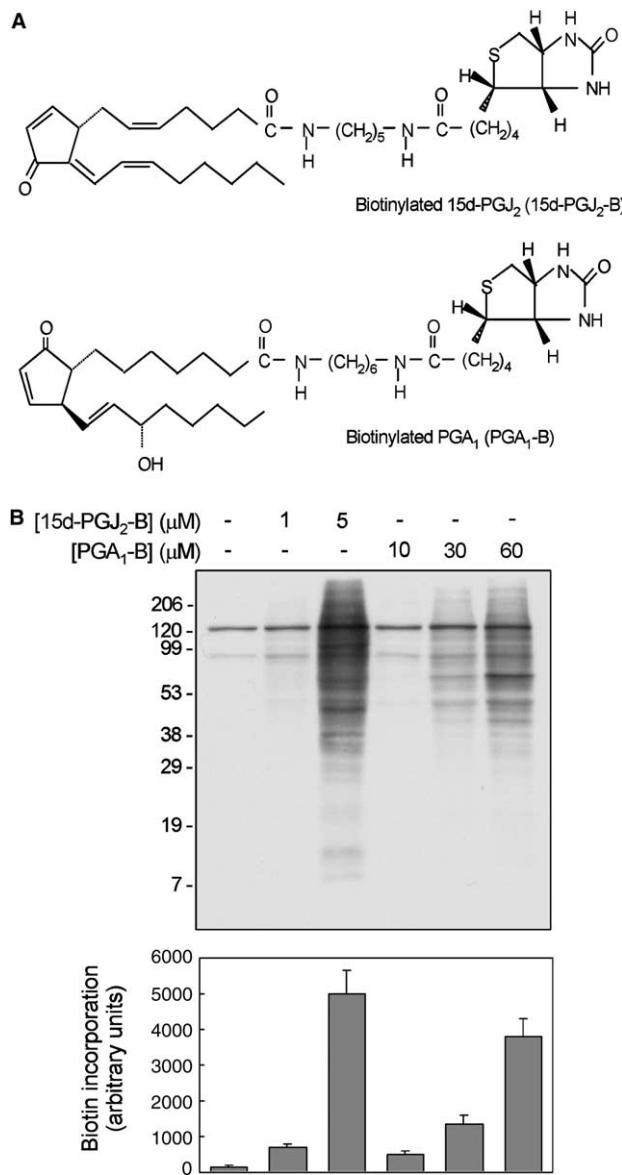


Fig. 1. Binding of 15d-PGJ₂-B and PGA₁-B to proteins in NIH-3T3 fibroblasts. (A) Structure of the biotinylated cyPG used in this study. (B) Cells were incubated with the indicated concentrations of biotinylated cyPG. Incorporation of the biotin label was assessed by Western blot as described in Section 2. Labeling intensity was estimated by image scanning of the blots. Results are average values \pm S.E.M from four independent experiments.

3.3. Effect of GSH on cyPG binding to proteins

The intracellular concentration of GSH has been proposed to be an important factor for the biological effects of cyPG. We therefore explored whether GSH could affect the intensity or selectivity of protein modification by biotinylated cyPG. As stated above, labeling of proteins present in lysates was similar with the two cyPG in the absence of added GSH (Fig. 4). Addition of GSH at concentrations in the range of those present in cells clearly reduced the incorporation of biotinylated cyPG into proteins in cell-free lysates. Noteworthy, this inhibition was more marked in the case of PGA₁-B. In addition, GSH reduced the incorporation of biotinylated cyPG more potently in certain polypeptide bands (marked by arrowheads in

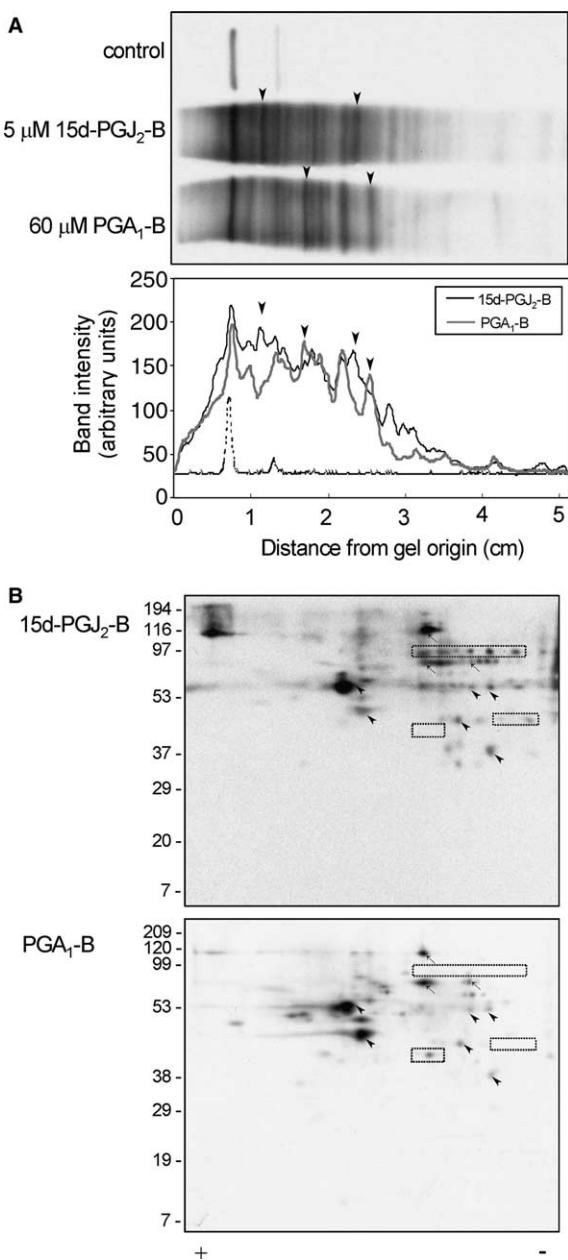


Fig. 2. Qualitative differences in the binding of biotinylated cyPG to cellular polypeptides in NIH-3T3. (A) Total cell lysates from control cells or cells treated with 5 μ M 15d-PGJ₂-B or 60 μ M PGA₁-B were analyzed by SDS-PAGE and Western blot. The intensity profiles obtained for each lane are shown (lower panel). Arrowheads mark the polypeptide bands which displayed more evident differences in biotin signal intensity. (B) Cell lysates were analyzed by 2D-electrophoresis and Western blot. Results shown are representative of five analysis for every condition. Endogenous biotinylated proteins are marked by arrows. Spots consistently appearing in both experimental conditions are marked by arrowheads and the regions where selective spots are detected are depicted by boxes.

Fig. 4, and this resulted in different labeling patterns when the biotinylated cyPG was 15d-PGJ₂-B or PGA₁-B. These observations suggest that GSH levels may contribute to the differential modification of cellular proteins by 15d-PGJ₂-B or PGA₁-B. Therefore we tested whether GSH levels could influence cyPG protein modification in intact cells. Pre-treatment

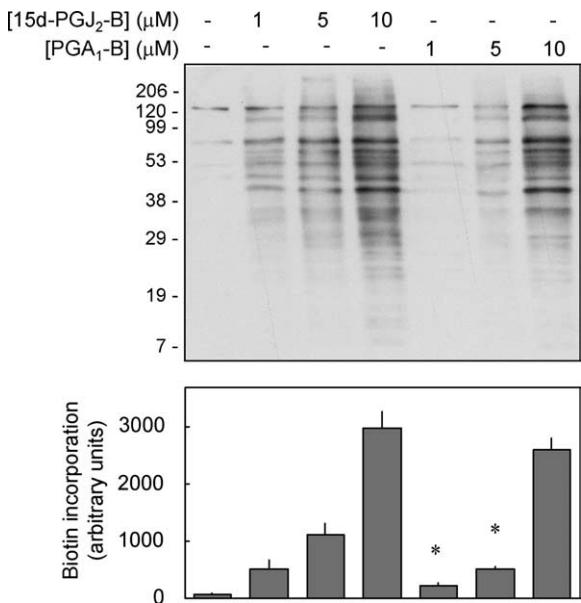


Fig. 3. Incorporation of biotinylated cyPG into NIH-3T3 proteins in cell-free extracts. Total cell lysates were incubated with the indicated concentrations of 15d-PGJ₂-B or PGA₁-B and biotin incorporation was assessed as described in Fig. 1. Results are average values \pm S.E.M. of five assays (* $P < 0.05$ by *t* test).

of NIH-3T3 fibroblasts with the GSH synthesis inhibitor buthionine sulfoximine (BSO), increased the intensity of protein labeling by biotinylated cyPG in a dose-dependent fashion (Fig. 5A and B). Interestingly, this increase was proportionally more marked in the case of low concentrations of PGA₁-B (see quantitation in Fig. 5C). In addition, inhibition of GSH biosynthesis induced a more prominent increase in the labeling of some polypeptide bands, thus altering the labeling patterns. To better observe these differences we performed 2D-electrophoresis (Fig. 6). The intensity of several spots clearly increased after BSO treatment. Some of these spots are marked by arrowheads in Fig. 6. Conversely, pre-incubation of fibroblasts with *N*-acetyl-L-cysteine to increase cellular thiol content, reduced the incorporation of biotinylated cyPG into cellular proteins, more intensely in the case of PGA₁-B (Fig. 5D). Taken together these observations suggest that a differential reactivity in the presence of soluble thiols, such as GSH, contributes to the selectivity of protein modification by cyPG.

4. Discussion

Biological actions of cyPG are due in part to their ability to covalently bind to cellular proteins. Several recent studies have sought to modify cyPG structure in order to obtain higher antiinflammatory or antiproliferative potency [16,17]. However, the specificity of protein modification by diverse cyPG has not been previously addressed. Here we have observed that 15d-PGJ₂-B is more effective than PGA₁-B at modifying cellular proteins. This is in agreement with the biological potency of their parent compounds. Typically, five to ten fold higher concentrations of PGA₁ are required to elicit effects comparable to those of 15d-PGJ₂ on IKK activity [8], NF- κ B DNA binding

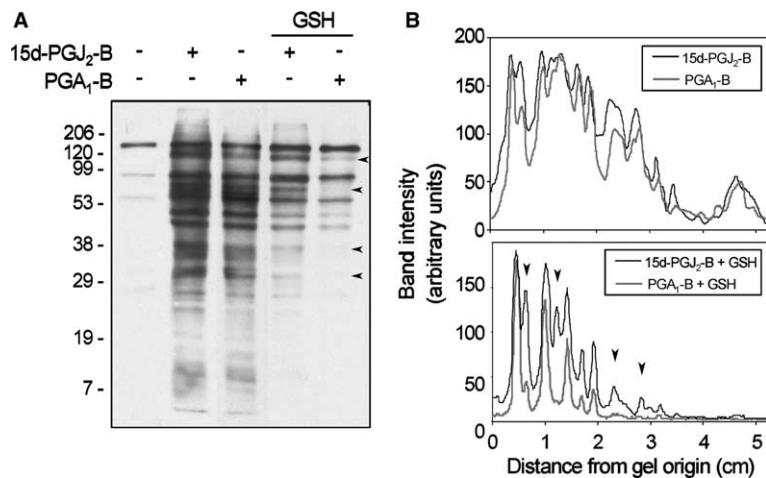


Fig. 4. Effect of GSH on binding of biotinylated cyPG to proteins in vitro. (A) Cell lysates were incubated with 10 μ M biotinylated cyPG in the absence or presence of 2 mM GSH and biotin labeling was detected as above. Polypeptides showing intense inhibition of cyPG incorporation in the presence of GSH are indicated by arrowheads. The blot shown is representative of four assays. (B) Densitometric profiles obtained for each lane.

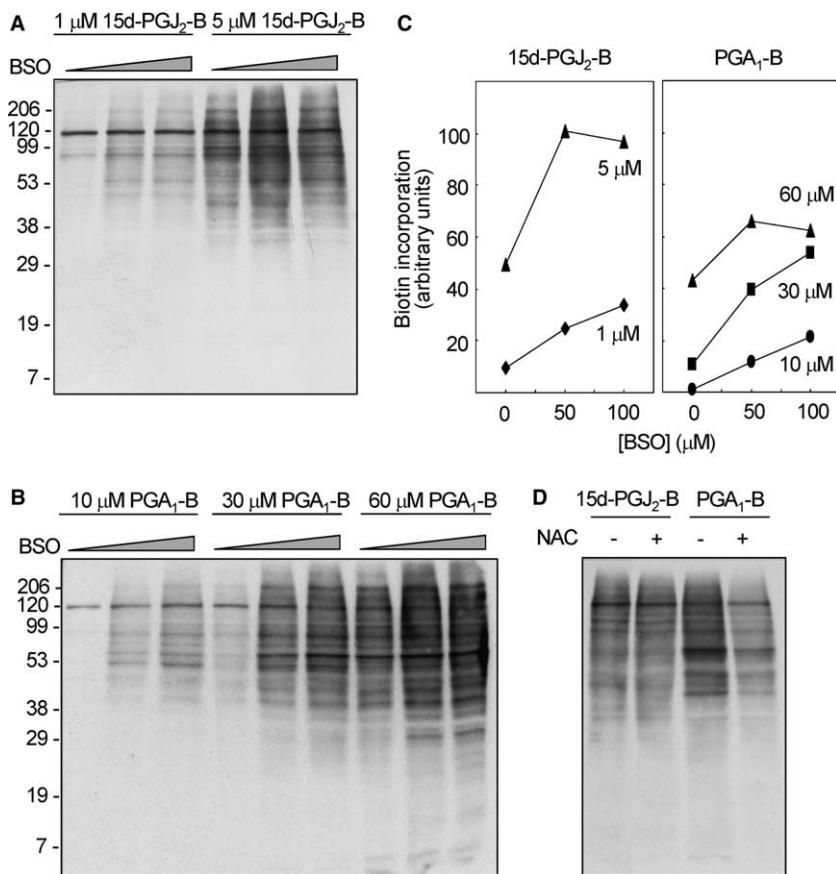


Fig. 5. Modulation of cellular GSH levels affects binding of biotinylated cyPG to proteins in cells. Cells were pre-incubated with BSO (at 0, 50 or 100 μ M) in serum-free medium for 16 h, before treatment with 15d-PGJ₂-B (A) or PGA₁-B (B) at the indicated concentrations for 2 h. Incorporation of biotinylated cyPG into cellular proteins was assessed by Western blot. The biotin signal was quantitated by image scanning and results are shown in (C). (D) NIH-3T3 cells were incubated with 5 mM *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) for 16 h. Subsequent incubation with 15d-PGJ₂-B (5 μ M) or PGA₁-B (60 μ M), was performed in fresh medium without NAC. Results shown are representative of three experiments with similar results.

[18], or induction of apoptosis [19]. Our results also show that incubation of intact cells with either biotinylated analog results in a different pattern of polypeptide labeling, consisting of common and selectively modified bands. Several factors could

contribute to this selectivity including different permeability or intracellular distribution or alterations in protein expression induced by the various treatments. Our results identify GSH levels as an important factor influencing the potency and selec-

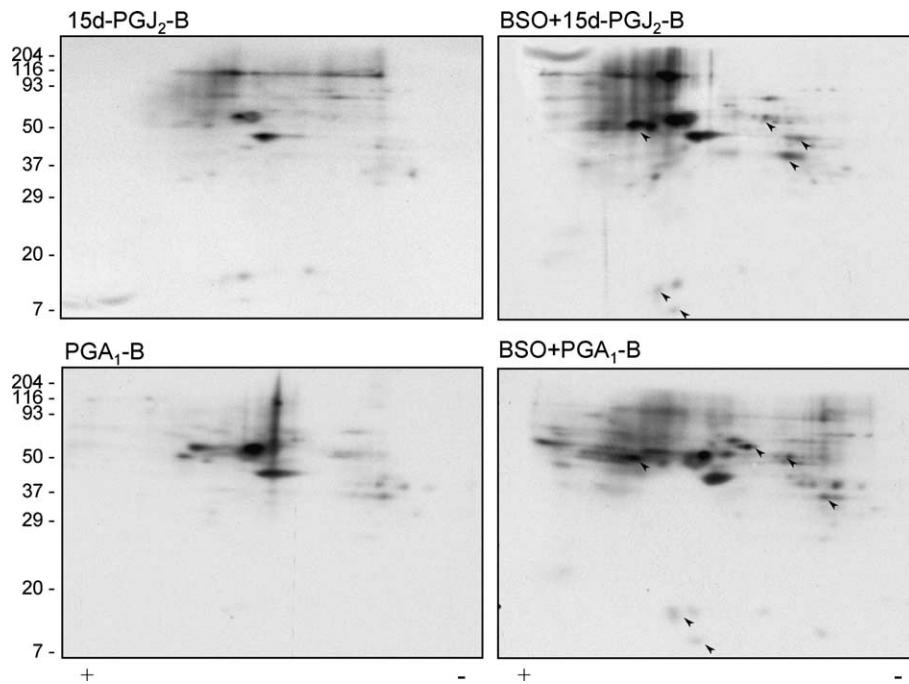


Fig. 6. 2D-electrophoresis analysis of biotinylated cyPG-modified proteins in GSH-depleted cells. Total cell lysates from NIH-3T3 cells treated with 5 μ M 15d-PGJ₂-B or 60 μ M PGA₁-B after pre-incubation in the absence or presence of 50 μ M BSO, as detailed in Fig. 5, were analyzed by 2D-electrophoresis and Western blot. Results are representative of three analysis.

tivity of protein modification by biotinylated cyPG, in cells and *in vitro*. This could be related to the formation of GSH-cyPG adducts, a process which can occur through enzymatic and non-enzymatic mechanisms and results in a reduction in the availability of free cyPG for protein modification [14]. In cells, conjugation with GSH also favors cyPG detoxification [20]. These factors can lead to an attenuation of the biological effects of cyPG [20]. Conversely, GSH depletion has been reported to enhance cyPG effects [21,22]. As it is shown here, modulation of GSH levels also leads to opposite changes in the extent of protein modification by cyPG. Interestingly, our results show that PGA₁-B binding to proteins is more dependent on GSH levels, both *in vitro* and in cells. This may be due to the fact that single enone cyPG, like PGA₁, form more stable adducts with soluble thiols than dienone cyPG, like 15d-PGJ₂ [14]. This would shift the equilibrium towards GSH-cyPG adduct formation in the case of PGA₁-B, with the consequences outlined above. Noteworthy, early evidence supported a differential subcellular fate of single enone and dienone cyPG, with single enone being present as soluble species in a higher proportion [23]. Although the interaction of cyPG with soluble thiols is reversible, the binding to cellular proteins has been proposed to be irreversible under physiological conditions [14,24]. Several factors have been postulated to contribute to the stability of cyPG-protein interactions, including the decreased molecular motion of protein biomatrices [24], the presence of low pK_a cysteine residues with a high reactivity, and the nature of the amino acids in the vicinity of the target cysteines [1]. These factors could also affect the selectivity of protein modification. In summary, our findings illustrate the differential binding to proteins of distinct cyPG and postulate a role for their unique reactivity towards GSH in this phenomenon. Identification of the proteins susceptible to be modified by various cyPG will provide a deeper insight into

the factors that determine their selectivity and help to ascertain whether target-specific cyPG can be designed.

Acknowledgments: This work was supported by grants from Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2003-03713) and, in part, by Fundación La Caixa (04/179-01). J.G. and K.S. are recipients of fellowships from C.S.I.C. We thank Dr. F.J. Cañada for helpful comments and discussion and M. Jesús Carrasco for technical assistance.

References

- [1] Bickley, J.F., Ciucci, A., Evans, P., Roberts, S.M., Ross, N. and Santoro, G.M. (2004) Reactions of some cyclopentenones with selected cysteine derivatives and biological activities of the product thioethers. *Bioorg. Med. Chem.* 12, 3221–3227.
- [2] Bernasconi, D., Amici, C., La Frazia, S., Ianaro, A. and Santoro, M.G. (2005) The IκB kinase is a key factor in triggering influenza A virus-induced inflammatory cytokines production in airway epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 280, 24127–24134.
- [3] Chatterjee, P.K. et al. (2004) The cyclopentenone prostaglandin 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ ameliorates ischemic acute renal failure. *Cardiovasc. Res.* 61, 630–643.
- [4] Mochizuki, M. et al. (2005) Role of 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ and Nrf2 pathways in protection against acute lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 171, 1260–1266.
- [5] Bishop-Bailey, D. and Wray, J. (2003) Peroxisome proliferator-activated receptors: a critical review on endogenous pathways for ligand generation. *Prostaglandins Lipid Mediat.* 71, 1–22.
- [6] Cernuda-Morollón, E., Pineda-Molina, E., Cañada, F.J. and Pérez-Sala, D. (2001) 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ inhibition of NF-κB DNA binding through covalent modification of the p50 subunit. *J. Biol. Chem.* 276, 35530–35536.
- [7] Pérez-Sala, D., Cernuda-Morollón, E. and Cañada, F.J. (2003) Molecular basis for the inhibition of AP-1 DNA binding by 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂. *J. Biol. Chem.* 278, 51251–51260.
- [8] Rossi, A., Kapahi, P., Natoli, G., Takahashi, T., Chen, Y., Karin, M. and Santoro, M.G. (2000) Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of IκB kinase. *Nature* 403, 103–108.

- [9] Shibata, T., Yamada, T., Ishii, T., Kumazawa, S., Nakamura, H., Masutani, H., Yodoi, J. and Uchida, K. (2003) Thioredoxin as a molecular target of cyclopentenone prostaglandins. *J. Biol. Chem.* 278, 26046–26054.
- [10] Moos, P.J., Edes, K., Cassidy, P., Massuda, E. and Fitzpatrick, F.A. (2003) Electrophilic prostaglandins and lipid aldehydes repress redox-sensitive transcription factors p53 and hypoxia-inducible factor by impairing the selenoprotein thioredoxin reductase. *J. Biol. Chem.* 278, 745–750.
- [11] Oliva, J.L., Pérez-Sala, D., Castrillo, A., Martínez, N., Cañada, F.J., Boscá, L. and Rojas, J.M. (2003) The cyclopentenone 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ binds to and activates H-Ras. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 4772–4777.
- [12] Levonen, A.L., Landar, A., Ramachandran, A., Ceaser, E.K., Dickinson, D.A., Zanoni, G., Morrow, J.D. and Darley-Usmar, V.M. (2004) Cellular mechanisms of redox cell signaling: the role of cysteine modification in controlling antioxidant defenses in response to electrophilic lipid oxidation products. *Biochem. J.* 378, 373–382.
- [13] Sánchez-Gómez, F.J., Cernuda-Morollón, E., Stamatakis, K. and Pérez-Sala, D. (2004) Protein thiol modification by 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ addition in mesangial cells: role in the inhibition of pro-inflammatory genes. *Mol. Pharmacol.* 66, 1349–1358.
- [14] Suzuki, M., Mori, M., Niwa, T., Hirata, R., Furuta, K., Ishikawa, T. and Noyori, R. (1997) Chemical implications for antitumor and antiviral prostaglandins: reaction of Δ^7 -prostaglandin A₁ and prostaglandin A₁ methyl esters with thiols. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 2376–2385.
- [15] Tanikawa, M. et al. (1998) Potent prostaglandin A₁ analogs that suppress tumor cell growth through induction of p21 and reduction of cyclin E. *J. Biol. Chem.* 273, 18522–18527.
- [16] Fernandes, P.A. et al. (2004) Design of 2-cyclopentenone derivatives with enhanced NF- κ B: DNA binding inhibitory properties. *J. Mol. Struct. – Theochem.* 685, 73–82.
- [17] Suzuki, M., Kiho, T., Tomokiyo, K., Furuta, K., Fukushima, S., Takeuchi, Y., Nakanishi, M. and Noyori, R. (1998) Rational design of antitumor prostaglandins with high biological stability. *J. Med. Chem.* 41, 3084–3090.
- [18] Straus, D.S. et al. (2000) 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ inhibits multiple steps in the NF- κ B signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 4844–4849.
- [19] Liu, J.D., Lin, S.Y., Ho, Y.S., Pan, S., Hung, L.F., Tsai, S.H., Lin, J.K. and Liang, Y.C. (2003) Involvement of c-jun N-terminal kinase activation in 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂- and prostaglandin A₁-induced apoptosis in AGS gastric epithelial cells. *Mol. Carcinogen.* 37, 16–24.
- [20] Paumi, C.M., Wright, M., Townsend, A.J. and Morrow, C.S. (2003) Multidrug resistance protein (MRP) 1 and MRP3 attenuate cytotoxic and transactivating effects of the cyclopentenone prostaglandin, 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ in MCF7 breast cancer cells. *Biochemistry* 42, 5429–5437.
- [21] Atsmon, J., Freeman, M.L., Meredith, M.J., Sweetman, B.J.L. and Jackson Roberts, I. (1990) Conjugation of 9-deoxy- Δ^9,Δ^{12} (E)-prostaglandin D₂ with intracellular glutathione and enhancement of its antiproliferative activity by glutathione depletion. *Cancer Res.* 50, 1879–1885.
- [22] Levonen, A.L., Dickinson, D.A., Moellering, D.R., Mulcahy, R.T., Forman, H.J. and Darley-Usmar, V.M. (2001) Biphasic effects of 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ on glutathione induction and apoptosis in human endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 1846–1851.
- [23] Narumiya, S., Ohno, K., Fukushima, M. and Fujiwara, M. (1987) Site and mechanism of growth inhibition by prostaglandins. III. Distribution and binding of prostaglandin A₂ and Δ^{12} -prostaglandin J₂ in nuclei. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 242, 306–311.
- [24] Noyori, R. and Suzuki, M. (1993) Organic synthesis of prostaglandins: advancing biology. *Science* 259, 44–45.

Protein Thiol Modification by 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂ Addition in Mesangial Cells: Role in the Inhibition of Pro-inflammatory Genes

Francisco J. Sánchez-Gómez, Eva Cernuda-Morollón, Konstantinos Stamatakis, and Dolores Pérez-Sala

Departamento de Estructura y Función de Proteínas, Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain

Received May 16, 2004; accepted August 18, 2004

ABSTRACT

The cyclopentenone prostaglandin and PPAR γ agonist 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂) displays anti-inflammatory effects in several experimental models. Direct modification of protein thiols is arising as an important mechanism of cyclopentenone prostaglandin action. However, little is known about the extent or specificity of this process. Mesangial cells (MC) play a key role in glomerulonephritis. In this work, we have studied the selectivity of protein modification by 15d-PGJ₂ in MC, and the correlation with the modulation of several pro-inflammatory genes. MC incubation with biotinylated 15d-PGJ₂ results in the labeling of a distinct set of proteins as evidenced by two-dimensional electrophoresis. 15d-PGJ₂ binds to nuclear and cytosolic targets as detected by fluorescence microscopy and subcellular fractionation. The pattern of biotinylated 15d-PGJ₂-modified polypeptides is readily distinguishable from that of total protein staining or labeling with biotinylated iodoacetamide. 15d-PGJ₂ addition requires the double bond in

the cyclopentane ring. 9,10-Dihydro-15d-PGJ₂, a 15d-PGJ₂ analog that shows the same potency as peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) agonist in MC but lacks the cyclopentenone moiety, displays reduced ability to modify proteins and to block 15d-PGJ₂ binding. Micromolar concentrations of 15d-PGJ₂ inhibit cytokine-elicited levels of inducible nitric-oxide synthase, cyclooxygenase-2, and intercellular adhesion molecule-1 in MC. In contrast, 9,10-dihydro-15d-PGJ₂ does not reproduce this inhibition. 15d-PGJ₂ effect is not blocked by the PPAR γ antagonist 2-chloro-5-nitro-N-phenylbenzamide (GW9662). Moreover, compounds possessing an α,β -unsaturated carbonyl group, like 2-cyclopenten-1-one and 2-cyclohexen-1-one, reduce pro-inflammatory gene expression. These observations indicate that covalent modification of cellular thiols by 15d-PGJ₂ is a selective process that plays an important role in the inhibition of MC responses to pro-inflammatory stimuli.

Cyclopentenone prostaglandins (cyPG) are endogenous prostanoids that arise from the dehydration of their parent PG. Thus, dehydration of PGE₂ gives rise to PGA₂, whereas cyPG of the J series, like PGJ₂ and 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ (15d-PGJ₂), arise from the dehydration of PGD₂. The generation of 15d-PGJ₂ has been reported to increase under situations associated with COX-2 induction, such as inflamma-

tory processes (Gilroy et al., 1999). 15d-PGJ₂ has been the subject of considerable study because of its identification as a ligand of the transcription factors known as peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR), which are involved in the control of lipid metabolism and immune response (Forman et al., 1995). During the course of these studies it has been realized that 15d-PGJ₂ may modulate multiple cellular functions by mechanisms dependent and independent of PPAR.

15d-PGJ₂ displays anti-inflammatory and protective effects against several types of injury both in cellular systems and in animal models (Rovin et al., 2001; Cuzzocrea et al., 2002; Ianaro et al., 2003b; Zingarelli et al., 2003). 15d-PGJ₂

This work was supported by grants from Ministerio de Ciencia y Tecnología SAF2003-03713 and Comunidad Autónoma de Madrid 08.4/0025.1/2003.

F.J.S.-G. and E.C.-M. contributed equally to this work.

Article, publication date, and citation information can be found at <http://molpharm.aspetjournals.org>. doi:10.1124/mol.104.002824.

ABBREVIATIONS: cyclopentenone, 2-cyclopenten-1-one; cyPG, cyclopentenone prostaglandin; PG, prostaglandin; 15d-PGJ₂, 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; iNOS, inducible nitric-oxide synthase; MC, mesangial cell; NF- κ B, nuclear factor κ B; AP-1, activator protein 1; COX-2, cyclooxygenase-2; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1; T0070907, 2-chloro-5-nitro-N-4-pyridinylbenzamide; TNF, tumor necrosis factor; HRP, Horseradish peroxidase; ECL, enhanced chemiluminescence; IL, interleukin; cyclohexenone, 2-cyclohexen-1-one; DMSO, dimethyl sulfoxide; GW9662, 2-chloro-5-nitro-N-phenylbenzamide; DAPI, 4,6-diamidino-2-phenylindole; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption ionization/time of flight; r.t., room temperature.

has been reported to attenuate the development of acute and chronic inflammation (Cuzzocrea et al., 2002) and to ameliorate the symptoms of septic shock (Zingarelli et al., 2003). In addition, micromolar concentrations of cyPG have been found to inhibit the expression of several pro-inflammatory genes including monocyte chemoattractant protein-1, matrix metalloproteinase-9, or inducible nitric-oxide synthase (iNOS) (Ricote et al., 1998; Reilly et al., 2001; Rovin et al., 2001). Although the pathophysiological importance of these findings is not clear at present, they can be of pharmacological relevance, because the elucidation of the mechanisms involved in the protective effects of cyPG could aid in the identification of potential targets for development of anti-inflammatory strategies. CyPG may modulate multiple cellular processes, including PPAR activation, generation of reactive oxidative species, induction of a heat shock response, and expression of proteins involved in cellular defense mechanisms, such as heme oxygenase (Straus and Glass, 2001). In addition, cyPG can directly modify cellular proteins. CyPG possess an α , β -unsaturated carbonyl group in the cyclopentane ring that can form covalent adducts with free thiols in glutathione or in proteins by Michael addition. This may result in the alteration of cellular redox status and/or in the modulation of protein function. Several proteins have been identified which can be covalently modified by 15d-PGJ₂. Some of these proteins are involved in the modulation of inflammation, including several components of the NF- κ B (Castrillo et al., 2000; Rossi et al., 2000; Straus et al., 2000; Cernuda-Morollón et al., 2001) and AP-1 activation pathways (Pérez-Sala et al., 2003), and proteins involved in the regulation of transcription factor activity by redox changes or electrophiles (Moos et al., 2003; Shibata et al., 2003; Itoh et al., 2004; Levonen et al., 2004). Therefore, the mechanisms operating in a given inflammatory situation may be multiple and depend on several factors like the structure and concentration of the cyPG, the cell type, and the nature of the inflammatory stimuli.

MC play an important role in glomerulonephritis because they are a source for inflammatory mediators, and key players in the production and turnover of extracellular matrix and in the interaction with leukocytes (Mené, 1996). MC express iNOS and cyclooxygenase-2 (COX-2) in response to pro-inflammatory agents, which are responsible for an increased generation of NO and prostaglandins (Rzymkiewicz et al., 1994; Saura et al., 1995). In their activated state, MC can also release cytokines that contribute to glomerular injury and express a variety of chemokines, integrins, and adhesion molecules, like intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), which play a pivotal role in leukocyte infiltration (Satriano et al., 1997). For these reasons, MC constitutes a relevant cellular model of inflammation. In this study, we illustrate the covalent modification of MC proteins by 15d-PGJ₂ and explore the contribution of this mechanism to the modulation of cytokine-elicited changes in the expression levels of the pro-inflammatory genes iNOS, COX-2, and ICAM-1.

Materials and Methods

Materials. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ was from Calbiochem-Novabiochem (San Diego, CA) or from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). 9,10-Dihydro-15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (9,10-dihydro-15d-PGJ₂), PGE₂, and T0070907 were from Cayman Chemi-

cal. Rosiglitazone was from Alexis Biochemicals. Recombinant human IL-1 β (5×10^7 U/mg) was from Roche Diagnostics S. L. (Barcelona, Spain). Recombinant human TNF- α was from Serotec (Oxford, UK). Polyclonal anti-iNOS and anti-c-Jun were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anti-COX-2 antibody was from Oxford Biomedical Research and anti-ICAM-1 was from R&D Systems (Minneapolis, MN). Horseradish peroxidase (HRP) conjugated anti-rabbit immunoglobulins were from DakoCytomation (Glostrup, Denmark). HRP-conjugated streptavidin and enhanced chemiluminescence (ECL) reagents were from Amersham Biosciences (Barcelona, Spain). Cell culture media and supplements were from Invitrogen S.A. (Barcelona, Spain). GelCode Blue Coomassie staining was from Pierce (Rockford, IL). All other reagents used were of the highest purity available from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Cell Culture and Treatments. Rat mesangial cells were obtained as reported earlier (Saura et al., 1995). Cells were grown in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin. For experiments, passages 7 to 18 were used. Confluent MC were incubated in serum-free medium for 24 h before experiments. For cytokine stimulation, cells were treated with a combination of 3 ng/ml IL-1 β plus 37 ng/ml TNF- α in serum-free medium without phenol red. PPAR agonists, 2-cyclopenten-1-one (cyclopentenone) and 2-cyclohexen-1-one (cyclohexenone) were dissolved in DMSO and added to cultures 2 h before cytokine stimulation. GW9662 and T0070907 were added in DMSO 30 min before PPAR agonists. Final DMSO concentration was 0.1% (v/v). Cells not treated with agonists received an equivalent volume of DMSO. iNOS activity was estimated from the accumulation of nitrite in the cell medium using the Griess method (Saura et al., 1995). Levels of the protein of interest were assessed by Western blot as described previously (Cernuda-Morollón et al., 2002). The levels of cellular actin were used as a control for intersample variability. None of the compounds used elicited pro-inflammatory gene expression in the absence of cytokines.

Plasmids and Transient Transfections. The PPAR reporter construct p4xAco-Luc, described in (He et al., 1999), was the generous gift of Drs. B. Vogelstein and K. W. Kinzler. To assess PPAR activity, preconfluent rat mesangial cells were incubated for 3 h in transfection mixture containing 1 μ g of 4xAco-Luc or empty vector (pBV-Luc) and 5 ng of pSG5-Renilla in Opti-MEM medium, in the presence of LipofectAMINE 2000 Reagent (Invitrogen). After a 4-h recovery period in serum-free medium, cells were treated with the indicated agents. The activities of firefly and *Renilla reniformis* luciferases present in cell lysates were measured using a dual luciferase reporter assay system from Promega (Madison, WI). All assays were done in duplicate and results are expressed as the ratio between firefly and *R. reniformis* luciferase activities.

Fluorescence Microscopy. 15d-PGJ₂ biotinylated at the carboxyl group was generously provided by Dr. F. J. Cañada. To visualize the subcellular distribution of 15d-PGJ₂ binding sites, cells were grown on glass coverslips. Subconfluent MC were incubated for 15 min in the presence of 10 μ M biotinylated 15d-PGJ₂ or vehicle (DMSO) in serum-free medium. After incubation, coverslips were washed several times with PBS and cells were fixed by a 15-min incubation with 3.5% formaldehyde and permeabilized by incubation with 0.05% Triton X-100 for 10 min. Coverslips were subsequently washed with PBS, incubated for 20 min with 1% (w/v) bovine serum albumin in PBS, and with 1 μ g/ml Alexa488-streptavidin (Molecular Probes Inc., Eugene, OR) for 30 min. To visualize cell nuclei, coverslips were incubated with 0.2 μ g/ml DAPI (Molecular Probes) for 20 min. After extensive washing, coverslips were allowed to dry and mounted with Fluorsafe (Calbiochem-Novabiochem). Fluorescence was observed with a Zeiss microscope connected to a charge-coupled device camera.

Incorporation of Biotinylated 15d-PGJ₂ into MC Proteins. MC were incubated with biotinylated 15d-PGJ₂ for 2 h in serum-free medium. Total cells lysates were obtained by disrupting cells in 50

mM Tris, pH 7.5, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.1 mM β -mercaptoethanol, 0.5% SDS containing 2 μ g/ml of each of the protease inhibitors: leupeptin, pepstatin A, and aprotinin. Nuclear and cytosolic extracts were obtained as described previously (Cernuda-Morollón et al., 2001). Protein concentration was determined by the BCA protein assay from Pierce (Rockford, IL). Fifteen microgram of protein from each experimental condition were electrophoresed on 12.5% polyacrylamide gels and transferred to Immobilon-P membranes (Millipore, Bedford, MA). For two dimensional electrophoresis, cells were lysed in 20 mM HEPES, pH 7.2, 50 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.3% sodium deoxycholate, and 0.1% SDS plus protease inhibitors. Aliquots of cell lysates containing 100 μ g of protein were precipitated with 10% TCA, resuspended in 130 μ l of IEF sample buffer (4% Triton X-100, 2 M thiourea, 7 M urea, 100 mM dithiothreitol, and 2% Bio-lute ampholytes) and loaded on Ready-Strip IPG Strips (pH 3–10; Bio-Rad) for isoelectric focusing on a Protean IEF cell (Bio-Rad), following the instructions of the manufacturer. For the second dimension, strips were equilibrated and loaded on 15% polyacrylamide SDS gels. Incorporation of biotinylated 15d-PGJ₂ into MC proteins was assessed by Western blot and detection with HRP-conjugated streptavidin and ECL, as described previously (Oliva et al., 2003; Pérez-Sala et al., 2003).

Binding of 15d-PGJ₂ to Proteins in Vitro. The ability of biotinylated 15d-PGJ₂ to form covalent adducts with proteins was explored in vitro by using total cell lysates or recombinant human c-Jun DNA binding domain as a model peptide by a Western blot assay, essentially as described previously by us (Pérez-Sala et al., 2003). The linearity of the detection of incorporated biotin was ensured by using a biotinylated BSA standard (Pierce). The formation of 15d-PGJ₂- or 9,10-dihydro-15d-PGJ₂-c-Jun adducts was assessed by MALDI-TOF mass spectrometry analysis as described previously (Pérez-Sala et al., 2003). In brief, peptides were purified by ZipTip C18 (Millipore, Bedford, MA). The laser desorption/ionization experiments were performed on a BIFLEX III time-of-flight instrument (Bruker-Franzen Analytik, Bremen, Germany) operated in the positive mode. A saturated solution of sinapinic acid in acetonitrile/water (1:2) with 0.1% trifluoroacetic acid was used as the matrix. Equal volumes (0.5 μ l) of the sample solution and the matrix were spotted on the target and air-dried. External calibration was performed, using the protein calibration standard II (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), and samples were analyzed in the linear mode.

Statistical Analysis. Results are expressed as mean \pm S.E.M. Statistical analysis was performed with the use of the unpaired two-tailed Student's *t* test or analysis of variance where applicable. Comparisons were considered statistically significant at the *p* < 0.05 level.

Results

15d-PGJ₂ Binds to Multiple Protein Targets in MC. CyPG may exert their effects by forming covalent adducts with cellular proteins. To assess the extent of protein modification in MC, we analyzed total lysates from cells incubated with 15d-PGJ₂ or biotinylated 15d-PGJ₂ by two-dimensional electrophoresis (Fig. 1). Western blot analysis of the two-dimensional gels showed the presence of several spots corresponding to endogenous biotinylated proteins in the lysates from cells treated with 15d-PGJ₂ (Fig. 1A). In gels from cells treated with biotinylated 15d-PGJ₂, we could detect at least 50 additional spots (Fig. 1B). The same labeling pattern was obtained in several experiments using different batches of cells. Total protein staining revealed over 350 spots. The biotin-positive spots did not coincide with the major proteins detected by Coomassie staining. These observations indicate that biotinylated 15d-PGJ₂ can bind to a defined set of tar-

gets in MC and this binding is determined by factors other than protein abundance.

15d-PGJ₂ Binds to Proteins Distributed in Nuclear and Cytosolic Compartments in MC. To date, a limited number of proteins that can be modified by cyPG have been identified using several experimental systems. To obtain a deeper knowledge of the cellular targets for 15d-PGJ₂ addition, we explored the distribution of the sites for covalent attachment of biotinylated 15d-PGJ₂ in MC by fluorescence microscopy. Incubation of MC in the presence of 10 μ M biotinylated 15d-PGJ₂ led to the incorporation of the modified PG into various cellular structures as detected with fluorescent streptavidin (Fig. 2A). The labeling pattern obtained after incubation with biotinylated 15d-PGJ₂ was clearly different from that of endogenous biotinylated proteins (Fig. 2A, vehicle), which showed a perinuclear distribution typical of mitochondrial localization, as expected for several biotin-dependent carboxylases (Hollinshead et al., 1997). In contrast, biotinylated 15d-PGJ₂ was distributed both in cytoplasmic and nuclear compartments. The position of cell nuclei is evidenced by staining with DAPI. To confirm the presence of both cytoplasmic and nuclear targets for covalent attachment of biotinylated 15d-PGJ₂ in MC, we performed subcellular fractionation. As depicted in Fig. 2B, incubation of MC with the biotinylated PG resulted in the incorporation of biotin into a broad number of polypeptides that could be detected both in nuclear extracts and in the cytosolic fraction. The patterns obtained in both fractions were different, show-

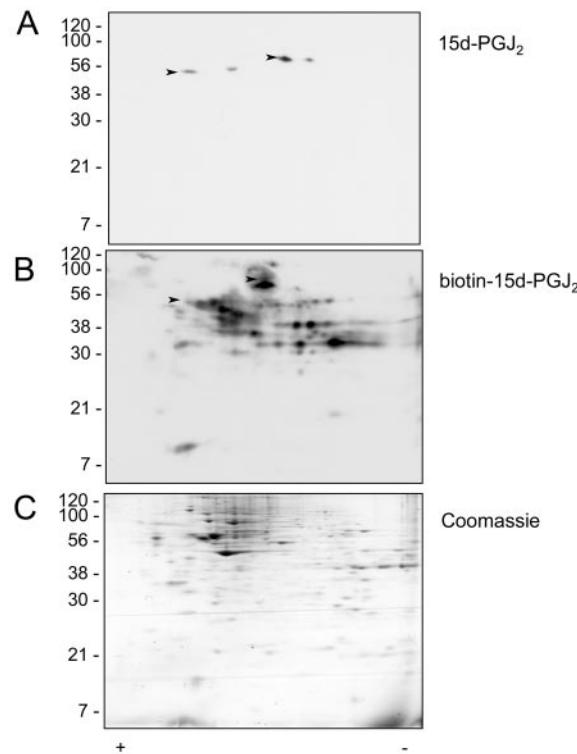


Fig. 1. Modification of MC proteins by biotinylated 15d-PGJ₂. MC were incubated with 5 μ M 15d-PGJ₂ or biotinylated 15d-PGJ₂ for 2 h. Cell lysates containing 100 μ g of protein were analyzed by two-dimensional electrophoresis and Western blot and by detection with HRP-conjugated streptavidin. ECL exposures were carried out for 1 min. The Coomassie staining of a gel run in parallel is shown in C. The position of molecular weight markers is shown on the left and that of the main endogenous biotinylated proteins is marked by arrowheads.

ing the presence of several polypeptides that were enriched in one of the fractions, some of which are marked by arrowheads in Fig. 2B.

Binding of Biotinylated 15d-PGJ₂ to Cellular Proteins Is Selective. We next explored the selectivity of protein modification by biotinylated 15d-PGJ₂. Incorporation of the biotin label into MC polypeptides after incubation of intact cells with biotinylated 15d-PGJ₂ was dose-dependent (Fig. 3A). Several faint bands could be distinguished above the background of endogenous biotinylated proteins after incubation of MC in the presence of 100 nM biotinylated 15d-PGJ₂, whereas micromolar concentrations of the biotinylated PG led to evident protein labeling. 15d-PGJ₂ can bind to purified proteins in vitro. We were interested in assessing the ability of 15d-PGJ₂ to modify MC proteins in cell-free extracts. After incubation of MC lysates with biotinylated 15d-PGJ₂, numerous biotin-containing polypeptides could be detected (Fig. 3B), although the intensity of the labeling was lower than when incubating intact cells with the same concentration of biotinylated 15d-PGJ₂. The available evidence suggests that the reaction of 15d-PGJ₂ with protein thiols does not occur randomly but takes place preferentially at specific cysteine residues within given proteins. To further substantiate this point, we compared the labeling pattern obtained by incubation of cell lysates with biotinylated 15d-PGJ₂ and with biotinylated iodoacetamide, a general cysteine-modifying reagent. Incubation of cell lysates with biotinylated iodoacetamide led to the incorporation of biotin into multiple polypeptide bands in a pattern that closely resembled total protein staining (Fig. 3B) and was readily distinguishable from biotinylated 15d-PGJ₂-induced protein modification. These differences were analyzed by image scanning and quantitation of the blots shown in Fig. 3B. The profiles obtained, shown in Fig. 3C, clearly illustrate the lack of coincidence between the main targets for biotinylated 15d-PGJ₂ and biotinylated iodoacetamide incorporation. Taken together, these observations suggest that binding of biotinylated 15d-PGJ₂ occurs at a specific set of cellular proteins and does not correlate with thiol accessibility.

Importance of the Cyclopentenone Moiety in the Modification of Protein Targets by 15d-PGJ₂. We have reported previously that c-Jun is a target for 15d-PGJ₂ addition, both in vitro and in intact cells (Pérez-Sala et al., 2003). To explore the structural requirements for protein modifica-

tion by 15d-PGJ₂, we performed an in vitro assay using a peptide from human c-Jun as a model of Michael acceptor. This peptide contains two cysteine residues; of them, the one equivalent to cysteine 269 in full-length human c-Jun has been shown to be the preferential site of modification by 15d-PGJ₂ (Pérez-Sala et al., 2003). The formation of adducts between 15d-PGJ₂ and the c-Jun peptide was monitored by MALDI-TOF mass spectrometry (Fig. 4). The control c-Jun peptide showed a peak $m/z = 13,479$, which corresponds to the calculated mass of the construct (Pérez-Sala et al., 2003). As we have reported previously, 15d-PGJ₂ (mass 316.5 Da) readily formed an adduct with c-Jun, as indicated by the appearance of a peak m/z at 13,795. We next explored the behavior of 9,10-dihydro-15d-PGJ₂, a 15d-PGJ₂ analog that lacks the cyclopentenone structure. This analog was designed to retain PPAR γ agonist activity and to be more resistant to metabolism through conjugation with glutathione, which has been proposed to occur across the α,β -unsaturated enone, and more specifically through carbon 9 (Paumi et al., 2003). A peak m/z of 13,802 was detected in the 9,10-dihydro-15d-PGJ₂-treated c-Jun sample (Fig. 4), which is compatible with the formation of an adduct between c-Jun and the 9,10-dihydro analog (expected m/z , 13,798). This suggests that in the absence of the electrophilic carbon in the cyclopentane ring, conjugation can occur through the electrophilic carbon at position 13. However, this analog is less efficient than 15d-PGJ₂ at forming a Michael adduct with c-Jun, as estimated from the relative intensity of the corresponding peaks. As expected, PGE₂, which does not possess an unsaturated carbonyl group, did not bind to the c-Jun peptide.

We next compared the performance of the various prostaglandins by using a Western blot-based competition assay. As it is shown in Fig. 5A, incubation of the c-Jun fragment with biotinylated iodoacetamide resulted in the incorporation of the biotin label as detected by Western blot and detection with HRP-conjugated streptavidin. Preincubation of the c-Jun construct with 15d-PGJ₂ clearly reduced labeling with biotinylated iodoacetamide (49 \pm 3% inhibition, average \pm S.E.M. of three assays). 9,10-Dihydro-15d-PGJ₂ was much less effective than 15d-PGJ₂ (15 \pm 7% reduction), and PGE₂ was virtually ineffective. In addition, we observed that the binding of biotinylated 15d-PGJ₂ to c-Jun in vitro was blocked by the presence of an excess of nonbiotinylated 15d-PGJ₂ (94 \pm 6% inhibition, average \pm S.E.M. of three assays).

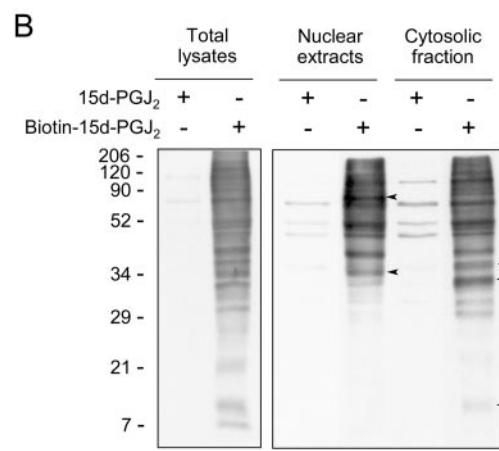
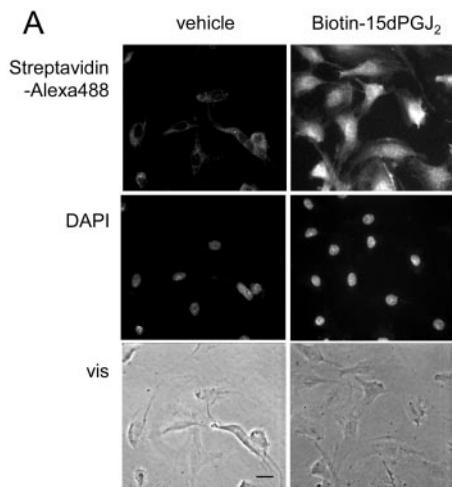


Fig. 2. Biotinylated 15d-PGJ₂ binds to nuclear and cytosolic proteins in MC. A, MC grown on glass coverslips were incubated with vehicle or 10 μ M biotinylated 15d-PGJ₂ and biotin-positive structures were visualized by incubation with Alexa488-streptavidin. The position of cell nuclei is evidenced by staining with DAPI, and cell morphology under visible light is shown at bottom (vis). Images were obtained at 40 \times magnification; scale bar, 25 μ m. B, MC were incubated in the presence of 5 μ M 15d-PGJ₂ or biotinylated 15d-PGJ₂ for 2 h, and the presence of biotinylated polypeptides in several cellular fractions was assessed by Western blot and detection with HRP-streptavidin. Arrowheads mark the position of bands that seem enriched in one of the fractions.

but it was only partially reduced by 9,10-dihydro-15d-PGJ₂ ($51 \pm 14\%$ reduction) and not affected by PGE₂ (Fig. 5B). Consistent with the results shown above, the binding of biotinylated 15d-PGJ₂ to proteins in MC lysates was markedly reduced by the presence of an excess of nonbiotinylated 15d-PGJ₂, whereas 9,10-dihydro-15d-PGJ₂ and PGE₂ only moderately reduced protein labeling (Fig. 5C). The labeling in the presence of an excess of 9,10-dihydro-15d-PGJ₂, as estimated from the scanning of several bands, was reduced by 20 to 30%

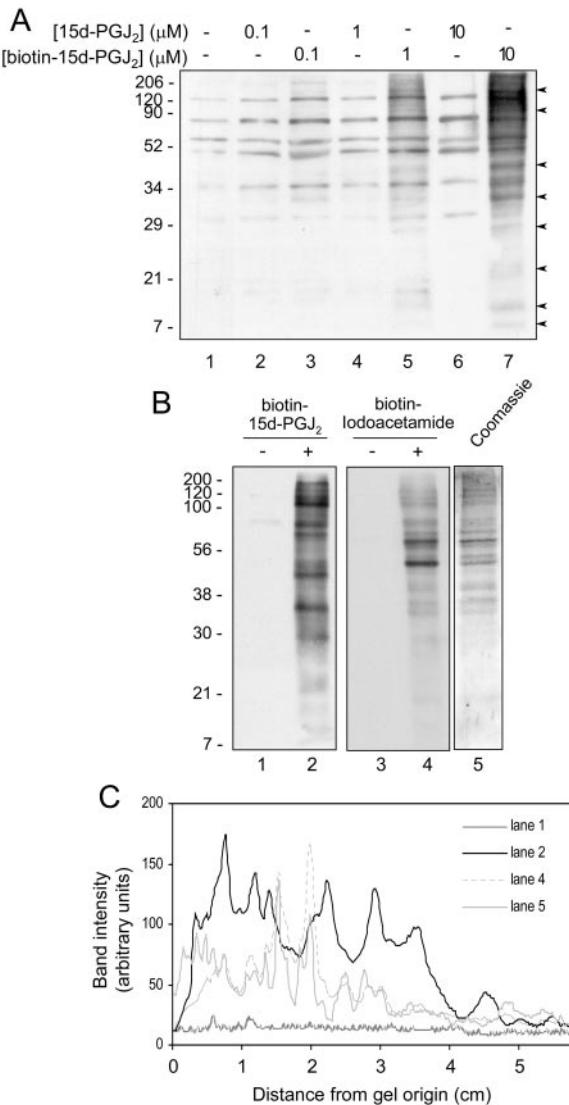


Fig. 3. Protein modification by biotinylated 15d-PGJ₂ in intact cells and in cell lysates. A, MC were incubated with increasing concentrations of 15d-PGJ₂ or biotinylated 15d-PGJ₂, and biotin-containing polypeptides in total cell lysates were detected by Western blot. To visualize faint bands, ECL exposures were carried out for 2 min. To show all the experimental conditions in the same exposure without saturating the signal, 2 μg of protein was loaded onto lane 7, 5 μg on lane 5, and 10 μg on the remaining lanes. B, MC lysates containing 6 μg of protein were incubated for 1 h at r.t. with vehicle, 10 μM biotinylated 15d-PGJ₂, or 2 mM biotinylated iodoacetamide, as indicated. Aliquots containing 6 μg (lanes 1, 2, and 5) or 0.6 μg of protein (lanes 3 and 4) were analyzed by SDS-PAGE, and biotin-containing polypeptides were detected by Western blot. Lane 5 shows the Coomassie staining of a blot run in parallel. Results shown are representative of three independent experiments. C, the blots shown in B were quantitated after image scanning, and the profiles obtained for each lane are shown. Results are expressed in arbitrary units.

compared with the labeling in the presence of PGE₂, which does not bind covalently to proteins, whereas 15d-PGJ₂ elicited an 80% inhibition. Taken together, these observations suggest that, although the 9,10-dihydro analog of 15d-PGJ₂ can form adducts with proteins to some extent, the double bond at position 9–10 in the cyclopentane ring of 15d-PGJ₂ is an important determinant for its binding to protein targets.

15d-PGJ₂ and 9,10-Dihydro-15d-PGJ₂ Activate PPAR in MC. To use 9,10-dihydro-15d-PGJ₂ as a tool to assess the relative importance of the multiple mechanisms potentially involved in the effects of 15d-PGJ₂ in MC, we compared the potency of both compounds as PPAR agonists. As shown in Fig. 6A, 9,10-dihydro-15d-PGJ₂ was able to activate PPAR to the same extent as 15d-PGJ₂, as assessed using a luciferase reporter assay. These results indicate that 15d-PGJ₂ and 9,10-dihydro-15d-PGJ₂ are equipotent as PPAR agonists in MC. The high-affinity PPAR γ agonist rosiglitazone also activated PPRE activity, although to a lower extent than 9,10-dihydro-15d-PGJ₂, and this effect was partially blocked by the PPAR γ antagonist T0070907 (Lee et al., 2002) (27% reduction of the rosiglitazone-elicited stimulation; Fig. 6B). In contrast, the electrophilic compounds cyclopentenone and cyclohexenone did not activate PPAR (Fig. 6B).

Role of Protein Modification in the Effects of 15d-PGJ₂ on iNOS Induction. iNOS is a key pro-inflammatory gene that can be modulated by cyPG (Ricote et al., 1998; Kwon et al., 1999). However, the mechanisms responsible for their effects have not been fully elucidated. We observed that micromolar concentrations of 15d-PGJ₂ markedly inhibited both nitrite accumulation and iNOS protein levels in MC stimulated with IL-1 β plus TNF- α (Fig. 7A). In contrast, 9,10-dihydro-15d-PGJ₂ did not reduce iNOS induction. None of these compounds modulated nitrite generation or iNOS levels per se. These results indicate that the double bond at the 9 position in 15d-PGJ₂ is important for its ability to interfere with iNOS induction. The observation that both compounds activate PPAR to the same extent makes it unlikely that the inhibitory effect of 15d-PGJ₂ is related to PPAR activation. In accordance to this, the PPAR γ antagonist GW9662 did not reduce 15d-PGJ₂ inhibition of iNOS induction (Fig. 7B). The PPAR γ agonist rosiglitazone, which is not structurally related to 15d-PGJ₂, did not inhibit iNOS levels but increased them (Fig. 7C), although the antagonist T0070907 did not elicit appreciable changes in this assay. In addition, the compound cyclopentenone, which mimics only the cyclopentenone moiety of 15d-PGJ₂ and does not activate PPAR, at concentrations similar to those used in previous studies (Straus et al., 2000; Cippitelli et al., 2003), effectively reduced cytokine-elicited iNOS levels (Fig. 8). Moreover, another cyclic electrophile possessing an unsaturated carbonyl group, but unrelated to 15d-PGJ₂, such as cyclohexenone, blunted iNOS induction in MC (Fig. 8). Under our conditions, cyclohexenone was a more potent inhibitor than cyclopentenone and completely abrogated cytokine-elicited iNOS levels at all concentrations assayed (50 to 200 μM, not shown).

Effect of 15d-PGJ₂ on the Levels of COX-2 and ICAM-1 in MC. To assess the significance of these findings, we next explored the modulation of two additional proteins that play key roles in glomerular inflammation, COX-2 and ICAM-1. As observed with iNOS, treatment of MC with 15d-PGJ₂ before stimulation with cytokines strongly inhibited the induction of COX-2 and ICAM-1 (62 ± 10% and 79 ± 13% inhibition, aver-

age \pm S.E.M. of five and four assays, respectively, $p < 0.05$ in both cases) (Fig. 9). It is remarkable that the 9,10-dihydro analog of 15d-PGJ₂, not only did not reduce COX-2 induction but also potentiated it (4.1 ± 0.8 -fold amplification of cytokine stimulation, $n = 6$), whereas it did not affect ICAM-1 (Fig. 9A). Neither the inhibitory effect of 15d-PGJ₂ nor the amplifying effect of 9,10-dihydro-15d-PGJ₂ on COX-2 levels was reduced in the presence of the PPAR γ antagonist GW9662. Both cyclohexenone and cyclohexenone inhibited COX-2 and ICAM-1 induction by cytokines. The inhibition of COX-2 induction by cyclopentenone reached $51 \pm 10\%$, average \pm S.E.M. of three assays, $p < 0.05$ by *t* test. Cyclohexenone completely abrogated COX-2 induction (Fig. 9B). Cyclopentenone inhibited cytokine-elicited ICAM levels by $66 \pm 13\%$, average \pm S.E.M. of three assays, $p < 0.05$. Treatment with cyclohexenone before cytokine stimulation reduced ICAM protein below basal levels. These results strengthen our hypothesis that the reactivity of 15d-PGJ₂ toward cellular thiols is important for its anti-inflammatory effects.

Discussion

CyPG, and 15d-PGJ₂ in particular, have attracted considerable attention recently because of their remarkable biological effects. 15d-PGJ₂ has been reported to exert anti-inflammatory or protective effects in both cellular and animal models of inflammation or injury. These effects were first attributed to its activity as an agonist of the transcription factor PPAR γ . However, it is becoming gradually more accepted that an important determinant of 15d-PGJ₂ activity resides in its cyclopentenone structure, capable of forming covalent adducts with thiol groups by Michael addition. In this study, we have observed that 15d-PGJ₂ binds to multiple but selective protein targets in MC and that the presence of the cyclopentenone moiety is important both for protein mod-

ification and for inhibition of the levels of pro-inflammatory proteins.

In light of recent in vitro and in vivo studies, a potential for cyPG or related compounds as pharmacological tools in the treatment of inflammatory conditions has been raised. Some recent examples of the beneficial effects of cyPG include the amelioration of acute renal failure (Chatterjee et al., 2004) and the reduction of restenosis after balloon angioplasty in rats (Ianaro et al., 2003b) by 15d-PGJ₂, effects that have been attributed to its ability to inhibit NF- κ B and the expression of pro-inflammatory genes. However, the possibility that cyPG may freely react with protein thiols may constitute a drawback to their use in therapy because it could contribute to lack of specificity or multiplicity of unwanted biological effects. The experiments presented herein illustrate that covalent binding of a biotinylated analog of 15d-PGJ₂ to MC proteins is not determined by protein abundance or simply by the presence of accessible cysteine residues. This implies that the process of protein modification by these products of the arachidonic acid pathway, which could be referred to as eicosanylation or prostanylation, displays a selectivity probably related to protein or cellular context. By using two-dimensional electrophoresis, we have observed that biotinylated 15d-PGJ₂ binds to a broad but limited set of proteins in intact cells. Although the possibility that the reactivity of biotinylated 15d-PGJ₂ may not be identical to that of 15d-PGJ₂ should be taken into account, our observations provide a starting point for the identification and subsequent functional studies of the modified proteins that will help to predict the potential consequences of 15d-PGJ₂ treatment.

The cyclopentenone moiety of 15d-PGJ₂ has been proposed as an important structural feature for some of the effects of this cyPG (Straus et al., 2000; Ianaro et al., 2003a). The 9,10-dihydro analog of 15d-PGJ₂ differs only in the absence of the endocyclic double bond and is therefore not a cyclo-

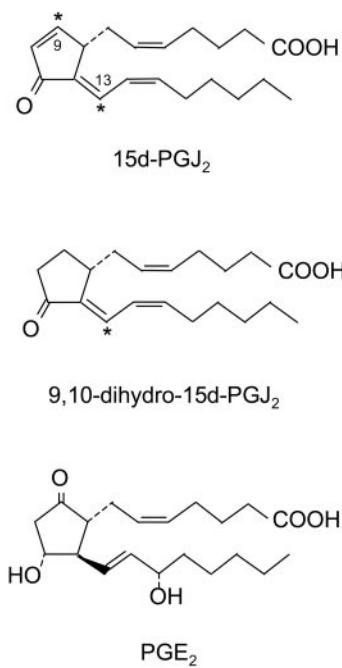
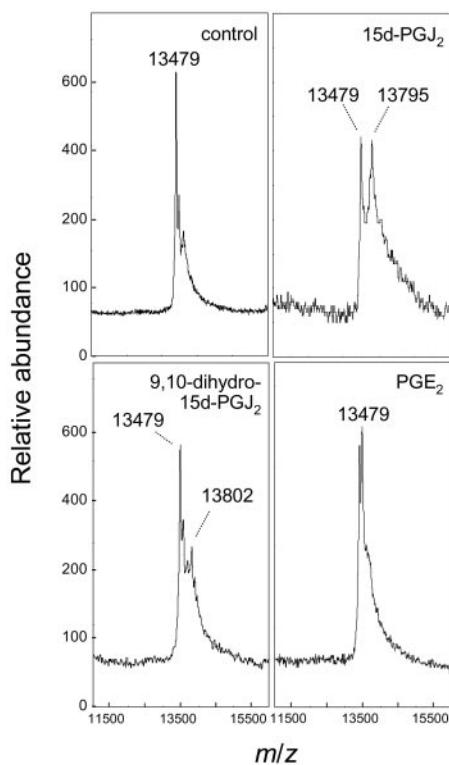


Fig. 4. MALDI-TOF mass spectrometry analysis of the interaction between c-Jun and several PG. c-Jun construct ($5 \mu\text{M}$) was incubated with $10 \mu\text{M}$ concentrations of the indicated compounds for 1 h at r.t. and analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry. Results shown are representative of three assays. The structure of the compounds used is shown on the right. Electrophilic carbons are marked by asterisks.

tenone. This compound, designed as an analog of 15d-PGJ₂ unable to undergo conjugation with glutathione across carbon 9, has been previously proposed as a tool to explore the importance of conjugation with thiols in the effect of 15d-PGJ₂ (Cippitelli et al., 2003; Paumi et al., 2003). However, the ability of 9,10-dihydro-15d-PGJ₂ to form adducts with proteins has not been explored. Our results indicate that 9,10-dihydro-15d-PGJ₂ still retains the ability to form covalent adducts with proteins, as observed in vitro using a fragment of c-Jun as a model. This suggests that other electrophilic carbons present in the molecule of 15d-PGJ₂, such as carbon 13, may also participate in the formation of Michael adducts with proteins. This hypothesis is in agreement with previous reports that have identified the formation of bis-conjugates of 15d-PGJ₂ with c-Jun (Pérez-Sala et al., 2003) and of 9-deoxy- $\Delta^9,\Delta^{12}(E)$ -PGD₂, a cyPG that also possesses two electrophilic carbons, with glutathione (Atsmon et al., 1990). Nevertheless, our results suggest that 9,10-dihydro-

15d-PGJ₂ shows reduced potency as a cysteine-modifying agent, as deduced from its lesser ability to block the incorporation of biotinylated iodoacetamide or biotinylated 15d-PGJ₂ into both recombinant proteins and cellular lysates. Consistent with this, in conditions under which 9,10-dihydro-15d-PGJ₂ and 15d-PGJ₂ were equipotent at activating a PPRE reporter, 9,10-dihydro-15d-PGJ₂ did not mimic the marked inhibitory effect of 15d-PGJ₂ on the levels of iNOS, COX-2, or ICAM-1. However, a moderate inhibitory effect could be evidenced with concentrations of 9,10-dihydro-15d-PGJ₂ above 20 μ M (results not shown). Taken together, these observations suggest that the cyclopentenone structure of 15d-PGJ₂ is an important determinant both in the inhibition of the induction of pro-inflammatory genes and in the ability of 15d-PGJ₂ to modify cellular proteins. However, 15d-PGJ₂ analogs retaining electrophilic carbons cannot be considered inert compounds with respect to cysteine modification, and care should be exercised when using them as a control for the actions of cyPG.

CyPG have been shown to inhibit the induction of various pro-inflammatory genes in several experimental systems. However, the mechanisms responsible for this effect may be multiple and seem to be dependent on the system under study. An involvement of PPAR γ has been proposed in cyPG-mediated inhibition of IL-1 β -elicited iNOS induction in car-

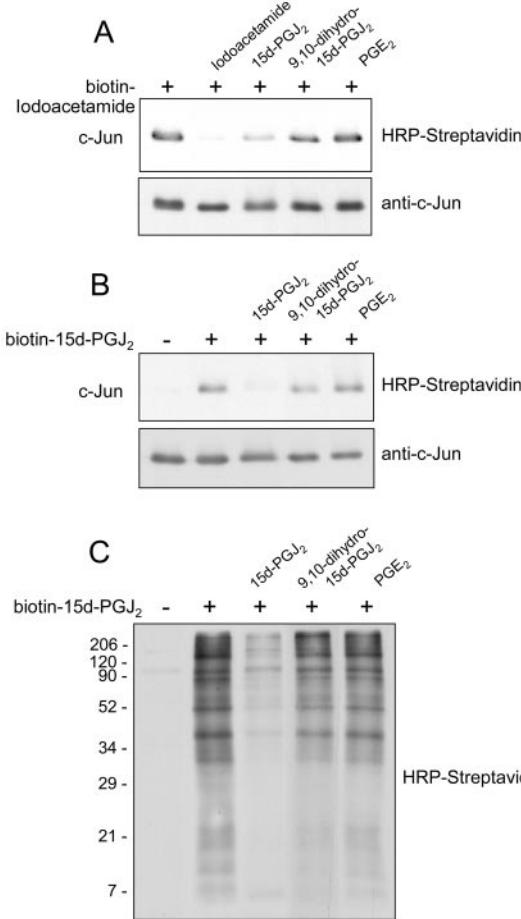


Fig. 5. Effect of several PG on the binding of biotinylated iodoacetamide or biotinylated 15d-PGJ₂ to c-Jun or cell lysates in vitro. A, c-Jun construct was preincubated with the indicated PG at 100 μ M final concentration or 2 mM iodoacetamide for 1 h at r.t. and subsequently incubated in the presence of 2 mM biotinylated iodoacetamide for 30 min. B, c-Jun was incubated with 1 μ M biotinylated 15d-PGJ₂ for 1 h at r.t. in the absence or presence of 100 μ M of the indicated compounds. C, aliquots from total cell lysates containing 6 μ g of protein were incubated with 10 μ M biotinylated 15d-PGJ₂ in the presence of 1 mM concentrations of the indicated PG. Incubation mixtures were subjected to SDS-PAGE and Western blot followed by detection with HRP-conjugated streptavidin or anti-c-Jun antibody, as indicated. Exposures shown are representative of at least three experiments with similar results for every assay.

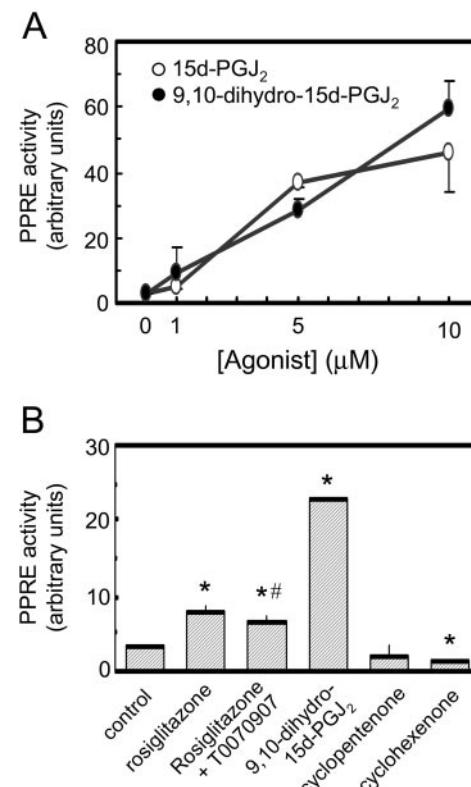


Fig. 6. Effect of 15d-PGJ₂ and 9,10-15d-PGJ₂ on the activity of a PPRE reporter. MC were transiently transfected with p4xAc-Luc plus pSG5-Renilla and treated for 16 h with the indicated concentrations of 15d-PGJ₂ or 9,10-dihydro-15d-PGJ₂ (A) or with 100 μ M cyclopentenone, 100 μ M cyclohexenone, 5 μ M rosiglitazone, 1 μ M T0070907, or 5 μ M 9,10-dihydro-15d-PGJ₂, as indicated (B). Results are expressed as the ratio between firefly and *R. reniformis* luciferase activities. Results are average values \pm S.E.M. of three independent experiments performed in duplicate. (*, $p < 0.05$ versus control by *t* test; #, $p < 0.05$ versus rosiglitazone).

diomyocytes (Mendez and LaPointe, 2003) and in human chondrocytes (Fahmi et al., 2001), as well as in the modulation of myeloperoxidase by 15d-PGJ₂ (Kumar et al., 2004) and in the protective effects of this cyPG in endotoxemia (Collin et al., 2004) and ischemia-reperfusion injury (Cuzzocrea et al., 2003). In contrast, PPAR γ -independent mechanisms have been invoked for the inhibitory actions of 15d-PGJ₂ on the expression of iNOS in pancreatic β -cells and in IFN γ -induced macrophages (Chen et al., 2003; Weber et al.,

2004), for the inhibition of NF- κ B and AP-1 in cells expressing undetectable levels of PPAR γ , such as HeLa cells (Straus et al., 2000; Pérez-Sala et al., 2003), and for some of the in vivo anti-inflammatory effects (Ianaro et al., 2003a). The effect of 15d-PGJ₂ on iNOS induction in MC and the mechanisms involved have not been previously addressed. Our results suggest that in MC the inhibition of cytokine-elicited

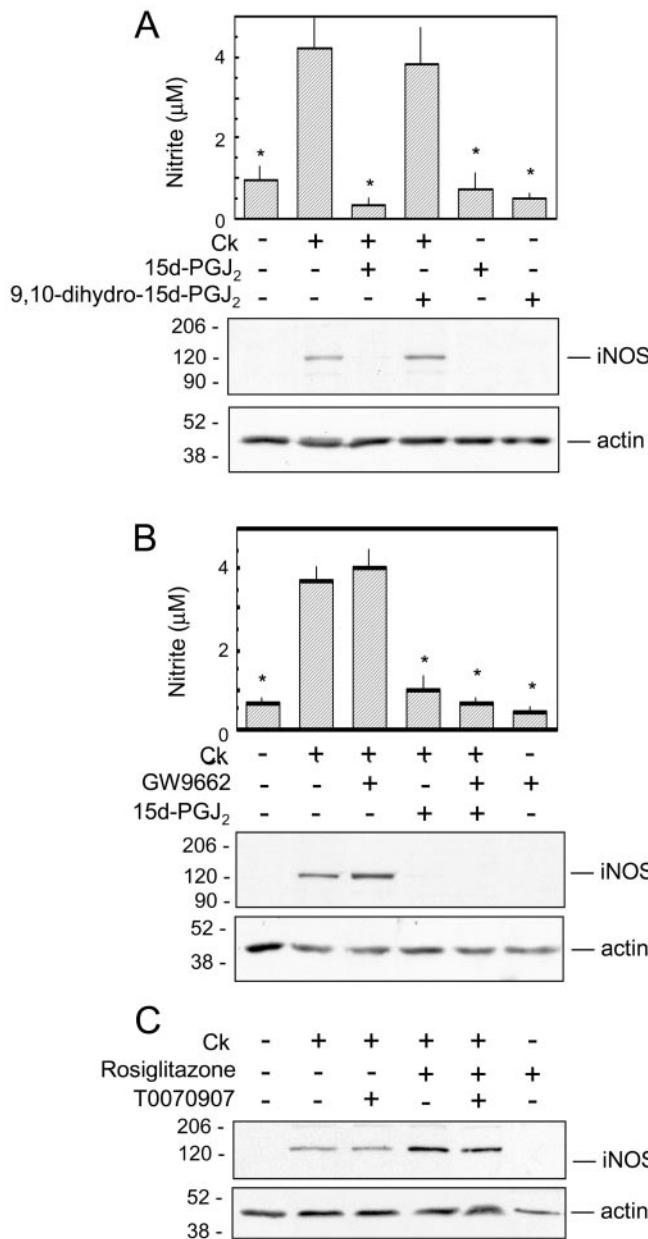


Fig. 7. Effect of 15d-PGJ₂ on iNOS induction is independent from PPAR γ activity. A, MC were preincubated for 2 h with the indicated PPAR agonists at 5 μ M before stimulation with IL-1 β plus TNF- α (Ck). B, MC were pretreated with 10 μ M GW9662 before addition of 15d-PGJ₂. C, MC were preincubated with 1 μ M T0070907 before addition of 5 μ M rosiglitazone. After 16 h of treatment with cytokines, the accumulation of nitrite in the cell supernatant was measured by the Griess method. Results are average values \pm S.E.M. of three experiments (*, $p < 0.05$ versus Ck by t test). Levels of iNOS and actin in MC extracts were assessed by Western blot. ECL exposures are representative of three experiments with similar results.

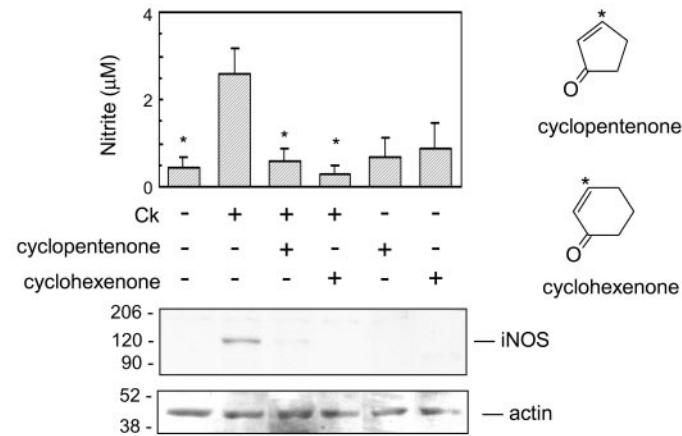


Fig. 8. Cyclopentenone and cyclohexenone inhibit iNOS induction. MC were pretreated with 100 μ M cyclopentenone or cyclohexenone for 2 h before stimulation with Ck. Levels of nitrite in the cell supernatants and of iNOS protein and actin in cell lysates were assessed as in Fig. 7. Results are average values \pm S.E.M. of three experiments (*, $p < 0.05$ versus Ck by t test). ECL exposures are representative of three experiments with similar results. The structure of the compounds used is shown on the right. Electrophilic carbons are marked by asterisks.

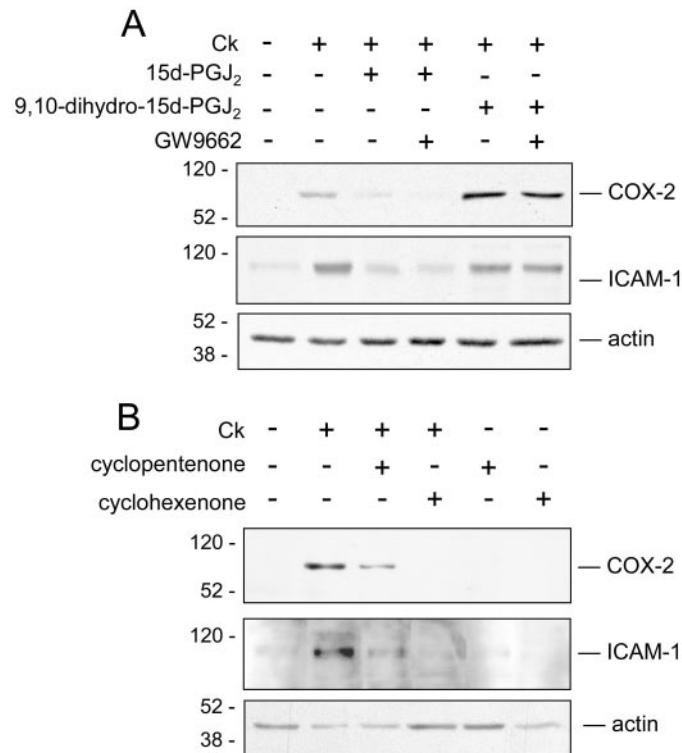


Fig. 9. Effect of several electrophilic compounds on the expression of COX-2 and ICAM-1 in MC. MC were pretreated with the indicated compounds, as specified in Fig. 7 and 8, before stimulation with Ck, and the protein levels of COX-2, ICAM-1, and actin were assessed by Western blot. ECL exposures are representative of three experiments with similar results.

iNOS induction is largely independent of PPAR γ activation. This inference is based on the fact that 15d-PGJ₂ and its 9,10-dihydro analog have different effects on iNOS induction but are equally potent as PPAR agonists, on the lack of effect of the PPAR γ antagonist GW9662 on 15d-PGJ₂-elicited inhibition, and on the inhibitory effect of other electrophiles, such as cyclopentenone and cyclohexenone. In addition, the PPAR γ ligand rosiglitazone increased iNOS levels rather than reducing them. This observation is also supported by previous results from our laboratory showing that other PPAR agonists amplify cytokine-elicited iNOS induction (Cernuda-Morollón et al., 2002). It is interesting that the inhibition of the induction of two additional pro-inflammatory genes, such as COX-2 and ICAM-1, also requires the presence of the endocyclic double bond of 15d-PGJ₂. It is remarkable that the absence of this bond, as it occurs in the 9,10-dihydro analog of 15d-PGJ₂, results in a strong potentiation of COX-2 induction. The elucidation of the mechanism of this effect, which is not blocked by GW9662, will require further investigation.

In conclusion, the observations described above point to the importance of covalent protein modification in the anti-inflammatory effects of 15d-PGJ₂. Our work illustrates the requirements, extent and selectivity of protein modification by 15d-PGJ₂ in MC. The identification of the detected targets for cyPG addition will provide a deeper insight into the mechanism of action and potential applications of these eicosanoids.

Acknowledgments

We thank Dr. F. J. Cañada for helpful comments and discussion, Dr. A. Prieto for help with mass spectrometry, and M. Jesús Carrasco for technical assistance.

References

- Atsmon J, Sweetman BJ, Baertschi SW, Harris TM, and L. Jackson Roberts I (1990) Formation of thiol conjugates of 9-deoxy- $\Delta^{12,14}$ (E)-prostaglandin D₂ and $\Delta^{12,14}$ (E)-prostaglandin D₂. *Biochemistry* **29**:3760–3765.
- Castillo A, Diaz-Guerra MJ, Hortelano S, Martin-Sanz P, and Bosca L (2000) Inhibition of IkappaB kinase and IkappaB phosphorylation by 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ in activated murine macrophages. *Mol Cell Biol* **20**:1692–1698.
- Cernuda-Morollón E, Pineda-Molina E, Cañada FJ, and Pérez-Sala D (2001) 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ inhibition of NF- κ B DNA binding through covalent modification of the p50 subunit. *J Biol Chem* **276**:35530–35536.
- Cernuda-Morollón E, Rodríguez-Pascual F, Klatt P, Lamas S, and Pérez-Sala D (2002) PPAR agonists amplify iNOS expression while inhibiting NF- κ B: implications for mesangial cell activation by cytokines. *J Am Soc Nephrol* **13**:2223–2231.
- Chatterjee PK, Patel NS, Cuzzocrea S, Brown PA, Stewart KN, Mota-Filipe H, Britti D, Eberhardt W, Pfeilschifter J, and Thiemermann C (2004) The cyclopentenone prostaglandin 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ ameliorates ischemic acute renal failure. *Cardiovasc Res* **61**:630–643.
- Chen CW, Chang YH, Tsai CJ, and Lin WW (2003) Inhibition of IFN-gamma-mediated inducible nitric oxide synthase induction by the peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂, involves inhibition of the upstream Janus kinase/STAT1 signaling pathway. *J Immunol* **171**:979–988.
- Cippitelli M, Fianda C, Di Bona D, Lupo A, Piccoli M, Frati L, and Santoni A (2003) The cyclopentenone-type prostaglandin 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ inhibits CD95 ligand gene expression in T lymphocytes: interference with promoter activation via peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-independent mechanisms. *J Immunol* **170**:4578–4592.
- Collin M, Patel N, Dugo L, and Thiemermann C (2004) Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in the protection afforded by 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ against the multiple organ failure caused by endotoxin. *Crit Care Med* **32**:826–831.
- Cuzzocrea S, Pisano B, Dugo L, Ianaro A, Patel NS, Di Paola R, Genovese T, Chatterjee PK, Di Rosa M, Caputi AP, et al. (2003) Rosiglitazone and 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂, ligands of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma), reduce ischaemia/reperfusion injury of the gut. *Br J Pharmacol* **140**:366–376.
- Cuzzocrea S, Wayman NS, Mazzon E, Dugo L, Di Paola R, Serraino I, Britti D, Chatterjee PK, Caputi AP, and Thiemermann C (2002) The cyclopentenone prostaglandin 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ attenuates the development of acute and chronic inflammation. *Mol Pharmacol* **61**:997–1007.
- Fahmi H, Di Battista JA, Pelletier JP, Mineau F, Ranger P, and Martel-Pelletier J (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit interleukin-1beta-induced nitric oxide and matrix metalloproteinase 13 production in human chondrocytes. *Arthritis Rheum* **44**:595–607.
- Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, and Evans RM (1995) 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* **83**:803–812.
- Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willis D, Chivers J, Paul-Clark MJ, and Willoughby DA (1999) Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med* **5**:698–701.
- He TC, Chan TA, Vogelstein B, and Kinzler KW (1999) PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell* **99**:335–345.
- Hollinshead M, Sanderson J, and Vaux DJ (1997) Anti-biotin antibodies offer superior organelle-specific labeling of mitochondria over avidin or streptavidin. *J Histochem Cytochem* **45**:1053–1057.
- Ianaro A, Ialenti A, Maffia P, Di Meglio P, Di Rosa M, and Santoro MG (2003a) Anti-inflammatory activity of 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ and 2-cyclopenten-1-one: role of the heat shock response. *Mol Pharmacol* **64**:85–93.
- Ianaro A, Maffia P, Cuzzocrea S, Mazzon E, Santoro MG, Di Rosa M, and Ialenti A (2003b) 2-Cyclopenten-1-one and prostaglandin J₂ reduce restenosis after balloon angioplasty in rats: role of NF-kappaB. *FEBS Lett* **553**:21–27.
- Itoh K, Mochizuki M, Ishii Y, Ishii T, Shibata T, Kawamoto Y, Kelly V, Sekizawa K, Uchida K, and Yamamoto M (2004) Transcription factor Nrf2 regulates inflammation by mediating the effect of 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂. *Mol Cell Biol* **24**:36–45.
- Kumar A, Piedrafita F, and Reynolds W (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands regulate myeloperoxidase expression in macrophages by an estrogen-dependent mechanism involving the -463GA promoter polymorphism. *J Biol Chem* **279**:8300–8315.
- Kwon G, Xu G, Marshall CA, and McDaniel ML (1999) Tumor necrosis factor α -induced pancreatic β -cell insulin resistance is mediated by nitric oxide and prevented by 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ and aminoguanidine. A role for peroxisome proliferator-activated receptor γ activation and iNOS expression. *J Biol Chem* **274**:18702–18708.
- Lee G, Elwood F, McNally J, Weiszmann J, Lindstrom M, Amaral K, Nakamura M, Miao S, Cao P, Learned RM, et al. (2002) T0070907, a selective ligand for peroxisome proliferator-activated receptor γ , functions as an antagonist of biochemical and cellular activities. *J Biol Chem* **277**:19649–19657.
- Levonen AL, Landar L, Ramachandran A, Ceaser EK, Dickinson DA, Zanoni G, Morrow JD, and Darley-Usmar VM (2004) Cellular mechanisms of redox cell signaling: the role of cysteine modification in controlling antioxidant defenses in response to electrophilic lipid oxidation products. *Biochem J* **378**:373–382.
- Mendez M and LaPointe MC (2003) PPARgamma inhibition of cyclooxygenase-2, PG-E₂ synthase and inducible nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *Hypertension* **42**:844–850.
- Mené P (1996) Physiology and pathophysiology of the mesangial cell. *Nefrología* **16**:8–13.
- Moos PJ, Edes K, Cassidy P, Massuda E, and Fitzpatrick FA (2003) Electrophilic prostaglandins and lipid aldehydes repress redox-sensitive transcription factors p53 and hypoxia-inducible factor by impairing the selenoprotein thioredoxin reductase. *J Biol Chem* **278**:745–750.
- Oliva JL, Pérez-Sala D, Castrillo A, Martínez N, Cañada FJ, Boscá L, and Rojas JM (2003) The cyclopentenone 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ binds to and activates H-Ras. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:4772–4777.
- Paumi CM, Wright M, Townsend AJ, and Morrow CS (2003) Multidrug resistance protein (MRP) 1 and MRP3 attenuate cytotoxic and transactivating effects of the cyclopentenone prostaglandin, 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ in MCF7 breast cancer cells. *Biochemistry* **42**:5429–5437.
- Pérez-Sala D, Cernuda-Morollón E, and Cañada FJ (2003) Molecular basis for the inhibition of AP-1 DNA binding by 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂. *J Biol Chem* **278**:51251–51260.
- Reilly CM, Oates JA, Sudian J, Crosby MB, Halushka PV, and Gilkeson GS (2001) Prostaglandin J₂ inhibition of mesangial cell iNOS expression. *Clin Immunol* **98**:337–345.
- Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, and Glass CK (1998) The peroxisome proliferator-activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation. *Nature (Lond)* **391**:79–82.
- Rossi A, Kapahi P, Natoli G, Takahashi T, Chen Y, Karin M, and Santoro MG (2000) Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of IkB kinase. *Nature (Lond)* **403**:103–108.
- Rovin BH, Lu L, and Cosio A (2001) Cyclopentenone prostaglandins inhibit cytokine-induced NF-kappaB activation and chemokine production by human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* **12**:1659–1667.
- Rzymkiewicz D, Leingang K, Baird N, and Morrison A (1994) Regulation of prostaglandin endoperoxide synthase gene expression in rat mesangial cells by interleukin-1 beta. *Am J Physiol* **266**:F39–F45.
- Satriano J, Banas B, Luckow B, Nelson P, and Schlondorff D (1997) Regulation of RANTES and ICAM-1 expression in murine mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* **8**:596–603.
- Saura M, López S, Rodríguez-Puyol M, Rodríguez-Puyol D, and Lamas S (1995) Regulation of inducible nitric oxide synthase expression in rat mesangial cells and isolated glomeruli. *Kidney Int* **47**:500–509.
- Shibata T, Yamada T, Ishii T, Kumazawa S, Nakamura H, Masutani H, Yodoi J, and Uchida K (2003) Thioredoxin as a molecular target of cyclopentenone prostaglandins. *J Biol Chem* **278**:26046–26054.
- Straus DS and Glass CK (2001) Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets. *Med Res Rev* **21**:185–210.
- Straus DS, Pascual G, Li M, Welch JS, Ricote M, Hsiang CH, Sengchanthalangsy LL, Ghosh G, and Glass CK (2000) 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J₂ inhibits

- multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:4844–4849.
- Weber SM, Scarim AL, and Corbett JA (2004) PPARgamma is not required for the inhibitory actions of PGJ₂ on cytokine signaling in pancreatic beta-cells. *Am J Physiol* **286**:E329–E336.
- Zingarelli B, Sheehan M, Hake PW, O'Connor M, Denenberg A, and Cook A (2003) Peroxisome proliferator activator receptor-gamma ligands, 15-deoxy-Δ^{12,14}-prostaglandin J₂ and ciglitazone, reduce systemic inflammation in polymicrobial sepsis by modulation of signal transduction pathways. *J Immunol* **171**: 6827–6837.

Address correspondence to: Dr. Dolores Pérez-Sala, Departamento de Estructura y Función de Proteínas, Centro de Investigaciones Biológicas, C.S.I.C., Ramiro de Maeztu, 9, 28040 Madrid, Spain. E-mail: dperezsala@cib.csic.es

Isoprenylation of RhoB Is Necessary for Its Degradation

A NOVEL DETERMINANT IN THE COMPLEX REGULATION OF RhoB EXPRESSION BY THE MEVALONATE PATHWAY*

Received for publication, April 25, 2002, and in revised form, September 25, 2002
Published, JBC Papers in Press, October 15, 2002, DOI 10.1074/jbc.M204049200

Konstantinos Stamatakis, Eva Cernuda-Morollón‡, Octavio Hernández-Perera§,
and Dolores Pérez-Sala¶

From the Departamento de Estructura y Función de Proteínas, Centro de Investigaciones Biológicas,
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (C.S.I.C.), Velázquez, 144, 28006 Madrid, Spain

Statins improve vascular functions by mechanisms independent from their cholesterol-lowering effect. Rho GTPases are emerging as key targets for the vascular effects of statins. RhoB is a short-lived, early-response inducible protein involved in receptor endocytosis, apoptosis, and gene expression. Here we show that statins regulate RhoB expression by acting at multiple levels. Simvastatin increased RhoB protein levels by 8- to 10-fold. This effect was related to a depletion of isoprenoid intermediates, as deduced from the observation that several metabolites of the cholesterol biosynthetic pathway, namely, mevalonate and geranylgeranyl-pyrophosphate, attenuated simvastatin-induced RhoB up-regulation. Moreover, prenyltransferase inhibitors mimicked simvastatin effect. Cholesterol supplementation did not prevent simvastatin-elicited up-regulation but increased RhoB levels *per se*. Simvastatin moderately augmented RhoB transcript levels, but markedly impaired the degradation of RhoB protein, which accumulated in the cytosol in its non-isoprenylated form. Inhibition of RhoB isoprenylation was apparently required for simvastatin-induced up-regulation, because levels of an isoprenylation-deficient RhoB mutant were not affected by simvastatin. Moreover, this mutant was found to be markedly more stable than the wild-type protein. These results show that RhoB isoprenylation is necessary for rapid turnover of this protein and identify a novel link between the cholesterol biosynthetic pathway and the regulation of G-protein expression.

Statins are a family of drugs widely used in the treatment of hypercholesterolemia. They are competitive inhibitors of hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA)¹ reductase (1), the enzyme catalyzing the rate-limiting step in the synthesis of cho-

lesterol, that is, the conversion of HMG-CoA to mevalonate (Scheme 1). Mevalonate is also the precursor of farnesyl-pyrophosphate and geranylgeranyl-pyrophosphate, the isoprenoid lipids involved in the posttranslational modification of a number of proteins, including most G-proteins (2, 3). For this reason, statins have also been used as pharmacological tools to assess the importance of protein isoprenylation in signal transduction (4, 5).

The clinical use of statins has revealed that these drugs promote beneficial effects on cardiovascular functions that do not correlate with their ability to lower serum cholesterol levels (6, 7). Treatment of endothelial cells with statins increases or preserves the expression of endothelial nitric oxide synthase (8, 9), while inhibiting the production of endothelin-1 (10). In addition, antiproliferative and anti-inflammatory effects of statins have been observed in several experimental systems (5, 11–13) and in patients (14, 15). Elucidation of the mechanisms underlying these diverse effects has shown that small G-proteins of the Rho family are critical targets for statins in many systems. Rho GTPases participate in the regulation of numerous cellular functions, including cytoskeletal organization, cell adhesion, smooth muscle contraction, endocytosis, receptor signaling, cell cycle progression, and gene expression (16–19). Rho proteins are posttranslationally modified by isoprenylation at a cysteine residue located near their C-terminal end (20). Inhibition of Rho function by impairment of protein isoprenylation is at the basis of the reported effects of statins on smooth muscle cell proliferation (11), endothelial nitric oxide synthase and inducible nitric oxide synthase expression (8, 21), pre-pro-endothelin-1 transcription (10), and protection against cerebral stroke (22). Evidence accumulating during the last decade indicates that, by limiting mevalonate availability, statins may influence not only the function but also the expression of several G-proteins, including Ras (23), Rab (24), Rap (25), and Rho proteins (26–28). However, the mechanisms responsible for these effects are not fully elucidated.

RhoB is a short-lived protein, the levels of which can be regulated by growth factors and stress signals both transcriptionally and posttranslationally (26, 29). RhoB can be modified either by farnesylation or geranylgeranylation at its C terminus (20), and it has been proposed that its function may depend on the presence and the nature of the isoprenoid moiety (30). Among the reported RhoB functions are the modulation of receptor endocytosis (31), apoptosis (32), and vascular gene expression, including that of pre-pro-endothelin-1 (10) and inducible nitric oxide synthase (33). A detailed knowledge of the effect of statins on Rho protein biology is of primary importance in the context of the therapeutic strategies for hypercholesterolemia and atherosclerosis. In the present study we have ex-

* This work was funded by grants from Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF2000-0149), Fundación Ramón Areces and Merck, Sharp & Dohme, Spain. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

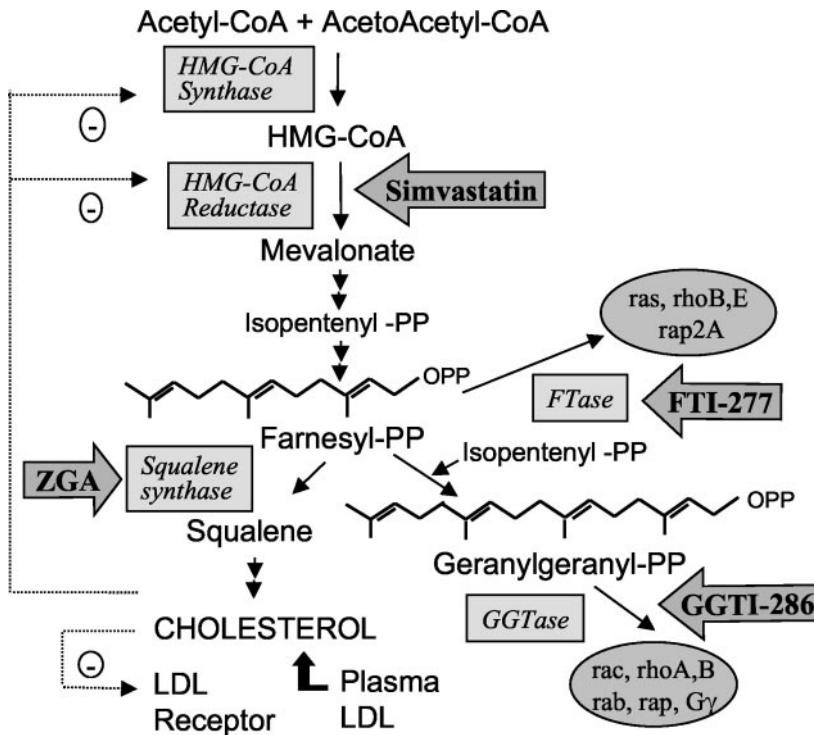
‡ Recipient of fellowships from Fundación Ramón Areces and Residencia de Estudiantes (Ayuntamiento de Madrid, Spain).

§ Present address: Unidad de Investigación, Hospital de Gran Canaria Dr. Negrín, Barranco de la Ballena s/n, 35020 Las Palmas de Gran Canaria, Spain.

¶ To whom correspondence should be addressed: Departamento de Estructura y Función de Proteínas, Centro de Investigaciones Biológicas, C.S.I.C., Velázquez, 144, 28006 Madrid, Spain. Tel.: 34-91-5611800 (ext. 4402); Fax: 34-91-5627518; E-mail: dperezsala@cib.csic.es.

¹ The abbreviations used are: HMG-CoA, hydroxymethylglutaryl-CoA; BAEC, bovine aortic endothelial cells; GGPP, geranylgeranyl-pyrophosphate; GFP, green fluorescent protein; HA, hemagglutinin.

SCHEME 1. Main intermediates in the cholesterol/isoprenoid biosynthetic pathway and pharmacological tools used to explore it. Enzymes of this pathway are represented in shaded rectangles and the corresponding inhibitors in arrowheads. FTase, farnesylyltransferase; GGTase, geranylgeranyltransferase; ZGA, zaragoic acid; LDL, low density lipoproteins.



plored the effect of statins on RhoB expression and processing in several cell types. Our results show that statins drastically increase the levels of cellular RhoB by mechanisms that involve the regulation of RhoB mRNA by the cholesterol biosynthetic pathway and the impairment of the proteolytic degradation of the non-isoprenylated RhoB protein. This latter observation provides the first evidence for the regulation of protein stability by isoprenylation.

MATERIALS AND METHODS

Materials—Simvastatin, lovastatin, and zaragoic acid were from Merck Sharp and Dohme. Antibodies anti-RhoA (sc-418), anti-RhoB (sc-180), and anti-HA (sc-7392) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anti-pan-Ras-10 (Ab-3) monoclonal antibody was from Oncogene Science (Uniondale, NY). Peroxidase-conjugated anti-rabbit and anti-mouse immunoglobulins were from Dako (Glostrup, Denmark). Deoxycytidine 5'-triphosphate [α -³²P]- (3,000 Ci/mmol) was from Amersham, Aylesbury, UK. FTI-277, GGTI-286, toxin B from *Clostridium difficile*, C3 exoenzyme from *Clostridium botulinum*, and the Rho-associated kinase inhibitor Y-27632 were from Calbiochem-Novabiochem (San Diego, CA). All other reagents were of the highest purity available from Sigma.

Cell Culture—Bovine aortic endothelial cells (BAEC) were isolated from thoracic aortas and characterized as previously described (9). Cells were maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% calf serum, 2 mM glutamine, 100 units/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin in an atmosphere with 5% CO₂. Experiments were performed on confluent monolayers at passages 3–8 made quiescent by serum deprivation for 24 h. Potential toxicity of the reagents used was tested by trypan blue exclusion and by analysis of the cell cycle distribution by flow cytometry (34). The concentrations of simvastatin used throughout this study did not induce apoptosis in BAEC. Mesangial cells were obtained and characterized as reported previously (35). Human umbilical vein endothelial cells were isolated and cultured according to published procedures (36). Mv1Lu, HeLa, and NIH-3T3 cells were from the Animal Cell Culture facility of Centro de Investigaciones Biológicas. Mv1Lu and NIH-3T3 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum, and HeLa cells were cultured in RPMI 1640 plus 10% fetal bovine serum.

SDS-PAGE and Immunoblotting—For SDS-PAGE, BAEC were homogenized by forced passes through a 26½-gauge needle in 10 mM Tris, pH 7.5, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.5% SDS, 0.1 mM β -mercaptoethanol, containing 2 μ g/ml of each of the protease inhibitors leupeptin,

aprotinin, and pepstatin. Protein was measured by the BCA method (Pierce, Rockford, IL), and aliquots containing 20 μ g of protein were electrophoresed on 15% SDS-polyacrylamide gels and transferred to Immobilon-P membranes (Millipore, Bedford, MA). Blots were incubated with anti-RhoA (1:1,000), anti-RhoB (1:500), or anti-pan-Ras (1:1,000) antibodies, and the proteins of interest were visualized using an ECL detection system from Amersham Biosciences. Levels of RhoA and B proteins were estimated by image scanning of the ECL exposures. The values obtained were corrected by the band intensities of the Coomassie staining of membranes after the blotting procedure or by the signal given by an antibody against a non-related protein.

Subcellular Fractionation—For obtention of S100 (cytosol) and P100 (membrane) fractions, cells were homogenized in 20 mM Tris, pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 250 mM sucrose, and 0.1 mM dithiothreitol containing protease inhibitors, and lysates were centrifuged at 200,000 \times g for 30 min at 4 °C in a Beckman TLA100 rotor.

Determination of RhoB Protein Stability—For this purpose, a previously published method was used (26). After treatment in the absence or presence of simvastatin, cells were incubated with 20 μ g/ml cycloheximide, a concentration that effectively blocked synthesis of RhoB protein, and levels of RhoB were analyzed by Western blot at various time points after cycloheximide addition.

RNA Isolation, Northern Blotting, and Hybridization—Total cellular RNA was isolated from BAEC with the guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform method and processed as previously reported (10). Equal loading was ensured by ethidium bromide staining. For analysis of RhoB mRNA expression, the full-length rat RhoB cDNA, a gift of Dr. G. C. Prendergast (The Wistar Institute, Philadelphia, PA), was used as a probe. Blots were stripped and rehybridized with a probe for human β -actin. Densitometric analysis was performed using an Agfa StudioStar TPO scanner with the public domain software NIH IMAGE 1.60b5. Results were calculated as the ratio of RhoB/ β -actin mRNA levels.

Plasmids and Transfections—The mammalian expression vector encoding the rat RhoB cDNA tagged at the amino terminus with a hemagglutinin epitope (pcDNA3-HA-RhoB) was generously provided by Dr. G.C. Prendergast. The isoprenylation-deficient HA-RhoBC193S mutant was generated from the above plasmid by PCR using primers forward: 5'-CCAGAGAGATCTATGTACCCATACGATGTGCCAGAC-3' and reverse: 3'-CAGAGCTCTAGATCATAGCACCTTCGAGCAGTTGA-TG-5'. The DNA fragments encoding wild-type and mutant HA-RhoB were subcloned into the *Bgl*II, *Eco*RI sites of the pEGFP-C1 vector (Clontech). Cells grown on 6-well plates or on 12-mm glass coverslips were transfected using LipofectAMINE Plus reagent (Invitrogen) fol-

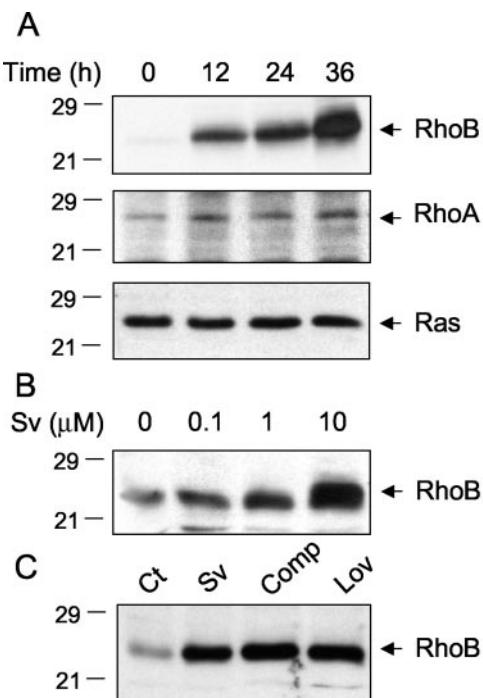


FIG. 1. Effect of HMG-CoA inhibitors on the abundance of RhoB protein in BAEC. *A*, BAEC were treated with simvastatin (*Sv*) at 10 μ M for the indicated time periods, and the levels of RhoB, RhoA, and Ras proteins were assessed by immunoblot. *B*, BAEC were treated with the indicated concentrations of simvastatin or (*C*) with different HMG-CoA inhibitors at 10 μ M for 24 h. Results shown are representative of at least three experiments. *Lov*, lovastatin; *Comp*, compactin.

lowing the instructions of the manufacturer. After a 24-h recovery period, cells were exposed to the various agents. The expression of RhoB or of GFP-RhoB proteins was monitored by Western blot or confocal fluorescence microscopy, as indicated. Transfection efficiency was ~80% in NIH-3T3 cells as estimated from fluorescence microscopy analysis of GFP-RhoB transfected cells.

RESULTS

HMG-CoA Inhibitors Increase RhoB Protein Levels in Vascular Endothelial Cells—Treatment of quiescent BAEC with the HMG-CoA inhibitor simvastatin led to a time- and dose-dependent increase in RhoB protein levels (Fig. 1). An increase in RhoB could be detected after a 24-h treatment with 0.1–1 μ M simvastatin, a concentration in the range of that reached in the plasma of patients treated with this drug (37), although the effect was more evident at simvastatin concentrations above 1 μ M, which are higher than those seen in humans. Treatment of BAEC with 10 μ M simvastatin for 24 h resulted in 6- to 10-fold higher RhoB protein levels. RhoA protein was also more abundant after simvastatin treatment (2- to 3-fold increase). The levels of Ras proteins, detected with a pan-Ras antibody, did not change appreciably under these experimental conditions. A similar effect on RhoB protein levels was brought about by other HMG-CoA reductase inhibitors, namely, lovastatin and compactin (Fig. 1C). This phenomenon was not restricted to BAEC, because it could also be evidenced in human umbilical vein endothelial cells and mesangial cells treated with simvastatin (Fig. 2). Simvastatin induced an increase in RhoB levels in all the cell types thus far studied, including 293T and COS-7 cells (data not shown), the epithelial cell lines Mv1Lu and HeLa, and in NIH-3T3 fibroblasts (Fig. 2).

Regulation of RhoB Expression by the Mevalonate Pathway—Statins are potent cholesterol-lowering agents. Therefore we explored whether the effect of simvastatin could be prevented by increasing cholesterol supply. Cholesterol supplementation

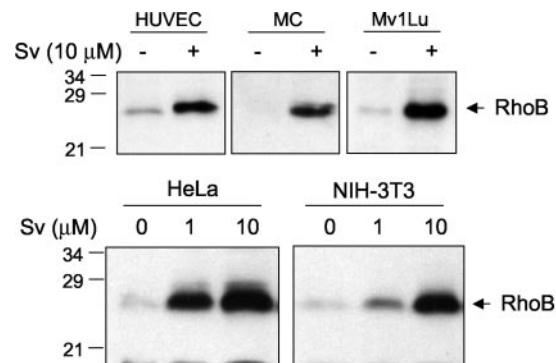


FIG. 2. Effect of simvastatin on RhoB protein levels in several cell types. The indicated cell types were treated with simvastatin for 24 h. *HUVEC*, human umbilical vein endothelial cells; *MC*, glomerular mesangial cells; *Mv1Lu*, mink lung epithelial cells; *HeLa*, epithelial carcinoma cells; *NIH-3T3*, mouse fibroblasts. RhoB levels were assessed by Western blot. Results shown are representative of at least two experiments.

did not prevent simvastatin-induced RhoB up-regulation in BAEC (Fig. 3A, left); conversely, a moderate up-regulation of RhoB protein levels could be detected in cholesterol-supplemented cells (1.6 \pm 0.12-fold increase with respect to control levels, $n = 4$). Because both simvastatin and cholesterol reduce the flux through the cholesterol biosynthetic pathway, these observations suggest that a down-regulation of this pathway or the depletion of some intermediate(s) may be involved in the effect of simvastatin. In keeping with this, treatment of BAEC with zaragocic acid, an inhibitor of squalene synthase, expected to increase the activity of the pathway (38), moderately reduced RhoB protein levels (20–30% reduction, $n = 3$, not shown). Incubation of BAEC in the presence of mevalonate attenuated the up-regulation of RhoB levels by simvastatin (Fig. 3A, right). To ascertain whether this effect was dependent on some specific products of mevalonate we explored the ability of various isoprenoid intermediates to circumvent simvastatin-induced up-regulation of RhoB (Fig. 3A, right). Incubation of BAEC with farnesyl-pyrophosphate during treatment with simvastatin slightly reduced the up-regulation of RhoB protein levels whereas geranylgeranyl-pyrophosphate (GGPP) had a protective effect similar to that of mevalonate. This effect of GGPP was not restricted to BAEC because it was also observed in HeLa and NIH-3T3 cells (results not shown).

The RhoB protein and transcript are short-lived species, the levels of which can be modulated both transcriptionally and posttranscriptionally (26, 29). To get insight into the mechanism of simvastatin-induced RhoB up-regulation we explored the levels of RhoB mRNA. As it can be observed in Fig. 3B simvastatin augmented the levels of RhoB transcript by ~2-fold, an extent lower than that observed at the protein level. The effect of simvastatin was specific for RhoB as evidenced by the observation that the levels of β -actin did not increase or were slightly decreased by simvastatin treatment. Cholesterol supplementation did not increase RhoB mRNA levels appreciably and was also ineffective at preventing the effect of simvastatin. RhoB mRNA levels followed a pattern similar to that observed for the RhoB protein in response to supplementation with mevalonate, farnesyl-pyrophosphate, and GGPP (Fig. 3B, right). The ability of GGPP to prevent simvastatin-induced RhoB up-regulation suggested the involvement of geranylgeranylated proteins in this effect. Because most G-proteins are modified by geranylgeranylation, we took advantage of the availability of bacterial toxins that selectively inactivate specific types of G-proteins to assess their effect on RhoB levels (Fig. 4). Treatment of BAEC with pertussis toxin, which inhib-

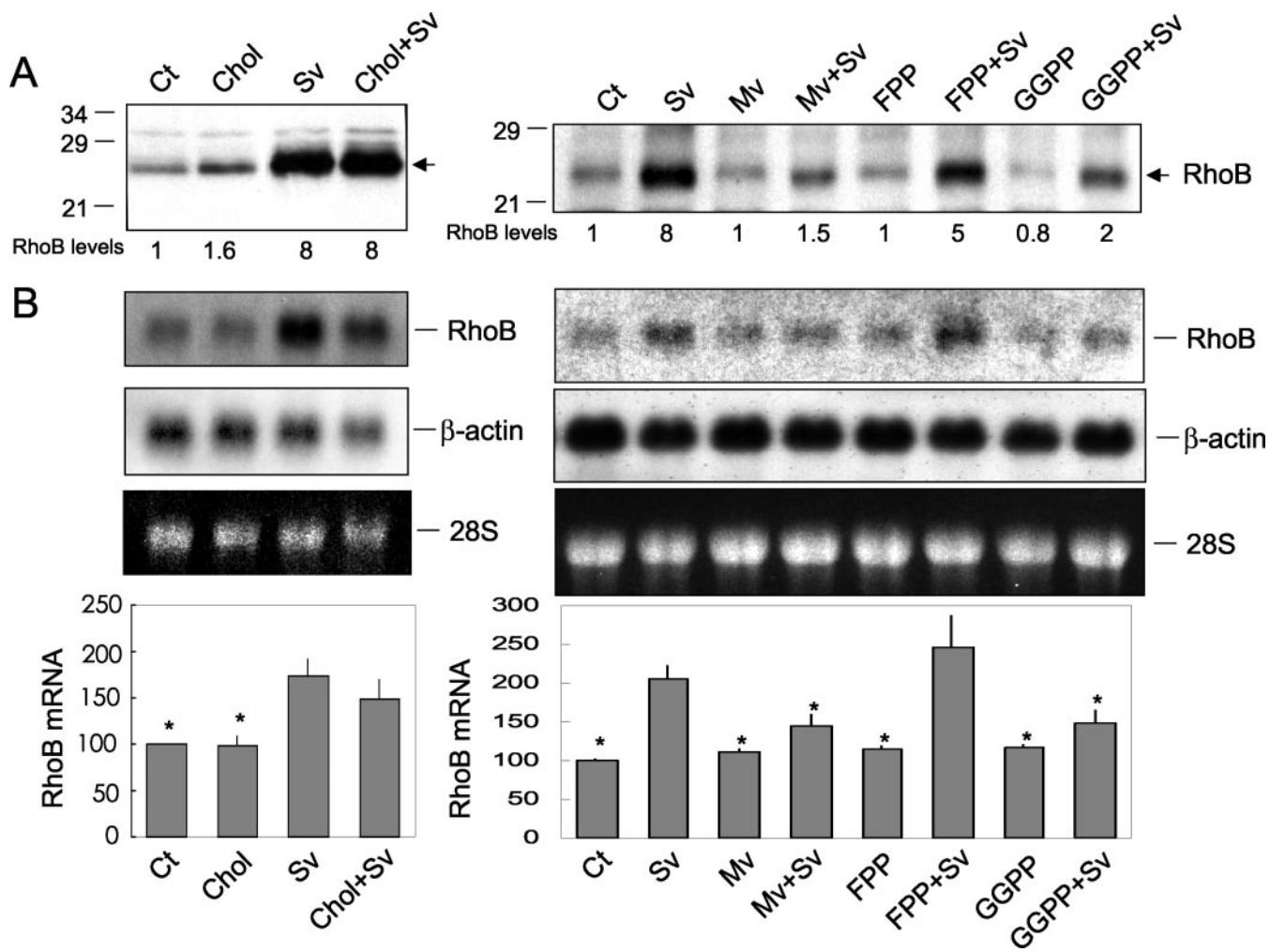


FIG. 3. Effect of cholesterol availability and isoprenoid intermediates on RhoB protein and mRNA abundance. *A*, BAEC were incubated with the indicated agents for 24 h and RhoB protein levels were estimated by immunoblot. *Sv*, 10 μ M simvastatin; *Chol*, 100 μ g/ml cholesterol; *Mv*, 100 μ M mevalonic acid; *FPP*, 5 μ M farnesyl-pyrophosphate; *GGPP*, 5 μ M geranylgeranyl-pyrophosphate. Levels of RhoB protein estimated by image scanning of ECL exposures, expressed in arbitrary units, are shown at the bottom. Results are representative of at least three experiments. *B*, BAEC were treated with the indicated agents as above. RhoB mRNA levels were determined by Northern blot. Blots were hybridized first with RhoB cDNA and reprobed with β -actin cDNA. Lower panels depict the densitometric analysis of RhoB mRNA levels after correction by the expression of β -actin. Data are mean \pm S.E. of three independent experiments. *, $p < 0.05$ versus simvastatin by Student's *t* test.

its G_i proteins, or with cholera toxin, which stimulates G_s proteins did not alter RhoB protein levels significantly (Fig. 4*A*). In contrast, treatment with either toxin B from *Clostridium difficile*, or with *Clostridium botulinum* C3 exoenzyme, known to block the activity of Rho proteins, increased RhoB levels, although to a lesser extent than simvastatin (Fig. 4*B*). Moreover, the Rho kinase inhibitor Y-27632 also augmented RhoB protein levels moderately. Interestingly, both toxin B and Y-27632 induced a similar increase in RhoB mRNA levels (Fig. 4*C*). Taken together, these observations suggest that the increase in RhoB mRNA expression induced by simvastatin could be mediated by the impairment geranylgeranylated proteins, among which Rho proteins are good candidates. However, the higher extent of amplification of RhoB protein levels by simvastatin suggests that there may be translational or posttranslational mechanisms that contribute to this effect.

Effect of Simvastatin on RhoB Protein Stability—RhoB protein degradation is an important process for the control of RhoB protein levels (26). We then explored whether this process was affected by simvastatin. In control cells, inhibition of protein synthesis with cycloheximide lead to a rapid decrease in RhoB protein levels, with less than 50% RhoB protein remaining after 6 h (Fig. 5*A*). In contrast, in cells pre-treated with sim-

vastatin for 24 h, the decay of RhoB protein levels was significantly reduced, thus suggesting the contribution of posttranslational events to simvastatin-elicited RhoB up-regulation. Treatment with simvastatin at the time of cycloheximide addition did not result in increased RhoB levels (Fig. 5*B*). Also, in these co-treatment experiments, the decay of RhoB levels was not reduced, even when a concentration of 40 μ M simvastatin was used ($n = 2$, results not shown), thus making unlikely the possibility of a direct interference of simvastatin with the activity of cellular proteases.

Effect of Simvastatin on RhoB Subcellular Distribution and Processing—Decreased degradation of RhoB in simvastatin-treated cells could result from alterations in RhoB subcellular localization and/or function due to impaired posttranslational processing. To test this hypothesis we assessed the effect of simvastatin on RhoB subcellular distribution and processing. In confluent, serum-deprived BAEC, RhoB was predominantly membrane-bound (Fig. 6*A*). In simvastatin-treated cells, the amount of membrane-bound RhoB was significantly reduced, whereas the increase in RhoB protein was exclusively localized to the soluble fraction. Treatment with simvastatin also led to a decrease in the electrophoretic mobility of RhoB protein, which is indicative of the lack of posttranslational modification

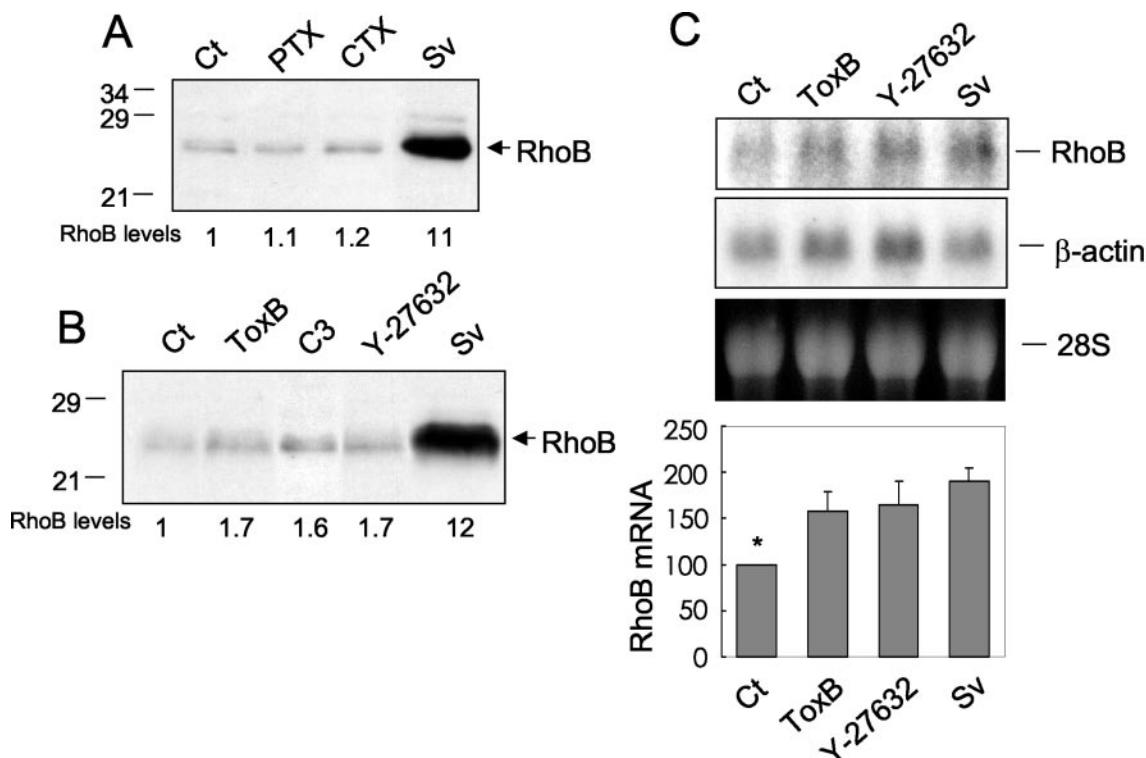


FIG. 4. Effect of bacterial toxins on RhoB levels. BAEC were treated with the indicated agents for 24 h, and the levels of RhoB protein and mRNA were assessed by Western (*A* and *B*) or Northern blot (*C*). PTX, 0.5 μ g/ml pertussis toxin; CTX, 0.5 μ g/ml cholera toxin; ToxB, 0.5 ng/ml toxin B from *Clostridium difficile*; C3, 50 μ g/ml *Clostridium botulinum* C3 exoenzyme; Y-27632, 5 μ M Rho-associated kinase inhibitor; Sv, 10 μ M simvastatin. Results shown are representative of at least three experiments. Levels of RhoB protein and mRNA estimated as in Fig. 3 are expressed in arbitrary units. *, $p < 0.05$ versus simvastatin by Student's *t* test.

(26) (Fig. 6*B*). Thus, in simvastatin-treated cells, most of RhoB protein is accumulated in the cytosol in its non-isoprenylated form.

RhoB Isoprenylation Is Necessary for Degradation—To ascertain whether the effect of simvastatin was related to the inhibition of protein isoprenylation we first explored the ability of the inhibitors of protein farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I, FTI-277 and GGTI-286, respectively, to increase RhoB levels (Fig. 7*A*). We observed that FTI-277 slightly increased the levels of RhoB protein and GGTI-286 induced a 3.8-fold increase of RhoB expression in BAEC ($n = 4$). The combination of the two inhibitors induced a potent increase in RhoB protein levels, that was comparable with that attained with simvastatin (8-fold increase, average of four experiments). A similar effect of prenyltransferase inhibitors was observed in NIH-3T3 fibroblasts (Fig. 7*A*). We next evaluated whether non-isoprenylated, cytosolic RhoB displays increased stability with respect to the wild-type protein. For this purpose, we generated wild-type and isoprenylation-deficient RhoB constructs and assessed their subcellular localization and stability in transient transfection experiments (Fig. 7*B*). GFP-HA-RhoBwt showed a preferential perinuclear distribution when transfected in NIH-3T3 fibroblasts, with a particulate pattern indicative of membrane association. In contrast, GFP-HA-RhoB-C193S showed a diffuse distribution, indistinguishable from that of GFP (data not shown), typical of soluble proteins. Treatment of GFP-HA-RhoBwt-transfected fibroblasts with simvastatin caused a redistribution of RhoB from the membrane-associated to the soluble compartment. We next explored the effect of simvastatin on the expression of transiently transfected wild-type and mutant RhoB proteins by Western blot and detection with an anti-HA antibody (Fig. 7*C*). Simvastatin potently increased the levels of HA-RhoBwt, suggesting that its effect largely depends

on the RhoB coding sequence. The levels of HA-RhoB-C193S expressed in cells were consistently higher than those of HA-RhoBwt and were not further increased by simvastatin, suggesting that inhibition of RhoB isoprenylation is required for simvastatin effect. Finally, we estimated the half-life of both proteins. As shown in Fig. 7*D*, HA-RhoBwt levels decayed rapidly upon inhibition of protein synthesis, displaying a stability similar to that of endogenous RhoB (Fig. 5). In contrast, HA-RhoB-C193S was markedly more stable. These results show that RhoB isoprenylation is required for rapid turnover of this protein.

DISCUSSION

The results presented in this work show that RhoB levels are modulated by the cholesterol biosynthetic pathway. Down-regulation of this pathway either by means of HMG-CoA reductase inhibitors or excess cholesterol is associated with an increase in the amount of RhoB. This regulation occurs in part at the mRNA level and largely at the protein level, because inhibition of RhoB isoprenylation either by pharmacological or genetic manipulation markedly reduces the degradation of this protein.

The cholesterol biosynthetic pathway provides the isoprenoid intermediates needed for the posttranslational modification of G-proteins. Although protein isoprenylation is an irreversible modification, it is susceptible to a certain degree of regulation, because the activity of the prenyltransferases may be controlled by some growth factors and by the availability of isoprenoids. The cholesterol pathway is subjected to a complex feedback regulation (1), and it can be modulated by stress (39). In recent years it has become evident that the activity of this pathway may control the maturation of certain G-proteins such as Ras, thus resulting in the regulation of Ras-mediated cellu-

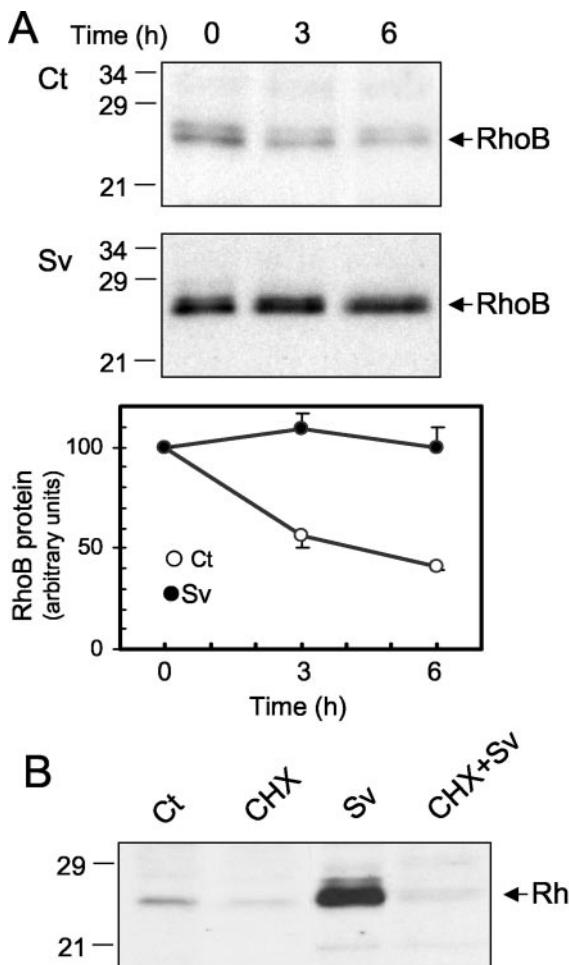


FIG. 5. Effect of simvastatin on RhoB protein degradation. *A*, BAEC were treated in the absence (*Ct*) or presence of 10 μ M simvastatin (*Sv*), as indicated. After 24 h, protein synthesis was blocked by addition of 20 μ g/ml cycloheximide, and RhoB protein levels were estimated by immunoblot at several time points after cycloheximide addition. ECL exposures shown correspond to a 4-min exposure for *Ct* and a 30-s exposure for *Sv*. Results shown in the lower panel are average values \pm S.E. of three experiments. *B*, BAEC were treated in the absence (*Ct*) or presence of 10 μ M simvastatin and/or 20 μ g/ml cycloheximide (*CHX*) for 24 h, and levels of RhoB were assessed by immunoblot.

lar processes in response to cholesterol levels or cellular stress (39, 40). In addition, several lines of evidence indicate that the mevalonate pathway may influence the expression of other members of the Ras superfamily, namely Ras1 and Ras2 in yeast (23), and Rab5 and Rab7 in thyroid cells (24), through mechanisms not yet completely elucidated.

The relationship between G-protein expression and cholesterol metabolism may be bidirectional. In a recent report, cdc42 proteins have been involved in the regulation of cholesterol efflux (41). In addition, in fibroblasts from patients with the inherited disorder of lipid metabolism known as Tangier disease, characterized by cellular accumulation of cholestry esters, the expression of several Rho proteins, including RhoB, is increased (42). On this basis, a role for Rho proteins in cholesterol transport has been hypothesized. Our results raise the possibility that the observed increase in Rho proteins expression may be caused in part by the accumulation of cholesterol in cells.

The mechanisms by which the mevalonate pathway regulates RhoB appear to be multiple. Recently, mevalonate depletion has been reported to result in an increase in RhoB mRNA (25). However, the involvement of isoprenoid intermediates or

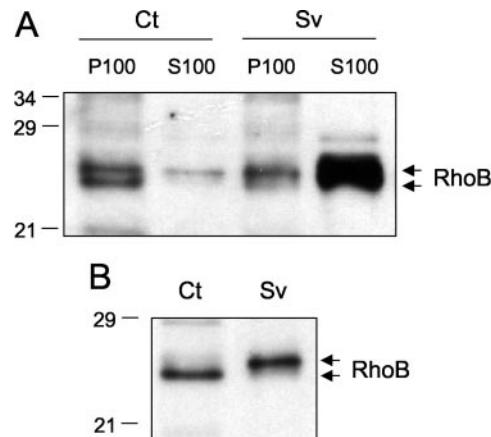


FIG. 6. Effect of simvastatin on RhoB subcellular localization and processing. BAEC were incubated in the absence or presence of 10 μ M simvastatin for 24 h. *A*, S100 (cytosol) and P100 (membrane) fractions were obtained and 10 μ g from each fraction were analyzed by immunoblot. *B*, electrophoretic mobility of RhoB protein present in cell lysates from control (20 μ g of total protein/lane) or simvastatin-treated cells (4 μ g/lane) was assessed by immunoblot. A lower amount of protein was analyzed in the case of simvastatin-treated cells to avoid the lack of resolution caused by RhoB overexpression. Results are representative of at least three experiments.

isoprenylated proteins in this effect has not been explored. Here we have shown that inhibition of mevalonate biosynthesis with simvastatin moderately up-regulates RhoB mRNA levels and that this effect is prevented by GGPP. In addition, we have observed that inhibition of Rho signaling by means of bacterial toxins that target and inactivate Rho proteins (43) or by a Rho kinase inhibitor, is also associated with a moderate increase in RhoB protein and mRNA levels. These observations suggest that geranylgeranylated proteins and, in particular, Rho proteins, exert a negative feedback on RhoB mRNA expression in endothelial cells. This interpretation is in accordance with previous studies that identified a negative role of RhoA and B on the activity of the mouse RhoB promoter (29). Our results indicate that the main effect of simvastatin on RhoB expression takes place at a posttranslational level by reducing RhoB degradation. This could occur through several mechanisms. Simvastatin could affect the activity of proteolytic pathways within the cell. In fact, statins have been reported to modulate the activity of the proteasome (44, 45), a protein-degradation pathway proposed to mediate RhoB turnover (26). However, the effect of simvastatin on RhoB levels and stability was completely prevented by co-treatment with cycloheximide, thus showing that *de novo* protein synthesis is required for its effect. Moreover, inhibition of protein isoprenylation by using peptidomimetic inhibitors of prenyltransferases reproduced the effect of simvastatin on RhoB levels. These observations suggest that the effect of simvastatin is related to the inhibition of protein isoprenylation rather than to a direct interference with cellular proteases. Because the increase in RhoB protein elicited by simvastatin occurs at the expense of non-prenylated cytosolic partitioned RhoB, it could be hypothesized that the immature cytosolic protein is a poorer substrate for proteases or it does not localize to the appropriate cellular compartment for degradation. This is supported by the fact that the Cys193Ser RhoB mutant, which lacks the isoprenylation site and is cytosolic, is markedly more stable than the wild-type protein. These observations indicate that isoprenylation of RhoB determines the half-life of the protein. Interestingly, carboxyl methylation of the isoprenylated cysteine in RhoA has been reported to reduce its turnover (46), thus providing another example of the regu-

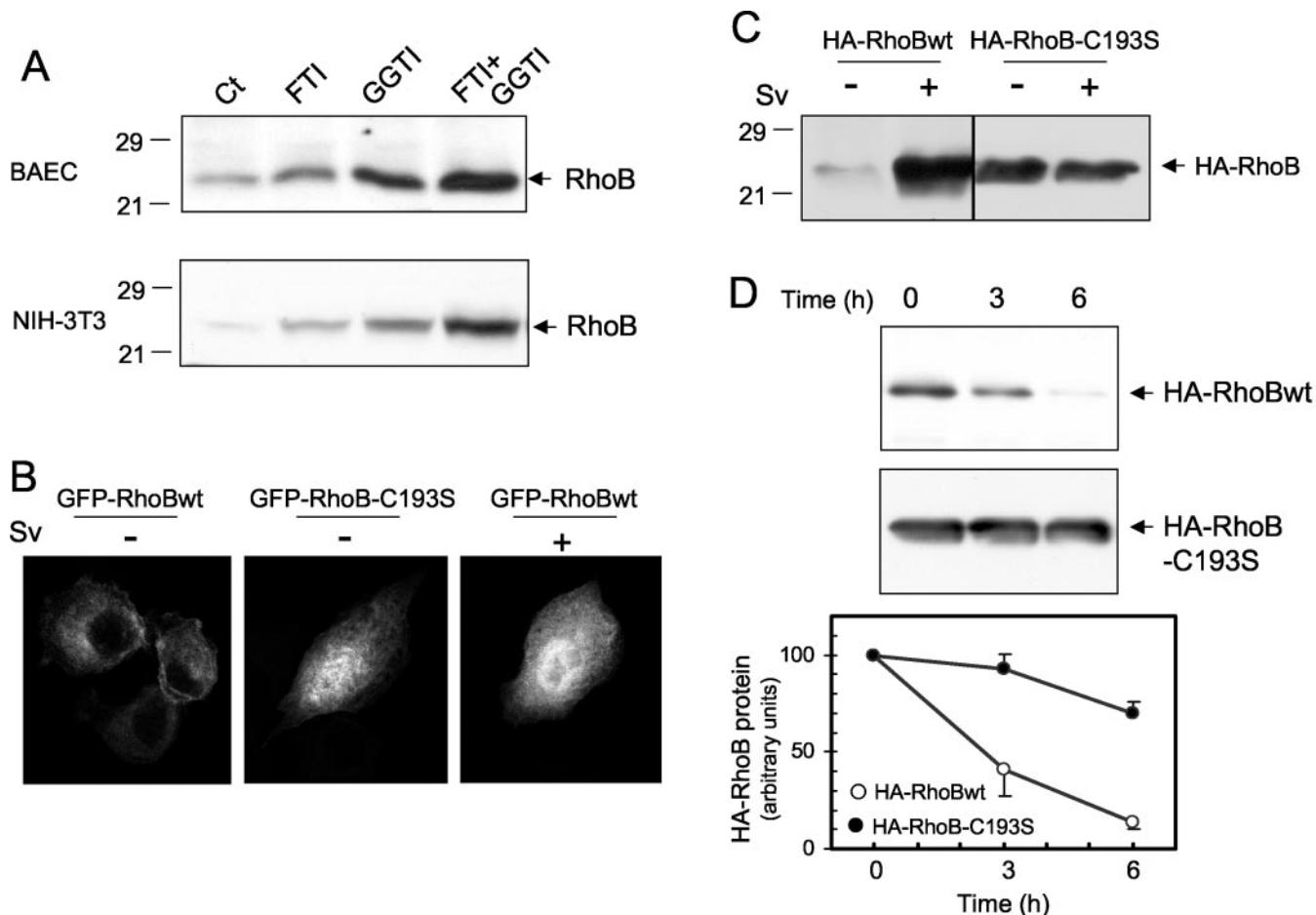


FIG. 7. Importance of isoprenylation for RhoB protein stability. *A*, BAEC or NIH-3T3 fibroblasts, as indicated, were treated with the farnesyltransferase inhibitor FTI-277 and/or the geranylgeranyltransferase I inhibitor GGTI-286 at 5 μ M for 24 h. Levels of RhoB protein were visualized by immunoblot. *B*, NIH-3T3 fibroblasts transfected with the indicated GFP-RhoB constructs were treated in the absence or presence of 10 μ M simvastatin for 24 h, and the subcellular localization of GFP-RhoB was visualized by confocal fluorescence microscopy. *C*, NIH-3T3 fibroblasts transfected with wild type (*wt*) or isoprenylation-deficient (*C193S*) HA-RhoB expression plasmids were plated on 6-well dishes and cultured in the absence or presence of 10 μ M simvastatin for 24 h, as indicated. Levels of exogenous wild-type and C193S RhoB proteins were estimated by Western blot with an anti-HA antibody. *D*, decay of wild-type and C193S HA-RhoB levels at the indicated time points after addition of cycloheximide was estimated as above. ECL exposures shown correspond to a 2-min exposure for wild-type and a 20-s exposure for C193S HA-RhoB. Results shown in the lower panel are average values \pm S.E. of four experiments.

lation of Rho protein stability as a function of their posttranslational processing.

Whether the increased stability of unprenylated RhoB is caused by changes in subcellular distribution, activity, or ability to interact with other cellular proteins will be the subject of further studies. Although inhibition of RhoB isoprenylation may abolish some of RhoB functions, like its cell transforming ability (47) or the activation of the endothelin-1 promoter (10), other functions could be conserved, as it has been described for the activation of the serum-response element-dependent transcription in overexpression experiments (47). Future work will address whether unprenylated RhoB may have specific functions or whether it behaves as a dominant-negative RhoB protein.

In conclusion, we have found that RhoB mRNA levels and protein stability can be regulated by the availability of isoprenoid intermediates needed for protein modification. These findings unveil the novel role of isoprenylation in the control of RhoB protein degradation and may contribute to the understanding of the complex structure-function relationships of RhoB posttranslational modifications.

Acknowledgments—We thank Dr. S. Lamas for helpful comments and discussion, Dr. M. Díaz-Cazorla for culture of human umbilical vein

endothelial cells and E. Soria and M. J. Carrasco for technical assistance.

REFERENCES

- Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (1990) *Nature* **343**, 425–430
- Zhang, F. L., and Casey, P. J. (1996) *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 241–269
- Rando, R. R. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1300**, 5–16
- Schafer, W. R., Kim, R., Sterne, R., Thorner, J., Kim, S.-H., and Rine, J. (1989) *Science* **245**, 379–385
- Pérez-Sala, D., and Mollinedo, F. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**, 1209–1215
- Eichstädt, H. W., Eskötter, H., Hoffman, I., Amthauer, H. W., and Weidinger, G. (1995) *Am. J. Cardiol.* **76**, 122A–125A
- O'Driscoll, G., Green, D., and Taylor, R. R. (1997) *Circulation* **95**, 1126–1131
- Laufs, U., and Liao, J. K. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 24266–24271
- Hernández-Perera, O., Pérez-Sala, D., Sánchez-Pascual, R., Navarro-Antolín, J., Hernández, G., Díaz, C., and Lamas, S. (1998) *J. Clin. Invest.* **101**, 2711–2719
- Hernández-Perera, O., Pérez-Sala, D., Soria, E., and Lamas, S. (2000) *Circ. Res.* **87**, 616–622
- Laufs, U., Marra, D., Node, K., and Liao, J. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 21926–21931
- Pahan, K., Sheikh, F. G., Namboodiri, A. M., and Singh, I. (1997) *J. Clin. Invest.* **100**, 2671–2679
- Bustos, C., Hernández-Presa, M. A., Ortego, M., Tunon, J., Ortega, L., Pérez, F., Díaz, C., Hernández, G., and Egido, J. (1998) *J. Am. Coll. Cardiol.* **32**, 2057–2064
- Weber, C., Erl, W., Weber, K. S., and Weber, P. C. (1997) *J. Am. Coll. Cardiol.* **30**, 1212–1217
- Romano, M., Mezzetti, A., Marulli, C., Ciabattoni, G., Febo, F., Ienno, S. D., Roccaforte, S., Vigneri, S., Nobile, G., Milani, M., and Davi, G. (2000) *J. Invest. Med.* **48**, 183–189

16. Kaibuchi, K., Kuroda, S., and Amano, M. (1999) *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 459–486
17. Ellis, S., and Mellor, H. (2000) *Trends Cell Biol.* **10**, 85–88
18. Mackay, D. J., and Hall, A. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 20685–20688
19. Khosravi-Far, R., Campbell, S., Rossman, K. L., and Der, C. J. (1998) *Adv. Cancer Res.* **72**, 57–107
20. Adamson, P., Marshall, C. J., Hall, A., and Tilbrook, P. A. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 20033–20038
21. Hausding, M., Witteck, A., Rodríguez-Pascual, F., Eichel-Streiber, C. V., Fostermann, U., and Kleinert, H. (2000) *Br. J. Pharmacol.* **131**, 553–561
22. Laufs, U., Endres, M., Stagliano, N., Amin-Hanjani, S., Chui, D.-S., Yang, S.-X., Simoncini, T., Yamada, M., Rabkin, E., Allen, P. G., Huang, P. L., Böhm, M., Schoen, F. J., Moskowitz, M. A., and Liao, J. K. (2000) *J. Clin. Invest.* **106**, 15–24
23. Dimster-Denk, D., Schafer, W. R., and Rine, J. (1995) *Mol. Biol. Cell* **6**, 59–70
24. Laezza, C., Bucci, C., Santillo, M., Bruni, C. B., and Bifulco, M. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **248**, 469–472
25. Holstein, S. A., Wohlford-Lenane, C. L., and Hohl, R. J. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 10678–10682
26. Engel, M. E., Datta, P. K., and Moses, H. L. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 9921–9926
27. Laufs, U., Endress, M., Custodis, F., Gertz, K., Nickenig, G., Liao, J. K., and Böhm, M. (2000) *Circulation* **102**, 3104–3110
28. Pérez-Sala, D., Cernuda-Morollón, E., and Hernández-Perera, O. (2001) *Eur. J. Biochem.* **268**, Suppl. 1, 143
29. Fritz, G., and Kaina, B. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 30637–30644
30. Lebowitz, P. F., Casey, P. J., Prendergast, G. C., and Thissen, J. A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 15591–15594
31. Gampel, A., Parker, P. J., and Mellor, H. (1999) *Curr. Biol.* **9**, 955–958
32. Liu, A.-X., Cerniglia, G. J., Bernhard, E. J., and Prendergast, G. C. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 6192–6197
33. Delarue, F. L., Taylor, B. S., and Sefti, S. M. (2001) *Oncogene* **20**, 6531–6537
34. Pérez-Sala, D., Collado-Escobar, D., and Mollinedo, F. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 6235–6242
35. Saura, M., Martínez-Dalmau, R., Minty, A., Pérez-Sala, D., and Lamas, S. (1996) *Biochem. J.* **313**, 641–646
36. Jaffe, E. A., Nachman, R. I., Becker, C. G., and Minick, R. C. (1972) *Circulation* **46**, 211–253
37. Desager, J.-P., and Horsmans, Y. (1996) *Clin. Pharmacokinet.* **31**, 348–371
38. Petras, S. F., Lindsey, S., and Harwood, H. J., Jr. (1999) *J. Lipid Res.* **40**, 24–38
39. Shack, S., Gorospe, M., Fawcett, T. W., Hudgins, W. R., and Holbrook, N. J. (1999) *Oncogene* **18**, 6021–6028
40. Gadbut, A. P., Wu, L., Tang, D., Papageorge, A., Watson, J. A., and Galper, J. B. (1997) *EMBO J.* **16**, 7250–7260
41. Hirano, K.-I., Matsuura, F., Tsukamoto, K., Zhang, Z., Matsuyama, A., Takaiishi, K., Komuro, R., Suehiro, T., Yamashita, S., Takai, Y., and Matsuzawa, Y. (2000) *FEBS Lett.* **484**, 275–279
42. Utech, M., Hobbel, G., Rust, S., Reinecke, H., Assmann, G., and Walter, M. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**, 229–236
43. Ridley, A. J., and Hall, A. (1992) *Cell* **70**, 389–399
44. Rao, S., Porter, D. C., Chen, X., Herliczek, T., Lowe, M., and Keyomarsi, K. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 7797–7802
45. Wojcik, C., Bury, M., Stoklosa, T., Giermasz, A., Feleszko, W., Mlynarczuk, I., Pleban, E., Basak, G., Omura, S., and Jakobisiak, M. (2000) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **32**, 957–965
46. Backlund, P. S. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 33175–33180
47. Lebowitz, P. F., Du, W., and Prendergast, G. C. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 16093–16095

Publicaciones relacionadas con este trabajo

Millán O, Rico D, Peinado H, Zarich N, Stamatakis K, Pérez-Sala D, Rojas JM, Caño A, Bosca L. (2006) Potentiation of tumor formation by topical administration of 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 in a model of skin carcinogenesis. *Carcinogenesis* **27**(2):328-36.

Konstantinos Stamatakis, Francisco J. Sánchez-Gómez and Dolores Pérez-Sala (2004) Protein modification by cyclopentenone prostaglandin addition: biological actions and therapeutic implications. *Gene Therapy & Molecular Biology* **8A**:241-258

[http://www.gtmb.org/volume8/html/24_Stamatakis/24._Stamatakis_et_al,_24.pdf]

Saenz-Morales D, Escribese M, Stamatakis K, García-Martos M, Alegre L, Conde E, Pérez-Sala D, Mampaso F, García-Bermejo L. (2006) Requirements for proximal tubule epithelial cell detachment in response to ischemia: role of oxidative stress. *Exp Cell Res* (en prensa).

Stamatakis K, Pérez-Sala D. (2006) Prostanoids with cyclopentenone structure as tools for the characterization of electrophilic lipid-protein interactomes. *Ann N Y Acad Sci* (en prensa)

