

UAB

Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Bioqímica i
Biologia Molecular.

Unitat de Medicina



**REGULACIÓN DE LA ESTABILIDAD, LOCALIZACIÓN
SUBCELULAR Y ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE LA MAP
KINASA ERK5 POR LAS CHAPERONAS HSP90 Y Cdc37. ROL DE
ERK5 EN CANCER DE PROSTATA.**

Ingrid Tatiana Erazo Andrade

TESIS DOCTORAL

Bellaterra, 2013

The logo of the Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), consisting of the letters 'UAB' in a bold, sans-serif font. The 'U' and 'A' are black, and the 'B' is a dark brown color.

Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Bioquímica i
Biologia Molecular.

Unitat de Medicina



REGULACIÓN DE LA ESTABILIDAD, LOCALIZACIÓN SUBCELULAR Y ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE LA MAP KINASA ERK5 POR LAS CHAPERONAS HSP90 Y Cdc37. ROL DE ERK5 EN CANCER DE PROSTATA

Memoria de tesis doctoral presentada por Ingrid Tatiana Erazo Andrade para optar al grado de Doctora en Bioquímica y Biología Molecular por la Universitat Autònoma de Barcelona.

Este trabajo ha sido realizado bajo la dirección de los Doctores José Miguel Lizcano de Vega y Néstor Gómez Trias en la Unitat de Medicina del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular y en el Institut de Neurociències de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Doctoranda,

Ingrid Tatiana Erazo Andrade

El director,

El co-director,

Dr. José Miguel Lizcano de Vega

Dr. Néstor Gómez Trias

Bellaterra, 2013

Este estudio ha sido realizado gracias a la financiación de los siguientes proyectos:

- Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCyT), ref.BFU2004-00757
- Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCyT), ref.BFU2007-60268

Este estudio también se ha realizado gracias a la concesión de una beca predoctoral de la Universitat Autònoma de Barcelona para Personal de Investigación en Formación (PIF),
ref.PR-406-01-2/08

ÍNDICE

ÍNDICE	i
ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
1. Cáncer	3
1.1 Cáncer de próstata.....	4
1.2 Receptor de Andrógenos.....	7
Estructura del Receptor de Andrógenos	7
Vía de señalización del Receptor de Andrógenos	9
Expresión del Receptor de Andrógenos en cáncer de próstata	11
2. LA MAP Quinasa ERK5	13
2.1 Vía de señalización de las MAP quinasas.....	13
2.2 ERK1/2.....	15
2.3 ERK5.....	20
Estructura de ERK5	20
Localización subcelular de ERK5	23
Papel de la quinasa <i>upstream</i> MEK5	25
Inhibidores de la vía ERK5-MEK5	28
Sustratos de ERK5	29
Papel de ERK5 en cáncer	32
3. CHAPERONAS Y CO-CHAPERONAS	39
3.1 Hsp90.....	39
Estructura de Hsp90	39
Proteínas cliente de Hsp90	41

3.2 Cdc37: Chaperona o co-chaperona de Hsp90?.....	45
Proteínas cliente de Cdc37	46
Rol de Cdc37 en cáncer	49
II. OBJETIVOS.....	48
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	51
1. Cultivos celulares.....	53
Líneas celulares utilizadas	53
Generación de clones estables (PC3-ERK5, PC3-Cdc37 y PC3-ERK5/Cdc37	54
Tratamiento de las células	55
2. Extracción y análisis de proteínas.....	56
Lisis y cuantificación de proteína	56
Fraccionamiento subcelular	56
3. Purificación de proteínas.....	57
Co-inmunoprecipitación	57
Ensayos de <i>pull down</i>	57
Obtención de una preparación pura y activa de ERK5 a partir de células de insecto infectadas con baculovirus	58
Obtención de una preparación pura y activa de ERK5 en cultivos en suspensión de células humanas HEK-293T	58
Ensayos de ubiquitinación y SUMOilación <i>in vivo</i>	59
4. Ensayos de actividad enzimática.....	60
4.1 Ensayos de actividad quinasa.....	60
Ensayo radiométrico de actividad quinasa utilizando péptido sustrato	60
Ensayo radiométrico de fosforilación de proteínas en gel de poliacrilamida (autorradiografía)	61

4.2 Ensayo <i>luciferase gen reporter</i> de actividad transcripcional para AP-1 y PSA (Antígeno prostático específico).....	61
5. Técnicas electroforéticas para la detección de proteínas.....	62
Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida	62
Electrotransferencia de proteínas: Inmunoblot	62
6. Inmunocitoquímica.....	65
7. Análisis por citometría de flujo.....	65
Ensayos de proliferación celular	65
Análisis de proliferación celular mediante ensayos de incorporación de BrdU	66
8. Transfección de DNA en células de mamífero.....	67
Transfección con Polietilenamina (PEI)	68
Transfección con Lipofectamina 2000	69
9. Silenciamiento génico con RNA de interferencia.....	70
Silenciamiento de la Cdc37 celular mediante transfección transitoria de esiRNA	70
Silenciamiento de la ERK5 celular mediante infección con lentivirus shRNAs	70
IV. Resultados.....	73
1. ERK5 forma un complejo trimérico con Hsp90 y Cdc37.....	75
1.1 ERK5 interacciona con Hsp90.....	78
La inhibición de Hsp90 induce la ubiquitinación y degradación proteosomal de ERK5	80
1.2 ERK5 Hsp90 β y Cdc37 interaccionan y forman un complejo trimérico <i>in vivo</i>	84
1.3 La activación de ERK5 induce la disociación de Hsp90 mediante un mecanismo que requiere la autofosforilación de la cola C-terminal de ERK5.....	88

1.4 La sobre-expresión de Cdc37 induce la disociación de Hsp90 del complejo ERK5-Cdc37 y la translocación al núcleo de ERK5.....	95
1.5 La activación de ERK5 y la sobre-expresión de Cdc37 inducen la SUMOilación de ERK5, previamente a su translocación nuclear.....	108
2. Rol de ERK5 y Cdc37 en la proliferación y migración celular.....	118
2.1 Cdc37 coopera con ERK5 en promover la proliferación de células de adenocarcinoma de próstata PC-3.....	120
2.2 Cdc37 coopera con ERK5 en promover la proliferación y migración celular en líneas estables PC-3.....	122
3. Caracterización molecular y funcional de la interacción de ERK5 y el receptor de andrógenos (AR).....	127
3.1 ERK5 y Cdc37 forman complejo in vivo con el Receptor de andrógenos.....	129
3.2 Validación funcional de la interacción de ERK5 con el AR: activación transcripcional del antígeno prostático específico (PSA).....	135
V. Discusión.....	139
1. Regulación de la estabilidad, localización subcelular y actividad transcripcional de ERK5 por las chaperonas Hsp90 y Cdc37.....	141
2. Rol de ERK5 en cáncer de próstata.....	154
VI. Conclusiones.....	161
VII. Referencias.....	165
VIII. ANEXOS.....	185

Anexo: Erazo,T., Moreno,A., Ruiz-Babot,G., Rodríguez-Asiain,A., Morrice,N.A., Espadamala,J., Bayascas,J.R., Gomez,N., and Lizcano,J.M. (2013). Canonical and kinase activity-independent mechanisms for extracellular signal-regulated kinase

5 (ERK5) nuclear translocation require dissociation of Hsp90 from the ERK5-Cdc37 complex. Mol. Cell Biol. 33, 1671-1686.....

187

ABREVIATURAS

aa. Amino acid

ADP: Adenosine diphosphate

AKT: RAC-alpha serine/threonine-protein kinase; protein kinase B

Ala (A): Alanine

AMP: Adenosine monophosphate

AP1: Activator protein 1

AR: Androgen Receptor

Arg (R): Arginine

Asp (D): Aspartic acid

ATP: Adenosine triphosphate

BDNF: Brain-derived neurotrophic factor

BMK1: Big MAP kinase

Cdc37: Cell division cycle 37

CDKs: Cyclin-dependent kinase

c-Myc: Cellular Myelocytomatosis

CREB: cAMP response element binding protein

Cys (C): Cysteine

EGF: Epidermal growth factor

ER: Estrogen receptor

ERK1/2: Extracellular signal-regulated kinase 1/2

ERK5: Extracellular-signal-regulated kinase 5; MAPK7

FGF-2: Fibroblast growth factor 2

GA: Geldanamycin

GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

Glu (E): Glutamic acid

Hsp90: Heat shock protein 90

JNK: c-jun N-terminal Kinase

Lys (K): Lysine

MAPK: Mitogen-activated protein kinase

MEF2: Myocyte enhancer factor 2

MEK5: MAPK kinase 5

Mg²⁺: Magnesium ion

NEM: N-ethylmaleimide

NES: Nuclear export signal

NLS: Nuclear localization signal

NGF: Nerve growth factor

p21: Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A

p38: p38 mitogen-activated protein kinase

PEI: Polietilenamin

PSA: Prostate specific antigen

SDS-PAGE: SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis

RAD: Radicicol

SENP: Sentrin-specific protease

Ser (S): Serine

SUMO: Small ubiquitin-like modifier

Thr (T): Threonine

TK: Tyrosine kinase

TRP: Tetratricopeptide repeat

Tyr (Y): Tyrosine

Ub: Ubiquitin

VEGF: Vascular endothelial growth factor

WT: wild-type



Resumen

La vía de señalización celular MEK5-ERK5 se activa en respuesta a un amplio rango de factores de crecimiento y diferentes tipos de estrés. Fosforila los factores de transcripción de la familia MEF2 y juega un relevante papel en el control de la proliferación celular inducida por factores como el EGF, además de controlar la supervivencia celular y la angiogénesis. ERK5 difiere estructuralmente de otras MAP quinasa en presentar una larga y única cola C-terminal. Esta cola tiene un efecto autoinhibitorio sobre la actividad quinasa y presenta un motivo de localización nuclear NLS (sólo accesible en la conformación activa/abierta de la quinasa), además de un dominio de activación transcripcional que interacciona con MEF2D y potencia la actividad transactivadora del factor de transcripción AP-1. Así, ERK5 activa la transcripción de ciertos genes no sólo por la fosforilación directa de factores de transcripción, sino también actuando como co-activador transcripcional de, por ejemplo, el factor AP-1.

Previamente en nuestro laboratorio, utilizando la técnica del *Tandem Affinity Purification* (TAP), se identificó a la chaperona Hsp90 β como una putativa proteína que interacciona con ERK5. En este trabajo, mediante ensayos de co-inmunoprecipitación de las proteínas endógenas y sobre-expresadas, demostramos que ERK5 forma un complejo trimérico con las chaperonas Hsp90 β y Cdc37, y que la inhibición farmacológica de Hsp90 β o Cdc37 induce la ubiquitinación y degradación proteosomal de ERK5. Estos resultados proponen a ERK5 como una nueva proteína cliente de la chaperonas Hsp90/Cdc37, necesarias para el correcto plegamiento y mantenimiento de la estructura de la quinasa.

Por primera vez se muestra que la activación canónica de ERK5 (por MEK5) induce la disociación de Hsp90 del complejo ERK5-Cdc37, como paso previo a la translocación nuclear de ERK5 y la consiguiente activación de la transcripción, por un mecanismo que requiere la autofosforilación de la cola C-terminal de la quinasa. Por otra parte, se ha establecido que la expresión de Cdc37 en exceso (como ocurre en algunos tipos de cáncer) promueve la disociación de Hsp90 del complejo y la translocación nuclear de una forma inactiva de ERK5 capaz de potenciar la actividad transcripcional del factor AP-1. Este resultado constituye la primera evidencia de un mecanismo no canónico de translocación que implica la entrada en el núcleo de una ERK5 inactiva que retiene la capacidad de activar la transcripción mediada por el factor AP-1. También se propone a Hsp90 como una proteína que serviría de anclaje citosólico de ERK5. Por otra parte, se han obtenido evidencias que muestran que tanto la activación canónica (MEK5) como no canónica (Cdc37) inducen la SUMOilación de ERK5 en el extremo N-terminal de la proteína. Mediante ensayos bioquímicos y de inmunofluorescencia aportamos evidencias que apuntan a que tanto la disociación de Hsp90 como la SUMOilación son eventos necesarios pero no suficientes *per se* para que ocurra la translocación nuclear de ERK5.

Se han generado líneas celulares que sobre-expresan establemente ERK5 y/o Cdc37, que muestran que ambas proteínas cooperan en promover un drástico incremento en la proliferación y la migración celular. Este resultado es relevante dado que la sobre-expresión de ERK5 como Cdc37 son eventos que ocurren en ciertos tipos de cáncer, como el adenocarcinoma prostático. Por último, mostramos que ERK5 interacciona con el receptor de andrógenos (AR) en el citosol de las células en reposo, y que la activación de este receptor con ligandos induce la translocación de AR y ERK5 inactiva al núcleo, donde siguen interaccionando y colaboran en la promoción de la actividad transcripcional del AR sobre la proteína antígeno prostático (PSA, biomarcador clínico específico del cáncer de próstata). Se ha observado otro *link* funcional entre ambas proteínas, ya que la activación de ERK5 por MEK5 o la sobre-expresión de Cdc37 incrementan la actividad ligando-dependiente del receptor de andrógenos, mientras que el silenciamiento de la ERK5 celular bloquea dicha activación transcripcional.

The MEK5-ERK5 signaling pathway is activated in response to growth factors and different forms of stress. ERK5 phosphorylates the transcription factors, members of the myocyte enhancer factor family, MEF2 and plays an important role in the control of cell proliferation induced by factors such as EGF, as well as control of cell survival and angiogenesis. In contrast with other MAPKs, ERK5 has a unique C-terminal tail. This domain auto-inhibits the kinase activity and has a nuclear localization signal (NLS) (only available in the active/open conformation), moreover contains a transcriptional activation domain that interacts with MEF2D and enhances the activity of the AP-1 transcriptional complex. Thus, ERK5 is able to activate transcription not only by direct phosphorylation of transcription factors but by acting itself as a transcriptional coactivator, as, for example, in the case for the activator protein 1 (AP-1) transcription factor.

Previously in our laboratory using the technique of Tandem Affinity Purification (TAP), we identified the chaperone Hsp90 β as a putative interacting protein ERK5. In this study, using co-immunoprecipitation assays of endogenous and recombinant proteins, we demonstrated that ERK5 forms a trimeric complex with Hsp90 β and Cdc37, and the pharmacological inhibition of Hsp90 and Cdc37 induces ubiquitination of ERK5 prior to degradation at the proteasome. These results suggest that ERK5 is a novel client protein of the chaperone Hsp90/Cdc37, and these chaperones are necessary to maintain the proper folding and structure of the kinase.

For the first time we show that the canonical activation of ERK5 (by MEK5) induces the Hsp90 dissociation from the ERK5-Cdc37 complex, leading to ERK5 nuclear translocation and activation of transcription, by a mechanism which requires the autophosphorylation at its C-terminal tail. Moreover, the overexpression of Cdc37 (as in some types of cancer) promotes Hsp90 dissociation and the nuclear translocation of a kinase-inactive form of ERK5 which retains transcriptional activity. This is the first example showing that ERK5 transcriptional activity does not require kinase activity. We propose that Hsp90 might be the cytosolic anchor of ERK5. Moreover, we show that both the canonical activation canonical (MEK5) as noncanonical (Cdc37) induce the ERK5 SUMOylation at its N-terminal half. The biochemical and immunofluorescence assays provided evidence that both the Hsp90 dissociation as the ERK5 SUMOylation are necessary but not sufficient per se to induce ERK5 nuclear translocation.

We generated stable cell lines that over-express ERK5 and/or Cdc37, we showed that both proteins cooperate to promote a dramatic increase in cell proliferation and migration. This result is important because overexpression of ERK5 and Cdc37 are events that occur in certain types of cancer, including prostate adenocarcinoma. Finally, we show that ERK5 interacts with the androgen receptor (AR) in the cytosol of resting cells, and that activation of this receptor with ligands induces the nuclear translocation of AR and inactive ERK5, and in this cellular compartment they continue interacting and promoting the transcriptional activity of AR through PSA (PSA specific clinical biomarker for prostate cancer). It has been observed another functional link between these proteins, and that activation of ERK5 by MEK5 or overexpression of Cdc37 increase ligand-dependent activity of the androgen receptor, whereas the silencing of ERK5 inhibits this transcriptional activation.

I.

Introducción

1. CÁNCER

El cáncer es una enfermedad heterogénea, que se caracteriza por la acumulación dinámica de cambios a nivel genómico, que finalmente dan lugar al establecimiento de una o varias poblaciones celulares con capacidad de proliferación incontrolada. Hanahan y Weinberg postularon siete alteraciones principales que caracterizan a la célula tumoral: i) independencia de señales de crecimiento, ii) insensibilidad a señales inhibitorias del crecimiento, iii) evasión de los programas de muerte celular, iv) capacidad de división ilimitada, v) angiogénesis, vi) metástasis y vii) la capacidad de las células tumorales de evadir el control del sistema inmune (**Figura 1**) (Hanahan and Weinberg, 2011).

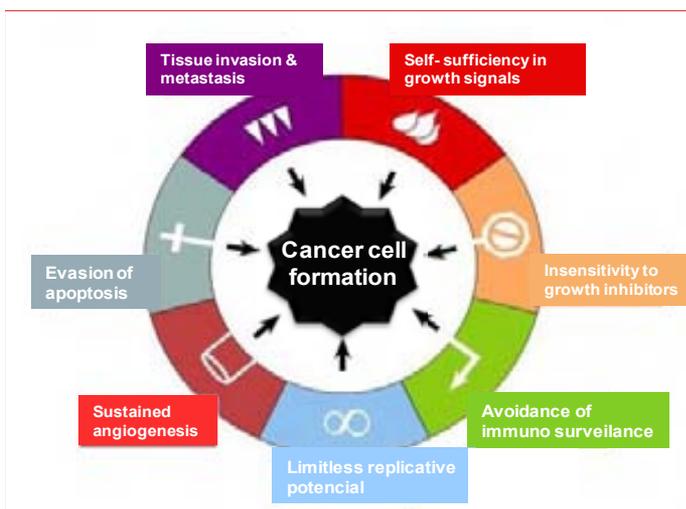


Figura 1. Modelo propuesto para el conjunto de capacidades adquiridas por las células tumorales (Hallmarks en cáncer). Figura adaptada de Hanahan and Weinberg, 2011.

La proliferación, diferenciación y muerte celular son procesos coordinados que ayudan a mantener la homeostasis en los diferentes tipos celulares. La regulación de estos procesos está dada en gran parte por las cascadas de señalización intracelular, por ello es usual que prácticamente todos los tumores humanos acumulan alteraciones a nivel de uno o varios componentes de las rutas de señalización.

En este sentido y por tratarse de la familia de quinasas en la que se centra este trabajo cabe destacar el papel que juegan las MAPKs en la contribución a transformación y tumorigénesis. A día de hoy, se ha establecido que la cascada SOS-Ras-Raf-MEK-MAPK se encuentra hiperactivada o constitutivamente activa en el 30% de los tumores humanos. La mayoría de lesiones tumorales en las que se encuentra ERK constitutivamente activo se producen por alteraciones en los primeros niveles de la vía de señalización, como la sobreexpresión de los miembros *upstream* de la cascada, los receptores tirosina quinasa (EGFR y PDGFR). Varias mutaciones dan lugar a formas constitutivamente activas de Ras y B-Raf. Además a nivel *downstream* también puede haber desregulación o amplificación de las dianas nucleares c-Myc y AP-1. Todo ello hace que esta vía contribuya a la proliferación celular incontrolada y resistencia a apoptosis y en consecuencia sea asociada a fenotipos de neoplasias agresivas (Roberts and Der, 2007).

1.1 Cáncer de Próstata

El cáncer de próstata (CaP) es el segundo tipo tumoral más común y la sexta causa principal de muerte por cáncer entre los hombres en todo el mundo con un estimado de 899.000 casos nuevos y 258.000 nuevas muertes en 2008. Dentro de los factores de riesgo de padecer esta enfermedad se encuentran el origen étnico, los antecedentes familiares de la enfermedad y la edad avanzada, siendo aproximadamente 70 años la edad media de diagnóstico (Center et al., 2012).

El método más utilizado en la detección precoz del cáncer de próstata es la medición en el suero de los niveles de la Proteína Antígeno Específica (PSA). Esta glicoproteína se produce casi exclusivamente en las glándulas prostáticas y forma parte del fluido seminal que protege el material genético de los espermatozoides y promueve su supervivencia en el medio ácido del tracto vaginal. En el 65% de los casos de CaP la concentración sérica de PSA aumenta por encima de los niveles normales (4µg/L). Si los niveles se encuentran entre 4 y 10, la probabilidad de tener un cáncer de próstata es del 25%. Si los niveles de PSA son mayores de 10, la posibilidad de padecer un cáncer de próstata es del 67% y aumenta conforme los niveles de PSA se incrementan. No obstante, el PSA se considera un marcador tumoral imperfecto debido a que la presencia de otras patologías también puede hacer variar sus niveles, lo que reduce la sensibilidad y especificidad de esta prueba (Catalonia et al., 1991).

A nivel clínico existen dos sistemas de clasificación del CaP que son primordiales en la definición del tratamiento y pronóstico, el primero denominado TNM que define los estadios tumorales, basado en la Tamaño (extensión) del tumor, si abarca Nódulos (ganglios) linfáticos y si hay presencia de Metástasis en hueso o en órganos (pulmón o hígado) (**Tabla 1**).

El segundo sistema de clasificación es el de grado histopatológico (Gleason), a partir del análisis de biopsias se define la apariencia microscópica del tejido y se adjudica un grado 1-5 de acuerdo al nivel de diferenciación glandular. De manera que en el Gleason 1 se observan glándulas uniformes no diferenciadas, compactas e individuales mientras que el Gleason 5 las glándulas están ausentes, encontrándose solo células atípicas o masas tumorales. La puntuación de Gleason final se obtiene mediante la sumatoria de los dos patrones predominantes encontrados en el análisis histológico, el *score* final puede estar entre 2-10 y se considera que los Gleason 7-10 son los de peor pronóstico (**Figura 2**) (Gleason, 1966; Epstein et al., 2006).

CLASIFICACION TNM
T: Evaluación del tumor primario
<p>Tx: No se puede evaluar el tumor primario T0: No hay evidencia de tumor primario T1: Tumor no evidente clínicamente, no palpable ni visible mediante técnicas de imagen. T1a: Tumor detectado en una extensión menor o igual al 5% del tejido resecado. T1b: Tumor detectado en una extensión mayor del 5% del tejido resecado. T1c: Tumor identificado mediante punción biópsica (realizado por PSA elevado). T2: Tumor confinado en la próstata. T2a: El tumor abarca la mitad de un lóbulo o menos. T2b: El tumor abarca más de la mitad de un lóbulo pero no ambos lóbulos. T2c: El tumor abarca ambos lóbulos. T3: Tumor que se extiende más allá de la cápsula prostática. T3a: Tumor que invade la mitad o menos de las vesículas seminales. T3b: Tumor que invade completamente una de las vesículas seminales. T4: Tumor que invade estructuras adyacentes: cuello vesical, recto, músculos elevadores del ano y/o pared pélvica.</p>
N: Evaluación de Nódulos linfáticos
<p>Nx: No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales N0: Sin metástasis ganglionares regionales N1: Metástasis en ganglios linfáticos regionales</p>
M: Evaluación de Metástasis a distancia
<p>Mx: No se pueden evaluar las metástasis a distancia M0: No hay metástasis a distancia M1: Metástasis a distancia. M1a: Metástasis en ganglios linfáticos no regionales. M1b: Metástasis en hueso. M1c: Metástasis en otras localizaciones (hígado, pulmón).</p>

Tabla 1. Clasificación (estadificación) del Cáncer de Próstata.



Figura 2. Grados de Gleason. Esquema representativo de los diferentes grados de diferenciación de un tumor de próstata. Los grados menores presentan una estructura glandular diferenciada y organizada. En los grados superiores la estructura se descompone (Gleason, 1966) .

En su fase inicial todos los tumores de próstata son adenocarcinomas hormono-dependientes pero en algunos casos ocurre regresión clínica en respuesta a las estrategias terapéuticas utilizadas. El tratamiento estándar para combatir el CaP es la ablación de andrógenos usada durante más de medio siglo. En la mayor parte de los casos esta terapia provoca la disminución del tamaño del tumor, reducción de los niveles séricos de PSA y apoptosis de la célula cancerosa (Huggins, 1967). Sin embargo, a diferencia de las células epiteliales normales de próstata incapaces de regenerarse y crecer en un medio privado de andrógenos. Las células tumorales de este tejido casi siempre logran adquirir un fenotipo andrógeno-independiente dando lugar al AIPC (*Androgen-independent prostate cancer*) que es una forma letal del cáncer de próstata que forma metástasis rápidamente y deja un pronóstico de supervivencia no superior a los dos años (Seruga and Tannock, 2008).

El cáncer de próstata es una enfermedad multifactorial lo que dificulta el poder establecer los mecanismos moleculares exactos que la generan. Pese a esto, lo que sí ha sido establecido es la relevancia que tiene los niveles de andrógenos, que permite mantener el equilibrio entre la proliferación y la muerte de las células epiteliales de la próstata. De ahí que la vía de señalización del Receptor de Andrógenos (AR) sea un elemento clave en la progresión de este tipo tumoral. En los siguientes apartados de este capítulo se revisará de forma general los aspectos más relevantes de la cascada de señalización del AR y el origen de su sobreexpresión en CaP.

1.2 Receptor de Andrógenos (AR)

El Receptor de Andrógenos (AR) clonado simultáneamente en 1988 por dos laboratorios, es un factor de transcripción que pertenece a la subfamilia de receptores nucleares para hormonas esteroides. Otros miembros de esta subfamilia son los receptores de estrógenos, progesterona, glucocorticoides y mineralocorticoides (Chang et al., 1988; Lubahn et al., 1988).

El receptor de andrógenos cumple múltiples funciones: i) media la transcripción ligando-dependiente de genes requeridos tanto en el desarrollo embrionario del fenotipo sexual masculino como en la maduración sexual masculina durante la pubertad. ii) En la edad adulta es esencial para las funciones reproductivas (glándula prostática). iii) está vinculado a funciones específicas en tejidos variados, en piel podría coadyuvar en el incremento del contenido de colágeno (Gelman, 2002; Yeh et al., 2002).

Varias de las funciones descritas antes fueron identificadas mediante la caracterización de los ratones deficientes en AR (ARKO). Se encontró que estos ratones no desarrollaron órganos masculinos (vesículas seminales, vasos deferentes ni próstata) tan solo externamente exhibieron apariencia de órganos sexuales femeninos. A nivel cerebral en dichos ratones no hubo proceso de masculinización de manera que los comportamientos por excelencia masculinos no fueron observados. También se encontró que el AR cumple una función en metabolismo óseo, los ratones ARKO presentan una marcada reducción en el tamaño de algunos huesos. Otro hallazgo interesante que postula al AR como un posible regulador negativo del desarrollo de adipocitos en hombres adultos, fue que los ratones masculinos ARKO desarrollaron obesidad tardía, al momento de nacer el fenotipo fue igual al de los salvajes, pero hacia las 12 semanas incrementaron su peso drásticamente. Asimismo se demostró la relevancia de la expresión del AR en crecimiento cardíaco, los ratones ARKO tienen el corazón significativamente más pequeño (Matsumoto et al., 2005; Ikeda et al., 2005).

Estructura de la proteína AR

El gen que codifica para el AR humano está localizado en el brazo largo del cromosoma X (Xq11.2-12) y tiene un tamaño de 90 kilobases, y comprende ocho exones, los cuales codifican para una proteína de 919 aminoácidos con una masa molecular aproximada de 110 kDa (Trapman et al., 1988).

El AR posee una estructura similar a los otros receptores de esteroides que consiste en cuatro dominios. El dominio regulador N-terminal – NTD (a.a 1–555) modula la actividad transcripcional del receptor. Los primeros 30 residuos de esta región interactúan con el dominio C-terminal de la proteína, esta unión es indispensable para alcanzar una eficiente activación transcripcional. Este dominio contiene además la región de activación de la transcripción independiente de ligando (TAF-1), siendo el lugar de interacción con ciertas proteínas correguladoras (McEwan, 2004).

El dominio de unión al DNA - DBD (a.a 556–624) es el encargado de estabilizar la unión del AR al DNA diana a través de dos dedos de zinc capaces de interactuar específicamente con pequeñas secuencias denominadas elementos de respuesta a andrógenos (AREs). A través de mutaciones puntuales se ha

determinado que los dedos de zinc también son requeridos en el proceso de dimerización del receptor (MacLean and Picard, 2003).

La región bisagra H (a.a 625-670), es muy importante para el movimiento del receptor. Esta región contiene una secuencia de localización nuclear (NLD) que consiste en dos grupos de aminoácidos básicos (en negrita) separados por 10 aminoácidos ácidos (⁶¹⁷**RK**CYEAGMTLGARK**LKK**⁶³³), induce el importe nuclear del AR (**Figura 3**) (MacLean et al., 1997; Clinckemalie et al., 2012).

Finalmente el dominio de unión al ligando (LBD) (a.a 671–919), es el lugar de unión de los andrógenos al receptor y contiene la región de activación de la transcripción dependiente de ligando (TAF-2) (a.a 625–670). Mediante análisis de delección se identificó una señal de exporte nuclear (NES) entre los aminoácidos 742-817, que es suficiente para provocar la salida del AR de nuevo al citoplasma (Saporita et al., 2003).

En ausencia de ligando la señal NES se encuentra activa y el AR se localiza en el citosol. En presencia de la hormona el NES es inhibido y se expone la señal de localización nuclear (NLD), que normalmente está enmascarada en la región bisagra (**Figura 3**) (Kesler et al., 2007).

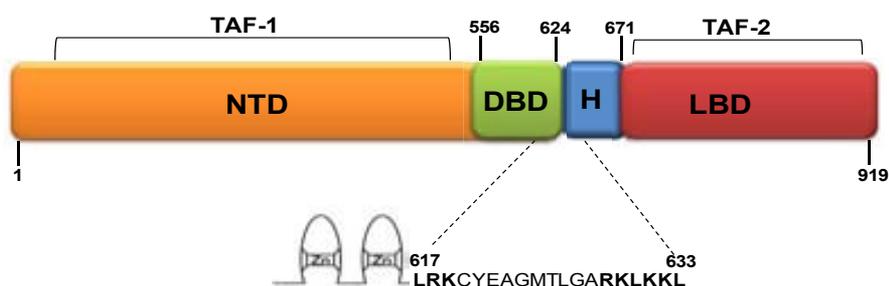


Figura 3. Representación esquemática de la estructura del Receptor de Andrógenos. NTD: Dominio N-terminal de transactivación (naranja). DBD: Dominio de unión al ADN (verde), con el módulo de dedos de zinc y la señal de localización nuclear (NLS) (secuencia presentada en detalle residuos 617-633). H: Región bisagra (azul). LBD: Dominio de unión al ligando (rojo). Figura extraída de Clinckemalie et al., 2012.

Vía de señalización del Receptor de Andrógenos (AR)

En condiciones basales el receptor de andrógenos se encuentra en el citoplasma, inactivo y unido a un dinámico “heterocomplejo” denominado *foldosome* conformado por chaperonas de la familia de las *heat-shock proteins*, co-chaperonas y otras proteínas que contienen motivos TRP (tetratricopéptido). La interacción del AR con estas chaperonas ocurre a través del dominio de unión al ligando LBD. El complejo de chaperonas estabilizan al AR, manteniéndolo en una conformación parcialmente desplegada que es el estado de más alta afinidad por andrógenos, esta conformación mantiene al LBD accesible a la hormona (Prescott and Coetzee, 2006).

La estabilización del AR por chaperonas en el citosol requiere la formación de subcomplejos dinámicos. El primero está conformado por la chaperona Hsp70 y su co-chaperona la Ydj1, miembro de la familia Hsp40, que ayuda al correcto alineamiento de las superficies de interacción del receptor y la Hsp70. Luego se forma un complejo intermedio, del que participa la co-chaperona Hop (*Hsp organizer protein*)

que recluta un homodímero de Hsp90, que junto a Hsp70 forman un puente usando motivos TRP en las interacciones. A partir de la liberación de Hop, se forma el complejo final entre Hsp90 y proteínas inmunofilinas que contienen motivos TRP. La Hsp90 es la encargada de mantener al AR en un estado competente para la unión de ADN (Prescott and Coetzee, 2006).

A diferencia de los otros receptores de hormonas, ha sido demostrado que el AR interacciona con la Cdc37, una co-chaperona normalmente vinculada al plegamiento de quinasas. Aunque la unión AR-Cdc37 ha sido poco caracterizada se conoce que la Cdc37 juega un papel importante en mantener la interacción entre los dominios N-terminal (NTD) y C-terminal (LBD) del AR, que es la conformación óptima para la total activación transcripcional del receptor y la posterior unión a cromatina. De manera, que la Cdc37 jugaría un rol clave en la transactivación del AR y no en su estabilidad (Rao et., 2001).

La unión con la hormona provoca varios efectos en la estructura del AR, primero ocurre la pérdida secuencial de chaperonas, de manera que se bloquea la formación del primer complejo AR-Hsp70. A continuación el receptor es fosforilado por varias quinasas, entre las que se encuentran la PKA y las MAPKs. Seguidamente el receptor dimeriza, adquiriendo la conformación que le permite interactuar con los elementos de respuesta a andrógenos (AREs) en las regiones promotoras de ciertos genes diana. Está forma activa del AR unida al ADN recluta a proteínas co-reguladoras que le permitirán estimular o inhibir la transcripción de genes nucleares (**Figura 4**) (Feldman and Feldman, 2001).

El AR regula más de 100 genes en células de próstata todos ellos con papeles fisiológicos muy variados. Hasta ahora las diana mejor estudiadas son dos proteínas que forman parte del fluido prostático y son marcadores de malignidad prostática, PAP (*Prostate acidic phosphatase*) y PSA (Nelson, 2002). Recientemente, se ha propuesto que el incremento en la proliferación celular de los adenocarcinomas de próstata propiciada por el AR podría explicarse por una desregulación del ciclo celular entre las fases G1/S que provoca el receptor mediante la inducción de la sobreexpresión de la ciclina D1, lo que promueve la activación de la CDK4. También ha sido demostrado que la activación del AR induce la degradación de p27 y disminución de la expresión del ARNm de p53 (Comstock and Knudsen, 2007).

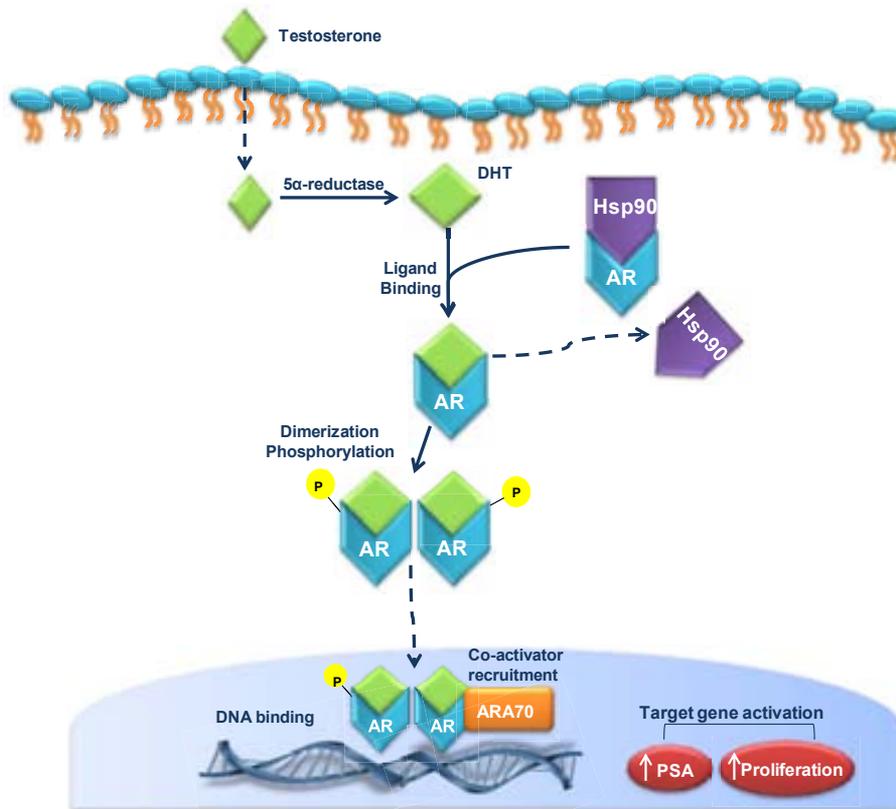


Figura 4. Vía de señalización del Receptor de andrógenos. La testosterona que circula en sangre al entrar en la célula es convertida por la enzima 5 α -reductasa en un esteroide más potente, dihidrotestosterona (DHT). La unión del DHT al AR provoca la disociación de las *heat shock proteins* y la fosforilación del receptor. El AR dimeriza (forma que puede unir elementos ARE de los genes diana). Una vez en núcleo se reclutan coactivadores como ARA70. La activación del AR induce respuestas biológicas como incremento del PSA y proliferación celular. Figura modificada de Feldman and Feldman, 2001.

Expresión del AR en cáncer de próstata

Tal y como ocurre en otros carcinomas, en próstata el progreso de la enfermedad también está relacionado con la presencia de modificaciones genéticas, a través de la acumulación de mutaciones. En general los tumores metastásicos acumulan más mutaciones que los tumores primarios. De hecho en próstata se ha encontrado que el 30% de los tumores “resistentes a la castración” que evolucionan a AIPC (andrógeno-independientes) acumulan mutaciones sucesivas que logran amplificar el gen del AR, lo que deriva en un incremento anómalo en la síntesis del receptor (Visakorpi et al., 1995).

Del mismo modo las mutaciones pueden dar lugar a un receptor desregulado “*outlaw*” que se activa e induce genes aún en ausencia de andrógenos. Una mutación puntual del AR en T877A provoca que el receptor sea activado por otras hormonas como los estrógenos, progesterona y anti-andrógenos (acetato de ciproterona y 2-hidroxi-flutamida). Otras mutaciones promueven la activación del AR por parte de otros

ligandos inusuales para esta vía como el IGF-1 (*insulin-like growth-factor-1*), EGF y KGF (*keratinocyte growth factor*) (Veldscholte et al., 1992; Culig et al., 1994; Chang et al., 2001).

Como se mencionó antes la privación de andrógenos es la terapia estándar contra el CaP, porque permite inicialmente recuperar el balance entre proliferación y apoptosis celular. Sin embargo, en muchos casos se ha encontrado que este tratamiento induce dos mecanismos compensatorios. En el primero, mediante el incremento en la actividad de la enzima 5 α -reductasa la próstata promueve una mayor producción de DHT, un ligando más potente que la testosterona (Makridakis et al., 1997). En el segundo mecanismo se originan formas del receptor que presentan más afinidad por la hormona, de manera que estos tumores son mucho más sensibles a concentraciones más pequeñas de hormona (Feldman and Feldman, 2001).

Todas las alteraciones en el receptor de andrógenos previamente descritas han conducido a una intensa búsqueda de estrategias de inhibición del AR a diferentes niveles: bloqueo de la unión al ligando, al ADN o inhibición de chaperonas. Todo ello con el fin de impedir su translocación al núcleo, activación transcripcional o en otros casos inducir su desnaturalización y degradación (**caja 1**).

Caja 1. Inhibición del Receptor de andrógenos.

Significativos avances en investigación básica y clínica han permitido desarrollar potentes inhibidores del AR que en algunos casos ya se administran a pacientes con CaP o se encuentran en fases clínicas avanzadas.

Anti-andrógenos: Estos compuestos compiten con los andrógenos endógenos por unirse al dominio de unión al ligando del AR. Inducen cambios conformacionales en el receptor que aunque permiten su translocación a núcleo y reclutamiento de coactivadores dejan un AR transcripcionalmente inactivo. En clínica se administran estos fármacos en simultáneo a la privación de andrógenos, para conseguir un bloqueo casi total de estas hormonas. Existen dos tipos de anti-andrógenos: esteroides (RU-486 – mifepristona y el acetato de ciproterona) y no esteroides (**flutamida**, nilutamida y bicalutamida) (Chen et al., 2009).

Segunda generación de anti-andrógenos: El MDV3100 y el ARN-509 (solo varían en un átomo) son moléculas pequeñas que tienen como diana el dominio LBD del AR. El MDV3100 no tiene actividad agonista. Cuando el receptor se une a este compuesto adquiere una conformación incapaz de interactuar con el DNA o reclutar coactivadores. Impide la translocación nuclear del AR en células LnCap de manera más eficiente que los anti-andrógenos. En ratones xenografts inhibe el crecimiento de tumores porque induce apoptosis en las células tumorales (Tran et al., 2009). Este fármaco ha pasado las fases clínicas I y II. En casi un 60% de los pacientes evaluados se redujo los niveles séricos de PSA y no se presentaron efectos secundarios debido a toxicidad (Scher et al., 2010; Mohler et al., 2012).

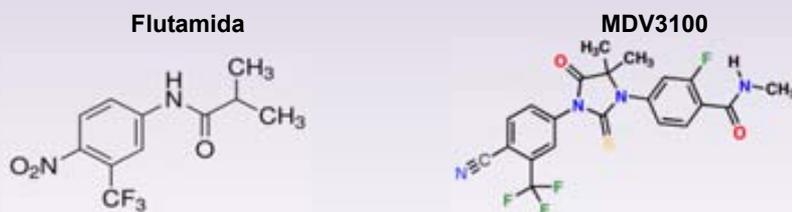


Figura C.1 Estructura química del anti-andrógeno clásico Flutamida y del nuevo antagonista del AR MDV3100. La principal falencia de los anti-andrógenos como la Flutamida es que tienen actividad agonista en células que expresan altos niveles del AR, por esta razón se generaron otras moléculas más específicas y que no inducen a genes diana del AR como el PSA (Massard et al., 2011).

Otro nuevo compuesto que inhibe la región AF-1 del AR es el EPI-001. Esta molécula logra bloquear la transactivación del dominio NTD del receptor sin bloquear la unión con la hormona y reduce la interacción del AR con los ARE de sus genes diana. *In vivo* reduce el crecimiento de tumores de próstata resistentes a la castración en ratones xenografts (Andersen 2010)

Inhibidores de Hsp90: El derivado de Geldanamicina, 17-AAG, en ratones con cáncer de próstata indujo degradación del AR y disminución del crecimiento de los tumores. Sin embargo, en clínica no se ha evidenciado una actividad significativa de este compuesto en el tratamiento de tumores resistentes a la castración (Solit et al., 2002).

2. La MAP quinasa ERK5

2.1 VIA DE SEÑALIZACION DE LAS MAP QUINASAS

La respuesta a estímulos extracelulares en células eucarióticas ocurre a través de cascadas de señalización, que transducen las señales de factores externos incapaces de atravesar la membrana celular e involucran diferentes componentes citoplasmáticos para finalmente activar a dianas (genes) nucleares. La vía de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos o MAPK se encuentra evolutivamente conservada y es activada por variados agentes extracelulares que operan a través de diferentes familias de receptores, desencadenando eventos de fosforilación secuenciales (Turjanski et al., 2007).

Uno de los mecanismos de activación de las MAPK mejor caracterizado es el mediado por receptores tirosina-quinasa (RTK). A esta familia pertenecen los receptores de diversos factores de crecimiento (EGF, FGF y PDGF) así como el receptor de insulina. Después de la unión al agonista, el receptor dimeriza y se autofosforila en diferentes residuos tirosina, con lo que se generan sitios de unión para proteínas adaptadoras que poseen dominios SH2, como Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*). Esta a su vez forma un complejo con SOS, un factor intercambiador de nucleótidos guanina (GEF), que promueve el intercambio de GDP por GTP en la proteína Ras, la cual adquiere su forma activa (Cobb and Goldsmith, 1995). La forma de Ras unida a GTP es capaz de unirse a varios efectores intracelulares mediando en su activación. Entre estos efectores destaca la proteína quinasa Raf. Una vez localizado en la membrana Raf se activa a través de un mecanismo complejo en el que participan varias quinasas y la proteína fosfatasa PP2A (Ory et al., 2003). De esta manera las MAP3K como Raf (Raf-1, B-Raf) activan a una familia de quinasas con especificidad dual, las MAPKK (por ejemplo MEK1/2) mediante la fosforilación de dos residuos Ser/Thr localizados en el subdominio de activación. Finalmente las MAPKK fosforilan las MAPK en dos residuos Tyr y Thr activándolas (**Figura 5**) (Ramos, 2008).

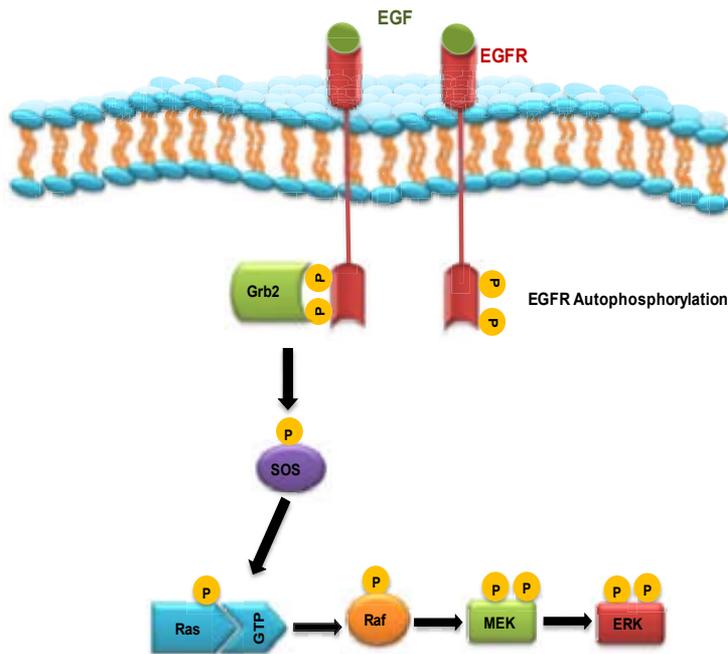


Figura 5. Mecanismo de activación de ERK1/2 en respuesta a EGF. Bajo estimulación por EGF, el receptor tirosina quinasa EGFR activa a Ras a través de los factores Intercambiadores de nucleótidos de guanina (SOS). La activación de Ras estimula a la vía Raf/MEK/ERK (Roberts and Der, 2007).

En mamíferos existen 4 subfamilias de MAPK clásicas: **ERK1/2** y **ERK5** que son fosforiladas en el motivo Thr-Glu-Tyr en su loop de activación, **JNKs** (JNK1-3) fosforiladas en Thr-Pro-Tyr y **p38** (p38 α - γ) en Thr-Gly-Tyr (**Figura 6**) (Turjanski et al., 2007). Una vez activadas las MAPK pueden fosforilar varias proteínas citosólicas pertenecientes a diferentes rutas de señalización y posteriormente translocar al núcleo, donde fosforilan distintos factores de transcripción dando lugar a la respuesta transcripcional correspondiente.

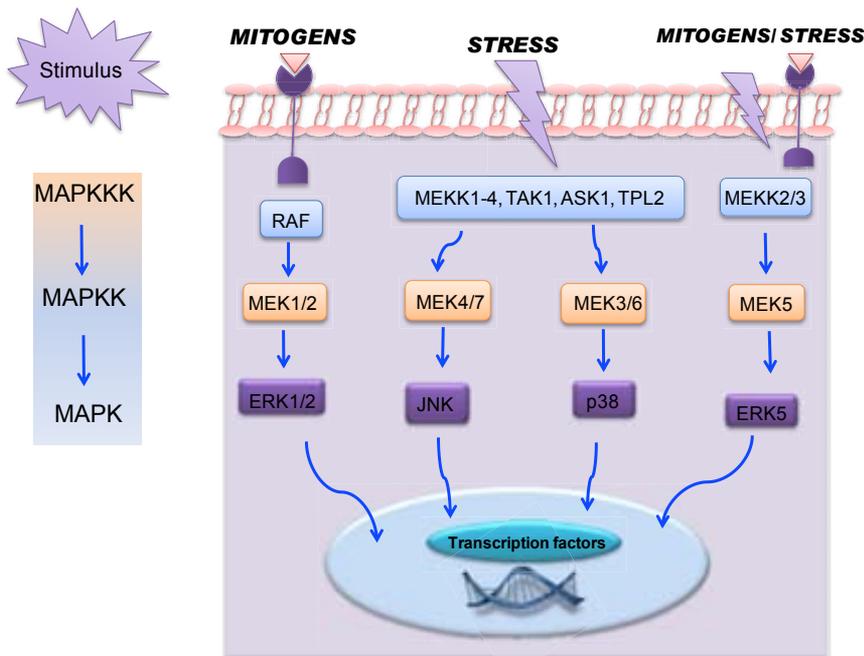


Figura 6. Representación esquemática de las cuatro cascadas canónicas de señalización de las MAP quinasas (Figura extraída de Keshet and Seger).

2.2 ERK1/2

ERK1 y ERK2 fueron las primeras MAPK descritas en la década de los 80's. La primera evidencia surgió al detectar que la estimulación de fibroblastos con el factor de crecimiento PDGF inducía la fosforilación en tirosinas de unas proteínas de aproximadamente 43 – 45 kDa (Cooper et al., 1982). Posteriormente se demostró que la incubación de extractos de adipocitos 3T3-L1 con insulina producía un incremento en la incorporación de ^{32}P en residuos Tyr/Thr de una quinasa de aproximadamente 41-43 kDa. Esta quinasa fosforilaba *in vitro* a la proteína asociada a microtúbulos (MAP-2) (Ray and Sturgill, 1988). Finalmente se demostró que esta proteína era activada por varios factores de crecimiento y mitógenos, por lo que fue denominada *Mitogen-Activated Protein kinase* (Rossomando et al., 1989). Estas evidencias dieron paso a un profundo interés en el estudio de estas proteínas, capaces de responder tanto a insulina como a factores de crecimiento a través de su fosforilación en tirosina (Avruch, 2007).

ERK1 y ERK2 tienen un 83% de homología, comparten la mayor parte de funciones y están ubicuamente expresadas. Sin embargo, la caracterización de los ratones deficientes en ERK1/2 confirmó que ambas proteínas no son completamente redundantes en sus funciones. Así los ratones *knockout* para ERK1^{-/-} no parecen tener ningún fenotipo aparente debido a que son viables y fértiles (Nekrasova et al., 2005; Pages et al., 1999). En ratones el doble *knockout* para ERK2^{-/-} resulta en una letalidad embrionaria entre los días E6.5 y E8.5 debido a defectos en el desarrollo placentario (Saba-EI-Leil et al., 2003; Hatano et al., 2003). Con respecto a MEK1, una de las quinasas activadoras *upstream*, se ha demostrado que los ratones MEK1^{-/-} presentan defectos en la estructura de las capas placentarias originadas por una falta de vascularización, lo que desencadena la muerte de embrión (Nadeau et al., 2012).

Sustratos de ERK1/2

En gran medida la identificación de las diferentes dianas de las MAPKs ha sido conseguida a través del desarrollo de inhibidores más o menos específicos de estas cascadas de señalización, adicionalmente el uso de estos compuestos ha aportado valiosa información de cara a dilucidar las funciones fisiológicas de los miembros de esta familia de quinasas. Para inhibir la cascada ERK1/2 se han utilizado clásicamente dos inhibidores no competitivos. El primer compuesto inhibidor desarrollado fue el PD098059 y posteriormente el U0126, ambos se unen a la forma inactiva de MKK1, bloqueando su fosforilación por Raf (Alessi et al., 1995; Favata et al., 1998). Ambos han sido excluidos para uso clínico. Recientemente, se han desarrollado nuevos inhibidores de MEK1 de mayor potencia, el PD184352 y PD0325901, que se encuentran en ensayos clínicos en el tratamiento de tumores sólidos de diferente tipo. El primero llegó a la fase II pero presenta los típicos efectos de toxicidad.

Dada la participación de ERK1/2 en procesos fisiológicos tan variados como proliferación, diferenciación, adhesión y migración celular, estas MAPK son capaces de activar a numerosas dianas *downstream*. Una vez activadas, ERK1/2 fosforilan a sus sustratos en la secuencia consenso Pro-Xaa-Ser/Thr-Pro (Avruch, 2007). Hasta el momento se han identificado más de 200 sustratos de estas quinasas (Daub et al., 2008; Roskoski, Jr., 2012). Los sustratos de las MAP quinasas se encuentran distribuidos en diferentes compartimentos celulares, y cabe destacar que en el núcleo fosforilan a varios factores de transcripción como c-Myc, c-Jun, c-Fos, Elk-1, p53, Ets1, STAT o SMAD, los cuales desempeñan papeles cruciales en la regulación de la proliferación y en los procesos tumorales (Yoon and Seger, 2006; Chambard et al., 2007). Un sustrato relevante en el citosol es la quinasa p90RSK (*p90 ribosomal S6 kinase*), que a su vez fosforila sustratos nucleares y citosólicos regulando la transcripción, traducción, migración, apoptosis y progresión del ciclo celular (Anjum and Blenis, 2008).

Localización subcelular de ERK1/2

La entrada al núcleo de ERK1/2 en respuesta a su activación por diferentes estímulos fue descrita en diversos modelos celulares (Traverse et al., 1992; Chen et al., 1992). Estos trabajos sugerían que la localización nuclear de ERK1/2 era necesaria en la inducción de determinadas respuestas. Por ejemplo en células PC12, donde el NGF induce su diferenciación a células neuronales, este factor causaba una activación sostenida de ERK1/2 y su entrada al núcleo, mientras que un agente mitogénico como el EGF provocaba una activación puntual de ERK1/2 que no resultaba en su translocación nuclear. El hecho de que la sobreexpresión de una forma activa de MEK1 indujera la diferenciación de las células PC12, mientras que la de un mutante dominante negativo bloqueara la diferenciación inducida por NGF indicaba que la entrada al núcleo de ERK1/2 y la fosforilación de determinados factores de transcripción por esta quinasa era necesaria para inducir su diferenciación celular (Cowley et al., 1994). En cuanto a la localización de MEK1, aunque inicialmente se pensó que residía exclusivamente en el citosol

posteriormente se observó que translocaba al núcleo después de su activación (Jaaro et al., 1997; Tolwinski et al., 1999; Yao et al., 2001). En este contexto, también se sabía que ERK1/2 y MEK1/2 en estado inactivo formaban un complejo en el citosol (Fukuda et al., 1997; Rubinfeld et al., 1999). Esta interacción resulta esencial para mantener ERK1/2 en el citosol y la activación de esta vía de señalización provoca la disociación de este complejo y la posterior translocación al núcleo de las dos proteínas de manera independiente. A diferencia de ERK1/2 la cual puede permanecer en el núcleo durante horas, la mayoría de moléculas de MEK1/2 son rápidamente exportadas al citoplasma. Esta distribución subcelular es debida a una secuencia rica en leucinas presente en la región N-terminal de MEK1/2 que actúa como señal de exporte nuclear dependiente del transportador CRM1 (Fukuda et al., 1996). Además de mediar en la retención citoplasmática de ERK1/2, también se demostró que MEK1/2 están implicadas en su salida del núcleo (Adachi et al., 2000). Así, las formas nucleares inactivas de MEK1/2 generadas por la acción de las fosfatasas se unirían a las moléculas de ERK1/2 inactivas presentes en el núcleo. Posteriormente este complejo sería rápidamente exportado fuera del núcleo gracias a la interacción de la secuencia NES de MEK1/2 con CMR1. Resulta interesante remarcar que MEK1/2 también induce el exporte de otras proteínas nucleares, como sucede en el caso del receptor nuclear PPAR γ , y que por lo tanto esta no es una función exclusiva para ERK1/2.

En cuanto a la entrada de moléculas al núcleo, en el caso de moléculas pequeñas pueden entrar por difusión pasiva, mientras que proteínas de elevado peso molecular y los RNAs utilizan mecanismos específicos de transporte activo. El primer paso en la entrada al núcleo de estas moléculas consiste en su interacción con proteínas transportadoras especializadas. Entre estas proteínas transportadoras las mejor caracterizadas son las importinas α/β . Las importinas interaccionan con una señal de localización nuclear (NLS) presente en las proteínas que van a ser transportadas (proteínas cargo) y las transportan al interior del núcleo (Sorokin et al., 2007). Estas NLS consisten en un clúster de 4 o más residuos básicos, pero en algunos casos la presencia de otro clúster básico adicional conforma una señal de localización nuclear bipartita (Kalderon et al., 1984, Dingwall et al., 1988). Aunque se han identificado otras NLS no canónicas, se desconoce el mecanismo a través del cual actúan. Las NLS se unen a una región específica de la importina- α , que a continuación se fija a importina- β . La interacción de la importina- β con algunas proteínas del poro nuclear permite el transporte de todo el complejo al interior del núcleo (Tran and Went, 2006). A continuación, este complejo se disocia gracias a la acción de la Ran, una proteína que pertenece a la familia de GTPasas de bajo peso molecular y que en el interior del núcleo se encuentra en su forma unida a GTP. Una vez disociadas, las importinas son transportadas al citosol por CMR1, mientras que las proteínas cargo permanecen en el núcleo donde pueden ejercer su función.

Tanto ERK1/2 como MEK1/2 carecen de una NLS canónica, por lo tanto su entrada al núcleo sería independiente de las importinas- α/β . Como se ha mencionado anteriormente, en estado basal ERK1/2 está localizada en el citoplasma gracias a su interacción con MEK1/2 u otras proteínas que la anclan a este compartimento celular. Una vez estimulada ERK1/2 se disocia de estas proteínas y entra al núcleo ya sea a través de difusión pasiva o transporte activo. Inicialmente se sugirió que la entrada de ERK1/2 al núcleo mediada por transporte activo requería la homodimerización de este enzima (Adachi et al., 1999), sin embargo otras evidencias descartan esta posibilidad (Lidke et al., 2010).

Recientemente se han identificado una serie de residuos en ERK1/2 que actúan como NLS no canónica (Chuderland et al., 2008; Zehorai et al., 2010). Esta secuencia contiene dos residuos Ser separados por una Pro (Ser-Pro-Ser; SPS; 244–246 en ERK2) que son fosforilados después de la activación de ERK1/2. La fosforilación de estas Ser es necesaria para la translocación nuclear de ERK1/2, ya que mientras su mutación a Ala impide la translocación al núcleo, su sustitución por residuos ácidos induce una rápida translocación. La presencia de estos residuos fosforilados habilita a ERK1/2 para su interacción con importina-7, un miembro recientemente identificado de la familia de las importinas que estaría implicado en la entrada al núcleo de proteínas que no poseen NLS canónicas (Wagstaff and Jans, 2009). **La Figura 7** muestra el modelo propuesto por estos autores, en células no estimuladas ERK1/2 permanecería retenida en el citosol debido a su interacción con varias proteínas de anclaje (MEK1, fosfatasa, microtúbulos, entre otras). La estimulación por factores de crecimiento induciría la fosforilación del T-loop así como la disociación de ERK1/2 de estas proteínas. Después de esto, ERK1/2 se fosforilaría en el dominio SPS ya sea por autofosforilación o por alguna quinasa no identificada y en este estado interaccionaría con la importina-7. Este complejo entraría al núcleo a través de los poros nucleares y una vez en el interior nuclear la interacción con GTP-Ran produciría la disociación de la importina-7 que sería exportada rápidamente al citosol, mientras que ERK1/2 permanecería en el núcleo donde fosforilaría a sus sustratos nucleares (Plotnikov et al., 2011).

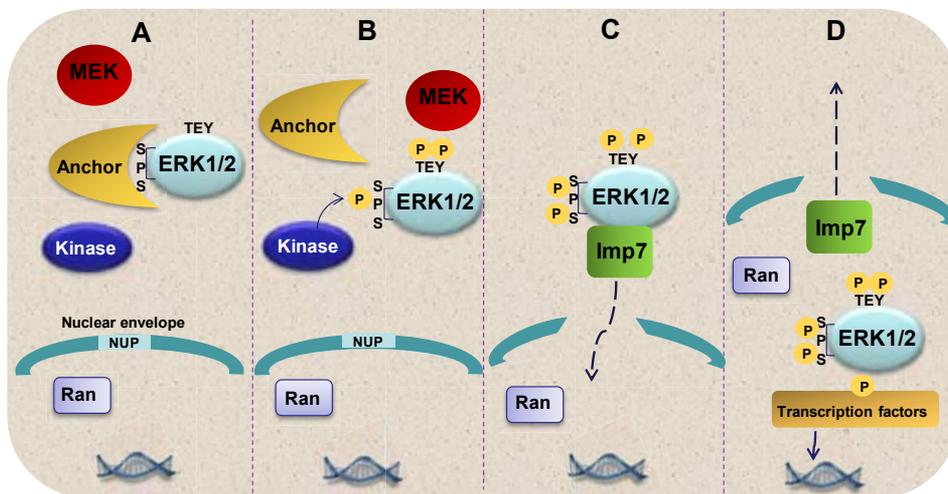


Figura 7. Mecanismo de translocación nuclear de ERK1/2. **A)** En células en reposo, ERK1/2 es retenida en el citoplasma por proteínas de anclaje específicas. **B)** La estimulación celular resulta en la fosforilación del motivo TEY de ERK por su activador MEK1/2, lo que induce la liberación de sus proteínas de anclaje y exposición del motivo SPS. **C)** Una quinasa desconocida fosforila dos serinas del SPS, que se comporta como una señal de translocación nuclear (NTS) que le permite unir a la importina a 7 y translocar a núcleo en complejo con ella. **D)** La GTPasa Ran induce la disociación de la importina 7, que es exportada de nuevo al citosol. La ERK1/2 queda libre para unir sustratos nucleares entre ellos diferentes factores de transcripción. Figura modificada de Plotnikov et al., 2011.

2.2 ERK5

La ERK5 fue identificada simultáneamente por dos grupos de investigación en 1995. Zhou y colaboradores mediante PCR aislaron inicialmente el cDNA de MEK5 (MAPK/Erk kinase 5). En este mismo trabajo a través de un ensayo de doble híbrido usando MEK5 como cebo, se identificó una proteína de aproximadamente 815 aminoácidos con una región N-terminal similar a las ERKs. Esta proteína se unía específicamente a MEK5 pero no a MEK1 ni MEK2, y la denominaron ERK5 (Zhou et al., 1995).

En paralelo, Lee y colaboradores mediante el cribado de una librería de cDNA de placenta humana identificaron una proteína con alta homología con ERK1/2 y con los sitios de activación treonina y tirosina conservados. Esta proteína difiere de los otros miembros de esta familia porque posee un dominio C-terminal más extenso, que le confiere casi el doble del tamaño, por lo que fue denominada “Big MAPK-1” (BMK1). Estas evidencias sugerían que la BMK1 era un nuevo miembro de la familia de las MAPKs, pero que debido a su estructura diferente podía participar en eventos celulares distintos a los de las otras MAPKs (Lee et al., 1995).

Estructura de ERK5

El gen que codifica para ERK5 también conocido como MAPK7 tiene una extensión de 5,82 Kb, se encuentra en el brazo corto del cromosoma 17 (17p11.2) y contiene 6 exones. ERK5 tiene ortólogos en la mayoría de mamíferos. De hecho los marcos abiertos de lectura de la ERK5 de roedores (ratón y rata) y humano comparten un 92% de homología. En las tres especies, el dominio quinasa localizado en el extremo N-terminal contiene el motivo dual de fosforilación TEY (Thr-218 y Tyr-220) conservado **Figura 8** (Kamakura et al., 1999). También ha sido reportado que la proteína SMA-5 de *C. elegans* comparte un 60% de identidad con la ERK5 humana (Watanabe et al., 2005).

El gen humano de ERK5 produce un mRNA de 2445 pares de bases, que codifica una proteína de 816 aminoácidos, que corresponden a un peso molecular de 98 KDa.

En ratones existen tres isoformas de ERK5 originadas a partir del *splicing* alternativo de los intrones 1 y/o 2: *mERK5a*, *mERK5b* y *mERK5c*. Las isoformas *b* y *c*, están truncadas en la región N-terminal (carecen de los primeros 69 y 139 aminoácidos respectivamente) y son catalíticamente inactivas, por lo que se considera que actuarían como dominantes negativos. La forma *ERK5a* es la más abundante (Yan et al., 2001).

Introducción – Capítulo 2

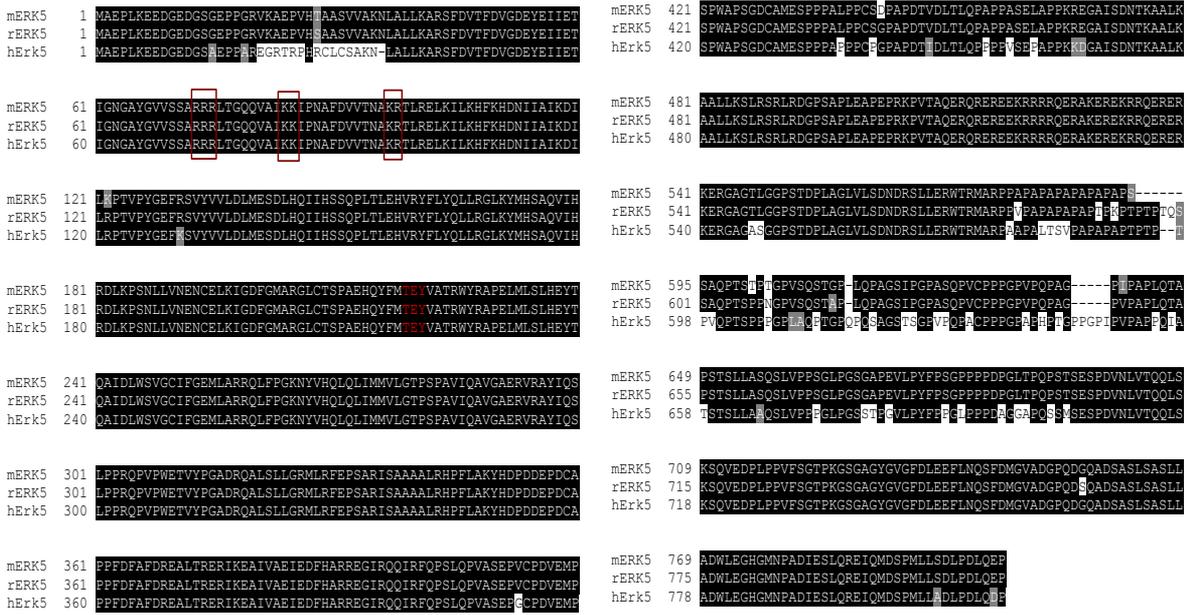


Figura 8. Alineamiento múltiple de las secuencias de la proteína completa de ERK5 humana, de ratón y de rata. La sombra negra indica los residuos idénticos. En rojo se resalta el dominio conservado de activación TEY.

Dominios funcionales de ERK5

El dominio catalítico de ERK5 está conservado, se encuentra en el extremo N-terminal, contiene el motivo TEY de fosforilación en el bucle de activación, y comparte una homología del 50% con ERK1/2. Este extremo interviene en la localización citoplasmática (aa 1–77), en la asociación con su activador MEK5 (aa. 78- 139) y en la oligomerización (aa. 140-406) (Figura 9) (Wang and Tournier, 2006).

El dominio C-terminal consta de 400 aminoácidos y es único de está MAPK. Hasta el momento no ha sido posible encontrar homología de esta región de ERK5 con ninguna otra proteína.

El dominio C-terminal es esencial para la actividad *in vivo* de ERK5. Contiene una señal de localización nuclear denominada NLS (Nuclear localization signal) (aa. 505-539), una señal de exportación nuclear denominada NES (Nuclear exportation signal) (aa. 771-816) y dos dominios ricos en prolina (aa. 434-465 y 578-701) que podrían actuar como sitios de unión para proteínas que contienen dominios SH3 (Src-homology 3) (Zhou et al. 1995; Yan et al. 2001). La región C-terminal también contiene el dominio de interacción con MEF2 (Myocyte enhancer factor-2) (aa. 440-501) y un dominio de activación transcripcional (aa. 664-789) que regula la actividad del factor de transcripción MEF2 (Figura 9) (Kasler et al., 2000).

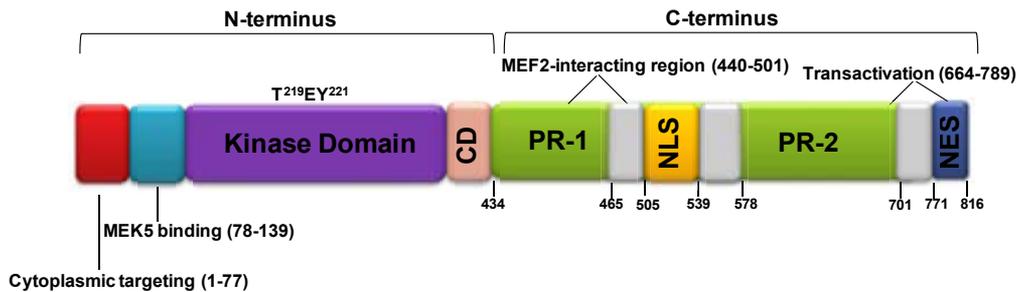


Figura 9. Representación esquemática de los dominios funcionales de ERK5. En el dominio N-terminal ERK5 contiene la región de asociación con su quinasas *upstream* y la secuencia TEY, que consiste en los dos residuos fosforilados por su activador. En la cola C-terminal contiene dos dominios ricos en prolinas (PR-1 y PR-2 precedidos de las señales de localización y exporte nuclear, NLS y NES respectivamente. También en el extremo C-terminal se encuentra el dominio de activación transcripcional de factores como los miembros de la familia MEF-2 (Wang and Tourmier, 2006).

La fosforilación del T-loop de ERK5 mediada por MEK5 induce la autofosforilación de su dominio C-terminal (Morimoto et al., 2007). A partir de estudios *in vitro* se han descrito múltiples sitios de autofosforilación: un primer sitio es Thr723 y una región que contiene tres serinas (Ser760, Ser764 y Ser766) (Morimoto et al., 2007). En otro estudio se estableció que ERK5 es fosforilada por MEK5 en la Thr28, Ser421, Ser433, Ser496, Ser731 y Thr733 (Mody et al., 2003). La autofosforilación de ERK5 en el C-terminal es necesaria para su actividad potenciadora de la transcripción de factores como MEF2, PPAR γ 1 y los miembros de la familia AP1 (c-Fos y Fra-1) (Akaike et al., 2004; Kasler et al., 2000; Terasawa et al., 2003).

Recientemente, dos grupos de investigación en forma independiente describieron que ERK5 es fosforilada en su dominio C-terminal durante la mitosis a través de un mecanismo independiente de MEK5. En ambos trabajos se describieron residuos diferentes de la cola C-terminal cuya fosforilación resulta clave para la localización nuclear de ERK5 y la transactivación de factores como Nur77. En el primer trabajo se identificaron los residuos Thr⁷³², Ser⁷⁰⁶, Ser⁷⁵³ y Ser⁷⁷³, en la otra publicación se estableció que los residuos eran Ser⁵⁶⁷, Ser⁷²⁰, Ser⁷³¹, Thr⁷³³ y Ser⁸⁰³. En contraposición a lo descrito, las fosforilaciones de estos sitios no ocurrían como consecuencia de la autofosforilación sino que fueron atribuidas a quinasas del ciclo celular, como la CDK1 (Diaz-Rodriguez and Pandiella, 2010; Inesta-Vaquera et al., 2010).

La cola C-terminal también tiene una función auto inhibitoria. Diferentes deleciones de esta región aumentan la actividad de ERK5 (Buschbeck and Ullrich, 2005). Por ello, se ha propuesto un modelo en el que la cola C-terminal enmascara el putativo CD *domain*, impidiendo la interacción de ERK5 con sus sustratos.

Localización subcelular de ERK5

La localización subcelular de ERK5 ha sido objeto de estudio de múltiples investigaciones y sin embargo continúa sin esclarecerse completamente. Inicialmente, se asumió que ERK5 tenía una distribución celular similar a la de ERK1/2 (Apartado I.1.2.2). Se demostró que en células Hela una forma de ERK5 fusionada a GFP localizaba en el citosol y la co-expresión con una forma constitutivamente activa de su activador MEK5 inducía su fosforilación y translocación al núcleo (**Figura 10.A**) (Kato et al., 1997; Yan et al., 2001). Esto fue corroborado por el hecho de que en las líneas tumorales de mama, BT474 y SKBR3, que sobreexpresan ErbB2, ERK5 se encuentra hiperfosforilada y localizada constitutivamente en el núcleo incrementando la tasa de proliferación en estas líneas celulares (Esparis-Ogando et al., 2002).

Contrariamente al mecanismo anteriormente expuesto, Raviv y colaboradores caracterizaron la localización subcelular de los componentes de la cascada de señalización ERK5-MEK en células HeLa y Rat-1. Estos autores detectaron la presencia en el núcleo tanto de ERK5 como de MEK5 independientemente de su estado de activación. Por otra parte, el primer activador *upstream* de la vía, MEKK2, se encontraba en el citosol de las células en reposo y bajo estimulación con EGF se acumulaba en núcleo. Estos autores proponían que tanto ERK5 como MEK5 se encuentran en el núcleo unidas a proteínas de anclaje nuclear y que MEKK2 sería la quinasa que bajo estímulos mitogénicos entraría al núcleo para transmitir las señales extracelulares. (**Figura 10.B**) (Raviv et al., 2004).

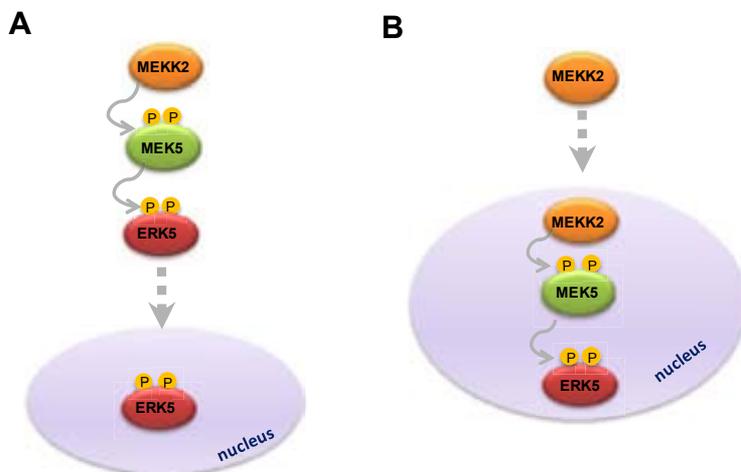


Figura 10. Dos mecanismos propuestos de transmisión de señales de citosol a núcleo en la vía de señalización de ERK5. Bajo estimulación ERK5 (**A**) y MEKK2 (**B**) translocan a núcleo para fosforilar a sus dianas *downstream* (Nishimoto and Nishida, 2006).

Posteriormente, en dos estudios sobre un extenso panel de líneas celulares se corroboró que la localización subcelular de ERK5 varía dependiendo del tipo celular. En la primera publicación se estableció que el dominio C-terminal de ERK5 es el responsable de la distribución nuclear de la proteína, porque contiene una señal de localización nuclear (NLS) entre los a.a 505-539 y una señal de exporte nuclear (NES) (Buschbeck and Ullrich, 2005). En el segundo trabajo se demostró que la fosforilación en el

TEY no es un paso crítico para la entrada o permanencia de ERK5 en el núcleo, en cambio la delección de los aa. 504-540 es suficiente para inducir la distribución citoplasmática de ERK5, lo que corrobora que esta región posee la NLS. Los autores propusieron que el rol biológico que podía estar llevando a cabo esta MAPK en el núcleo estaría relacionado con regulación de la muerte celular por apoptosis inducida por los receptores TRAIL (Borges et al., 2007).

En 2006, el grupo del Dr. Nishida propuso el modelo hasta ahora aceptado para explicar el mecanismo de tránsito entre citoplasma y núcleo de ERK5. En condiciones de reposo, ERK5 se localiza en el citosol debido a que se encuentra en una conformación plegada generada por la interacción entre sus dominios N y C-terminal. Dicha interacción puede producir una señal de exporte nuclear (*CRM1-dependent nuclear export signal*) o bien un dominio de unión para proteínas de anclaje citoplasmático. Una vez activada, ERK5 se autofosforila en múltiples residuos, como se expuso en el apartado anterior, lo que promueve la disociación intramolecular de sus dominios y con ello la pérdida de la actividad NES. Esta activación también provoca la exposición de un motivo bipartito de localización nuclear que consiste en dos grupos de residuos básicos en tándem (aa. 520-524) y (aa. 533-535), lo que induce la translocación nuclear de ERK5 (**Figura 11**) (Kondoh et al., 2006).

La presencia de sustratos de ERK5 tanto en citosol como en núcleo y la variabilidad de su distribución subcelular en estado basal en diferentes líneas celulares, deja entrever que existen múltiples aspectos sin dilucidar de esta MAPK, pudiendo participar en funciones variadas dependiendo del contexto celular e interacciones que establezca.

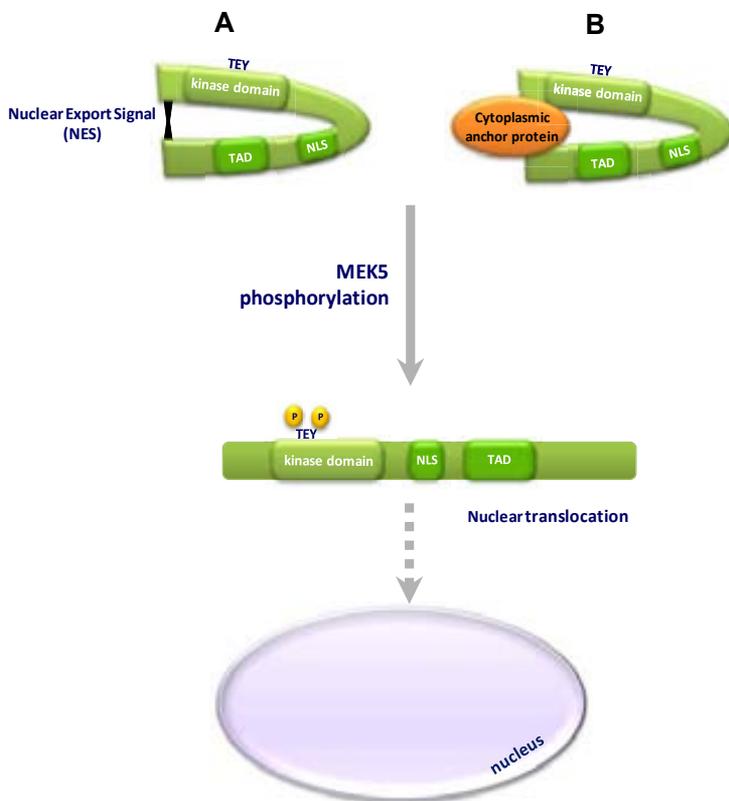


Figura 11. Modelo hipotético de translocación nuclear de ERK5. En condiciones de reposo los dominios N-terminal y C-terminal de ERK5 interactúan generando una señal de exporte nuclear – NES (A) o bien produciendo una región de unión a una proteína de anclaje citoplasmático sin identificar (B). Bajo estimulación ERK5 es fosforilado por MEK5 en el microdominio TEY lo que disocia sus dominios funcionales, quedando inhibida la señal NES. ERK5 adquiere una conformación abierta con la señal de localización nuclear (NLS) expuesta y transloca a núcleo (Figura tomada de Kondoh et al., 2006).

Papel de la quinasa *upstream* MEK5

Inicialmente se estableció que ERK5 se activaba frente a choque hiperosmótico y estrés oxidativo (Abe et al., 1996). Posteriormente, se determinó que la actividad de ERK5 también aumenta en presencia de suero (Kato et al. 1997) y de los factores de crecimiento EGF, FGF-2, BDNF y VEGF (Kato et al., 1998; Kato et al., 2000; Hayashi and Lee, 2004; Wang et al., 2006). Asimismo, las citoquinas LIF y IL-6 estimulan la actividad ERK5 (Carvajal-Vergara et al., 2005).

En 1995 dos grupos independientes identificaron MEK5 (English et al., 1995; Zhou et al., 1995). MEK5 es la única MAPKK que fosforila el motivo TEY de ERK5. Mediante estudios *in vitro* se ha determinado que MEK5 inicialmente fosforila a ERK5 en la Thr218, lo que induce un cambio conformacional que permite la posterior fosforilación de Tyr220, necesaria para la completa activación catalítica de ERK5 (Mody et al., 2003). Tal y como se explicó en el apartado anterior, esta fosforilación permite la autofosforilación de varios residuos de la cola C-terminal de ERK5, necesarios para el incremento de la activación transcripcional.

El cDNA de la MEK5 humana codifica para una proteína de 444 aminoácidos que comparte el 93% de homología con la MEK5 de rata y ratón (Kamakura et al., 1999). Presenta dos isoformas derivadas de un procesamiento alternativo de un único mRNA, la isoforma α de 50 kDa y la isoforma β de 40 kDa (**Figura 12**). Ambas poseen los sitios de fosforilación críticos para su activación (MEK5 α se fosforila en Ser³¹¹-Thr³¹⁵ y MEK5 β en Ser²²²-Thr²²⁶). La MEK5 α posee un dominio N-terminal más extenso, y tiene una distribución tisular restringida principalmente a tejidos altamente diferenciados como el cerebro, mientras que la MEK5 β se expresa en casi todos los tejidos, en especial en los mitóticamente activos como el hígado. Los 89 aminoácidos que componen el dominio N-terminal de MEK5 α , así como una región denominada OPR (*octicosapeptide repeat*) ubicada entre los aminoácidos 57 al 83 exclusiva para esta isoforma son determinantes para la activación de ERK5. La ausencia de estos dos componentes en MEK5 β hace que se comporte como dominante negativo, generando una acción inhibitoria sobre la asociación de ERK5 y MEK5 α (Cameron et al., 2004).

MEKK2 y MEKK3 son las MAPKKKs que activan MEK5. La isoforma MEK5 α contiene un dominio PB1 (Phox-Bem1p) que es el sitio de acoplamiento de sus activadores (Nakamura and Johnson, 2003). (Nakamura and Johnson, 2003). No obstante, los dominios quinasa de MEKK2 y MEKK3 son muy similares, la MEKK2 presenta mayor afinidad de asociación con MEK5. ERK5 compite con MEKK2 por el sitio de unión a MEK5. En estado de reposo MEKK2 y MEK5 forman complejo y bajo estimulación MEKK2 es liberado y ERK5 puede asociarse con su activador MEK5 (Seyfried et al., 2005; Wang and Tournier, 2006).

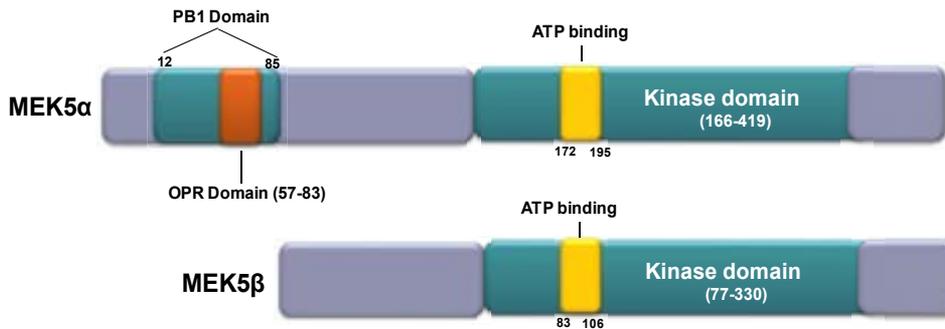


Figura 12. Representación esquemática de los dominios funcionales de MEK5α y MEK5β

La caracterización fenotípica de los ratones deficientes en ERK5 y MEK5 demuestra que la supresión de ambas proteínas de manera independiente genera defectos similares en el desarrollo cardiovascular y en la angiogénesis, lo que deriva en la muerte de los embriones entre los días 9.5 – 10.5 de gestación (Caja 2).

Caja 3. Ratones knock-out de la vía de ERK5-MEK5

Con el fin de dilucidar el rol fisiológico de cada uno de los componentes de la cascada de ERK5 han sido desarrollados ratones deficientes en estas proteínas.

Tres grupos de investigación obtuvieron los ratones ERK5^{-/-} con efectos fenotípicos similares (Regan et al., 2002; Sohn et al., 2002; Yan et al., 2003). Los embriones de ratón deficientes en ERK5 mueren aproximadamente a día 10,5 de gestación (E10.5). Para establecer la causa específica de la muerte embrionaria se produjeron ratones *knock-out* de ERK5 condicionales de algunos tejidos. La falta de expresión de ERK5 en las células endoteliales también provoca la muerte gestacional, mientras que la ausencia de ERK5 en otros tejidos, como el cardíaco no afecta el desarrollo (Hayashi and Lee, 2004). Estos resultados permitieron concluir que ERK5 es crítica en las funciones de las células endoteliales, su ausencia genera alteraciones en la vasculogénesis y la angiogénesis.

Los ratones MEK5^{-/-} presentan fallos a nivel endotelial por alteraciones durante la angiogénesis y en el desarrollo del cerebro. En estos ratones la tasa de proliferación de las células cardíacas disminuye y aumenta la apoptosis lo que afecta el desarrollo del corazón (Wang et al., 2005).

Por su parte, los ratones deficientes en la expresión de MEKK2 y MEKK3 exhiben diferencias fenotípicas muy marcadas. Los ratones MEKK3^{-/-} mueren durante el desarrollo embrionario (E11.0) por alteraciones en la angiogénesis como en los otros miembros de la vía (Yang et al., 2000). En cambio la pérdida de expresión de MEKK2 no afecta la viabilidad ni la fertilidad (Guo et al., 2002).

Inhibidores de la vía ERK5-MEK5

Los primeros compuestos identificados como inhibidores de la vía MEK5/ERK5 fueron los previamente caracterizados como inhibidores de MEK1/2, PD098059 y U0126 (Alessi et al., 1995; Favata et al., 1998). En otro estudio se demostró que ambos compuestos inhibían la activación de ERK5 inducida por EGF a concentraciones similares a las necesarias para inhibir ERK1/2 (Kamakura et al., 1999).

Posteriormente se desarrollaron otros compuestos como el PD184352 o el PD0325901, que a pesar de que inhiben ambas vías presentan una mayor selectividad por MEK1/2 (Mody et al., 2001; Bain et al., 2007). El uso de estos inhibidores a concentraciones adecuadas permite la identificación de sustratos fisiológicos de ERK5. Por ejemplo, en el caso de PD184352, la fosforilación de aquellas proteínas que en ensayos celulares no es afectada por concentraciones de 1-2 μM pero es bloqueada por concentraciones de 10-20 μM se atribuiría a ERK5. Este tipo de compuestos actúan como inhibidores no competitivos de MEK1/2 (Favata et al., 1998). Mediante mutagénesis dirigida y difracción de rayos X se ha identificado la región de la proteína a la que se une el compuesto PD184352 así como los diferentes residuos con los que establece interacciones (Delaney et al., 2002; Ohren et al., 2004). Esta región consiste en un profundo bolsillo hidrofóbico adyacente al centro de unión del ATP y separado de él por los residuos conservados K97 y M143. El resultado de la unión del inhibidor a este bolsillo hidrofóbico es la estabilización de una conformación inactiva del *loop* de activación y de la hélice C así como una deformación del centro activo. Estos datos estructurales explican la gran especificidad de estos inhibidores con respecto a aquellos que se unen al centro activo de las quinasas. El centro de unión de estos inhibidores está situado en una región que presenta muy baja homología con la misma región de otras quinasas y que es muy diferente a la del centro activo. El hecho que MEK5 presente un 85% de identidad con MEK1/2 en esta región explica porque estos compuestos también inhiben a este enzima.

En 2008, se identificaron los primeros inhibidores específicos de la vía de MEK5-ERK5, BIX02188 y BIX02189. Estos compuestos inhiben la actividad catalítica de MEK5 de forma dosis dependiente con una IC_{50} de 4,3 y 1,5 nM respectivamente. Ambos compuestos también inhiben la actividad catalítica de ERK5 con una IC_{50} de 810nM y 59 nM respectivamente, mientras que no inhiben a otras quinasas estrechamente relacionadas como MEK1/2, ERK2 y JNK2. En ensayos utilizando células Hela estimuladas con sorbitol estos inhibidores también resultan altamente específicos, bloqueando la activación de ERK5 sin afectar a la fosforilación de ERK1/2, p38 y JNK (Tatake et al., 2008).

Recientemente, Yang y colaboradores sintetizaron una nueva molécula denominada XMD8-92 que inhibe específicamente la actividad catalítica de ERK5. Este inhibidor mostró ser 10 veces más selectivo por ERK5 que por ninguna de las otras 402 quinasas detectadas en células HeLa. El XMD8-92 logró inhibir la activación de ERK5 inducida por EGF con una IC_{50} de 240 nmol/L, sin afectar la activación de ERK1/2 incluso a concentraciones altas (5 μM). Asimismo, esta molécula disminuyó sustancialmente la activación transcripcional de MEF-2C inducida por ERK5. El tratamiento con XMD8-92 en ratones tanto inmunodeficientes como inmunocompetentes bloqueó el crecimiento de tumores cervicales y de pulmón, con un 95% de eficacia. Dada la alta tolerabilidad de este fármaco en ratones, ya se encuentra en las primeras fases pre-clínicas (Yang et al., 2010).

Sustratos de ERK5

El número de sustratos de ERK5 identificados y validados es mucho menor en comparación con las otras MAPKs. En todos los sustratos reconocidos se ha podido comprobar la especificidad de ERK5 en la fosforilación de los motivos Ser/Thr que son los típicos residuos fosforilados por MAPKs.

La mayor parte de los efectores *downstream* de ERK5 son factores de transcripción, los mejor caracterizados son los tres miembros de la familia MEF2 (*myocyte enhancer factor-2*), MEF2A, C y D (Kato et al., 2000). Como se mencionó en el apartado 1.2.1, la cola C-terminal de ERK5 contiene un sitio de unión a MEF2 y un dominio de activación transcripcional esencial para la coactivación de MEF2. Las isoformas MEF2A y C pueden ser reguladas tanto por ERK5 como por p38.

Cabe destacar la fosforilación de la Ser³⁸⁷ de la MEF2C mediada exclusivamente por ERK5 en respuesta a la estimulación con EGF o suero, es fundamental para el incremento de la transcripción del factor c-jun (Kato et al., 1997). MEF2D es un sustrato exclusivo de la vía de ERK5 (Kasler et al., 2000).

Otro de los sustratos de ERK5 es el factor de transcripción Sap1 (*Sodium channel associated protein 1*), la fosforilación de este factor mediada por ERK5 activa la transcripción celular a través de SER (*Serum response element*) que es responsable del aumento de la expresión del promotor de c-Fos (Kamakura et al., 1999; Terasawa et al., 2003). Además de estimular su expresión, ERK5 aumenta la capacidad transcripcional de c-Fos y Fra-1, probablemente a través de la quinasa p90RSK (*Ribosomal Protein S6 Kinase*) (Terasawa et al., 2003). Ha sido descrito que ERK5 se une y activa a p90RSK. En esta asociación interviene el dominio CD de ERK5 y el dominio D (*docking*) de p90RSK (Ranganathan et al., 2006).

Por otro lado, ERK5 fosforila a c-Myc en la Ser⁶² que es esencial en la estabilidad de la proteína, esta activación ayuda a prevenir la ubiquitinación y degradación proteosomal de c-Myc (English et al., 1995; Sears, 2004).

Otra diana *downstream* es la proteína de uniones gap conexina 43 (Cx43) fosforilada por ERK5 en la Ser²⁵⁵. Cx43 participa en la conducción de la corriente intercelular en los miocitos ventriculares y el intercambio de nutrientes entre células. Lo que explica el rol fisiológico relevante que cumple ERK5 a nivel cardíaco (Cameron et al., 2003).

ERK5 también regula la apoptosis mediante la activación de varias proteínas durante el proceso de morfogénesis de las células endoteliales microvasculares. La angiogénesis inducida por el factor VEGF en estas células activa a ERK5, que a su vez fosforila a Akt en los sitios canónicos (Thr³⁰⁸ y Ser⁴⁷³) y a la proteína Bad (Ser¹³⁶), que promueve la inhibición de la actividad de las caspasas 3/7, lo que en conjunto produce señales antiapoptóticas (Roberts et al., 2010). Asimismo, se ha reportado que la expresión de un siRNA de ERK5 disminuye sustancialmente la fosforilación de Akt en respuesta a la estimulación con el factor de crecimiento derivado de plaquetas PDGF (Lennartsson et al., 2010; Roberts et al., 2010). La

MKP3 (*MAP kinase phosphatase-3*) parece actuar como modulador negativo de esta activación, la reducción de la expresión de esta fosfatasa habilita a Akt para ser fosforilada por ERK5 tras el tratamiento con PDGF (Razmara et al., 2012).

También ha sido observado que ERK5 fosforila *in vitro* a la proteína pro-apoptótica Bim. Durante la mitosis Bim se encuentra en la mitocondria, en su estado desfosforilado se asocia con Bax e induce la activación de la ruta de caspasas. Por tanto, ERK5 podría ser un factor de supervivencia durante este proceso (Girio et al., 2007).

ERK5 fosforila a la proteína de la leucemia mielocítica (PML) en la Ser⁴⁰³ y Thr⁴⁰⁹. Esta activación además de bloquear la función como supresor de tumores de PML suprime la expresión de la proteína p21, que es sustrato de PML y actúa como regulador del ciclo celular. En consecuencia, la inhibición de ERK5 con el compuesto XMD8-92 demostró tener una acción claramente anti-proliferativa porque potencia la expresión de p21 a través de PML (Yang et al., 2010).

Es importante destacar que la mayor parte de sustratos de ERK5 mencionados anteriormente fueron descritos mediante ensayos de fosforilación *in vitro* con proteínas recombinantes. De manera que es necesario realizar análisis con las proteínas endógenas para caracterizar los verdaderos sustratos *in vivo* de ERK5. La Figura 13 esquematiza la cascada de señalización de ERK5 con los diferentes componentes efectores de la vía.

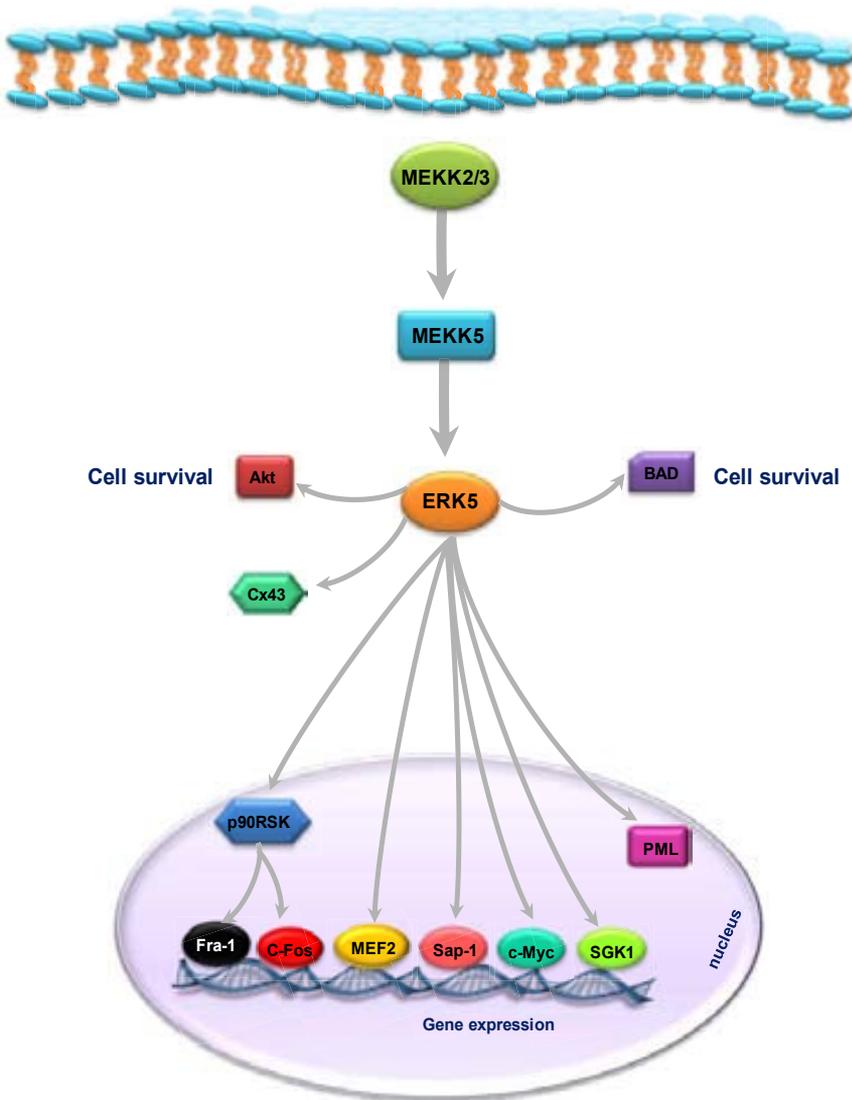


Figura 13. Representación esquemática de la vía de señalización de ERK5 con sus principales sustratos. La fosforilación de ERK5 promueve la activación de varios sustratos. Previo a su translocación a núcleo puede regular la activación de varias proteínas vinculadas a supervivencia celular como Akt y Bad. Una vez en el núcleo ERK5 induce la activación de numerosos factores de transcripción entre ellos MEF2, c-Fos y c-Myc.

Papel de ERK5 en cáncer

ERK5 en proliferación celular

La desregulación de la vía de señalización de ERK5 ha sido asociada a la aparición de varios marcadores del desarrollo de carcinomas, como el incremento en la proliferación y en las capacidades invasivas y metastásicas.

La primera evidencia de que la vía de señalización de ERK5 podía estar vinculada a la regulación de la proliferación celular se obtuvo al establecer que la activación de ERK5 por EGF inducía la transcripción génica de c-jun, un gen requerido en proliferación celular, a través de la activación transcripcional de MEF2C. Asimismo, la expresión del mutante inactivo de ERK5 AEF (con el motivo de activación T-loop mutado) bloqueaba el progreso a fase S de las células HeLa bajo estimulación (Kato et al., 1998).

Posteriores estudios en otras líneas celulares, como BT474 (carcinoma de mama) y MM1S (mieloma múltiple) han corroborado que ERK5 cumple un rol crucial en proliferación (Esparis-Ogando., 2002; Carvajal-Vergara et al., 2005).

Recientemente, se estableció que los micro ARN, miR-143 y miR-145, regulan negativamente la expresión de ERK5. Los miRNA son secuencias cortas de mRNA que se unen a la región 3'-UTR (*untranslated region*) de los ARNm diana e inhiben su traducción. La reintroducción de miR-143 y miR-145 exógenos disminuye los niveles de expresión de ERK5 y la proliferación de líneas tumorales de próstata, LnCap y C4-2, y de las células de carcinoma de vejiga, T24. A través de la expresión de un ARN de interferencia de ERK5 se obtuvo resultados similares lo cual validó a ERK5 como la proteína responsable de este efecto en la proliferación (Clape et al., 2009; Noguchi et al., 2011).

El mecanismo por el cual ERK5 regula la progresión del ciclo celular continúa sin esclarecerse. De hecho, la fase del ciclo celular en la que interviene ERK5 aún resulta controversial. Algunos autores proponen que esta quinasa actúa en la transición G1/S y otras evidencias en cambio muestran que ERK5 se encuentra activada en el paso G2/M.

La vinculación al paso entre G1 y S fue dada inicialmente debido a que ERK5 fosforila a la proteína quinasa inducible por suero y glucocorticoides SGK1, mediante la fosforilación en la Ser⁷⁸ en respuesta a factores de crecimiento, lo que promueve la entrada en fase S del ciclo celular (Hayashi et al., 2001).

Asimismo, fue encontrado que ERK5 puede regular la expresión del gen de la ciclina D1, una proteína clave durante la transición G1/S y cuya desregulación está frecuentemente asociada a la transformación neoplásica. ERK5 regula la activación transcripcional de la ciclina D1 y la expresión del mutante quinasa muerto de ERK5 bloquea la síntesis de esta proteína endógena inducida por suero en varias líneas tumorales de mama (Mulloy et al., 2003).

Otra evidencia de que ERK5 participa en las primeras fases del ciclo celular ha sido publicada recientemente. ERK5 suprime la expresión de la proteína p21, que regula la progresión a fase G1 a través de la inhibición de la CDK2. Cuando ERK5 se encuentra activa promueve la activación transcripcional de c-Myc, que a su vez induce la transcripción de los microARN miR-17-5p y miR-20a que regulan negativamente el ARNm de p21. La inhibición de ERK5 altera el paso de células de carcinoma de mama de fase G1 a S (Perez-Madrigal et al., 2012).

De manera contraria a lo descrito, Cude y colaboradores encontraron que el máximo pico de activación de ERK5 se da durante la transición de fase G2 a mitosis. La fosforilación de ERK5 durante este período induce la activación de sustratos *downstream*, como la quinasa RSK2, que a su vez fosforila a IκB (inhibidor de kappa B) provocando su degradación. Lo cual libera al factor nuclear NFκB, que transloca a núcleo induciendo la expresión de genes como las ciclinas B1-B2, Plk-1 y Cdc25B (Cude et al., 2007).

En concordancia con lo anterior, Zen y colaboradores identificaron una amplificación del gen que codifica para ERK5 que le confiere a las células de carcinoma hepatocelular (HCC) mayor capacidad proliferativa porque induce la entrada en mitosis. En el 53% de los tumores primarios de HCC analizados se encontró un mayor número de copias del gen de ERK5 en el cromosoma 17p11. En líneas celulares de HCC que poseen este amplicón, ERK5 se encuentra fosforilado durante la transición de G2/M (Zen et al., 2009).

Frecuentemente, las alteraciones en la cascada de ERK5 pueden ser originadas por la activación que inducen diferentes oncogenes. Ha sido demostrado que el oncogén Ras es capaz de activar a ERK5 en las líneas celulares PC12, C2C12 y COS7 (English et al., 1998; Kamakura et al., 1999; English et al., 1999). El oncogén Cot estimula la actividad de c-jun a través de las MAPKs JNK, p38 y ERK5 lo que induce la transformación neoplásica de las células NIH3T3 (Chiariello et al., 2000). También la forma oncogénica de Src activa a ERK5 en fibroblastos, lo que produce la formación de podosomas o invadopodios, que consiste en prolongaciones de la membrana plasmática ricas en actina que confieren capacidad invasiva (Schramp et al., 2008).

La formación de metástasis requiere de un complejo proceso multifásico que incluye cambios en la forma de las células tumorales, alteraciones en la adhesión celular e incremento en la motilidad. Se ha reportado que ERK5 puede estar involucrado en varios de estos eventos en diferentes tipos tumorales. En algunas líneas celulares de osteosarcoma ERK5 se encuentra sobreexpresada e induce la expresión de la metaloproteasa de matriz extracelular, MMP-9, esta endopeptidasa degrada la matriz extracelular (ECM), que es un paso clave para la diseminación del tumor a otras estructuras (Kim et al., 2012). También ha sido demostrado *in vivo* el rol de ERK5 en la formación de metástasis. Por IHC se observó que ERK5 está sobreexpresado en las metástasis de los nódulos linfáticos originadas a partir de carcinomas orales de células escamosas (OSCC). En este tipo tumoral ERK5 contribuye con Scr en la desorganización del citoesqueleto, que permite reducir la adhesión celular a las células vecinas y a la ECM y con ello facilita la propagación de las células tumorales (Sticht et al., 2008).

En otro trabajo se sugirió que ERK5 podría promover la metástasis a través de un mecanismo que incluye la activación de la quinasa de adhesión focal FAK, que es una tirosina quinasa sobreexpresada en diferentes tipos de tumores. En líneas de cáncer de mama y de próstata se encontró que ERK5 forma un complejo con la integrina, $\alpha\beta3$ y FAK. La fosforilación de FAK mediada por las integrinas también induce la fosforilación de ERK5. En estos modelos celulares la activación de FAK y de ERK5 son cruciales para incrementar la motilidad celular (Sawhney et al., 2009).

La angiogénesis es fundamental en el proceso de metastatización, ya que además de permitir el transporte de las células tumorales a otros tejidos, es esencial para el soporte nutricional del tumor. Hayashi y colaboradores en un estudio con ratones xenografts establecieron que ERK5 también regula la angiogénesis durante el desarrollo tumoral. La delección del gen que codifica para ERK5 inhibe significativamente la neovascularización y el crecimiento de tumores inducida por los factores pro-angiogénicos VEGF o bFGF, mediante un mecanismo que requiere la activación de la proteína p90RSK (Hayashi et al., 2005).

ERK5 en cáncer de mama

La cascada de señalización de ERK5/MEK5 tiene especial relevancia en el desarrollo y progresión del carcinoma de mama.

Mutaciones que provocan la amplificación génica y sobreexpresión de la proteína HER2 (ErbB2) ocurren entre un 20-30% de los casos de cáncer de mama. Previamente, se había postulado a ERK5 como un efector de la cascada de ErbB. Ya que la activación de estos receptores por neuregulina, uno de los ligandos conocidos de la familia del EGF, provoca la activación de ERK5. Además, varias líneas celulares derivadas de carcinomas mamarios que sobreexpresan HER2 presentan ERK5 constitutivamente activo (Esparis-Ogando et al., 2002).

Un extenso estudio de pacientes que presentaban tumores de mama HER2 positivos reveló que la mayor parte sobreexpresan también ERK5. La terapia clásica usada en este tipo de tumores consiste en la administración del anticuerpo anti-HER2, trastuzumab, que mostró un efecto pobre sobre el control de la activación de ERK5. No obstante, el tratamiento con trastuzumab junto a un dominante negativo de ERK5, disminuía de manera significativa la proliferación de la línea tumoral de mama BT474. Los autores proponen a ERK5 como un potencial biomarcador del pronóstico de esta enfermedad, debido a que los niveles de expresión de esta quinasa mostraron estar inversamente correlacionados con el tiempo de supervivencia de los pacientes (Montero et al., 2009).

Una de las mayores dificultades en el tratamiento del cáncer es la resistencia a la quimioterapia. En un análisis *in vitro* de líneas celulares de cáncer de mama, MCF-7 sensibles a apoptosis (APO+) y resistentes a apoptosis (APO-) se encontró que el mRNA que codifica para MEK5 se encuentra incrementado casi 22 veces en las células APO negativas. La expresión de una forma dominante negativa de ERK5 revirtió el fenotipo de resistencia a apoptosis e incrementó la muerte celular. Lo

anterior demostró que ERK5 podría estar generando señales antiapoptóticas y por tanto un tratamiento inhibitorio de esta vía sería interesante para promover la sensibilización a la muerte de las células tumorales de mama (Weldon et al., 2002).

MEK5 es regulado por el oncogén STAT3, asociado a carcinogénesis en varios tejidos por tener efectos tanto proliferativos como antiapoptóticos. Un análisis por microarreglos de tejido mamario tumoral que sobreexpresaban STAT3 demostró un incremento de 22 veces en el ARNm de MEK5. El *knock down* de STAT3 en células reduce los niveles de expresión de MEK5 (Song et al., 2004). En otro estudio de tumores de mama invasivos, se demostró que cerca del 35% de los casos presentaba fosforilación de STAT3, mayor número de metástasis en los nódulos linfáticos regionales y aumento de la expresión del receptor de progesterona. Estos niveles de fosforilación se asociaron al aumento de expresión de diversas proteínas entre las que se encontraba MEK5 (Hsieh et al., 2005).

ERK5 en cáncer de próstata

En 2008 McCracken y colaboradores demostraron por primera vez que ERK5 contribuye a carcinogénesis en próstata *in vivo*. Por una parte, encontraron que el incremento en la expresión citoplasmática de ERK5 en tumores se correspondía con aumento en el desarrollo de metástasis en hueso. Un subgrupo de 15 pacientes (de 81 casos en total) presentó mayor localización nuclear de ERK5 que fue asociada a la transformación del tumor, de hormono-sensible a hormono-resistente. En general, en esta investigación se estableció que los altos niveles de expresión de ERK5 en próstata confiere a las células mayor potencial proliferativo, que además corresponden con incremento en el grado del tumor (gleason) (McCracken et al., 2008).

En otro estudio se estableció que las células de adenocarcinoma de próstata que sobreexpresan establemente ERK5 (PC3-ERK5) tienen mayor tasa de proliferación y motilidad comparadas con la línea celular PC-3 parental. El tratamiento con el inhibidor PD18435 a dosis inhibitorias de ERK5, suprime de forma significativa la formación de invadopodios. La inmunohistoquímica de tumores primarios de próstata reveló que un incremento en la expresión de ERK5 podía estar relacionado con gleason superiores a 7 y con incremento en la expresión de la proteína PSA (Ramsay et al., 2011).

Recientemente, ha sido validada *in vivo* la inversa correlación que existe entre la expresión del miRNA143 y el incremento de ERK5 nuclear en tumores de próstata. La inmunohistoquímica de microarreglos de tejidos (TMA) procedentes de 168 pacientes arrojó que los tejidos tumorales con mayor presencia de ERK5 activo en núcleo presentaban menor expresión del miR-143. Cada micro ARN tiene múltiples genes diana, lo que dificulta establecer la causa de la reducción de su expresión en cualquier tejido y su uso con fines clínicos. Lo anterior sugiere que la rápida evaluación de la expresión de ERK5 por inmunohistoquímica podría ser una estrategia más efectiva, en la definición de terapias dirigidas contra el cáncer de próstata (Ahmad et al., 2013).

A partir de un análisis de 127 tumores de próstata mediante inmunoblot e inmunohistoquímica se concluyó que existe una fuerte correlación entre el incremento en la expresión de MEK5 y los grados tumorales más avanzados (metástasis en hueso). Este fenotipo tumoral fue explicado por los autores debido a que MEK5 induce un claro aumento en el ARNm de la MMP9, proteína involucrada en el desarrollo de metástasis (Mehta et al., 2003).

Todas estas evidencias sugieren que la vía de ERK5/MEK5 cumple un rol crucial en carcinogénesis, invasión y metástasis por lo que constituyen dianas relevantes en el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer.

ERK5 en otros tipos de cáncer

Otro de los tipos tumorales donde se ha estudiado el rol de ERK5 es en el Mieloma Múltiple (MM) que es una neoplasia clonal de las células B diferenciadas, caracterizada por la acumulación anómala de este tipo de células plasmáticas en la médula ósea.

En un primer estudio el grupo del Dr. Pandiella demostró que el factor de crecimiento de las células de mieloma, Interleucina 6 (IL-6), es capaz de fosforilar el *T-loop* de ERK5 de forma independiente de las vías de Ras y Src. Asimismo, reportaron que ERK5 se encontraba sobreexpresada en un panel de siete líneas celulares de mieloma y en las células plasmáticas de la médula ósea de los pacientes con esta patología analizados. De manera interesante se demostró que la expresión de un dominante negativo de ERK5 disminuía significativamente la proliferación de las células MM. Además esta forma mutada de ERK5 lograba sensibilizar las células al tratamiento con dexametasona y Bortezomid (PS341). Estos compuestos se administran actualmente en clínica a pacientes con MM porque actúan como inductores de apoptosis de las células tumorales (Carvajal-Vergara et al., 2005).

En un segundo trabajo publicado recientemente por el mismo laboratorio se comprobó el papel de ERK5 en el control de la apoptosis de las células de mieloma múltiple. Como primera medida establecieron que el potente inhibidor multiquinasa TG02 tiene una clara acción anti-mieloma. Dentro de las múltiples dianas del TG02 se encuentra ERK5. Este compuesto inhibe la fosforilación de ERK5 en Thr⁷³² en la cola C-terminal lo que impide su autofosforilación, sin afectar el motivo TEY. La activación de ERK5 genera un efecto protector en las células de MM que se vuelven resistentes a la apoptosis inducida por la dexametasona y el bortezomid. Este fenotipo de resistencia fue revertido mediante la inhibición de ERK5 con TG02. El TG02 también inhibe las CDK1, CDK2, CDK7 y CDK9, lo que induce arresto del ciclo celular de las células MM en la transición de G2/M. Estos resultados demuestran de manera consistente que el uso de este inhibidor representa una estrategia terapéutica alternativa en el manejo del mieloma múltiple. Al ser un fármaco multi-diana por un lado disminuiría la proliferación de las células tumorales mediante el bloqueo de las CDKs, y por otro lado a través de la inhibición de ERK5 prevendría la adquisición de resistencia a apoptosis que presentan usualmente estas células (Alvarez-Fernandez et al., 2013).

El mesotelioma maligno es un tipo de cáncer de las superficies mesoteliales, que suele afectar la pleura, el pericardio y el peritoneo. Su etiología es la inhalación prolongada de asbesto y es bastante agresivo ya que los pacientes presentan un promedio de supervivencia inferior a los 12 meses a partir del momento del diagnóstico.

En varias líneas celulares de mesotelioma maligno ERK5 se encuentra constitutivamente activado. Lo anterior se explica debido a que tanto el EGFR como el HGFR (receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos) están sobreexpresados y activos en el 90% de los casos de mesotelioma maligno. Ambos receptores median en la activación de ERK5 por estímulos no canónicos como el asbesto y el HGF en células de mesotelioma (Shukla et al., 2013). Adicionalmente, ha sido encontrado que la proliferación celular del mesotelioma que promueve el HGF ocurre a través de la cascada PI3K/ERK5/Fra1 y este efecto logra ser inhibido significativamente mediante el silenciamiento de MEK5 (Ramos-Nino., 2002).

El tratamiento de células de mesotelioma maligno con bajas concentraciones de la droga quimioterapéutica doxorubicina activa a ERK5, lo que promueve supervivencia celular (Shukla et al., 2010) Ha sido demostrado que el silenciamiento de ERK5 en combinación con doxorubicina y cisplatino induce de manera más eficiente la muerte celular en estos tumores. Esta estrategia fue aplicada en ratones reduciendo significativamente el crecimiento de los tumores de mesotelioma maligno (Shukla et al., 2013).

Todos estos datos constituyen una clara evidencia de que independientemente del tipo tumoral, ERK5 juega un rol clave en el proceso de adquisición de resistencia a apoptosis frecuentemente desarrollado por las células tumorales. El silenciamiento o la inhibición de ERK5 podrían representar una alternativa prometedora para aumentar la efectividad de los fármacos quimioterapéuticos clásicos

I.3 CHAPERONAS Y CO-CHAPERONAS

3.1 Hsp90

Las chaperonas moleculares es un grupo amplio de familias de proteínas muy diferentes entre sí, que como característica común tienen el rol que juegan en la estabilización de las proteínas sintetizadas *de novo* o mal plegadas, específicamente asisten en el proceso de plegamiento y prevención de la agregación irreversible. A este grupo pertenece la familia de las *heat shock proteins* de 90 kDa, conservada evolutivamente desde bacterias a eucariotas. En procariotas la isoforma de Hsp90 se denomina HtpG y comparte aproximadamente un 50% de homología con la Hsp90 de las células eucarióticas. En mamíferos se han identificado cuatro homólogos de Hsp90 que residen en diferentes compartimentos celulares: Hsp90 α y Hsp90 β en citosol, Grp94 (*glucose-regulated protein*) en retículo endoplásmico y Trap-1 (*tumor necrosis factor receptor-associated protein 1*) en la matriz mitocondrial (Jackson, 2012).

La Hsp90 es una proteína extremadamente abundante, representa entre el 1-2% del total de proteínas citosólicas celulares y bajo condiciones de estrés sus niveles de expresión pueden incrementar hasta un 4%. Está chaperona además de estar involucrada en el proceso de biogénesis de proteínas, regula la actividad de diferentes componentes de las vías de señalización entre los que se encuentran algunas proteínas quinasas, receptores de hormonas y factores de transcripción, estabilizando la forma inactiva manteniéndola competente para su activación (Jackson, 2012).

Estructura de la Hsp90

A partir de la cristalización de Hsp90 hace más de 15 años se ha logrado avanzar potencialmente en el conocimiento de los dominios que la conforman (**Figura 14.A**) (Prodromou et al., 1996).

Hsp90 y sus homólogos contienen tres dominios conservados, el primer dominio N-terminal de 25 kDa posee un dominio de unión a ATP y tiene actividad ATPásica. En esta unión están involucrados varios residuos de Hsp90 (Leu³⁴, Asn³⁷, Asp⁷⁹, Asn⁹², Lys⁹⁸, Gly¹²¹ y Phe¹²⁴). Este dominio de Hsp90 es fundamental para su actividad como chaperona. La energía que se obtiene de la hidrólisis del ATP es usada para inducir un cambio conformacional en Hsp90 que facilita la unión a la proteína cliente para su correcto plegamiento. En este dominio se unen varios antibióticos de origen natural como la Geldanamicina, sus derivados y el Radicol, que son inhibidores de la actividad ATPásica de Hsp90 (Avila et al., 2006).

El dominio M ó intermedio de 33 kDa, está involucrado en el reclutamiento de co-chaperonas y la unión de las proteínas clientes. Sin ser su función central también contribuye con el dominio N en la hidrólisis

del ATP debido a que contiene un residuo arginina (Arg³⁸⁰) que podría interactuar con el fosfato-γ de una molécula de ATP unida al N-terminal (Pearl and Prodromou, 2006).

El dominio C-terminal de 12 kDa posee un motivo para dimerización, un segundo sitio de unión para fármacos inhibitorios como el taxol, novobiocina y ECGC. También en esta porción de la proteína se encuentra el motivo MEEDV que es reconocido por co-chaperonas con dominios de repetición de tetratricopéptidos (TRP), estos motivos son necesarios en la formación del complejo Hsp90-Hsp70 que está mediado por la co-chaperona Hop (*Hsp organizer protein*) (Pearl and Prodromou, 2006).

La actividad ATPásica de Hsp90 es un elemento clave en el proceso de interacción con las proteínas cliente, ya que además de definir la conformación estructural de la chaperona determina el grado de afinidad en la unión de sustratos. En ausencia de ATP, Hsp90 existe como un dímero en una conformación abierta de baja afinidad por sustratos. Cuando se da la unión de ATP un segmento corto del dominio N denominado “tapa” de Hsp90 se cierra mediante el solapamiento de varios residuos de los dominios N-terminal de ambas subunidades del dímero. Esto deja un dímero trenzado y compactado, con el sitio activo para que Hsp90 convierta el ATP en ADP y Pi. Esta conformación es la de mayor afinidad en la unión de sustratos (**Figura 14.B-C**) (Wandinger et al., 2008).

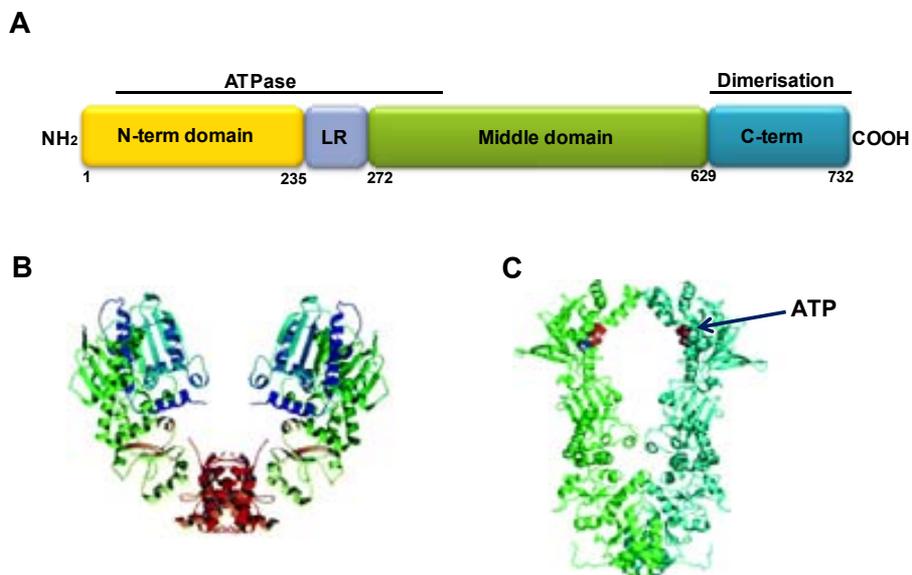


Figura 14. Estructura de Hsp90 (A) Dominios estructurales de la Hsp90 humana. El ciclo ATPasa tiene lugar en residuos tanto del dominio N-terminal como el intermedio. LR (azul): Es la región enlazadora. El dominio C-terminal está vinculado a la dimerización. Estructura de HtpG de *E. Coli* durante el ciclo ATPasa. En verde y azul las dos cadenas de los homodímeros de HtpG. **(B)** Conformación abierta en ausencia de ATP **(C)** Conformación cerrada propia de la hidrólisis de ATP, con ATP unido. Figura modificada de Jackson, 2012.

Proteínas cliente de Hsp90

Hsp90 contribuye a la correcta maduración de un amplio número de proteínas. Mediante estudios de proteómica y ensayos de inmunoprecipitación se han identificado más de 200 proteínas que interactúan con Hsp90. Estos resultados han sido corroborados mediante el uso de inhibidores específicos de Hsp90. Una reciente revisión resume los principales resultados en la identificación de sustratos de Hsp90 (Hartson and Matts, 2012). También el grupo del Dr. Picard de Ginebra ha generado un sitio web donde se dispone de una lista actualizada de las proteínas que interactúan con Hsp90 (<http://www.picard.ch/downloads/Hsp90interactors.pdf>).

Las proteínas cliente de Hsp90 pueden ser divididas en dos grandes grupos, el de los factores de transcripción y el de las quinasas. El primer grupo está compuesto entre otros por todos los receptores de hormonas (andrógenos, estrógenos, progesterona y glucocorticoides) y los factores p53, PPAR α/β (receptores activados en la proliferación de los peroxisomas). Al extenso grupo de quinasas pertenecen familias de quinasas tanto serina-treonina como tirosina, algunas de ellas son AKT, CDK1/4, ErbB2, GSK3 β , LKB1, mTOR, PDK1, p90RSK, PKC, SGK-1, RAF-1/B-Raf. Recientemente, también se han sumado a las quinasas clientes, las MAPKs ERK5, p38 y JNK, inicialmente excluidas del grupo de sustratos de Hsp90 (Citri et al., 2006).

A día de hoy sigue sin definirse la forma en que Hsp90 logra establecer interacciones específicas con proteínas cliente tan diferentes entre sí. Se cree que más que reconocer motivos de secuencia específicos en sus sustratos, la Hsp90 interactúa con proteínas con características comunes de inestabilidad. En un extenso trabajo publicado recientemente se ha determinado que las proteínas cliente de Hsp90 presentan muy baja solubilidad por lo que son más propensas a la agregación y además son muy inestables frente a cambios térmicos drásticos (Taipale et al., 2012).

El mecanismo que emplea Hsp90 en la unión de proteínas cliente es complejo porque requiere una serie de pasos secuenciales. En función de la proteína cliente involucrada participan diferentes grupos de co-chaperonas, es decir que no existe un modelo único de plegamiento.

Uno de los modelos mejor caracterizados es el del receptor de glucocorticoides, que pasa por complejos multi-proteicos que lo mantienen en un correcto plegamiento para posteriormente ser activado. Inicialmente, se forma un primer complejo entre el receptor (proteínas cliente) que se unen a Hsp70 y Hsp40. A continuación la proteína Hop recluta este complejo inicial y a Hsp90, formándose de este modo el complejo intermedio. Lo que ocurre en este paso está poco detallado pero se cree que los componentes asociados a Hsp70 se liberan del complejo por la presencia de ATP y p23. En este punto, y de un modo ATP-dependiente, la Hsp90 expone completamente el dominio de unión a ligando del GR. p23 estabiliza la unión de ATP a Hsp90, y las inmunofilinas entran en el complejo, formándose el complejo final. En presencia del ligando (hormona), el receptor es liberado, dimeriza y puede unirse a sus

coactivadores para finalmente translocar a núcleo y asociarse a la cromatina. En ausencia de ligandos el GR es liberado para entrar en nuevos ciclos de plegamiento (**Figura 15**) (Whitesell and Lindquist, 2005).

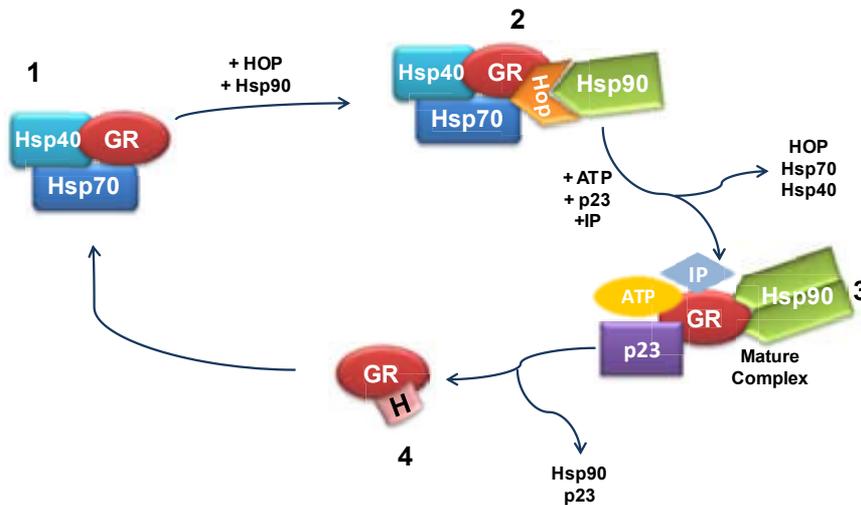


Figura 15. Representación esquemática del proceso de plegamiento del receptor de glucocorticoides (GR) (1) Formación del complejo inicial entre Hsp70/Hsp40 y GR recién sintetizado (2) Interacción de Hsp90 con el complejo intermedio a través del dominio TRP de Hop (3) La unión de ATP provoca la dimerización de Hsp90, se disocian Hop, Hsp70/ Hsp40, dejando un complejo maduro conformado por el GR, Hsp90, p23 y las inmunofilinas (IP) (4) La activación del GR por la unión a la hormona (H en rosa) induce la disociación de GR del complejo de chaperonas (Figura modificada de Morishima et al., 2001).

Como se mencionó antes existen varios inhibidores de Hsp90 ATP-competitivos como la Geldanamicina y el Radicol. En presencia de estos inhibidores no hay hidrólisis de ATP por lo que Hsp90 no adquiere la conformación estructural necesaria para el correcto acople con la proteína cliente, lo que impide su plegamiento (Blagg and Kerr, 2006). Por lo tanto la proteína sustrato queda unida al complejo intermedio y se recluta la co-chaperona CHIP que interacciona tanto con Hsp70 como Hsp90. CHIP fue la primera chaperona con propiedades de E3 ligasa de ubiquitina descrita. CHIP reconoce y une a la proteína cliente mal plegada, lo que provoca su ubiquitinación. Ha sido reportado que CHIP interacciona y co-localiza en células con el proteosoma. Por lo que podría ser también la responsable de transferir la proteína cliente del complejo intermedio al proteosoma para su degradación. CHIP interviene en la degradación proteosomal de los receptores de esteroides (GR, AR, ER), ErbB2 y el supresor de tumores Smad4 (McDonough and Patterson, 2003; Blagg and Kerr, 2006; Fan et al., 2005).

Nuevos inhibidores de Hsp90 derivados de los antibióticos clásicos Geldanamicina y Radicol están siendo probados en el tratamiento de varias enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson. No obstante, la mayor aplicación en clínica de estas moléculas es en el tratamiento contra el cáncer (**Caja 3**).

Caja 3. Hsp90: una diana relevante en la terapia contra el cáncer

Tan solo al inicio de la década de los 90's la industria farmacéutica empieza a considerar relevante la búsqueda de inhibidores de Hsp90. El punto de inflexión se marcó en 1994 al descubrir que Hsp90 es la diana de los dos antibióticos naturales, geldanamicina y radicol. Que adoptan la conformación estructural que adquiere el ATP al unirse al bolsillo del N-terminal de Hsp90. Estos compuestos han sido esenciales en la caracterización de los sustratos de Hsp90. Sin embargo fueron descartados a nivel clínico por su alta toxicidad e inestabilidad (Neckers and Workman, 2012).

El principal reto en la inhibición de esta chaperona consiste en que debido a los altos niveles de expresión de las *heat shock proteins* la célula puede desencadenar mecanismos de compensación sobreexpresando otras Hsp, lo que provoca citotoxicidad. Por otro lado, estos compuestos también pueden provocar la degradación de proteínas no oncogénicas, lo que afecta la viabilidad de las células no tumorales.

Hasta el momento 17 compuestos que inhiben Hsp90 se encuentran en ensayos clínicos. El profundo interés en el control de la expresión de Hsp90 surge a partir de varias evidencias que la vinculan a malignidad y transformación celular:

i) Las células tumorales incrementan los niveles de expresión de Hsp90 para estabilizar oncoproteínas cliente. El compuesto derivado de geldanamicina, 17-AAG o tanespimicina ha avanzado exitosamente en los ensayos clínicos y se encuentra en fase III. El tratamiento con tanespimicina ha producido efectos favorables en el control de la expresión de B-Raf en pacientes con metástasis de melanomas. Otro ejemplo, el co-tratamiento con 17-AAG y trastuzumab (anticuerpo monoclonal contra HER2) disminuye los niveles de expresión y fosforilación de HER2 en pacientes con tumores de mama (Mahalingam et al., 2009). Asimismo, el tratamiento combinado tanespimicina y trastuzumab deja un 57% de eficacia en pacientes con tumores de mama metastásicos HER+, disminuyendo la diseminación del tumor (Trepel et al., 2010)

ii) En cáncer de mama ER+ (que expresan el receptor de estrógenos) Hsp90 se encuentra sobreexpresada y formando complejo multichaperona en el núcleo de las células tumorales. La principal consecuencia de este incremento es la estabilización del ER α que se encuentra involucrado en aumento de la proliferación celular, lo que genera tumores refractarios al tratamiento clásico de supresión hormonal (Diehl et al., 2009).

Tal y como se explicó anteriormente en el proceso de ensamblaje de proteínas cliente a Hsp90 participa una maquinaria amplia de co-chaperonas, que en la mayor parte de los casos son las que confieren especificidad en las interacciones de la chaperona. Al menos 15 co-chaperonas de Hsp90 hasta el momento han sido identificadas (**Tabla 2**). En los siguientes apartados se describirá en más detalle el rol de la co-chaperona Cdc37, ya que es una proteína fundamental en el presente trabajo.

Co-chaperona	Sitio de unión a Hsp90	Función celular
Hop	C-terminal	Ensamble de complejo de chaperonas (Hsp70/90).
p23	N-terminal	Estabilización de la conformación cerrada de Hsp90
Sba1/p23	N-terminal	Inicia la liberación de la proteína cliente activa. Ralentiza la función ATPásica de Hsp90.
PP5	C-terminal	Defosforilación de Hsp90. <i>Chaperoning</i> del receptor de glucocorticoides. Tiene dominios TRP.
Cyp40	C-terminal	Participa en el <i>chaperoning</i> del receptor de estrógenos. Tiene dominios TRP.
FKBP51/52	C-terminal	Participa en el <i>chaperoning</i> de los receptores de progesterona y glucocorticoides. Tiene dominios TRP
Aha1	Dominio M	Potenciador de la actividad ATPásica de Hsp90.
TTC4	C-terminal	Potenciador de la actividad ATPásica de Hsp70.
CHIP	C-terminal	Ubiquitinación de proteínas cliente para degradación proteosomal. Tiene dominios TRP.
Trp2	No identificado	Estimula la liberación dependiente de ATP de la proteína cliente
UNC-45 (She4)	C-terminal	Une a Hsp90/Hsp70 durante el proceso de microfilamentos. Tiene dominios TRP
Cns1	C-terminal	Esencial para viabilidad en levaduras. Tiene dominios TRP
XAP-2	C-terminal	Activación transcripcional del AhR. Tiene dominios TRP
TOM70	C-terminal	Participa en el plegamiento de las proteínas importadas hacia la mitocondria

Tabla 2. Principales co-chaperonas de Hsp90 durante el proceso de plegamiento de proteínas clientes (Nollen and Morimoto, 2002; Zuehlke and Johnson, 2010).

3.2 Cdc37: ¿Chaperona o co-chaperona de Hsp90?

La Cdc37 (también conocida como p50) fue identificada inicialmente como una proteína esencial para la progresión del ciclo celular en *Saccharomyces cerevisiae*, ya que mutaciones en su gen codificante provocaba detención del ciclo en fase G1 (Reed, 1980). También en *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster* resulto esencial para la viabilidad debido a las interacciones que establecía con la quinasa dependiente de ciclinas (CDK1) (MacLean and Picard, 2003). Posteriormente, en células de mamíferos se encontró que Cdc37 formaba complejo con Hsp90 y la tirosina quinasa v-Scr (Brugge, 1986).

La primera evidencia de que Cdc37 podría formar parte de la maquinaria de chaperonas de Hsp90 se obtuvo con la clonación del gen de Cdc37. Al sobreexpresar Cdc37 en células de insecto se incrementaba la cantidad de Hsp90 unida a CDK4 (Stepanova et al., 1996). Paulatinamente la identificación de otras dianas comunes entre Hsp90 y Cdc37 (Raf-1, quinasas de la familia Scr), permitió afirmar que Cdc37 hacía las veces de co-chaperona de Hsp90 en la estabilización de proteínas quinasas (MacLean and Picard, 2003).

La Cdc37 humana es una proteína de 378 aminoácidos (aproximadamente 44.5 kDa) que posee en su extremo amino-terminal un dominio de unión a quinasas (KBD) (a.a. 1-126). Este dominio posee una serina conservada, que tanto en levaduras (Ser¹⁴) como en mamíferos (Ser¹³) es fosforilada por la caseína quinasa 2 (CK2). Esta activación es indispensable para que Cdc37 establezca la interacción con sus proteínas cliente, en ausencia del proceso de maduración de la quinasa dicha fosforilación es inhibida (Miyata and Nishida, 2005).

A continuación, Cdc37 posee una segunda región, HBD (aa. 127-282) involucrada en la interacción con el dominio amino-terminal de Hsp90 (**Figura 16.A**). La Cdc37 tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad ATPásica de Hsp90. La interacción con Cdc37 provoca que Hsp90 se mantenga en una conformación abierta, con la superficie de interacción (dominio M) accesible para la quinasa cliente. Cdc37 se une a la región que contiene la “tapa” separando físicamente los dos monómeros de Hsp90 (Apartado I.3.1), Cdc37 se inserta a través de su Arg¹⁶⁷ dentro del bolsillo de unión a nucleótidos de Hsp90 generando un enlace de hidrógeno con el residuo catalítico Glu³³. Este enlace provoca la inhibición ATPásica que es fundamental en el proceso de plegamiento de la quinasa cliente porque garantiza que esta se encuentre unida a Hsp90 en el momento inicial del ciclo y permite también prolongar el tiempo de interacción del complejo. Por otro lado, ha sido reportado que 20 residuos de este dominio (aa. 181-200) son requeridos para la unión de las quinasas cliente Akt1, Raf-1, Aurora B y Cdk4 (Terasawa and Minami, 2005).

A cerca del dominio C-terminal de Cdc37 (aa. 282-378) aún sigue sin conocerse su función específica.

Proteínas clientes de Cdc37

Cdc37 establece interacciones específicas con un amplio número de quinasas, de tal manera que dentro de una misma familia solo reconoce a unos pocos miembros. Por ejemplo, en el caso de las CDKs, Cdc37 une a CDK2, CDK4, CDK6 y CDK7 pero no a CDK3 y CDK5.

Aún sigue siendo un enigma cómo Cdc37 logra distinguir sus quinasas clientes de las que no lo son. Frente a esta cuestión mediante mutagénesis de algunas quinasas y ensayos de co-inmunoprecipitación se estableció que Cdc37 se une al lóbulo pequeño del dominio catalítico de las quinasas. De hecho se han identificado diferentes motivos de unión en la estructura de algunas quinasas cliente. Por espectrometría de masas (LC-MS/MS) se encontró que CDK2 y CDK4 tienen dos residuos de glicina conservados (GXFG) en el bucle rico en glicina ubicado en el extremo N-terminal, este bucle es el punto de acoplamiento de la Cdc37 a estas dos quinasas (**Figura 16.B**) (Terasawa et al., 2006). Por medio de ensayos similares esta vez con la proteína tirosina quinasa específica de leucocitos Lck, se estableció que la región de unión a Cdc37 incluía tanto la α -C hélice como las hojas β 4/ β 5 del dominio N-terminal de la quinasa (Prince and Matts, 2004). Estas evidencias sugieren que se deben realizar análisis exhaustivos de la región N-terminal de un panel amplio de quinasas para evaluar la presencia de estos motivos que parecen ser conservados.

Estos hallazgos condujeron a la propuesta de tres posibles mecanismos que permitirían el acoplamiento de Cdc37 a sus proteínas cliente. Primero solo las quinasas cliente poseerían el bucle rico en glicina accesible a Cdc37, hipótesis posteriormente descartada porque en algunas quinasas cliente no ha sido hallado este motivo de unión. Segundo, todas las quinasas pueden interactuar con Cdc37 transitoriamente pero solo las quinasas clientes pueden mantener esta unión por más tiempo. Tercero, solo las proteínas cliente son capaces de inducir un cambio conformacional en Cdc37 de manera que exponga su dominio de unión a quinasas (KBD) (Terasawa et al., 2006).

Hsp90 por su parte es capaz de interactuar con ciertas quinasas a través del dominio catalítico y con otras se une a su dominio C-terminal. Por todo lo anterior, se concluye que hasta momento no ha sido identificado o bien no existe un motivo de unión a chaperonas único en todas las quinasas cliente.

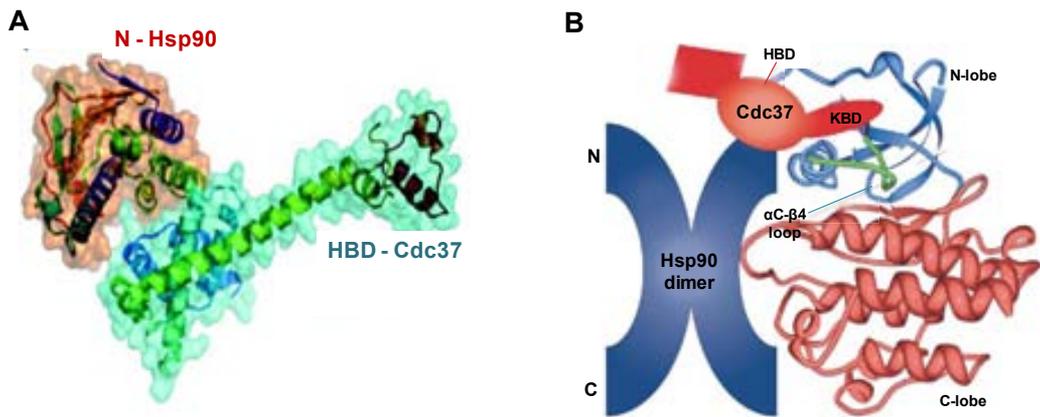


Figura 16. Esquema de complejos quinasa – Cdc37 – Hsp90 (A) Estructura secundaria del complejo Hsp90-Cdc37, en la interacción de ambas chaperonas interviene el dominio central de Cdc37, HBD (azul) y el N-terminal de Hsp90 (rosa) (Figura tomada de Pearl, 2005). (B) La Cdc37 une a la quinasas clientes a través de su dominio KBD (amino-terminal). Se representa las quinasas cliente en un diagrama de cintas, el dominio N-terminal (azul) que es el sitio de unión para Cdc37 y el C-terminal (rojo) por donde se acopla la Hsp90 en algunas quinasas (Figura extraída Gray, Jr. et al., 2008).

El proceso de plegamiento y activación de quinasas difiere del mecanismo clásico que ocurre con los receptores de esteroides descrito anteriormente (Apartado I.3.1.2). Arlander y colaboradores definieron que durante el proceso de maduración de quinasas se requiere un mínimo de cinco proteínas, cuatro de ellas chaperonas (Hsp70, Hsp40, Hsp90 y Cdc37) y la quinasa CK2. De manera que el complejo inicial al que se une la quinasa recién sintetizada está formado por Hsp70/Hsp40. La fosforilación de Cdc37 mediada por CK2, habilita a Cdc37 para interaccionar con la quinasa cliente y posteriormente reclutar a Hsp90. En este modelo demostrado *in vitro* no se requiere la participación de Hop y p23, que hacen parte del complejo intermedio de *chaperoning* de los receptores de hormonas (Figura 17) (Arlander et al., 2006).

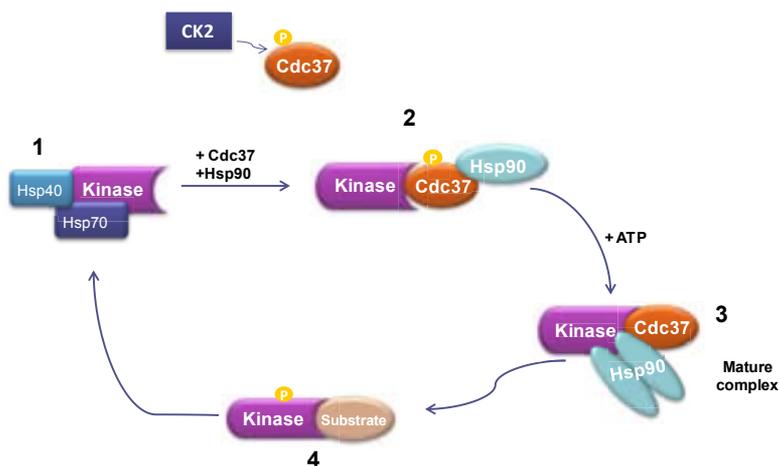


Figura 17. Representación esquemática del proceso de plegamiento de quinasas (1) Las quinasas recién sintetizadas se unen a Hsp70 y Hsp40 para prevenir la agregación (2) La Cdc37 fosforilada por CK2 es capaz de unir a la quinasa y reclutar a Hsp90 (3) La unión de ATP deja cambios conformacionales que completan el ciclo de maduración de la quinasa (4) Una vez estable y activada puede unir a sus sustratos (Figura modificada de Smith et al., 2009).

Varias investigaciones documentan que la Cdc37 puede llevar a cabo funciones de chaperona de manera independiente de la Hsp90, lo que conduce a cuestionar el papel exclusivo de la Cdc37 como co-chaperona de Hsp90. Por ejemplo, Cdc37 se considera un “guardián” de la abundancia de las quinasas celulares. Debido a que participa en las primeras fases de la biogénesis de estas proteínas uniéndose a las cadenas recién sintetizadas para evitar su degradación. Un análisis de más del 50% de las quinasas de levadura reveló que la expresión del mutante de Cdc37 (S14A), no fosforilable por CK2 e incapaz de unir quinasas, provocaba la disminución de los niveles de expresión de cerca del 90% de las proteínas analizadas (Mandal et al., 2007). También en levaduras se demostró que el mutante de Cdc37 que carece del dominio HBD de unión a Hsp90, aún en ausencia de esta región es capaz de estabilizar a la quinasa v-Scr, mantener su actividad y la viabilidad celular (Lee et al., 2002; Kimura et al., 1997). Otras evidencias que ayudan a soportar la idea de la independencia de Hsp90 son: que en células de mamífero tan solo el 50% del complejo Cdc37-CDK4 se encuentra también unido a Hsp90 (Dai et al., 1996). Asimismo a partir de un extenso análisis estequiométrico de los complejos quinasas cliente-Hsp90-Cdc37 de células de insecto se estableció que Cdc37 podía encontrarse como un dímero en complejo con la quinasa cliente sin Hsp90 (Vaughan et al., 2006). Tanto en levaduras como en mamíferos ha sido demostrado que Cdc37 es capaz de reconocer a sus proteínas cliente y llevar a cabo funciones como chaperona en ausencia de Hsp90, pero el estado óptimo para sus sustratos requiere la cooperatividad de ambas chaperonas.

Rol de Cdc37 en cáncer

Como se explicó en el apartado anterior Cdc37 juega un rol crucial en el control de diferentes vías de señalización, transcripción, ciclo celular e incluso biosíntesis de proteínas. En este apartado destacaremos otra de las funciones de Cdc37 que la ha convertido en una diana importante en la búsqueda de estrategias terapéuticas contra el cáncer.

Cdc37 es la única co-chaperona de Hsp90 hasta el momento vinculada a proliferación celular. En levadura la falta de expresión de Cdc37 detiene el crecimiento y división celular. En células epiteliales de próstata humana, el incremento en los niveles de Cdc37 se traduce en desregulación de la ciclina D1 e incremento en proliferación (Pearl, 2005).

El trabajo publicado por Stepanova y colaboradores fue el primero que relacionó Cdc37 con el desarrollo de tumores humanos. Ellos demostraron que Cdc37 se encuentra sobreexpresado en el 100% de las lesiones pre-malignas (neoplasias) y tumores en los tejidos prostáticos humanos analizados. Además encontraron que al inducir la sobreexpresión de Cdc37 en el epitelio próstata de ratones transgénicos estos generaban hiperplasias y displasias (Stepanova et al., 2000). Dado el rol que cumple el receptor de andrógenos en proliferación y diferenciación del tejido prostático, los efectos específicos que induce Cdc37 en próstata podrían ser la consecuencia de la unión y estabilización que ejerce Cdc37 sobre el AR, pero no sobre otros receptores de esteroides.

Los efectos de la sobreexpresión de Cdc37 no se limitan a próstata de hecho parece incrementar en prácticamente todos los tejidos en proliferación, lo que deja abundante expresión de esta co-chaperona en carcinomas variados entre ellos, mieloma múltiple, carcinoma hepatocelular, linfoma anaplásico de células grandes y leucemia mielocítica aguda (Gray, Jr. et al., 2008).

Cdc37 no es por definición un oncogén pero sí es un factor limitante en la transformación celular por la estabilización que ejerce sobre ciertas quinasas cliente mutadas o sobreexpresadas. Mediante el silenciamiento de Cdc37 se logró inducir la degradación vía proteosoma de varias de sus quinasas clientes normalmente sobreexpresadas en líneas tumorales de colón, mama y próstata, entre ellas ErbB2, CRAF, Cdk4, Cdk6 y Akt. La desestabilización de Cdc37 y sus quinasas cliente fue suficiente para inhibir la proliferación de las células de carcinoma de colón humano, porque se inhibió la transición de G1/S en el ciclo celular, consistente con la depleción de Cdk4/6 y reducción en la fosforilación del supresor de tumores Rb (Retinoblastoma 1) (Smith et al., 2009).

En síntesis, tanto la sobreexpresión de Cdc37 en varios tipos de carcinomas como la evidencia de que mediante su silenciamiento se disminuye la expresión de quinasas cliente relevantes en carcinogénesis han conducido a la búsqueda y desarrollo de estrategias para modular la actividad de esta co-chaperona. Estas estrategias han sido dirigidas hacia dos puntos principales, primero el bloqueo de las interacciones funcionales de Cdc37 con sus proteínas cliente y por otro lado la inhibición de la fosforilación de Cdc37 en la Ser13.

En cuanto a la primera estrategia, en 2008 se estableció que el Celastrol inhibe efectivamente la interacción Cdc37-Hsp90. El Celastrol es un antioxidante triterpenoide extraído de la raíz de *Tripterygium wilfordii* (comúnmente denominado *Thunder of God vine*) usado en la medicina tradicional china para el manejo de las enfermedades inflamatorias, asma y la artritis reumatoide. Este compuesto bloquea completamente la interacción entre Cdc37 y Hsp90, impidiendo la formación del puente de hidrógeno entre la Arg¹⁶⁷ de Cdc37 y Glu³³ de Hsp90. La inhibición de esta interacción induce la degradación de varias quinasas clientes como Cdk4 y Akt. A nivel *in vitro* promueve significativamente la apoptosis, e *in vivo* se ha demostrado que produce una clara disminución del crecimiento tumoral y la formación de metástasis en ratones xenografts de cáncer de páncreas (Zhang et al., 2008). Estudios posteriores afirman que el Celastrol puede considerarse también como un inhibidor de Hsp90, porque se une a su extremo C-terminal bloqueando la actividad ATPásica, sin inhibir la unión a ATP (Zhang et al., 2009; Zhang et al., 2010). Múltiples evidencias reafirman el uso del Celastrol en el tratamiento contra el cáncer. Por ejemplo en carcinoma de próstata induce la degradación proteosomal del receptor de andrógenos, IκB-α, Bax y p27, además inhibe significativamente el crecimiento de este tipo de tumores (Yang et al., 2006).

Con respecto a la segunda estrategia se ha demostrado que el tratamiento de células con el inhibidor de CK2, el TBB, bloquea la fosforilación en la Ser13 de Cdc37 que lleva a cabo esta quinasas y que consiste

en un paso crucial para que ocurra la unión entre Cdc37 y sus proteínas cliente. Asimismo, la sobreexpresión de la serina/treonina fosfatasa (PP5) en células tumorales de colón reduce los niveles de fosforilación en este sitio y con ello la expresión de CRAF, una de sus quinasas cliente (Smith and Workman, 2009).

II.

Objetivos

La vía de señalización de las MAP quinasas ERK5-MEK5 se activa en respuesta a un amplio rango de factores de crecimiento y a diferentes tipos de estrés celular (incluyendo estrés osmótico y oxidativo). ERK5 fosforila los factores de transcripción de la familia MEF2 y juega un relevante papel en el control de la proliferación celular inducida por factores como el EGF, además de controlar la supervivencia celular y la angiogénesis. Como consecuencia la desregulación de la actividad ERK5 está implicada en la generación y progresión en el ciclo celular de la célula tumoral, especialmente en el cáncer de mama y próstata. ERK5 difiere estructuralmente de otras MAP quinasas en presentar una larga y única cola C-terminal que presenta un motivo de localización nuclear NLS y un dominio de activación transcripcional que potencia la actividad transactivadora de factores de transcripción como AP-1.

A pesar de lo expuesto a día de hoy faltan por definir los mecanismos moleculares precisos por los que la activación de ERK5 por MEK5 induce su translocación nuclear y la activación de la transcripción. Por ello, y dado que previamente en nuestro laboratorio se identificó a la chaperona Hsp90 β como putativa proteína que interacciona con ERK5, se proponen los siguientes objetivos:

- 1. Análisis de complejo trimérico que forma ERK5 con Hsp90 β y su co-chaperona Cdc37, y caracterización del papel que juegan estas chaperonas en la estabilidad, activación y translocación nuclear de ERK5.**
- 2. Caracterización del un mecanismo implicado en la translocación nuclear no canónica de ERK5 inducida por la sobreexpresión de Cdc37.**
- 3. Estudio del rol de la interacción ERK5-Cdc37 en la proliferación celular, utilizando el paradigma del adenocarcinoma prostático.**
- 4. Caracterización molecular y funcional de la interacción entre ERK5 y el Receptor de Andrógenos (AR).**

III.

Material y métodos

1. CULTIVOS CELULARES

Las líneas celulares utilizadas fueron adquiridas del ECACC (*European Collection of Cell Cultures*). Cada línea celular fue expandida a partir de un vial *stock* que fue conservado en nitrógeno líquido y congelado en presencia de medio de cultivo suplementado con 10% de DMSO (medio de congelación), que actúa como agente crioprotector. Con el fin de garantizar la disponibilidad de *stocks* originales de cada línea celular y previo al inicio de los experimentos se procuró generar *batches* procedentes de diferentes pases. Para la congelación, las células fueron tripsinizadas, resuspendidas en medio de congelación y transferidas a un criotubo, y éste a un contenedor Cryo Freezing (Nalgene) embebido en alcohol isopropílico. Este sistema permite congelar las células con un descenso de temperatura de 1-3°C/min. Tras 72 horas a -80°C, los criotubos fueron transferidos a un tanque de nitrógeno líquido.

Todas las líneas celulares utilizadas durante este estudio se mantuvieron en crecimiento en medio completo en incubador con atmósfera húmeda, 5% de CO₂ a 37°C. Se subcultivaron aspirando el medio completo, haciendo dos lavados con PBS (*phosphate buffered saline*) y tripsinizando cuando el flask o la placa alcanzaron un 90% de confluencia. Tras la tripsinización, las células se resuspendieron en medio completo y fueron sembradas a la densidad deseada.

LÍNEAS CELULARES UTILIZADAS

Células HEK-293T: Procedentes de células de riñón embrionario humano. Difieren de las células HEK-293 parentales en que expresan el antígeno T SV40 que asegura la rápida replicación episomal de plásmidos como el pcDNA3.1. Esta línea fue utilizada en todos los experimentos que requirieron la expresión de proteínas recombinantes, dada su alta eficiencia de transfección. Medio de cultivo: DMEM (Sigma, D-5796), 10% suero fetal bovino (Gibco), 1% penicilina/estreptomicina (Gibco).

Células HeLa: Derivadas de carcinoma epitelial de cérvix humano. Presentan unos niveles de expresión elevados para ERK5, Cdc37 y Hsp90 β , por lo que representan un modelo celular eficaz para el análisis de la expresión, interacción y funcionalidad de las proteínas endógenas. Medio de cultivo: DMEM (Sigma, D-5796), 10% suero fetal bovino (Gibco), 1% penicilina/estreptomicina (Gibco).

Células PC-3: Derivadas de células metastásicas lumbares procedentes de un carcinoma de próstata andrógeno-independiente. Se caracterizan por no expresar el receptor de andrógenos y tener muy baja actividad de 5- α reductasa, enzima que cataliza el paso de testosterona (T) a dihidrotestosterona (DHT). Dado su alto potencial metastásico han sido utilizadas como modelo en los ensayos de proliferación celular. Medio de cultivo: DMEM F-12 (Sigma), 10% suero fetal bovino (Gibco), 1% penicilina/estreptomicina (Sigma), 2mM L-glutamina (Gibco).

Células LnCap: Procedentes de células metastásicas de ganglios linfáticos generadas de un carcinoma de próstata hormono-sensible (obtenidas de una muestra de epitelio de un hombre

caucásico de 50 años en 1977). Expresan el receptor de andrógenos y la proteína Antígeno específica de próstata (PSA). Fue el modelo celular utilizado para el estudio del receptor de andrógenos endógeno y la respuesta al tratamiento con andrógenos. Medio de cultivo: RPMI (Gibco), 10% suero fetal bovino, 1% penicilina/estreptomicina (Sigma); 2 mM L-glutamina, 10mM Hepes, 1mM piruvato de sodio.

Células SH-SY5Y: Derivadas de neuroblastoma procedente de médula ósea humana. Medio de cultivo: DMEM F-12 (Sigma), 15% suero fetal bovino (Gibco), 1% penicilina/estreptomicina (Sigma), 1% (v/v) Aminoácidos no esenciales (Sigma).

Células MEF: Fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) inmortalizados. En este estudio se utilizaron líneas células MEF inmortalizadas provenientes de ratones transgénicos salvajes y deficientes para MEK5 (MEK5^{-/-}), cedidas por la Dra. Catherine Tournier (Faculty of Life Sciences, Manchester, Reino Unido) (Wang et al., 2005). (Wang et al., 2005). Medio de cultivo: DMEM (Sigma), 10% suero fetal bovino (Gibco), 1% penicilina/estreptomicina, 2mM L-glutamina, 1% (v/v) aminoácidos no esenciales (Sigma), 1mM piruvato sódico, 0,001% (v/v) de β -mercaptoetanol.

MATERIAL DE CULTIVO

- Tripsina-EDTA (Gibco): 0.05% tripsina; 0.53 mM EDTA
- Poli-L-lisina (Sigma P-1399): Utilizado únicamente para adherir las células LnCap a la superficie de cultivo. Dos horas antes de sembrar las células se cubre la superficie con polilisina diluida 1/50 en agua estéril, y se lava dos veces con PBS previamente a la siembra de las células.

GENERACION DE CLONES ESTABLES (PC-3 FLAG-ERK5, PC-3 FLAG-Cdc37, PC-3 FLAG-ERK5/FLAG-Cdc37)

Para generar las líneas celulares que sobre-expresan establemente ERK5 y Cdc37 se sembraron células PC-3 en placas de 10 cm a baja confluencia (10%). 24 horas después las células fueron transfectadas con los vectores pcMV4 FLAG-ERK5 y/o pcDNA3.1 FLAG-Cdc37, mediante el método de polietilamina (PEI) (página 65). 24 horas después de la transfección se inició el proceso de selección de células añadiendo al medio de cultivo el antibiótico G418 (Geneticina, Sigma) a una concentración final de 500 μ g/ml. El medio con antibiótico fue reemplazado cada 24 horas durante 8 días. Durante la formación de colonias y hasta su selección, las células fueron mantenidas en medio con 100 μ g/ml de G418, renovado cada 3 días. Al cabo de unos 28-30 días se obtuvieron colonias individuales que fueron seleccionadas, expandidas y analizadas mediante inmunoblot con el anticuerpo anti-FLAG de los correspondientes lisados celulares. Los clones que sobre-expresaron niveles equiparables de FLAG-ERK5 y FLAG-Cdc37 fueron seleccionados, congelados y guardados en nitrógeno líquido.

TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS.

- Activación de ERK5 con EGF: Para inducir la activación de ERK5 endógena, 24 horas después de sembrar las células, el medio completo (10% FBS) fue sustituido por medio sin FBS durante 12 horas previas a la estimulación. Las células fueron tratadas por los tiempos indicados con el factor de crecimiento EGF (Sigma) a una concentración final de 20 ng/mL.
- Tratamiento con inhibidores específicos de proteínas chaperonas: Los diferentes tratamientos con inhibidores fueron aplicados directamente sobre el medio de cultivo completo. Para monitorizar la ubiquitinación de ERK5 y evitar su degradación las células fueron tratadas con el inhibidor del proteosoma MG-132 (Calbiochem) a una concentración final de 20 μ M durante 24 horas. En el análisis del efecto de la inhibición de Hsp90 o Cdc37 las células fueron tratadas con los fármacos Radicol (Sigma), Geldanamycin (Serva) o Celestrol (Sigma) a las concentraciones y tiempos indicados. En la condición control se añadió un volumen equivalente de DMSO (Sigma).
- Tratamiento con el inhibidor de ERK5 XMD8-92 (Ensayo de EC50 AP1 *luciferase gene reporter*): Células HeLa y HEK-293T fueron transfectadas con los vectores indicados. Cuatro horas después de la transfección se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco que contenía el inhibidor disuelto en DMSO a las concentraciones finales indicadas.
- Activación del Receptor de Andrógenos: Las células LnCap fueron deprivadas de esteroides durante 24 horas usando medio RPMI libre de rojo fenol suplementado con 2.0% de *stripped serum (free charcoal serum)* y posteriormente tratadas con el andrógeno 5 α -Dihidrotestosterona (DHT. Sigma) o con el agonista sintético de andrógenos, R1881 (sigma), a las concentraciones indicadas durante 24 horas.

2. EXTRACCION Y ANÁLISIS DE PROTEINAS

LISIS Y CUANTIFICACION DE PROTEINA

Los cultivos celulares fueron lavados 2 veces con PBS y lisados con tampón de lisis frío (Tabla 3). Todo el proceso de extracción fue realizado en hielo para evitar la degradación proteica, las células fueron desprendidas de la placa con un *scraper* (Sarstedt), y los lisados celulares centrifugados a 12,000 g durante 12 minutos a 4 °C. El sobrenadante (fracción soluble) fue conservado a -20°C. La concentración de proteína fue cuantificada mediante el método de Bradford, usando el colorante *Coomassie Blue G-250* (Pierce), mediante lectura de absorbancias en espectrofotómetro (LKB Instruments) a una longitud de onda de 595 nm.

Tampón	Composición
Tampón de lisis	50 mM Tris-HCl pH 7,4; 0,27 M sacarosa; 1 mM ortovanadato sódico, pH 10; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 10 mM glicerofosfato sódico; 50 mM NaF; 5 mM pirofosfato sódico; 1% (w/v) NP-40; 0,1% β-mercaptoetanol; <i>Cocktail</i> inhibidor de proteasas (Sigma).

Tabla 3. Composición del tampón de lisis celular

FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR

Para la separación de las fracciones citosólicas y nucleares las células fueron cultivadas en placas de 10 cm. Después de efectuar dos lavados con PBS frío las células se recogieron con 0.5 mL de tampón de A. Después de 10 min de incubación en hielo las células fueron homogenizadas (50 *strokes*) en homogenizador de vidrio Teflón (Braun). Después de una centrifugación a 2,000 g por 15 minutos a 4°C, el sobrenadante que contienen la fracción citosólica fue conservado a -20°C. El precipitado, que contiene mayoritariamente núcleos, fue lavado con 1 mL de tampón A y centrifugado nuevamente a 2,000 g por 10 min. El sobrenadante fue descartado y el *pellet* fue incubado 10 minutos en hielo con 250 µL de tampón RIPA, homogeneizado mediante 5 pasos a través de una jeringa (25 Gauge). Se realizó una última centrifugación a 2,000 g durante 15 minutos para eliminar las membranas nucleares y en el sobrenadante se obtuvo la fracción nuclear, que fue conservada a -20°C. En los casos en que se requirió obtener fracciones subcelulares para ensayos de co-inmunoprecipitación se utilizó un tampón RIPA que carece de SDS (este detergente aniónico produce la disociación de los componentes de complejos proteicos) y una concentración de NP-40 reducida al 0.5% (w/v).

Tampón	Composición
A	10 mM Hepes; 10 mM KCl pH 7.9; 1.5 mM MgCl ₂ ; <i>Cocktail</i> inhibidor de proteasas (Sigma)
RIPA	25 mM Tris-HCl pH 7.9; 150 mM NaCl; 1 mM EGTA; 5 mM pirofosfato sódico; 0.5% (w/v) ácido desoxicólico; 0.1% (w/v) SDS; 1% (w/v) NP-40.

Tabla 4. Composición de los tampones utilizados en ensayos de fraccionamiento subcelular.

3. PURIFICACION DE PROTEINAS

CO-INMUNOPRECIPITACIÓN

Estos ensayos fueron utilizados para establecer la existencia de interacciones *in vivo* entre proteínas endógenas o recombinantes. 5 µl de Proteína G-*Sepharose* (GE Healthcare) preequilibrada en tampón de lisis que fueron incubados con 1 µg del anticuerpo correspondiente, en agitación a 4°C durante 45-60 min. A continuación se realizaron dos lavados con tampón de lisis (Tabla 3), se añadió el lisado celular y se incubó durante 90 minutos a 4°C en agitación en noria. Se realizaron tres lavados en tampón de lisis con 0,15 M NaCl y un lavado en tampón quinasa (50mM Tris pH 7,5; 0,1mM EGTA; 0,1% (v/v) β-mercaptoetanol). Al *pellet* final se añadieron 15 µl de tampón de muestra de electroforesis (ver tabla 6) y tras calentar 5 min a 100°C, las proteínas inmunoprecipitadas fueron resueltas mediante electroforesis SDS-PAGE y analizadas a mediante inmunoblot. Como control, en todos los ensayos de co-inmunoprecipitación se realizó un control negativo donde los lisados celulares se incubaron con la resina de Proteína G-*Sepharose* libre de anticuerpo.

ENSAYOS DE PULL DOWN

Los ensayos de *pull down* fueron realizados para comprobar la interacción entre proteínas recombinantes y para la identificación de los dominios implicados en la interacción. Se utilizaron vectores de expresión para células eucariotas que codifican para las proteínas pertinentes fusionadas a la proteína glutathion-S-transferasa (GST) o para los péptidos FLAG y HA. Estos plásmidos fueron transfectados en diferentes líneas celulares, que fueron bisadas a los tiempos indicados.

Para la purificación de las proteínas recombinantes fusionadas a FLAG, HA y GST se emplearon resinas de agarosa que contienen los anticuerpos inmovilizados covalentemente (FLAG-M2-*Agarose* y HA-*Agarose*, Sigma) y la resina Glutathion-sepharose-4B (GE Healthcare) que contiene glutathión inmovilizado. Se utilizaron 5µl de cada resina, que fueron incubados con las cantidades Se realizaron tres lavados en tampón de lisis con 0,15 M NaCl, seguidos de un lavado en tampón quinasa, y al *pellet* final se añadieron 15 µl de tampón de muestra de electroforesis y tras calentar 5 min a 100°C, las proteínas fueron resueltas mediante electroforesis SDS-PAGE.

OBTENCION DE UNA PREPARACIÓN PURA Y ACTIVA DE ERK5 A PARTIR DE CÉLULAS DE INSECTO INFECTADAS CON BACULOVIRUS.

Para obtener grandes cantidades de ERK5 recombinante pura y activa se generaron partículas víricas recombinantes que se usaron para infectar células de insecto, a partir de las cuales se purificaron las quinasas. Para ello, se generaron baculovirus recombinantes usando el sistema Bac-to-Bac (Invitrogen) a partir del vector pFastBAC codificante para His-ERK5 humana y MEK5DD humana (donación del Professor Sir Philip Cohen, MRC Protein Phosphorylation Unit, Dundee, UK). Se infectaron cultivos de 500 ml de células de insecto *Spodoptera frugiperda* (Sf9, a una densidad de 1.5×10^6 células/ml) a una MOI (*multiplicity of infection*) de 5 con los 2 baculovirus generados. Después de 72 horas las células fueron recogidas mediante centrifugación (2,000 g 10 min), resuspendidas en 100 ml de tampón de lisis y congeladas en nitrógeno líquido. Las células fueron homogenizadas en un homogenizador (potter) con pistón de teflón (20 *strokes*), centrifugadas 20,000 g durante 15 minutos a 4°C y el sobrenadante fue utilizado para realizar una cromatografía de afinidad en resina de Ni²⁺-agarosa (Qiagen). La obtención de las partículas víricas y la infección de células Sf9 fue realizada por el Dr. Ricardo Biondi (Research Group PhosphoSites, Johann Wolfgang Goethe University Hospital, Frankfurt, Alemania).

Para la purificación, se añadió NaCl al lisado a una concentración final de 0.5 M y se incubó con 5 ml de resina Ni²⁺-agarosa durante 2 horas a 4°C en agitación. Tras lavar la resina 4 veces con tampón de lisis, se empaquetó en una columna y se lavó toda la noche con tampón Tris 50 mM pH 7.5 con 0.5 M NaCl y 30 mM imidazol. La proteína se eluyó con 12 ml de tampón Tris 50 mM pH 7.4, 0.27 M sacarosa, 200 mM NaCl y 400 mM imidazol. Se recogieron fracciones de 1 ml, de las cuales se determinó la concentración de proteína y la actividad kinasa ERK5 (utilizando ³²P-ATP y PIMtide como sustratos, ver apartado M.4.1). Las fracciones que presentaron mayor concentración y actividad fueron juntadas, concentradas hasta 3 ml en concentrador VivaSpin MWCO 50,000 y cargadas en una columna de gel filtración Superdex 200 HR 16/60 equilibrada con tampón Tris 50 mM pH 7.5 con 0.15 M NaCl, 0.1% 2-mercaptoetanol, 0.27 M sacarosa. Se recogieron fracciones de 3 ml y aquellas que presentaron mayor actividad ERK5 fueron juntadas y concentradas. La proteína purificada fue alícuotada y guardada a -80°C hasta su uso.

OBTENCIÓN DE UNA PREPARACIÓN PURA Y ACTIVA DE ERK5 EN CULTIVOS EN SUSPENSIÓN DE CÉLULAS HUMANAS HEK-293T.

Para obtener elevadas cantidades de ERK5 pura y activa se utilizaron células HEK-293T en suspensión (500 mL), que fueron transfectadas con 166 µg de cada uno de los vectores de expresión que codifican para las proteína GST-ERK5, HA-MEK5DD y Cdc37. Estos cultivos fueron realizados por la Dra. Julia Lorenzo del Institut de Biotecnologia i de Biomedicina de la Universitat Autònoma de Barcelona. Después de 48 horas, las células fueron recogidas mediante centrifugación del cultivo a 4,000 g durante 10 minutos. El *pellet* celular fue resuspendido en 20 mL de tampón de lisis y homogenizado mediante 20

strokes en homogenizador (potter) de Teflón (Braun), seguido de centrifugación a 15,000 g durante 20 minutos. La proteína ERK5 activa fue purificada mediante la incubación del sobrenadante resultante con 250 μ l de la resina Glutation Sepharose-4B (pre-equilibrada en tampón de lisis) durante dos horas a 4°C y en agitación. A continuación se realizaron 4 lavados secuenciales en tampón de lisis con 0,15 M NaCl, seguidos de 4 lavados en tampón quinasa y un último lavado con tampón de elución (50 mM Tris pH 7.5, 0.1% β ME; 0,1 mM EGTA, 0,27 M sacarosa). La proteína fue eluída mediante la incubación de la resina con glutatión a una concentración final de 40 mM a 4°C en agitación durante 1 hora. Finalmente la proteína eludida fue separada de la resina mediante ultrafiltración en tubo con filtro SpinX (poro 0,45 μ m, Costar) y se centrifugó a 8000 g durante 1 minuto. El filtrado recogido, correspondiente a la proteína purificada fue alicuotado y guardado a -80°C. La cuantificación y determinación de pureza de la proteína obtenida fue llevada a cabo mediante electroforesis SDS-PAGE y tinción Coomassie, utilizando diferentes cantidades de BSA como patrón de concentración de proteína.

ENSAYO DE UBIQUITINACIÓN Y SUMOILACIÓN *IN VIVO*.

En este trabajo se ha evaluado la ubiquitinación y SUMOilación de ERK5 *in vivo* en células HEK-293T. La ubiquitinación de ERK5 fue monitorizada mediante la transfección de estas células con vectores de expresión que codifican para ERK 5 y para una forma de ubiquitina humana fusionada a una cola de 6 histidinas. Por su parte, la SUMOilación fue monitorizada mediante la transfección con vectores de expresión que codifican para ERK 5, para SUMO2 humana fusionada a una a una cola de 6 histidinas y para la E2 ligasa de SUMO Ubc9 (enzima que cataliza la conjugación del sustrato). El plásmido que codifica para 6xHis-Ubiquitina fue cedido por el Dr. Alfred Vertegaal (Leids University Medical Center, the Netherlands), mientras que los plásmidos que codifican para 6xHis-SUMO2 y Ubc9 fueron cedidos por el Dr. Ron Hay (University of Dundee, Scotland).

El protocolo utilizado es el descrito por Tatham y colaboradores (Tatham et al., 2009). (Tatham et al., 2009). 48 horas después de ser transfectadas se recogieron las células (discos de 10 cm) en PBS suplementado con 10 mM N-etilmaleimida (NEM) que inhibe las *sentrin* proteasas específicas de SUMO (SENPs), mediante centrifugación a 2,000 g por 5 min. La Tabla 5 resume la composición de los tampones usados en este ensayo. El pellet celular fue resuspendido en tampón B1. Después de comprobar la eficiencia de la transfección se efectuó la purificación de las especies His-Ubiquitina o His-SUMO2, según el protocolo. Para proceder al ensayo, a cada muestra se añadió 10 mM imidazol y 10 mM 2-mercaptoetanol, se sonicó durante 15 segundos, se centrifugó a 4,000 g durante 5 min. Las especies SUMOiladas o Ubiquitinadas de los sobrenadantes fueron purificadas en resina de afinidad Ni²⁺-agarosa (25 μ L por cada disco de 10 cm) preequilibrada en tampón B1. Se incubaron los sobrenadantes con la resina en agitación a temperatura ambiente y al cabo de 2 horas se centrifugó a 4,000 g durante 1 minuto. Los precipitados fueron lavados secuencialmente con 1 mL de los tampones:

2 veces con tampón B1 suplementado con 10 mM 2-mercaptoetanol

3 veces con tampón B2 suplementado con 10 mM 2-mercaptoetanol

2 veces con tampón B3 suplementado con 10 mM 2-mercaptoetanol

1 vez en tampón B3 suplementado con 0.5 M NaCl y 0.2% (w/v) Triton X-100

1 vez en tampón B3 suplementado con 0.5 M NaCl

1 vez en tampón B3 suplementado con 0.5 M NaCl y 0.1% Triton X-100

3 veces en tampón B3

Finalmente las especies SUMOiladas o ubiquitinadas fueron eluidas de los *pellets* mediante la incubación con 30 μ L de tampón de elución durante 1 hora a 37°C y analizadas mediante inmunoblot.

Tampón	Composición
B1	6 M Guanidinio-HCl; 0.1 M Na ₂ HPO ₄ ; 0.1 M NaH ₂ PO ₄ ; 0.01 M Tris-HCl pH 8
B2 (fresco)	8 M Urea; 0.1 M Na ₂ HPO ₄ ; 0.1 M NaH ₂ PO ₄ ; 0.01 M Tris-HCl pH 8
B3 (fresco)	8 M Urea; 0.1 M Na ₂ HPO ₄ ; 0.1 M NaH ₂ PO ₄ ; 0.01 M Tris-HCl pH 6.3
Elución	250 mM imidazol; 30% (v/v) tampón de muestra 5x

Tabla 5. Tampones utilizados en la purificación de proteínas SUMOiladas o Ubiquitinadas

4. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

4.1 ENSAYOS DE ACTIVIDAD QUINASA

Ensayo radiométrico de actividad quinasa utilizando péptido sustrato.

Los ensayos de actividad quinasa se realizaron a partir de muestras purificadas mediante ensayos de inmunoprecipitación de *pull down*, o bien con la proteína ERK5 activa recombinante. En el primer caso, se utilizaron lisados de células Hela o HEK-293T que sobre-expresaban diferentes proteínas fusionadas a GST, FLAG o HA y que fueron incubados con la resina correspondiente durante 1 hora. Tras la incubación se realizaron 2 lavados con tampón de lisis con 0.15 M NaCl y dos lavados con tampón quinasa, procurando dejar en el último lavado un volumen total de 15 μ L de tampón quinasa. En el segundo caso, se incluyó directamente en un tubo eppendorf la cantidad indicada de proteína ERK5 activa recombinante. En todos los casos, se iniciaron las reacciones mediante la adición de una mezcla de tampón quinasa y acetato de magnesio (10 mM concentración final) y los sustratos 0.1 mM ³²P-[γ -ATP] (GE Healthcare, 500 cpm/pmol) y el péptido sustrato de ERK5 PIMtide (ARKKRRHPSGPPTA, sintetizado por JPT Peptide Technologies, Germany) a las la concentración indicada. El volumen de reacción fue de 50 μ l para ensayos de actividad ERK5 de lisados celulares y de 30 μ l para ensayos con proteína ERK5 recombinante, que fue incubado durante los tiempos indicados a 30°C en agitación a 1000 rpm en agitador *thermomixer* (Eppendorf). La reacción fue detenida mediante la aplicación de 40 μ L (lisados) o

30 μ L (ERK5 recombinante) de la reacción sobre un de papel (2x2 cm) de fosfocelulosa P81 (Whatman, un péptidos básicos) que fueron depositados en un contenedor con 50 mM de ácido fosfórico. Después de varios lavados, los papeles fueron secados y la radioactividad incorporada se cuantificó mediante contaje Cerenkov en un contador de centelleo Wallac-II (GE HealthCare). Como blanco de reacción se utilizó una mezcla que carecía del péptido PIMtide. Los datos de actividad presentados en milliUnidades corresponden a la cantidad de enzima que cataliza la fosforilación de 1 pmol de sustrato (PIMtide) en 1 minuto.

Ensayo radiométrico de fosforilación de proteínas en gel de poliacrilamida (autorradiografía)

Este ensayo fue utilizado para monitorizar la fosforilación *in vitro* de proteínas por EKR5. Para ello se incubó en un volumen final de 50 μ L la cantidad indicada de ERK5 recombinante activa con los *pellets* de resinas que contenían las proteínas inmunoprecipitadas o procedentes de ensayos de de *pull down*, en una mezcla compuesta por tampón quinasa. Las reacciones se iniciaron mediante a adición de 10 mM de acetato de magnesio y 0.1 mM 32 P-[γ -ATP] (500 cpm/pmol). Las reacciones se llevaron a cabo a 30°C en agitación (1000 rpm) durante 1 hora y se finalizaron añadiendo 8 μ L de tampón de muestra de electroforesis (Tabla 6) concentrado 5 veces. Las muestras se calentaron 5 minutos a 100°C y las proteínas se resolvieron mediante gel SDS-PAGE y se visualizaron con tinción Coomassie. La incorporación de radioactividad se determinó mediante autorradiografía (Hyperfilm MP, GE Healthcare).

4.2 ENSAYO LUCIFERASE GENE REPORTER DE ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL PARA AP-1 Y PSA (ANTÍGENO PROSTÁTICO ESPECÍFICO).

ERK5 posee un dominio de activación transcripcional capaz de transactivar la actividad de factores de transcripción como MEF2 y AP1. Con el fin de monitorizar la activación transcripcional mediada por ERK5 se evaluó la inducción de la actividad transcripcional del factor AP1. Para ello se utilizó el vector *reporter* pGL4-AP1 *luciferase*, que expresa el gen de la luciferasa bajo control de tres secuencias consenso del promotor de AP1 (Stratagene).

Células HeLa y HEK-293T sembradas en placas de 12 pocillos fueron transfectadas con 500 ng de DNA total: 100 ng de pGI4-(Ap1)-luc, 50 ng de GST-ERK5 salvaje o de los correspondientes mutantes indicados (D200A, 5A y K6/K22R) 200 ng de Flag-Cdc37 o HA-MEK5DD según correspondiera, y 50 ng del vector pRL-CMV-Renilla luciferasa (Promega). La actividad Renilla se usó como control de la variación en la transfección de cada pocillo, de manera que sus valores fueron utilizados para normalizar los de la actividad luciferasa. Después de 24 horas, las células transfectadas fueron lavadas con PBS y lisadas en 200 μ L de *Passive Lysis Buffer* (tampón de lisis incluido en el kit de Promega) e incubadas durante 15 min en agitación fuerte para facilitar la lisis celular. Las actividades luciferasa y Renilla fueron determinadas en placa opaca de 96 pocillos, utilizando 20 μ L de lisado y 50 μ L de cada tampón del kit *Dual Luciferase Reporter Assay System* (Promega), en el lector de luminiscencia de microplaca *Clarity*TM

(BioTek Instruments). Los resultados se presentan como actividad luciferasa de AP1 normalizada con la actividad de la Renilla.

Para determinar el efecto de la sobre-expresión o silenciamiento de ERK5 sobre la activación transcripcional de la proteína PSA (Antígeno prostático específico) se utilizó el plásmido pGL4.10-PSA *luciferase*, que codifica para la región -4.882/+12 de sitio de inicio de transcripción del PSA humano, cedido por el Dr. Eric Bolton de la University of California San Francisco, USA (Jones et al., 2009). En los casos indicados, al día siguiente de la transfección las células fueron tratadas con 1 y 10 nM de DHT o R1881 durante 24 horas. La lisis celular y medición de la actividad luciferasa se realizó en las mismas condiciones descritas previamente.

5. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS PARA LA DETECCIÓN DE PROTEÍNAS

ELECTROFORESIS EN GEL DE SDS-POLIACRILAMIDA

Para resolver las proteínas procedentes de lisados celulares se utilizó la electroforesis desnaturizante en gel de SDS-Poliacrilamida, utilizando el sistema kit Mini-Protean III de Bio-Rad. Las muestras se diluyeron en tampón de muestra (Tabla 6), se calentaron 5 minutos a 100°C y se separaron por electroforesis en geles de diferente porcentaje de acrilamida, según el peso molecular de las proteínas a resolver. En cada carril se cargaron 10-30 µg de proteína. Se aplicó un voltaje constante de 150 V durante 75 minutos.

ELECTROTRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS: INMUNOBLOT

Una vez finalizada la electroforesis las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Schleicher & Schurell) según el método descrito por Renart (Renart et al, 1979) y Towbin (Towbin et al, 1979). Para ello se utilizó el sistema Mini Trans-Blot Electroforesis Transfer Cell (Bio Rad), en tampón de transferencia (Tabla 6) y aplicando un voltaje constante de 100 V durante 90 minutos.

La membrana con las proteínas transferidas fue bloqueada con tampón de bloqueo (Tabla 6) durante una hora en agitación y e incubada con el correspondiente anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C en agitación. Después de 3 lavados de 5 minutos con tampón TBS-Tween (Tabla 6), se incubó la membrana durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa diluido 1/6000 en tampón de bloqueo. Los anticuerpos secundarios utilizados (Pierce) fueron: goat anti-rabbit (No. 31460), goat anti-mouse (No. 31430), rabbit anti-sheep (No. 31480). Después de realizar 3 lavados de 10 minutos con tampón TBS-Tween, la detección de las proteínas fuer realizada mediante ensayo de quimioluminiscencia (mezcla de 1ml de reactivo de ECL 1 y 2), utilizando reactivos generados en nuestro laboratorio (Tabla 5) y película fotográfica (Medical X-Ray Film, Agfa).

Tampón	Composición
Tampón de muestra	25 mM Tris-HCl pH 6,8; 2% p/v SDS; 10% glicerol, DTT 10 mM, 0,002% p/v azul de bromofenol
Tampón de electroforesis	25 mM Tris-HCl; 192 mM Glicina; 20% SDS
Tampón de transferencia	25 mM Tris-HCl; 192 mM Glicina; 20% Metanol
TBS-Tween (TBS-T)	20 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl pH 7,6; 0,2 % Tween
Tampón de bloqueo	TBS-T + 5% leche desnatada
Reactivo 1 ECL	1M Tris-HCl pH 8,5; 0.5 Luminol (Fluka); 79.2 mM ácido p-cumárico (Fluka)
Reactivo 2 ECL	1M Tris-HCl pH 8,5; 8.8 M peróxido de hidrógeno.

Tabla 6. Composición de los tampones utilizados en ensayos de electroforesis y de inmunoblot.

La Tabla 7 muestra los anticuerpos utilizados en este trabajo y la concentración a la que fueron usados.

Anticuerpos primarios	Suministrado por	Fabricado en	Concentración
Actina	Sigma Aldrich No. A-1978	Mouse	WB 1:20000
BrdU	BD Biosciences No. 555627	Mouse	IF 1:100
Cdc37	Santa Cruz No. Sc-13129	Mouse	WB 1:5000 IP 1µg IC 1:200
Ciclina β	BD Biosciences No. 610220	Mouse	WB 1:5000
Ciclina D1	Thermo scientific No. RM-9104-S0	Rabbit	WB 1:1000
c-Myc	Santa Cruz No. sc-40	Mouse	WB 1:1000
CREB	Abcam No.ab5803	Rabbit	WB 1:5000
FLAG	Sigma Aldrich No. F-3165	Mouse	WB 1:5000 IP 1µg
GAPDH	Ambion No. 4300	Mouse	WB 1:20000

GST	Santa Cruz No. Sc-459	Rabbit	WB 1:5000 IC 1:500
ERK1/2	Cell Signaling No.4695	Rabbit	WB 1:5000
ERK5	MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK)	Sheep	WB 0,2 µg/ml
ERK5 C-term	Sigma Aldrich No. E1523	Rabbit	WB 1:6000 IP 0,5µg
ERK5	Santa Cruz No. Sc-5626	Rabbit	IC 1:100
pERK5	Biosource No.44-612G	Rabbit	WB 1:2000
HA	Sigma Aldrich No.H3663	Mouse	WB 1:2000
His	GE Healthcare No. 27-4710-01	Mouse	WB 1:500
Hsp90	Calbiochem No.ca1024	Mouse	WB 1:2000
MEK5	Stressgen No.KAP-MA003	Rabbit	WB:1:1000
SUMO2	Invitrogen No.51-9100	Rabbit	WB 0.5 µg/ml
Receptor de Andrógenos	Santa Cruz No. Sc-7305	Mouse	WB 1:2000 IP 1µg IC 1:200
Ubc9	MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee, UK)	Sheep	WB 1:500
Ubiquitina	Santa Cruz No.sc-8017	Mouse	WB 1:1000

Tabla 7. Lista de anticuerpos utilizados. WB, western blot; IP, immunoprecipitation; IC, immunocytochemistry; IF, immunofluorescence

6. INMUNOCITOQUÍMICA

Para realizar los ensayos de inmunofluorescencia se sembraron células en placas de 12 pocillos sobre cubreobjetos pre-tratados con poli-L-lisina. 48 horas después, las células fueron lavadas con PBS y fijadas en un solución de 4% de paraformaldehído durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de tres lavados de 5 minutos con PBS en agitación suave, las células se permeabilizaron con solución 1 (Tabla 8) durante 7 minutos. Tras un lavado de 5 minutos con PBS se incubó con solución 2 durante 15 minutos, y se bloqueó con solución 2 suplementada con 5% (w/v) de BSA (solución 3) durante 1 hora. Las células fijadas fueron incubadas con el correspondiente anticuerpo primario diluido en solución 4 durante 16 h en cámara húmeda a 4°C. Después de 5 lavados con PBS se incubó durante 45 minutos con el correspondiente anticuerpo secundario (conjugado a fluorescencia), diluido en solución 4. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron Alexa fluor 594 chicken anti-mouse IgG y Alexa fluor 488 anti-rabbit IgG (Invitrogen). A partir de este punto las células inmunoteñidas fueron preservadas de la luz para evitar la excitación de los fluorocromos. Tras 5 lavados con PBS, las células fueron incubadas 5 minutos con 5 ng/ml de Hoescht 33259 (Invitrogen) disuelto en agua para marcar los núcleos celulares. Se eliminó el exceso de Hoescht con 4 lavados con PBS y se montaron las preparaciones con medio de montaje Fluorosave™ (Calbiochem). Las células se visualizaron mediante microscopía de fluorescencia en un microscopio Nikon Eclipse 90i.

Tampón	Composición
Solución 1	0.02% saponina en PBS
Solución 2	0.01% saponina; 10 mM glicina en PBS
Solución 3	0.01% saponina; 10 mM glicina; 5% BSA en PBS
Solución 4	0.01% saponina; 1% BSA en PBS

Tabla 8. Composición tampones utilizados para inmunofluorescencia de cultivos celulares.

7. ANALISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

ENSAYOS DE PROLIFERACION CELULAR

Para realizar las curvas de proliferación celular se sembraron 10^5 células de la línea PC-3 en placas de 12 pocillos que fueron transfectadas con vectores de expresión que codifican para proteínas fusionadas a GFP. A los tiempos indicados de cultivo (mínimo 12 horas post-transfección) las células se lavaron con PBS, se tripsinizaron y se añadió 50 μ L de FBS. Las células fueron recogidas por centrifugación a 1,500 g durante 5 minutos, y el pellet celular resuspendido en 500 μ L de PBS. El análisis citofluorométrico se realizó mediante el conteo de al menos 10,000 células por condición. La intensidad de fluorescencia fue cuantificada en el citómetro de flujo Beckman Coulter FC 500, a una longitud de onda de 490 nm.

ANÁLISIS DE PROLIFERACIÓN CELULAR MEDIANTE ENSAYOS DE INCORPORACION DE BrdU

El porcentaje de células en fase S fue determinado mediante el marcaje de células con el análogo estructural de la timidina, 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU), un método que permite cuantificar las células en las que se produce síntesis de DNA. 48 horas después de ser transfectadas con los vectores indicados, las células fueron incubadas con una solución de BrdU 3 µg/mL durante 16 horas. Las células fueron fijadas durante 20 minutos a temperatura ambiente con etanol frío al 70% (en una proporción de 10⁵ células/100µL). Para disgregar el pellet celular el etanol fue añadido gota a gota agitando con vórtex simultáneamente. Una vez fijadas, las células se lavaron con 1 mL de tampón de lavado (Tabla 9) y se centrifugaron durante 5 minutos a 1,000 g. Debido a que el anticuerpo anti-BrdU utilizado solo detecta el BrdU incorporado en un ADN monocatenario, el precipitado celular se incubó con 100 µL de solución de desnaturalización durante 20 min. El tampón de desnaturalización fue removido por centrifugación con 1 mL de tampón de lavado. Para neutralizar los ácidos remanentes el pellet se resuspendió en 500 µL de borato sódico (Na₂B₄O₇) pH 8.5 durante 2 minutos. Nuevamente las células fueron lavadas y centrifugadas para proceder a la incubación durante 20 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo primario anti-BrdU (BD Biosciences) diluido 1/200 en tampón de dilución. Se lavó una vez más y a continuación se incubó durante 20 minutos con el anticuerpo secundario Alexa fluor 488 donkey anti-mouse IgG diluido 1/1000. A partir de este momento las células fueron preservadas de la luz. El precipitado celular se lavó y se resuspendió en 500 µL de PBS y el número de células que presentaron BrdU incorporado fue determinado en citómetro de flujo Beckman Coulter FC 500, a una longitud de onda de 488 nm.

Tampón	Composición
Lavado	0.5% BSA en PBS
Desnaturalización	2 M HCl
Tampón de dilución	0.5% BSA; 0.5% Tween [®] -20 en PBS

Tabla 9. Tampones utilizados en la determinación de incorporación de BrdU por citometría de flujo.

8. TRANSFECCION DE DNA EN CELULAS DE MAMIFERO.

La Tabla 10 incluye un listado de los vectores de expresión utilizados en este trabajo. En todos los experimentos de transfección se utilizó el correspondiente plásmido vacío como control de transfección. En función del tipo celular se utilizaron 2 métodos de transfección: polietilenamina (PEI, para células HEK-293T, HeLa, SH-SY5Y y PC-3) y lipofectamina 2000 (células LnCap y MEF).

Vector	Proteína de fusión	Procedencia
pEBG2T	GST	Dr. Philip Cohen MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee,UK)
pEBG2T	GST-ERK5 WT	Dr. Philip Cohen MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee,UK)
pEBG2T	GST-ERK5 NTERM (1-490)	Dr. Philip Cohen MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee,UK)
pEBG2T	GST-ERK5 CTERM (401-816)	Clonado en el laboratorio
pEBG2T	GST-ERK5 K6/22R	Clonado en el laboratorio
pEBG2T	GST-ERK5 5A	Dra. Ana Cuenda Centro Nacional de Biotecnología-CSIC (Madrid,Spain)
pEBG2T	GST-ERK5 5E	Dra. Ana Cuenda Centro Nacional de Biotecnología-CSIC (Madrid,Spain)
pEBG2T	GST-ERK5 D200A	Dra. Ana Cuenda Centro Nacional de Biotecnología-CSIC (Madrid,Spain)
pCMV4	FLAG	Dr. Néstor Gómez Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)
pCMV4	FLAG-ERK5 WT	Dr. Néstor Gómez Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)
pCMV5	HA-MEK5DD	Dr. Eusike Nishida Kyoto University (Japan)
pCMV5	HA-Hsp90 β	Dr. Andreas Papapetropoulos University of Patras, Greece
pCDNA3	FLAG-Cdc37	Dr. Claus Scheidereit Max Delbrück Center for Molecular Medicine, (Berlin, Germany)
pCDNA3	HA-ERK5 CTERM (401-816)	Dr. Eusike Nishida Kyoto University (Japan)
pCDNA3	GST-ERK5 AEF	Dr. Eusike Nishida Kyoto University (Kyoto, Japan)
pCDNA3	His-SUMO2	Dr. Alfred Vertegaal Leiden University Medical Center (The Netherlands)
pCDNA3	Ubc9	Dr. Ron Hay College of Life Sciences (Dundee, UK)

pCDNA-Myc9	Myc-SENP1	Dr. Chin Ha Cheng Seoul National University (Korea)
pCDNA-Myc9	Myc-SENP2	Dr. Chin Ha Cheng Seoul National University (Korea)
pEGFP	GFP	Dr. Philip Cohen MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee,UK)
pEGFP	GFP-ERK5	Dr. Philip Cohen MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee,UK)
pEGFP	GFP-Cdc37	Clonado en el laboratorio
pCMV	His-Ubiquitin WT	Dr. Alfred Vertegaal Leiden University Medical Center (The Netherlands)
pCMV	His-Ubiquitin 7KR	Dr. Alfred Vertegaal Leiden University Medical Center (The Netherlands)
pRBG4	HA-Ubiquitin	Dra. Suzanne Conzen University of Chicago
pCAN	HA-AR	Dr. Daniel Berwick UCL School of Pharmacy (London, UK)
pGL4	Luciferase-AP1 promoter	Stratagene
pGL4.10	Luciferase-PSA promoter	Dr. Eric Bolton University of California (San Francisco, USA)
pRL-CMV	Renilla	Promega
Xpress	ERK5 K6/22R	Dr. Jun-ichi Abe University of Rochester, NY

Tabla 10. Lista de plásmidos utilizados.

TRANSFECCIÓN CON POLIETILENAMINA (PEI)

La técnica de transfección con polietilenamina (PEI, Polysciences Inc.) se basa en la formación de un complejo DNA-polímero catiónico: los cationes del polímero PEI (de 25 kDa) capturan el DNA en suspensión y lo condensan sobre sí, favoreciendo la entrada del DNA en la célula. Se prepararon *stocks* de trabajo a una concentración de 1 mg/ml de PEI en agua pH 7.4 (neutralizada con HCl), que fueron alícuotados y guardados a -80°C. La relación DNA: PEI ($\mu\text{g}:\mu\text{l}$) que permite obtener niveles óptimos de transfección debe ser previamente determinado para cada tipo celular. En este trabajo se han utilizado las siguientes: HeLa y HEK-293T: 1:10.5 ($\mu\text{g}:\mu\text{l}$); PC-3:1:8 ($\mu\text{g}:\mu\text{l}$). SH-SY5Y: 1:7.5 ($\mu\text{g}:\mu\text{l}$). La eficiencia de transfección fue del 90% para las células HEK293T, 70% para las PC-3 y HeLa y del 60% para las SH-SY5Y.

Las células a transfectar fueron subcultivadas en placas de 10 cm con un día de antelación para obtener entre un 50 y un 80% de confluencia. El plásmido a transfectar fue diluido en 1 mL medio DMEM sin

suero, se añadió el PEI y se agitó la mezcla se agitó en vórtex durante 5 segundos. Después de 10 minutos a temperatura ambiente, la mezcla se añadió gota a gota a las células. Las células fueron incubadas durante 24-48 horas a 37°C antes de ser lisadas.

TRANSFECCIÓN CON LIPOFECTAMINA 2000

La técnica de transfección mediante lipofectamina (Lipofectamine™ 2000) se basa en el uso de liposomas catiónicos de carga neta altamente positiva que interaccionan con los fosfatos del DNA, sirviendo de vehículo para su entrada en la célula. Esta técnica se ha utilizado para transfectar las células LnCaP y MEF, dado que el uso del polímero PEI resulta en un bajo rendimiento y en una alta toxicidad en estas células. El uso de Lipofectamina 2000 permite una eficiencia de transfección del 80% (células LnCaP) y del 30-40% para las células MEF cuando el medio de estas células fue suplementado con 2 mM de L-glutamina).

Las células fueron subcultivadas en placas de 12 pocillos el día anterior a la transfección para obtener un 60-70% de confluencia. Tres horas antes de la transfección el medio de cultivo fue sustituido por 1ml de medio sin antibiótico. En un tubo eppendorf se añadieron 0.5 µg de DNA en 0.5 mL de medio OPTIMEM (Gibco) y en otro tubo 2.5 µl de lipofectamina sobre 0.5 ml de medio OPTIMEM. Tras 5 minutos a temperatura ambiente, la mezcla de lipofectamina se añadió sobre la mezcla de DNA, se agitó suavemente y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos, tras los cuales se añadió la mezcla final gota a gota sobre las células a transfectar. El medio de transfección se cambió por medio completo 4 horas después de la transfección.

9. SILENCIAMIENTO GENICO CON RNA DE INTERFERENCIA.

SILENCIAMIENTO DE LA CDC37 CELULAR MEDIANTE TRANSFECCIÓN TRANSITORIA DE esiRNAs.

Para inducir el silenciamiento génico (*knock-down*) se emplearon siRNAs que son RNA de doble cadena cortos generados a partir de la amplificación por PCR del cDNA de interés. Los productos amplificados son sometidos a reacciones de transcripción de manera que se obtienen monocadenas de RNA que posteriormente son ligadas. Estos dsRNA largos son procesados por la enzima endoribonucleasa III, Dicer, que los corta en fragmentos que no superan las 30 pb (siRNA). Estos RNA pequeños se incorporan en el complejo RISC (*RNA-induced silencing complex*), donde el mRNA es fragmentado y posteriormente degradado.

El silenciamiento de Cdc37 en células HeLa fue realizado mediante el uso de un *pool* de cinco siRNAs (Mission esiRNA, EHU104551, Sigma) (Tabla 11) que tienen como diana cinco regiones diferentes del mRNA que codifica para la Cdc37 humana (*Gen Bank Accesion* No. NM_007065). Esta estrategia garantiza mayor eficiencia y especificidad del *knock-down*. Las células Hela sembradas en placas de 6 pocillos a un 50% de confluencia fueron transfectadas (Lipofectamina 2000) con 1 µg por pocillo de la mezcla Cdc37 esiRNA (574 pb), o con 1 µg de un siRNA *scramble* (como control). Se evaluó la eficiencia del silenciamiento de Cdc37 a los 3, 4 y 5 días post-transfección, mediante análisis por inmunoblot de los niveles de Cdc37 de los lisados celulares.

siRNA	Secuencia
Cdc37 esiRNA	AAAGACGGCTTCAGCAAGAGCATGGTAAATACCAAGCCCGAGAAGACGGAGGA GGACTCAGAGGAGGTGAGGGAGCAGAAACACAAGACCTTCGTGGAAAAATACG AGAAACAGATCAAGCACTTTGGCATGCTTCGCCGCTGGGATGACAGCCAAAAGT ACCTGTCAGACAACGTCCACCTGGTGTGCGAGGAGACAGCCAATTACCTGGTC ATTTGGTGCATTGACCTAGAGGTGGAGGAGAAATGTGCACTCATGGAGCAGGT GGCCCACCAGACAATCGTCATGCAATTTATCCTGGAGCTGGCCAAGAGCCTAAA GGTGGACCCCGGGCCTGCTTCGGCGAGTTCTTCACTAAGATTAAGACAGCCG ATCGCCAGTACATGGAGGGCTTCAACGACGAGCTGGAAGCCTTCAAGGAGCGT GTGCGGGGCCGTGCCAAGCTGCGCATCGAGAAGGCCATGAAGGAGTACGAGG AGGAGGAGCGCAAGAAGCGGCTCGGCCCGGCGGCCTGGACCCCGTCGAGG TCTACGAGTCCCTCCCTGAGGAACTCCAGAAGTGCTTCGATGTGA

Tabla 11. Secuencia de los esiRNA para Cdc37 utilizados.

SILENCIAMIENTO DE LA ERK5 CELULAR MEDIANTE LA INFECCIÓN CON LENTIVIRUS shRNAis

Para obtener un silenciamiento estable y eficiente de la proteína ERK5 endógena se utilizaron vectores lentivirales, obtenidos a partir de plásmidos pLKO.1 que codifican que codifican para diferentes shRNAis. Inicialmente se evaluaron cinco plásmidos pLKO.1 que contienen 5 diferentes shRNAs para diferentes regiones de la proteína ERK5 humana (obtenidos de Sigma, Tabla 12). Las células HEK-293T fueron transfectadas con cada uno de estos y se determinó la eficiencia del silenciamiento de la ERK5 celular mediante análisis de inmunoblot de los correspondientes lisados celulares.

shRNA	shRNA Referencia	Secuencia
1	TRCN0000196956/pLKO.1	CCGGGCTCTCTTTGCATGAGTATACCTCGAGGTATACTCAT GCAAAGAGAGCTTTTTTG
2	TRCN0000010261/pLKO.1	CCGGCCGCCCTTTGACTTTGCCTTTCTCGAGAAAGGCAAAG TCAAAGGGCGGTTTTT
3	TRCN0000010275/pLKO.1	CCGGGCCAAGTACCATGATCCTGATCTCGAGATCAGGATC ATGGTACTTGGCTTTTT
4	TRCN0000010262/pLKO.1	CCGGGCTGCCCTGCTCAAGTCTTTGCTCGAGCAAAGACTT GAGCAGGGCAGCTTTTT
5	TRCN0000197264/pLKO.1	CCGGGTTTCATCTCAGACCCACCTTTCTCGAGAAAGGTGGGT CTGAGATGAACTTTTTTG

Tabla 12. Secuencias diana utilizadas en el silenciamiento de la ERK5 celular

Para la producción de los lentivirus se usaron dos plásmidos derivados del genoma del virión HIV-1, que han sido modificados mediante la eliminación de los genes accesorios *vif*, *vpr*, *vpu* y *nef* para evitar su efecto virulento. El primer vector es el de empaquetamiento, psPAX2, que contiene un promotor CAG, que permite una eficiente expresión de las proteínas de empaquetamiento *Gag*, *Pol*, *Tat* y *Rev*. El plásmido pMD2G o de envuelta viral, codifica para la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV), su expresión es fundamental debido a la alta estabilidad que confiere permitiendo recuperar las partículas víricas por ultracentrifugación. Las partículas lentivirales fueron generadas en células HEK-293 mediante la co-transfección de los vectores del virión (psPAX2 y pMD2G) y de los plásmidos de ERK5 shRNA o el vector pLKO.1 vacío (control), como muestra la **Figura 18**. La transfección fue realizada utilizando PEI y una variación del método arriba descrito.

Por cada lentivirus a producir se sembraron tres placas de 10 cm de células HEK-293T al 70% de confluencia. Una hora antes de la transfección se cambió el medio por medio sin suero y sin antibiótico. Cada placa fue transfectada con una mezcla de 30 µg de DNA (15 µg de shRNA-ERK5, 5.3 µg de pMD2.G y 9.7 µg de psPAX2, diluidos en 970 µl de NaCl 150 mM estéril) y 200 µl de PEI en 800 µl de NaCl 150 mM estéril. Se agitó y después de 10 minutos a temperatura ambiente se añadió a las células gota a gota, y al cabo de tres horas el medio fue sustituido por medio fresco completo. Pasadas 24 horas se recolectó el medio que contenía los primeros virus y reemplazó por medio fresco. Cada 12 horas, tres veces en total, se recolectó el medio celular que fue mantenido a 4°C. Todos los sobrenadantes de las diferentes horas post-transfección fueron pasados a través de un filtro de 0.45 µm y centrifugados a 50,000 g durante 120 minutos a 16°C. Se aspiró cuidadosamente el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* (que contiene las partículas víricas) en 150 µL de PBS, se alicuotó y se guardó a -80°C hasta su uso.

Infección de células con lentivirus shRNAi para ERK5.

Los lentivirus fueron utilizados para silenciar la expresión de ERK5 de células LnCap. Para ello se sembraron células en placas de 6 pocillos, que fueron infectadas con 5 μ l (por pocillo) del correspondiente lentivirus. Los virus se dejaron en el medio durante 5 horas, tras las cuales el medio fue sustituido por medio RPMI *red-phenol free*; 2% *stripped serum*. Cuatro días después de la infección las células fueron sometidas los tratamientos indicados, lisadas y procesadas.

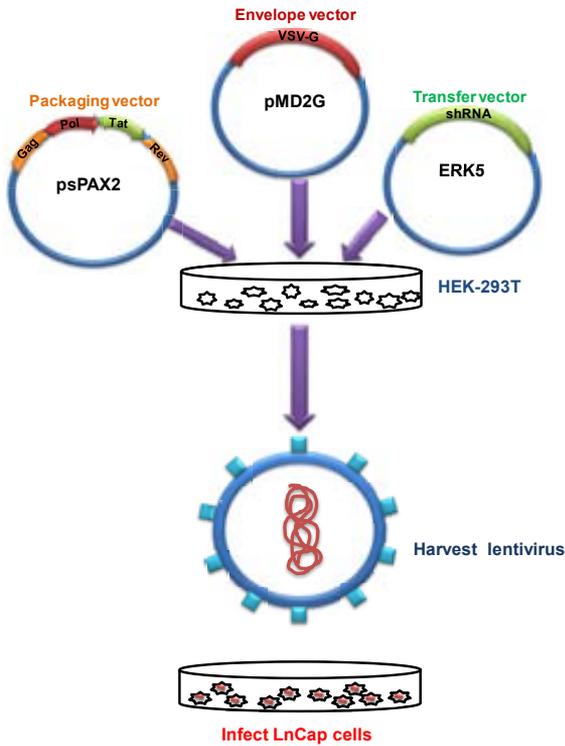


Figura 18. Representación esquemática de los plásmidos y protocolo utilizados para la generación de lentivirus shRNA de ERK5

IV.

Resultados

RESULTADOS – CAPÍTULO 1:

ERK5 forma un complejo trimérico con Hsp90 y Cdc37

1. ERK5 forma un complejo trimérico con Hsp90 y Cdc37

1.1 ERK5 interacciona con Hsp90.

En experimentos previos realizados en nuestro laboratorio se observó que, al someter extractos de células HeLa de homogenado de cerebro de rata a una cromatografía en gel filtración en condiciones nativas, ERK5 eluía en dos fracciones claramente diferenciadas, una correspondiente a su peso molecular teórico (110 kDa) y otra que correspondía a un peso molecular mayor de 700 kDa. Este resultado sugería que ERK5 forma complejos de alto peso molecular, posiblemente debidos a su interacción con otras proteínas. Con el fin de identificar las proteínas que interaccionan con ERK5 en condiciones nativas, se llevó a cabo una purificación de afinidad en tándem TAP (*Tandem Affinity Purification*). Para ello se generaron líneas estables de células SH-SY5Y que expresan dos formas de ERK5 fusionadas a GFP y se seleccionaron los clones con un bajo nivel de expresión, condición que evita la presencia de falsos positivos en la purificación TAP. Una de las líneas expresa la forma salvaje de ERK5 (ERK5-wt), mientras que la otra expresa el fragmento N-terminal que codifican los primeros 490 residuos y que contiene el dominio quinasa (aa. 54-346). Posteriormente, se realizaron dos cromatografías secuenciales en condiciones suaves para preservar la integridad de las interacciones y los productos purificados se separaron en geles de poliacrilamida LDS-PAGE (**Figura 19.A**). Después de teñir las proteínas, cada una de las bandas visualizadas fue cortada, procesada e identificada mediante espectrometría de masas (nLC-MS/MS). En la **Figura 19.B** se detallan las proteínas identificadas junto a la puntuación del análisis de masas (*score*, relevante si >60), el número de péptidos identificados y el porcentaje de la secuencia de la proteína que representan estos péptidos. Estos resultados han sido descritos y discutidos en la memoria de Tesis Doctoral de Ana Maria Moreno (Tesis UAB 2009)

En total se identificaron 12 proteínas que interaccionan con las dos formas de ERK5, lo que indica que estas interacciones se dan a través de los primeros 490 residuos de ERK5, probablemente a través del dominio quinasa. Cuatro de las proteínas identificadas corresponden a las isoformas de la proteína 14-3-3 δ , γ , η , ϵ cuya interacción con ERK5 ha sido descrita por otros autores (Zheng et al., 2004), lo que valida el uso del TAP como una correcta aproximación para la identificación de proteínas que interaccionan con ERK5.

Las proteína identificada con la puntuación más alta y un mayor porcentaje de péptidos secuenciados cubiertos (33% en el caso de ERK5-wt y 55% para ERK5-Nterm) fue la forma β de la chaperona *Heat shock protein 90* (Hsp90 β), por lo que se decidió proceder a su estudio. En primer lugar se diseñaron experimentos con la finalidad de validar *in vivo* la putativa interacción de ERK5 con Hsp90 β . Para ello se realizaron experimentos de inmunoprecipitación de ERK5 o Hsp90 β de células SH-SY5Y, y se observó que ambas proteínas co-inmunoprecipitan (**Figura 20.A**). En su conjunto estos resultados muestran que ERK5 y Hsp90 forman un complejo *in vivo*. En paralelo se transfectaron células HEK293 con vectores que codifican para Hsp90 y ERK5 fusionada a GST, que fueron utilizadas para purificar la GST-ERK5 en resina de afinidad glutatión-*Sepharose*. La **Figura 20.B** muestra la presencia de Hsp90 en los

precipitados de GST-ERK5 y, por tanto, que ambas proteínas sobre-expresadas también interactúan en la célula.

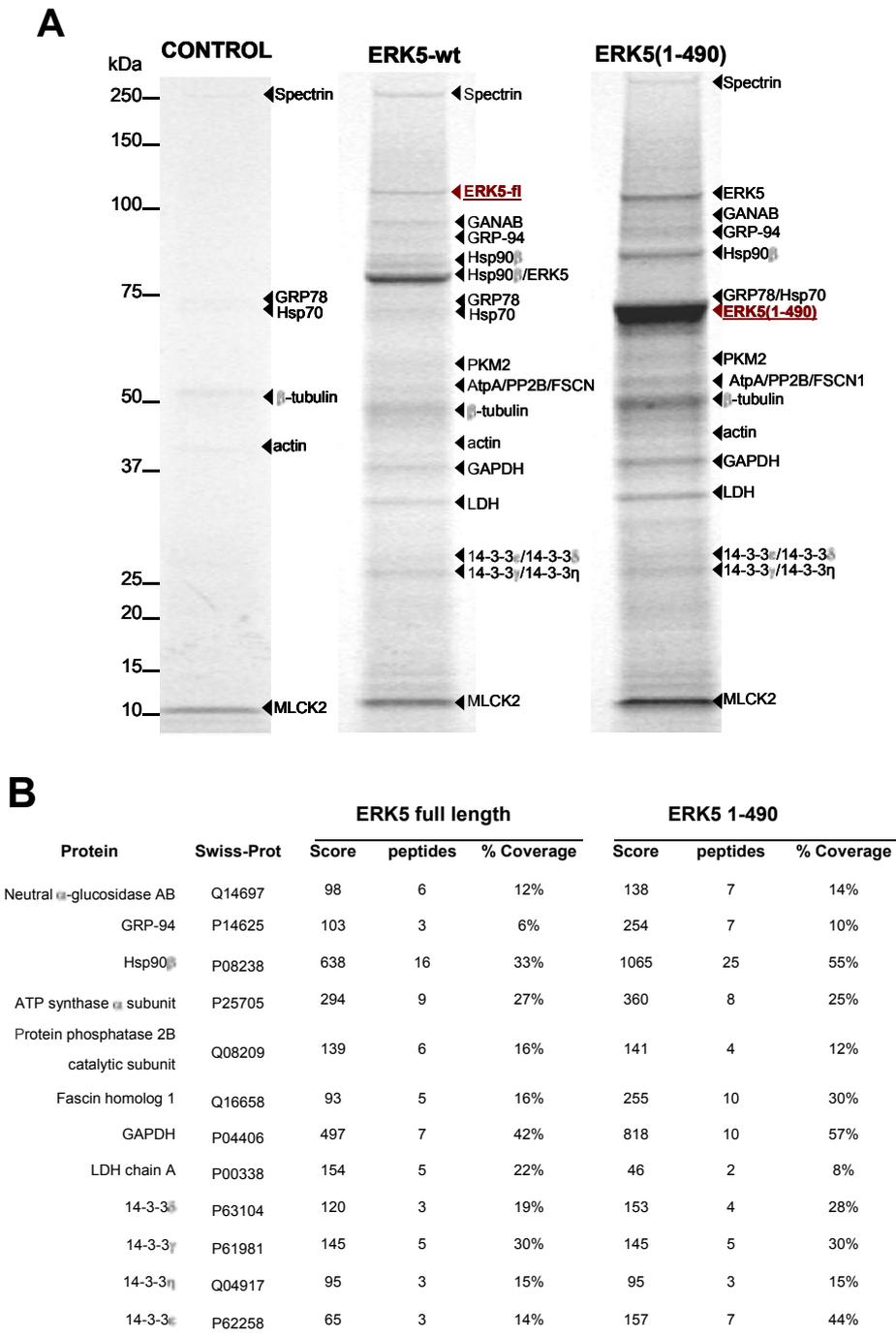


Figura 19. Identificación de las proteínas que interactúan con ERK5 mediante purificación de afinidad en tandem (TAP). (A) Se utilizaron células SH-SY5Y que expresan establemente el vector control TAP vacío, ERK5 salvaje (wt) y ERK5 N-terminal (ERK5 1-490). Las proteínas purificadas fueron resueltas en geles de poliacrilamida 4-12% LDS-NuPAGE y visualizadas por tinción *Colloidal Coomassie Blue*. Cada banda visualizada fue recortada, tripsinizada y analizada por espectrometría de masas (nLC-MS/MS). Las proteínas cebo utilizadas (ERK5 salvaje y

ERK5 N-terminal 1-490) se muestran subrayadas. **(B)** Resumen de los resultados del análisis por espectrometría de masas. GANAB, neutral alpha-glycosidase antibody; GRP-94, glucose-regulated protein 94; GRP-78, glucose-regulated protein 78; AtpA, ATP synthase alpha; PP2B, protein phosphatase 2B catalytic subunit; FSCN1, fascin homolog 1; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; LDH, l-lactate dehydrogenase; MLCK2, skeletal myosin light-chain kinase 2. La tabla muestra la referencia de cada proteína en la base de datos Swiss-Prot, el score (Mascot score), donde un valor > 70 es considerado significativo. El número de péptidos encontrados de esa proteína, el tanto por ciento del total de la proteína que representan los péptidos encontrados. Figura extraída de la tesis doctoral de Ana Moreno Iglesias (UAB).

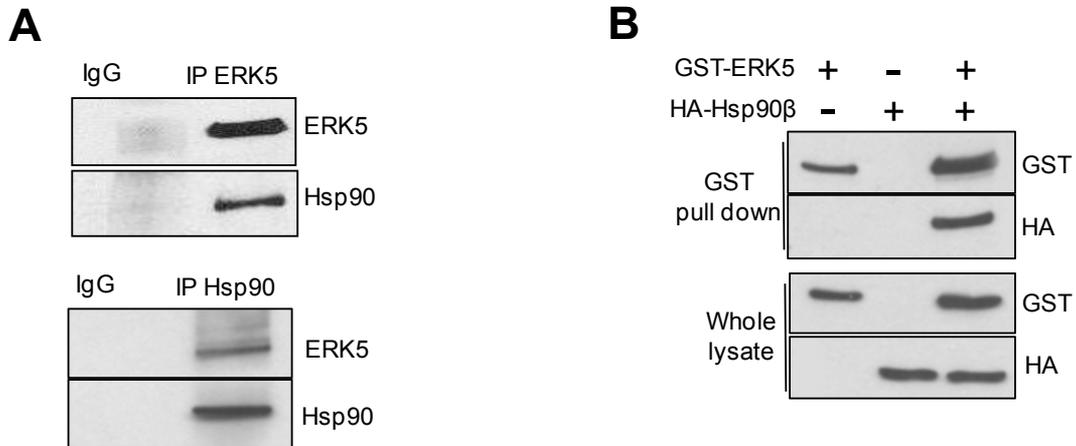


Figura 20. ERK5 interacta con Hsp90β **(A)** Co-immunoprecipitación de las proteínas ERK5 y Hsp90 endógenas. 1 mg de extracto de células SH-SY5Y fue inmunopurificado con los anticuerpos anti-ERK5 o anti-Hsp90 y los inmunoprecipitados analizados mediante inmunoblot para ambas proteínas. **(B)** Células HEK-293T fueron transfectadas con vectores de expresión que codifican para GST-ERK5 y HA-Hsp90β y los lisados (250 μg de proteína) fueron purificados en resina de afinidad glutatión-*Sepharose*, según el protocolo descrito en Material y Métodos. Los complejos precipitados se analizaron mediante inmunoblot utilizando los anticuerpos anti-GST (ERK5) y anti-HA (Hsp90β). En paralelo se analizó el nivel de expresión de cada proteína mediante inmunoblot (paneles inferiores, *whole lysate*). Se obtuvieron resultados similares en 3 experimentos independientes.

La inhibición de Hsp90 induce la ubiquitinación y degradación proteosomal de ERK5.

Para confirmar si ERK5 es una quinasa cliente de Hsp90β y para establecer el papel de esta chaperona sobre la estabilidad de ERK5 se trataron células con inhibidores de Hsp90 Geldanamicina (GA) y Radicolol (RAD), y se evaluó los niveles de expresión de la ERK5 celular. Los miembros de la familia Hsp90 regulan el plegamiento y la maduración de multitud de proteínas en un proceso que requiere ATP (Pearl and Prodromou, 2006; McClellan et al., 2007). Estos compuestos inhiben la acción chaperona de las Hsp90 al bloquear competitivamente el centro de unión del ATP, lo que resulta en el bloqueo del proceso de plegamiento de las proteínas clientes, su mal plegamiento y degradación en el proteosoma (Prodromou et al., 1997). Por ello estos compuestos son una herramienta de gran utilidad en la identificación de proteínas clientes de Hsp90 (Basso et al., 2002).

Los experimentos se llevaron a cabo en dos líneas celulares humanas diferentes, HeLa y SH-SY5Y. Las células se trataron con diferentes concentraciones de GA y RAD (0.1 -10 μM) durante 24 horas y se

determinaron mediante inmunoblot los niveles de expresión de ERK5 y de ERK1/2. Las proteínas ERK1/2 fueron utilizadas como control negativo, dado que a pesar presentar una elevada homología con ERK5, no son proteínas clientes de Hsp90. La incubación de las dos líneas celulares con ambos inhibidores durante 24 horas provocó una disminución en los niveles celulares de ERK5 de una manera dosis-dependiente (**Figura 21.A**), observándose una pérdida total de la expresión a una concentración de 5 μM . Como control se muestran que los niveles de ERK1/2 no se vieron afectados por la exposición de las células a ambos compuestos. A continuación se realizó una cinética en el tiempo utilizando una concentración de 5 μM para cada compuesto, concentración que induce la completa pérdida de expresión de ERK5 a las 24 horas. La **Figura 21.B** que 5 μM Radicol induce la pérdida completa de la expresión de ERK5 a las 8 horas, mientras que en el caso de la Geldanamicina es necesario un tiempo de incubación de 24 horas.

En su conjunto estos resultados muestran por primera vez que ERK5 humana es una proteína cliente de Hsp90 y que requiere de esta chaperona para su estabilidad.

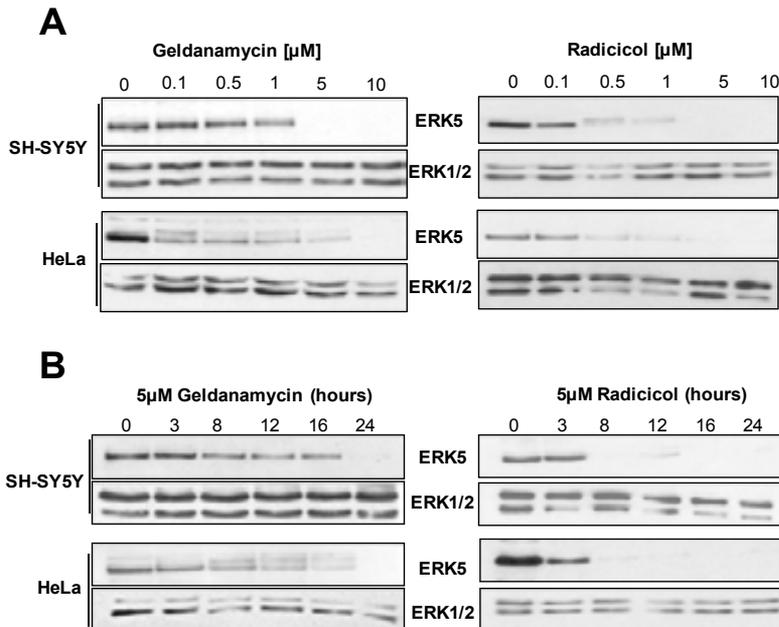


Figura 21. La inhibición de Hsp90 induce la degradación de ERK5. (A) Células HeLa y SH-SY5Y fueron tratadas con las concentraciones indicadas de los inhibidores de Hsp90, Geldanamicina (GA) o Radicol (RAD). Después de 24 horas se evaluó mediante inmunoblot los niveles de expresión de ERK5 y ERK1/2 endógenas. **(B)** Células HeLa y SH-SY5Y fueron tratadas con GA o RAD 5 μM , y a los tiempos indicados las células fueron lisadas y los niveles de las proteínas ERK5 y ERK1/2 analizados mediante inmunoblot. Se obtuvieron resultados similares en 3 experimentos independientes.

Como se ha indicado, la inhibición de la actividad Hsp90 resulta en un plegamiento incorrecto de sus proteínas clientes y su posterior degradación celular. Esta degradación puede darse a través de alguno de los sistemas proteolíticos celulares. La mayor parte de las proteínas intracelulares son degradadas en el proteosoma, después de ser modificadas por la ubiquitina (*Ubiquitin Proteasome Pathway*), aunque también existen otras proteasas (calpaínas y caspasas) que pueden llevar a cabo esta función, e incluso pueden ser degradadas en los lisosomas (Lecker et al., 2006).

Para determinar qué vía de degradación celular era la responsable de la pérdida de expresión de ERK5 inducida en respuesta a la inhibición de Hsp90, se evaluó el efecto de diferentes compuestos sobre la pérdida de expresión de la ERK5 de células tratadas con geldanamicina. Específicamente, se evaluó los efectos de los inhibidores del proteosoma (MG-132), de calpaínas (MDL-128), de caspasas (ZVAD) y de la función lisosomal (NH₄Cl). Células SH-SY5Y fueron sometidas a un pre-tratamiento de 3 horas con cada uno de estos inhibidores, previo al tratamiento con Geldanamicina por 24 horas. Las células fueron lisadas en tampón de lisis 1% Nonidet P-40 (NP-40), centrifugadas y la fracción insoluble (*pellet*) NP-40 (*pellet*) fue solubilizada en tampón 1% SDS. En la **Figura 22** se observa que el tratamiento con Geldanamicina disminuye los niveles de expresión de ERK5 y que el pre-tratamiento con el inhibidor del proteosoma MG-132 provoca la acumulación de ERK5 en la fracción insoluble (*pellet*), mientras que la inhibición de calpaínas, caspasas o de la función lisosomal no previno la degradación de ERK5 inducida por Geldanamicina.

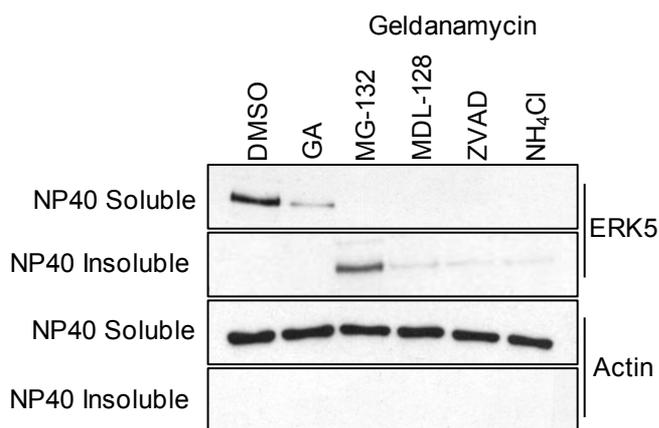


Figura 22. La pérdida de expresión de ERK5 inducida por la inhibición de Hsp90 es dependiente del proteosoma. Células SH-SY5Y fueron pretratadas 3 h con 20 μ M MG-132 (inhibidor del proteosoma), 10 μ M MDL-28170 (inhibidor de calpaínas), 10 μ M Z-VAD (inhibidor de caspasas) o 20 mM NH₄Cl (inhibidor de la función lisosomal), seguido de tratamiento de 24 horas con 5 μ M Geldanamicina. Las células se lisaron en tampón NP-40 1% y se centrifugaron a 12000 g 12 min. El pellet (fracción NP-40 insoluble) se resuspendió en 1% SDS. Los niveles de ERK5 y actina de las fracciones soluble e insoluble se evaluaron por inmunoblot. Se obtuvieron resultados similares en 3 experimentos independientes.

Los resultados obtenidos se ajustan a lo descrito para otras proteínas cliente de Hsp90, para que las que se ha descrito que la inhibición de esta chaperona induce el mal plegamiento de sus proteínas cliente, su ubiquitinación y degradación proteosomal (Basso et al., 2002; Prince et al., 2005; Grbovic et al., 2006).

Por ello, a continuación se diseñaron experimentos con la finalidad de detectar formas de ERK5 ubiquitinadas previo a su degradación en el proteosoma.

Se utilizaron células HEK-293T, que fueron transfectadas con plásmidos que codifican para las proteínas FLAG-ERK5 y HA-ubiquitina y tratadas con Geldanamicina y/o MG-132 durante 24 horas. ERK5 fue inmunoprecipitada y la especie ubiquitinadas fueron visualizadas mediante la tinción de los inmunoprecipitados con anticuerpo anti-ubiquitina. La **Figura 23.A** muestra el típico patrón de ubiquitinación, que consiste en la acumulación de bandas de ERK5 de migración lenta (formas ubiquitinadas) cuando las células fueron tratadas con Geldanamicina y MG-132 y que co-expresan ambas proteínas. La **Figura 23.B** muestra el experimento análogo, en donde se sobre-expresaron las proteínas FLAG-ERK5 y His-ubiquitina, se purificó en resina de afinidad (Niquel-agarosa) la ubiquitina sobre-

expresada y se detectó la presencia de ERK5 en los precipitados mediante inmunoblot. La incubación de las células con el inhibidor del proteosoma resultó en una discreta ubiquitinación de ERK5, que aumentó claramente con el tratamiento combinado de inhibición de Hsp90 y proteosoma.

Estos resultados muestran por primera vez que la inhibición de Hsp90 resulta en la ubiquitinación de ERK5.

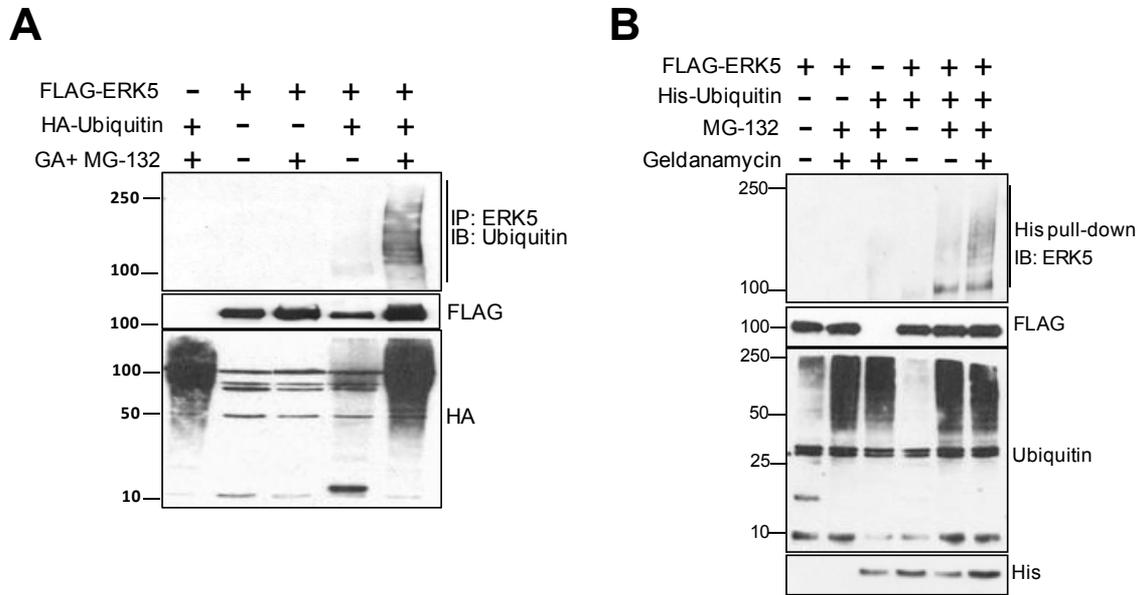


Figura 23. La inhibición de Hsp90 induce la ubiquitinación de ERK5 (A) Células HEK-293T fueron transfectadas con los vectores de expresión para FLAG-ERK5 y/o HA-Ubiquitina. En los casos indicados, las células fueron tratadas 3 horas con GA y 24 horas con el inhibidor MG-132. Las muestras fueron lisadas en tampón RIPA, comprobados los niveles de transfección con anti-FLAG y anti-HA (inmunoblots de paneles medio e inferior), y ERK5 sobre-expresada fue inmunoprecipitada con resina de agarosa con anticuerpo anti-FLAG-ERK5, según descrito en Material y Métodos. La ubiquitinación de ERK5 fue monitorizada mediante inmunoblot de los inmunoprecipitados, utilizando anticuerpo anti-Ubiquitina (panel superior). **(B)** Células HEK-293T fueron transfectadas con vectores de expresión para FLAG-ERK5 y/o His-Ubiquitina y tratadas con MG-132 y/o Geldanamicina. Las células fueron lisadas en condiciones desnaturalizantes y las especies ubiquitinadas (marcadas con cola de 6xHis) fueron purificadas mediante resina de Nickel-agarosa y analizadas para ERK5 mediante inmunoblot (panel superior). Los paneles inferiores muestran los niveles de expresión de FLAG-ERK5, Ubiquitina total y Ubiquitina sobre-expresada (His). Se obtuvieron resultados similares en 2 (A) o 3 (B) experimentos independientes.

Con el fin de identificar la región de ERK5 que sufre ubiquitinación, se sobre-expresó en células HEK293T formas de ERK5 fusionadas a GST y que codifican para la mitad N-terminal (aa 1-490, que contiene el dominio quinasa) o C-terminal (aa. 401-816), en combinación con una forma de ubiquitina fusionada a una cola de 6 histidinas (His-Ubiquitina). Las proteínas celulares ubiquitinadas se purificaron en resina de afinidad (Ni^{2+} -agarosa), y se determinó la presencia de ERK5 en los precipitados mediante inmunoblot, utilizando un anticuerpo anti-GST. En respuesta a la inhibición del proteosoma, solo se detectaron las típicas formas ubiquitinadas para la mitad N-terminal de ERK5, y éstas no aumentaron en respuesta al tratamiento combinado de MG-132 y Geldanamicina (**Figura 24**). Este resultado indica que es en la mitad N-terminal donde se ubiquitina ERK5.

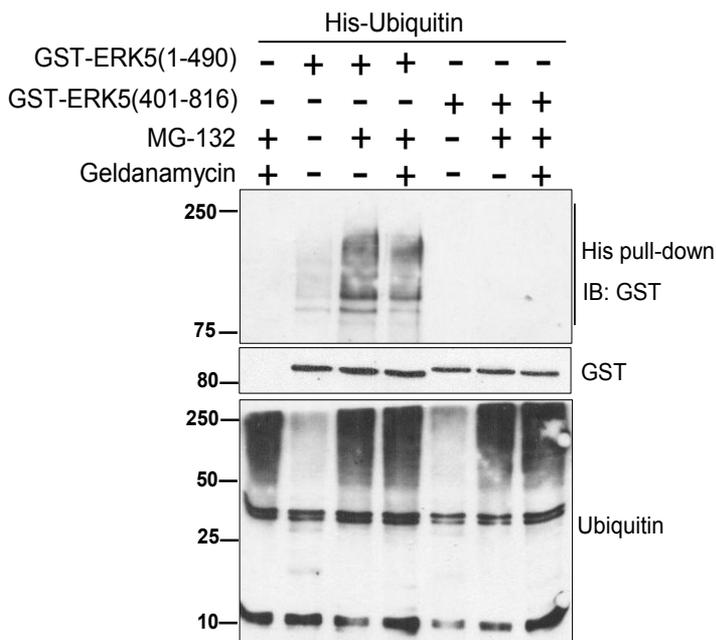


Figura 24. ERK5 sufre ubiquitinación en su mitad N-terminal (dominio quinasa). Células HEK293T que sobreexpresan las formas N-term (1-490), C-term (401-816) de ERK5 fusionadas a GST, y/o His-Ubiquitina, fueron tratadas con MG-132 y/o Geldanamycin. Las células fueron lisadas en condiciones desnaturalizantes y las especies ubiquitinadas (marcadas con cola de 6xHis) fueron purificadas mediante resina de Nickel-agarosa y analizadas para ERK5 mediante inmunoblot con anticuerpo anti-GST (panel superior). Los paneles inferiores muestran los niveles de expresión de GST-ERK5 y ubiquitina total. Se obtuvieron resultados similares en 3 experimentos independientes.

1.2 ERK5 Hsp90 β y Cdc37 interaccionan y forman un complejo trimérico *in vivo*.

Como se mencionó en la Introducción, la co-chaperona Cdc37 asiste a Hsp90 durante el plegamiento de proteínas quinasas, facilitando la interacción entre la quinasas cliente y Hsp90 (Kimura et al., 1997). Para comprobar si este era el caso para ERK5, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación de las proteínas endógenas de diferentes líneas celulares y extractos de tejido, en los que se inmunoprecipitó cada proteína y se detectó la presencia de las otras dos proteínas en los inmunoprecipitados mediante inmunoblot. La **Figura 25.A** muestra que tanto al inmunoprecipitar ERK5, Hsp90 o Cdc37 de células SH-SY5Y en todos los casos se detectó la presencia de las 3 proteínas en los correspondientes inmunoprecipitados, pero no en los correspondientes controles en los que no se incluyó el anticuerpo. Se obtuvieron idénticos resultados se obtuvieron al utilizar extractos de células HeLa o de tejido cerebral de rata (**Figura 25.B**), y en su conjunto muestran que ERK5, Cdc37 y Hsp90 interaccionan y forman un complejo trimérico *in vivo*.

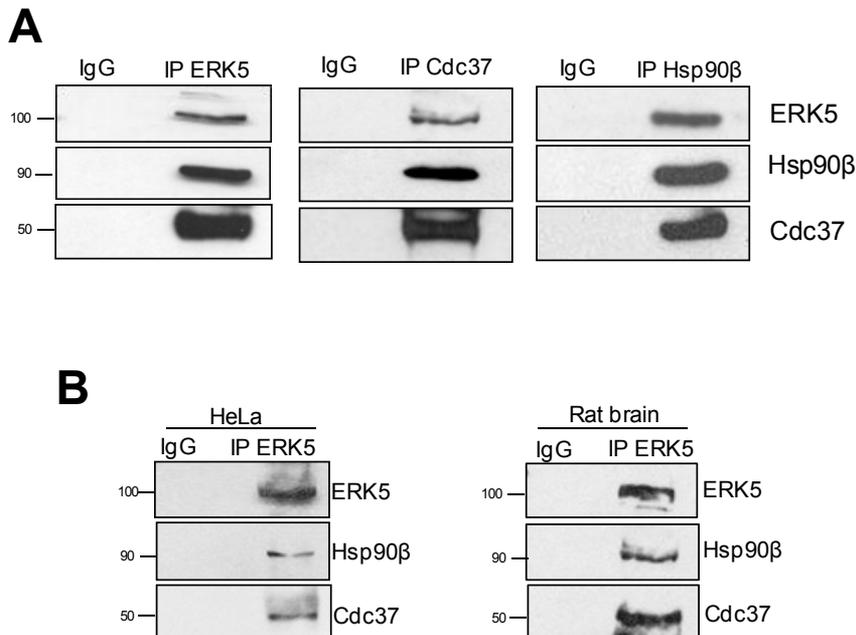


Figura 25. Las proteínas endógenas ERK5, Hsp90β y Cdc37 forman un complejo trimérico. (A) 1 mg de proteína de células SH-SY5Y fue inmunoprecipitado con anticuerpo anti-ERK5, anti-Cdc37 o anti-Hsp90, y se analizó mediante inmunoblot la presencia de cada proteína en los inmunoprecipitados. Como control se incubaron lisados celulares con resina proteína G-*Sepharose* sin anticuerpo (IgG). **(B)** 0.5 mg de extracto de cerebro de rata y de células HeLa fueron inmunopurificados con anticuerpo anti-ERK5, y la presencia de ERK5, Hsp90 y Cdc37 en los inmunoprecipitados fue analizada mediante inmunoblot. Se obtuvieron resultados similares en 4 (A) o 3 (B) experimentos independientes.

Habiendo establecido que ERK5 interactuaba con el complejo de chaperonas Hsp90β/Cdc37 a continuación se procedió a determinar cuál era la región de ERK5 involucrada en esta unión. Como se ha mencionado en la Introducción, ERK5 posee un dominio quinasa en su extremo N-terminal (aa. 54-346), mientras que la cola C-terminal contiene un dominio de transactivación transcripcional. Para ello se utilizaron células HEK293, que fueron transfectadas con vectores de expresión que codifican para las formas de ERK5 fusionadas a GST salvaje (aa. 1-816), N-terminal (aa. 1-490) y C terminal (aa. 401-816), en ausencia y/o en combinación con vectores que codifican para Cdc37 y Hsp90β, y después de precipitar ERK5 o Cdc37 en resina Ni²⁺-agarosa o con anticuerpo anti-Cdc37, la presencia de las proteínas en fue analizada mediante inmunoblot. En el caso de ERK5 salvaje se observó la presencia de las tres proteínas en los precipitados, tanto al precipitar ERK5 como Cdc37, lo que indican que las ERK5, Cdc37 y Hsp90 recombinantes también interactúan en la célula (**Figura 26.A**). En un experimento análogo en el que se precipitó la forma N-terminal de ERK5 también se observó la formación del complejo ternario con Cdc37 y Hsp90 (**Figura 26.B**), mientras que no se la presencia de las chaperonas al precipitar la forma C-terminal de ERK5, a pesar de que Cdc37 y Hsp90 sí que interactuaban (**Figura 26.C**).

Estos resultados indican que tanto Hsp90 como Cdc37 interaccionan con la mitad N-terminal de ERK5, probablemente a través de su dominio quinasa, tal y como se ha descrito para las proteínas quinasas clientes de Hsp90 y Cdc37 (Citri et al., 2006)

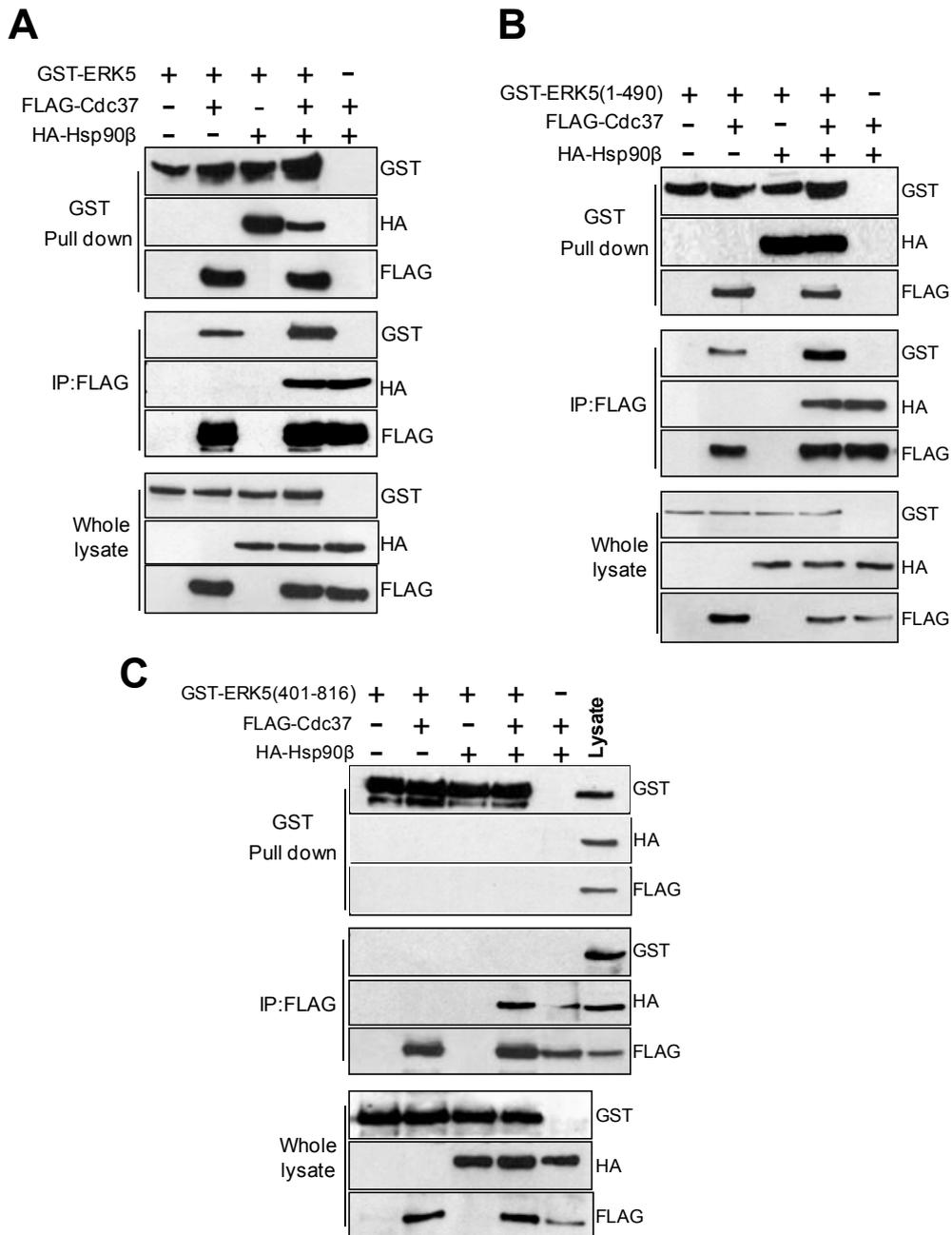


Figura 26. Cdc37 y Hsp90 β se unen al dominio N-terminal de ERK5. Células HEK-293T fueron transfectadas con 1 μ g de cada vector de expresión que codifica para HA-Hsp90 y/o FLAG-Cdc37 y/o GST-ERK5 salvaje (**A**) la forma de ERK5 N-terminal (**B**) o C-terminal (aa. 401-816). Las proteínas ERK5 y Cdc37 sobre-expresadas fueron purificadas mediante resina glutatión-*Sepharose* o proteína G-*Sepharose* unida a anticuerpo anti-FLAG, respectivamente, y la presencia en los inmunoprecipitados de las proteínas indicadas fue analizada mediante inmunoblot. Los paneles inferiores (*whole lysate*) muestran los niveles de expresión para cada proteína. Se obtuvieron resultados similares en 3 experimentos independientes.

Dado que Cdc37 juega un rol esencial en el reclutamiento de Hsp90 hacia la proteína sintetizada, por lo que media en el papel que juega Hsp90 en el plegamiento y estabilidad de la proteína cliente (Roe et al., 2004), a continuación se procedió a evaluar el efecto que tiene el silenciamiento de Cdc37 en la estabilidad de ERK5. Para ello se utilizó una mezcla comercial de 5 siRNA que codifican para distintas regiones de Cdc37, que fue transfectada en células HeLa, y se monitorizó los niveles de expresión de las proteínas objeto de estudio a diferentes días post-transfección.

La **Figura 27** muestra que se alcanzó un 90% de silenciamiento de Cdc37 a los 4 días post-transfección y de un 100% a los 5 días, y coincide con el grado de silenciamiento de ERK5 y Akt, una proteína previamente descrita como cliente de Cdc37 (Basso et al., 2002). Como control se muestra que el silenciamiento de Cdc37 no afectó a las proteínas Hsp90 β o ERK1/2.

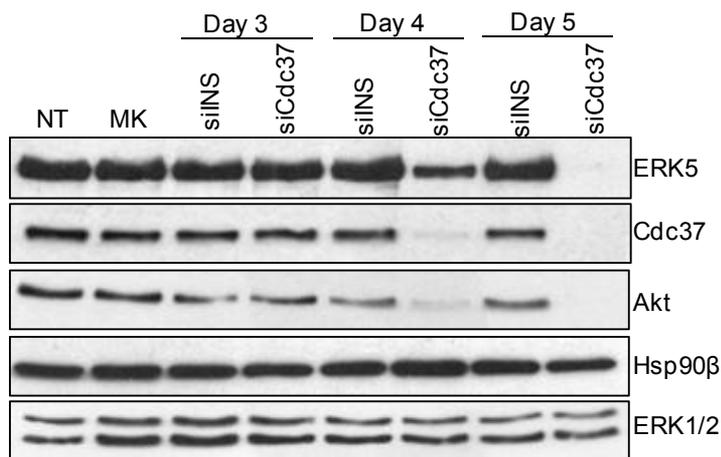


Figura 27. El silenciamiento de Cdc37 resulta en la pérdida de la expresión de ERK5. Células HeLa fueron transfectadas con 1 μ g de una mezcla de 5 siRNA codificantes para Cdc37 humana (siCdc37) o un siRNA inespecífico (siINS). MK (control) corresponde a células tratadas con el vehículo de transfección Lipofectamina. NT, células no transfectadas. A los días indicados las células fueron lisadas en 1% SDS y los niveles de expresión de las proteínas indicadas fueron analizados mediante inmunoblot. Se obtuvieron resultados similares en 3 experimentos independientes.

1.3 La activación de ERK5 induce la disociación de Hsp90 del complejo ERK5-Cdc37, mediante un mecanismo que requiere la autofosforilación de la cola C-terminal de ERK5.

Se ha descrito que algunas proteínas cliente de Hsp90 se disocian de esta chaperona después de su activación. Este el caso de los receptores de esteroides, que requieren de la estabilización de Hsp90 en su forma inactiva pero que la unión al ligando/hormona resulta en su activación y disociación de Hsp90. Esta pérdida de interacción con Hsp90 es fundamental para que se den los cambios conformacionales necesarios que permiten la translocación nuclear del receptor y la activación de la transcripción, como ellos el desenmascaramiento de la señal de localización nuclear y del dominio de unión a DNA (Pratt and Toft, 1997). Por ello, a continuación se evaluó si este era también el caso para ERK5.

Los experimentos en donde se evaluó el complejo ternario ERK5-Cdc37-Hsp90 fueron realizados en células HeLa estimuladas con el factor de crecimiento epidérmico (EGF), un activador de la vía MEK5-ERK5. Las células fueron estimuladas a diferentes tiempos, y se evaluó el complejo trimérico endógeno mediante la inmunoprecipitación de ERK5 y detección de Hsp90 y Cdc37 mediante inmunoblot. La activación producida por el tratamiento con EGF 15 y 30 min fue monitorizada mediante el uso de un anticuerpo que reconoce la fosforilación por MEK5 del motivo TEY del *T-loop* de ERK5 (pERK5) y por el característico retraso en la movilidad electroforética que presenta ERK5 una vez autofosforilada (panel superior, **Figura 28**). Tal y como se ha descrito arriba, la ERK5 basal interacciona con Hsp90 y Cdc37. Sin embargo, ERK5 activa co-precipitó con Cdc37 pero no con Hsp90, lo que sugiere que la activación de ERK5 resulta en la disociación de Hsp90 del complejo ERK5-Cdc37 (**Figura 28**). Los paneles de la derecha muestran que la activación de Akt por EGF (monitorizada mediante inmunoblot del *hydrophobic motif* pSer473) no resultó en la disociación de Hsp90 del complejo Akt-Cdc37 (**Figura 28**). Hasta nuestro conocimiento, esta es la primera que se describe que la activación de una MAP quinasa o quinasa relacionas resulta en la disociación de Hsp90, tal y como ocurre para el receptor de glucocorticoides o el de andrógenos.

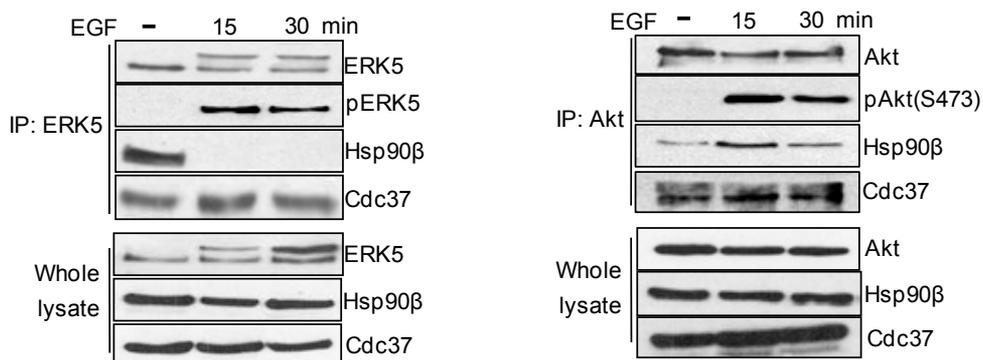


Figura 28. La activación de ERK5 por EGF induce la disociación de Hsp90 del complejo ERK5-Cdc37. Células HeLa fueron deprivadas de suero durante 16 horas y estimuladas con EGF 20 ng/ml durante 15 y 30 min. 1 mg de cada lisado celular fue inmunoprecipitado con anticuerpo anti-ERK5 (paneles de la izquierda) y con anticuerpo anti-Akt (paneles de la derecha), y la presencia de las proteínas indicadas en los inmunoprecipitados fue analizada mediante inmunoblot. Los paneles inferiores (*whole lysate*) muestran los niveles de expresión para cada proteína. Se obtuvieron resultados similares en 3 experimentos independientes.

En el apartado anterior se mostró que la inhibición de Hsp90 induce la ubiquitinación y degradación proteosomal de la ERK5 celular basal.

Dado que la activación de ERK5 por EGF resulta en la disociación de Hsp90, a continuación se planteó la posibilidad de que ERK5 activa fuera insensible a los inhibidores de Hsp90. Para ello se trató a diferentes tiempos con 5 μ M de Radicol células HeLa que sobre-expresaban GST-ERK5 junto con una forma constitutivamente activa de MEK5 humana (MEK5DD, en la que los residuos Ser311 y Ser315 han sido reemplazados por Asp). Este mutante activa específicamente a la ERK5 endógena y recombinante de todas las líneas celulares, lo que se puede corroborar por el retraso electroforético de ERK5 en el correspondiente inmunoblot. Como se ha mostrado anteriormente, la **Figura 29.A** (paneles de la izquierda) la inhibición de Hsp90 induce la pérdida de la expresión de las ERK5 endógena y recombinante. Por el contrario, las formas activas de ERK5 endógena y recombinante son insensibles a la acción del Radicol, a una concentración y tiempo que induce la pérdida de expresión de la Akt celular. Estos resultados corroboran la observación de que la ERK5 activa no une Hsp90 y, en consecuencia, su estabilidad no es afectada por la inhibición de esta chaperona.

Dado que previamente hemos mostrado que el silenciamiento de Cdc37 resulta en la pérdida de expresión de ERK5 celular basal (Figura 27), también se evaluó el efecto del bloqueo funcional de Cdc37 en la estabilidad de las formas de ERK5 endógena basal y activa. El Celastrol, un triterpeno natural con efectos anti-inflamatorio, se une a Cdc37 y rompe la interacción Cdc37-Hsp90 lo que a su vez conduce a la degradación proteosomal de la proteína cliente de Hsp90 (Zhang et al., 2008). La **Figura 29.B** muestra que el tratamiento de células HeLa con 5 μ M de Celastrol durante 16-24 horas induce una drástica disminución en los niveles de expresión de las ERK5 y Akt basales, sin afectar a la expresión de Hsp90 o ERK1/2. Como ocurría para el inhibidor de Hsp90 Radicol, el Celastrol no tuvo efecto alguno sobre los niveles de expresión de la ERK5 activa, a una concentración que indujo la degradación de la Akt celular. En su conjunto estos resultados corroboran que la ERK5 activa celular no une Hsp90 y en consecuencia, es insensible a los inhibidores de Hsp90 y Cdc37 que afectan a la ERK5 basal y otras proteínas clientes de Hsp90.

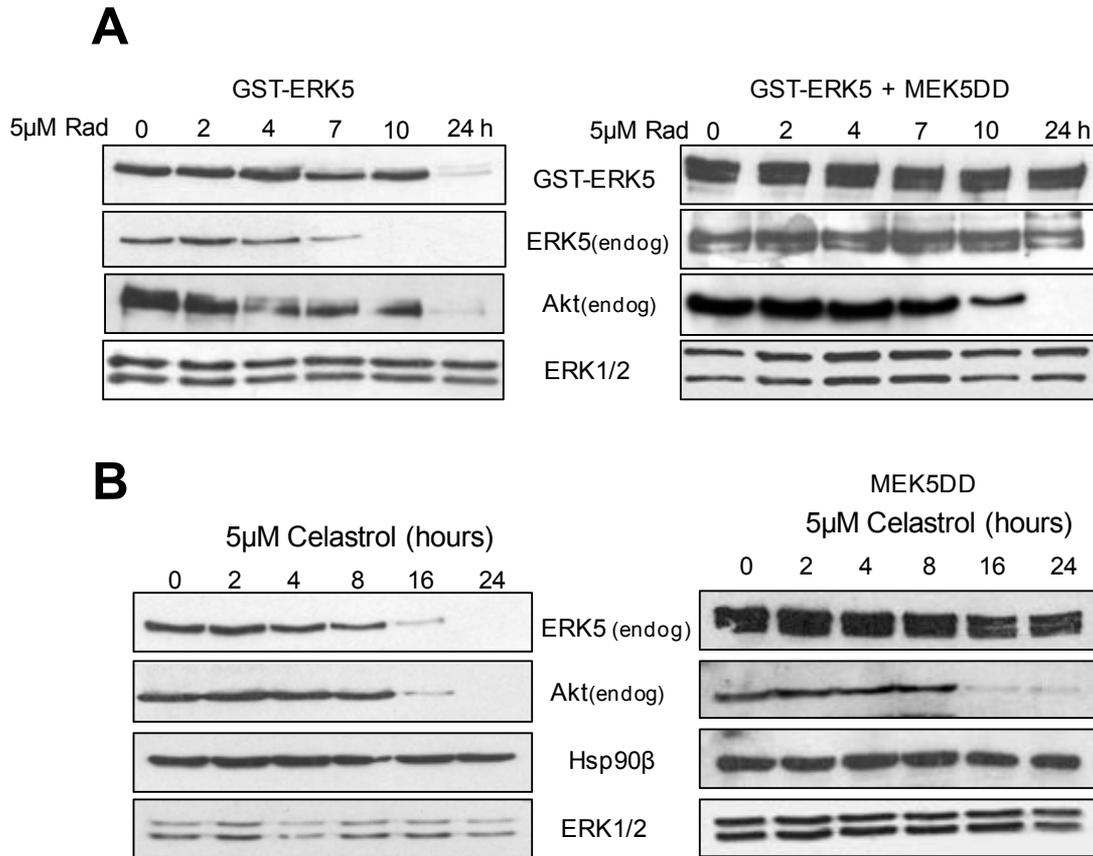


Figura 29. ERK5 activa no es sensible a la inhibición de Hsp90 o Cdc37 (A) Células HeLa que sobreexpresan GST-ERK5 (paneles de la izquierda) o GST-ERK5 y HA-MEK5DD (paneles de la derecha) fueron tratadas con 5 µM de Radicol durante los tiempos indicados, y los niveles de expresión de las proteínas indicadas fue obtenidos mediante ensayo inmunoblot de los correspondientes lisados celulares. **(B)** Células HeLa sin transfectar (paneles de la izquierda) y transfectadas con el vector que codifica para HA-MEK5DD (paneles de la derecha) fueron tratadas con 5 µM Celastrol (inhibidor de Cdc37). A los tiempos indicados, las células fueron lisadas en 1% SDS y los niveles de expresión de ERK5, Akt, Hsp90 y ERK1/2 fueron analizados mediante inmunoblot. Se obtuvieron resultados similares en 3 experimentos independientes.

ERK5 no fosforila a Hsp90 o Cdc37.

Para dilucidar el mecanismo molecular que opera en la disociación de Hsp90 del complejo ERK5-Cdc37 se procedió a evaluar si este proceso era la consecuencia de una fosforilación directa de estas chaperonas por la ERK5 activa. Para comprobarlo, se llevó a cabo un ensayo de actividad quinasa *in vitro* incubando una preparación pura de ERK5 recombinante activa con las proteínas Hsp90 y/o Cdc37 inmunoprecipitadas de extractos celulares, en presencia de ³²P-ATP y magnesio. La **Figura 30** muestra las correspondientes autorradiografía y la tinción Coomassie Blue del ensayo, donde se observa que ERK5 no fosforila a Hsp90 o Cdc37.

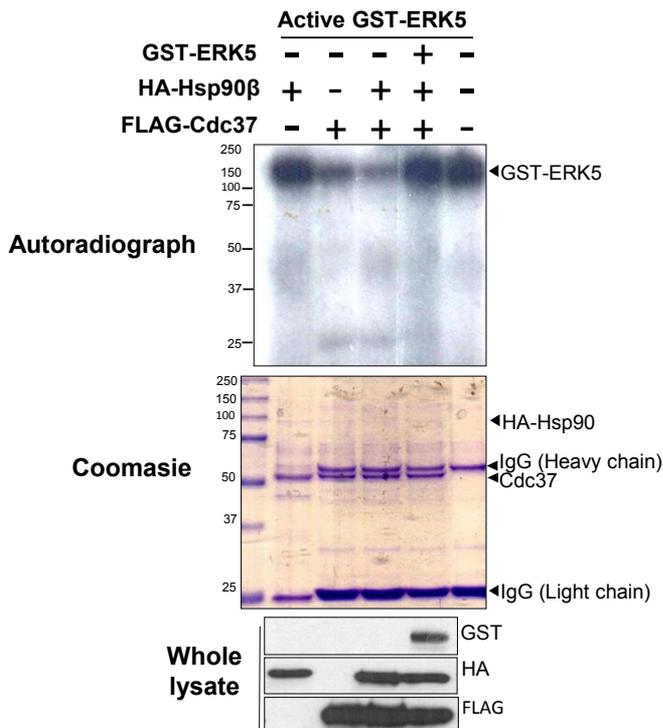


Figura 30. ERK5 no fosforila a Hsp90 β o a Cdc37 *in vitro*. Lisados de células HEK-293T que sobre-expresan vector vacío (-) o las proteínas HA-Hsp90 y/o FLAG-Cdc37 fueron utilizados para inmunoprecipitar Hsp90 (resinas de anti-HA agarosa, carril 1) o Cdc37 (resina anti-FLAG agarosa, carriles 2-4). Los inmunoprecipitados fueron incubados con 1 μ g de GST-ERK5 activa pura, 10 mM de acetato de magnesio y 200 μ M [γ - 32 P]-ATP (1000 cpm/pmol) durante 1 hora a 30°C. Las proteínas fueron resueltas por SDS-PAGE, visualizadas por tinción Coomassie Blue (panel central) y el 32 P incorporado fue detectado por autorradiografía (panel superior). Los niveles de transfección fueron verificados por inmunoblot (*whole lysate*). Resultados análogos se obtuvieron en dos experimentos independientes

La disociación de Hsp90 y la translocación nuclear de ERK5 requieren la autofosforilación de la cola C-terminal de ERK5.

A continuación se estudió si la disociación de Hsp90 requería de la actividad quinasa de ERK5, para lo que se utilizó una forma mutada que carece de actividad catalítica. Esta forma (D200A) puede ser fosforilada en el motivo TEY por MEK5, pero dado que el ácido aspártico 200 del centro activo necesario para la coordinación del magnesio acomplejado al ATP ha sido sustituido por alanina, esta forma carece de actividad catalítica. Se realizó un experimento en el que las formas salvaje y catalíticamente inactivas de ERK5 fueron co-transfectadas en células con o sin MEK5DD. Posteriormente se precipitó ERK5 y se determinó la presencia de Hsp90 en los inmunoprecipitados. Como ocurre para la proteína endógena, la activación de la ERK5 sobre-expresada resulta en la disociación de Hsp90. Sin embargo Hsp90 permanece unida a la forma catalíticamente inactiva (ERK5-D200A) después de su activación (**Figura 31.A**). Este resultado permite concluir que la actividad quinasa de ERK5 media en la pérdida de la interacción con Hsp90.

En el experimento anterior la MEK5 constitutivamente activa (MEK5DD) sobre-expresada fosforila las dos formas de ERK5 en el motivo TEY, pero tan solo en la forma salvaje se observa el retraso electroforético. Este retraso se produce debido a la autofosforilación de ERK5 en la región C-terminal. Por lo tanto nos planteamos la posibilidad de que a pesar de que la interacción de ERK5 con las chaperonas se efectuó a través del dominio quinasa, sea la autofosforilación del dominio C-terminal y el consecuente cambio conformacional de esta región la que provoque la disociación de Hsp90. Para demostrar esto, se determinó si en la fosforilación de la forma de ERK5 que solo contiene el dominio quinasa también se

produce la disociación de Hsp90. En la **Figura 31.B** se muestra que la co-expresión de MEK5DD con la forma N-terminal de ERK5(1-490) resulta en la fosforilación del motivo TEY pero no en la disociación de Hsp90. Es decir, se requiere la presencia del dominio C-terminal de ERK5 para que ocurra la disociación de Hsp90.

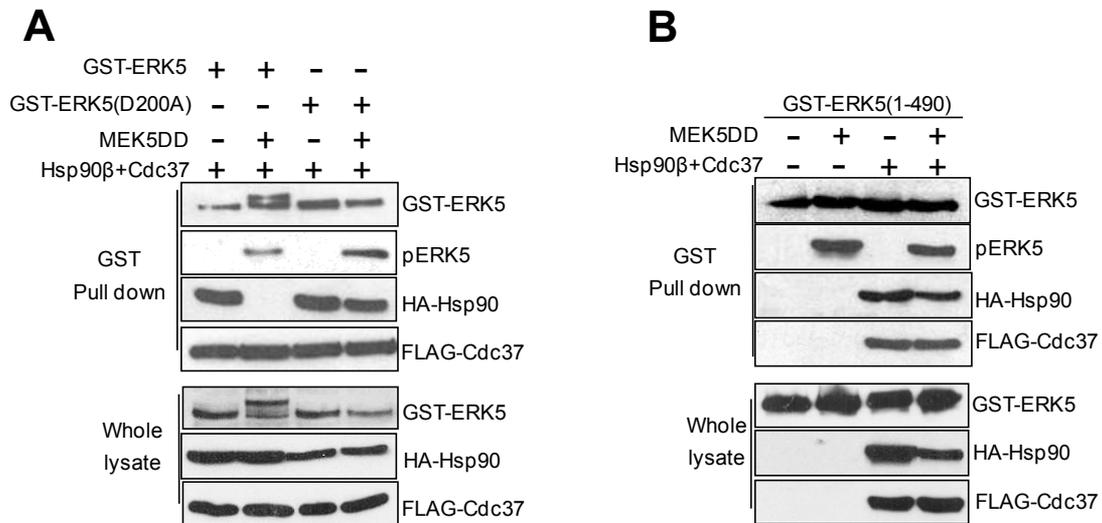


Figura 31. La actividad quinasa de ERK5 y su dominio C-terminal son requeridos en la disociación de Hsp90 del complejo ERK5-Cdc37. Células Hela fueron transfectadas con los vectores de expresión indicados (ERK5-D200A, mutante sin actividad quinasa). Se utilizaron 250 µg de proteína para purificar en resina de afinidad *glutatión-Sepharose* las diferentes formas de ERK5 fusionadas a GST, y los complejos purificados fueron visualizados mediante inmunoblot utilizando los anticuerpos indicados. Los paneles inferiores (*whole lysate*) muestran los niveles de expresión para cada proteína. Se obtuvieron resultados similares en 3 experimentos independientes.

La fosforilación de ERK5 por MEK5 induce la actividad quinasa de ERK5, y esto conlleva la autofosforilación en varios residuos en el dominio C-terminal, su translocación al núcleo y la activación de la transcripción inducida por ERK5. En el modelo propuesto por Kondoh y Nishida ampliamente aceptado, en estado basal (no activa) ERK5 se encontraría en conformación plegada gracias a la interacción de la cola C-terminal con la mitad N-terminal, de manera que el motivo NLS quedaría escondido. En respuesta a la activación por MEK5, la autofosforilación de ERK5 en su cola C-terminal provocaría la apertura de la estructura, la exposición del motivo NLS y la consecuente translocación nuclear. (Kondoh et al., 2006). Para estudiar el rol de la autofosforilación de la cola C-terminal de ERK5 en la disociación de Hsp90, se utilizaron mutantes de ERK5 en los cuales cinco de los residuos autofosforilados de la cola C-terminal (S⁵⁶⁷, S⁷²⁰, S⁷³¹, T⁷³³ y S⁸⁰⁶) han sido sustituidos por alanina para prevenir su fosforilación (ERK5-5A), o a ácido glutámico para mimetizar la fosforilación (ERK5-5E). En primer lugar, se caracterizó la localización subcelular de estos mutantes mediante microscopía de fluorescencia. Como se ha descrito previamente (Inesta-Vaquera et al., 2010) el mutante ERK5(5A) presenta una localización citosólica y la sobre-expresión de MEK5DD no indujo su translocación nuclear, mientras que el mutante ERK5(5E) reside constitutivamente en el núcleo dado que mimetiza la

translocación nuclear que se da en respuesta a la autofosforilación de la cola C-terminal después de su activación (Figura 32).

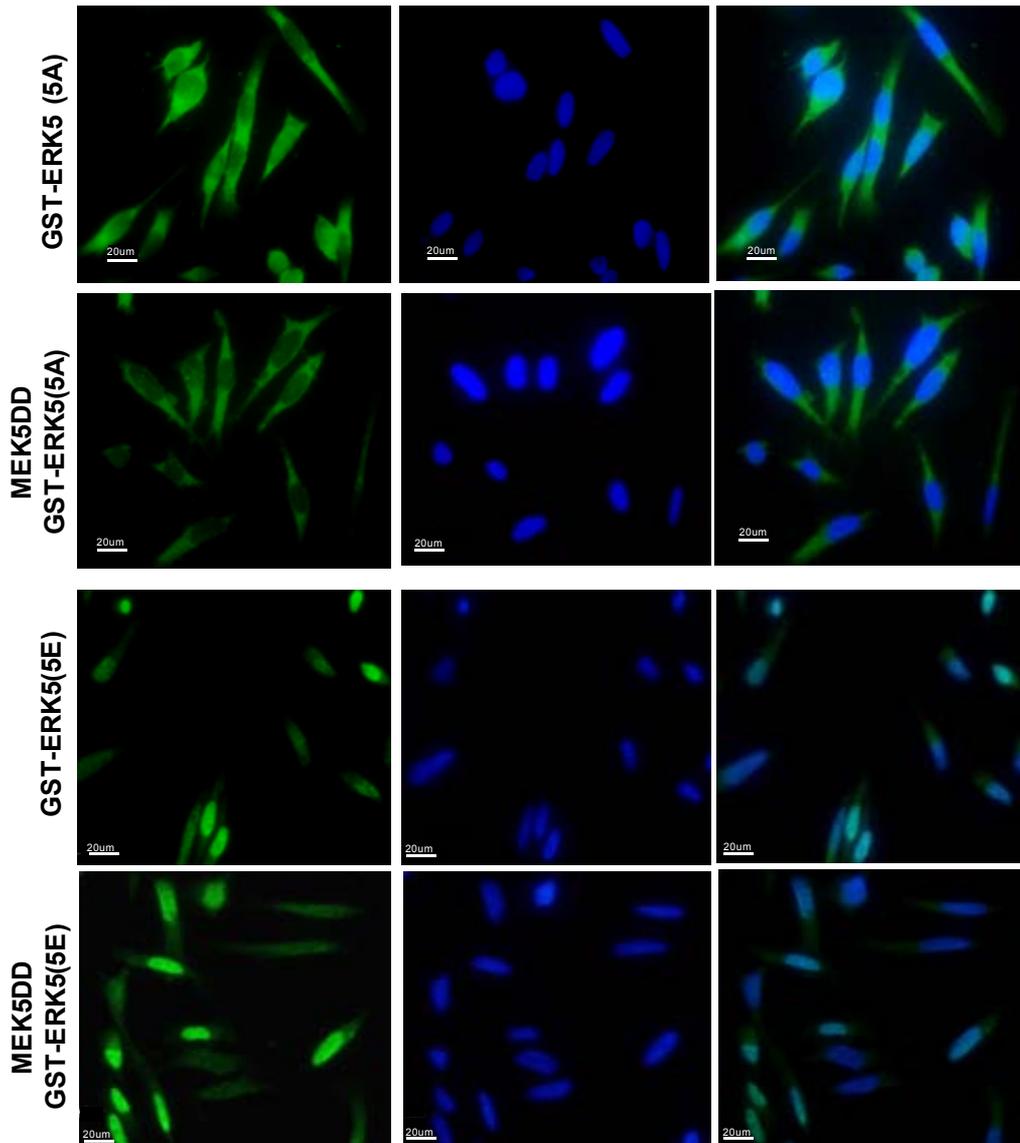


Figura 32. La autofosforilación de ERK5 en la cola C-terminal es necesaria para su translocación nuclear. Microscopía de fluorescencia de células PC3 transfectadas con los vectores indicados, fijadas con paraformaldehído al 4% y visualizadas mediante microscopía de fluorescencia para GST (verde). Los segundos paneles muestran en azul la tinción de núcleos (DAPI), y los terceros muestran la superposición de los dos anteriores (Merged). La barra blanca de escala representa 20 µm. ERK5(5A) y ERK5(5E) son mutantes de ERK5 en los que los residuos S567, S720, S731, T733 y S806 han sido reemplazos por alanina o ácido glutámico, respectivamente. Resultados representativos de tres cultivos independientes.

A continuación se estudió la interacción de estos mutantes con Hsp90 y Cdc37. La **Figura 33** muestra que el mutante deficiente en autofosforilación ERK5(5A) se encuentra siempre asociado a Hsp90 y Cdc37, incluso después de su activación por MEK5DD. Por el contrario, el mutante constitutivamente fosforilado en la cola C-term ERK5(5E) no interacciona con Hsp90 en condiciones basales. En síntesis, estos resultados sugieren en primer lugar que se requiere la autofosforilación de varios residuos de la cola C-terminal de ERK5 como paso previo a la disociación de Hsp90. Y en segundo lugar, sugieren que la chaperona Hsp90 podría jugar un rol como proteína de anclaje citoplasmático, dado que la forma ERK5(5A) de la que no se disocia Hsp90 presenta una localización citosólica, mientras que la forma ERK5(5E) no une Hsp90 y presenta una localización nuclear constitutiva.

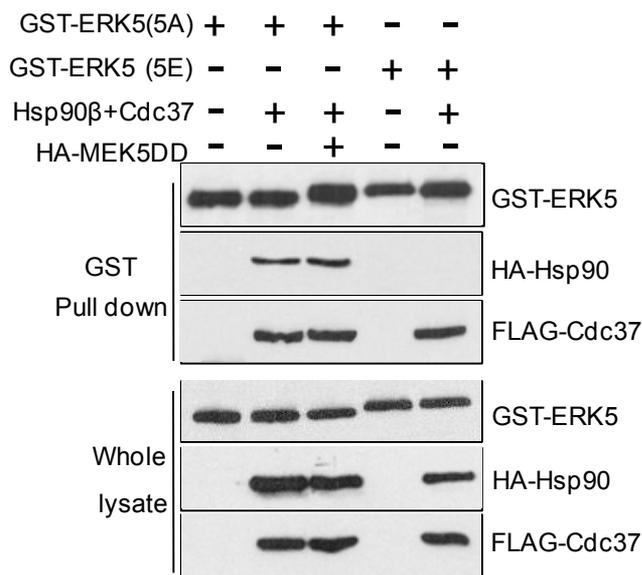


Figura 33. La disociación de Hsp90 del complejo ERK5-Cdc37 requiere la autofosforilación de ERK5 en su cola C-terminal. Los mutantes indicados se sobre-expresaron solos o en combinación con Hsp90 y Cdc37 y/o MEK5-DD. La proteína ERK5 sobre-expresada fue purificada en resina de afinidad glutatión-*Sepharose* y la presencia en los inmunoprecipitados de las proteínas indicadas fue analizada mediante inmunoblot. Los paneles inferiores (*whole lysate*) muestran los niveles de expresión para cada proteína. Se obtuvieron resultados similares en 2 experimentos independientes.

1.4. La sobre-expresión de Cdc37 promueve la disociación de Hsp90 del complejo ERK5-Cdc37 y la translocación de ERK5 al núcleo.

Al estudiar el complejo trimérico ERK5/Cdc37/Hsp90 en ensayos donde se sobre-expresaban las proteínas, observamos el complejo trimérico únicamente se expresaban cantidades equivalentes de las tres proteínas, pero que un exceso de Cdc37 provocaba la pérdida de Hsp90 del complejo. Con la finalidad de comprobar este punto se llevó a cabo un ensayo en el que se transfectaron células HeLa con una concentración fija de los vectores que expresan ERK5 (fusionada a GST) y Hsp90 (0.5 μg de DNA) y concentraciones variables de Cdc37 (de 1 a 4 μg). A continuación se purificó ERK5 en resina de afinidad glutatión-*Sepharose* y se analizó la presencia de Hsp90 y Cdc37 en los precipitados. Se encontró el complejo trimérico en las células que fueron co-transfectadas con 1 μg del vector que codifica para Cdc37 se formaba el complejo trimérico (como ya se había observado en la Figura 26A), mientras que la sobre-expresión de mayores cantidades de Cdc37 (2-4 μg) comportaba la pérdida de la interacción de Hsp90 con el complejo ERK5-Cdc37 (Figura 34).

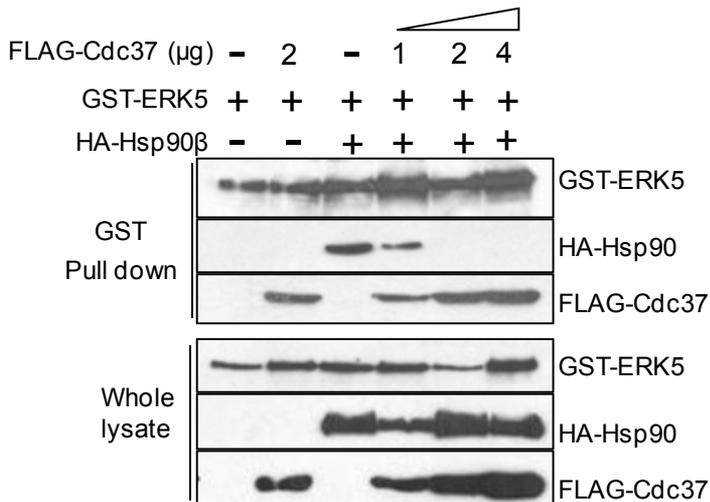


Figura 34. La sobreexpresión de Cdc37 induce la disociación de Hsp90 del complejo ERK5-Cdc37. Células HeLa fueron transfectadas con 0.5 μg de cada uno de los vectores que codifican para las proteínas indicadas y/o las cantidades indicadas del vector que codifica para Cdc37. Al cabo de 48 horas las células fueron lisadas, ERK5 recombinante purificada en resina de afinidad glutatión-*Sepharose*, y se analizó mediante inmunoblot la presencia de las proteínas indicadas en los precipitados. Los paneles inferiores muestran los niveles de expresión de las proteínas (*whole lysate*). Se obtuvieron resultados similares en 4 experimentos independientes.

La activación de ERK5 por EGF o por la sobre-expresión de MEK5DD resulta en la disociación de Hsp90 y en la translocación de ERK5 al núcleo. Dados los resultados de la **Figura 34**, se procedió a estudiar si la sobreexpresión de Cdc37 también promueve un cambio en su localización subcelular de ERK5.

Como primera aproximación se realizó un fraccionamiento subcelular de células HeLa en las se co-expresó ERK5 con MEK5DD o un exceso de Cdc37. La **Figura 35** muestra que en condiciones basales ERK5 se encuentra en la fracción citosólica, y que la sobre-expresión de MEK5DD resulta en la activación de ERK5 (pERK5) y en una localización mayoritariamente nuclear. Más interesantemente, la sobreexpresión de Cdc37 también induce la translocación nuclear de la ERK5 endógena y sobre-expresada, en condiciones en las que no ERK no se activa, como muestra la ausencia de señal del anticuerpo que reconoce el T-loop fosforilado (pERK5) y de retraso electroforético.

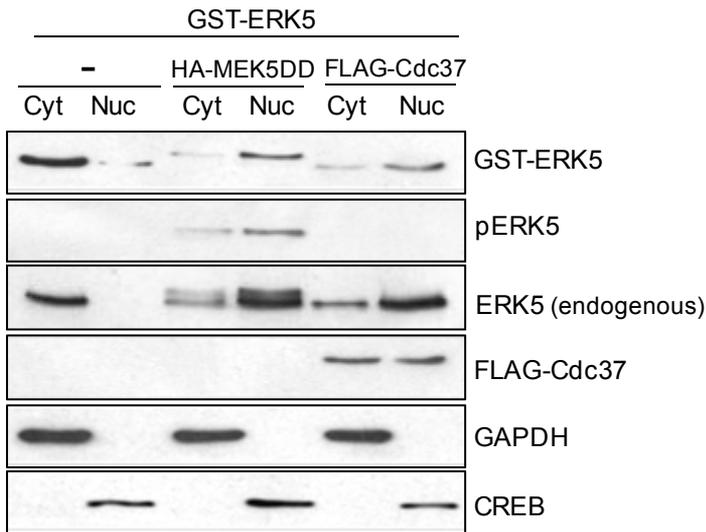


Figura 35. La sobreexpresión de Cdc37 induce la translocación nuclear de ERK5. A) Fraccionamiento subcelular de células HeLa. Se prepararon fracciones citosólicas (Cyt) y nucleares (Nuc) de células HeLa que sobreexpresaban las proteínas indicadas, según se describe en la sección *Material y Métodos*. Se utilizaron 20 µg de cada fracción para analizar la presencia de las proteínas indicadas mediante inmunoblot. Las proteínas GAPDH y CREB fueron utilizadas como marcadores de la fracción citosólica y nuclear, respectivamente. Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos independientes.

Estos resultados fueron confirmados mediante microscopía de fluorescencia. Para ello se co-expresó en células HeLa ERK5 fusionada a la proteína fluorescente GFP (GFP-EK5) en combinación con MEK5DD o Cdc37. Mientras que en las células control ERK5 localiza mayoritariamente en el citosol, la expresión de tanto MEK5DD como de Cdc37 en exceso resulta en la localización nuclear de ERK5 (**Figura 36.A**). Análogamente, también se comprobó que la sobreexpresión de MEK5DD o Cdc37 resulta en la translocación al núcleo de la ERK5 endógena (**Figura 36.B**).

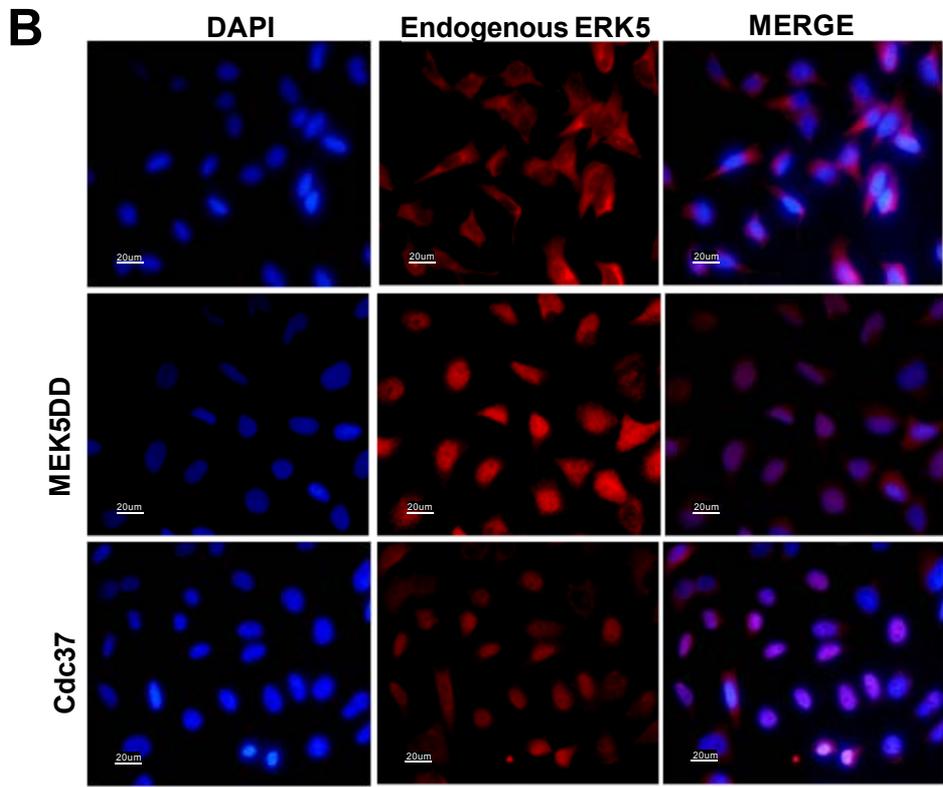
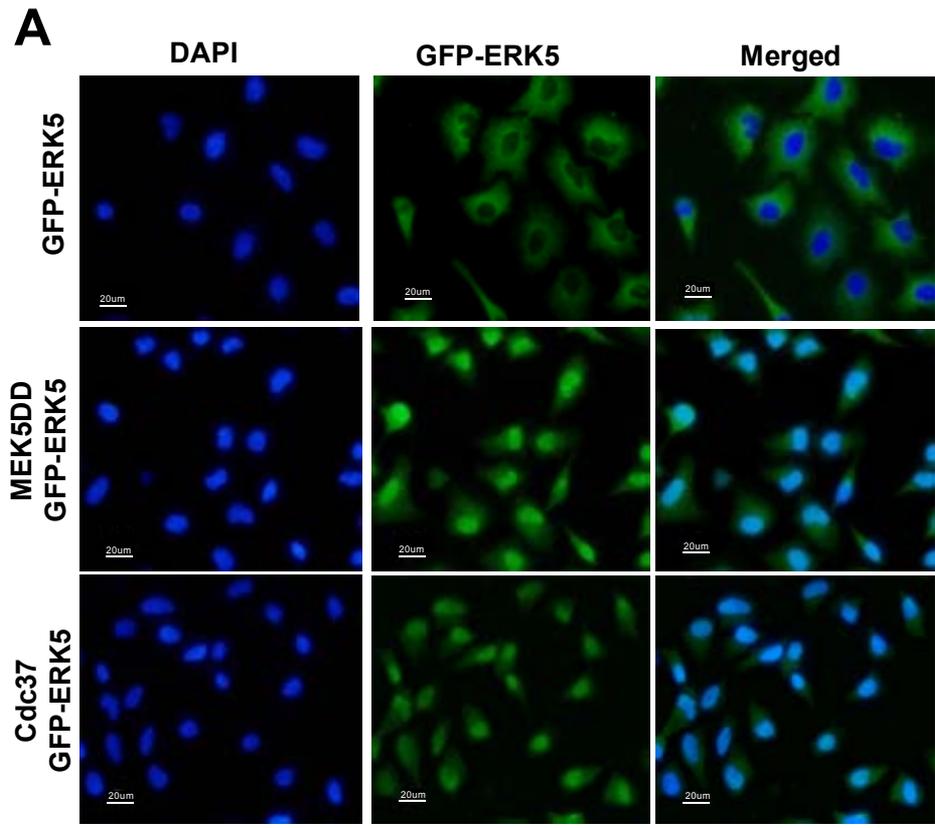


Figura 36. La sobreexpresión de Cdc37 induce la translocación nuclear de ERK5 (A) Microscopía de fluorescencia de células que sobre-expresan ERK5. HeLa que sobre-expresan GFP-ERK5, sólo o en combinación con MEK5DD o Cdc37 fueron fijadas con paraformaldehído y visualizadas mediante microscopía de fluorescencia para GFP-ERK5 (verde) y tinción nuclear DAPI (azul). Los terceros paneles muestran la superposición de los dos anteriores (Merged). **(B)** Microscopía de fluorescencia de ERK5 endógena. Células HeLa fueron transfectadas con el vector pcDNA3.1 vacío (paneles superiores), o con los vectores que codifican para MEK5-DD (paneles intermedios) o Cdc37 (paneles inferiores). Las células fueron fijadas con paraformaldehído visualizadas mediante microscopía de inmunofluorescencia para ERK5 (rojo) y tinción nuclear DAPI (azul). Los terceros paneles muestran la superposición de los dos anteriores (Merged). Resultados representativos de 3 cultivos independientes

A pesar de que varios autores han descrito que Cdc37 se distribuye principalmente en el citoplasma de la célula (Stepanova et al., 1996; Jinwal et al., 2012), en otro trabajo se muestra que su localización subcelular varía en respuesta al estrés hiperosmótico, que induce una localización puntuada de Cdc37 en la región cromatinica (Tatebe and Shiozaki, 2003). Por ello se evaluó si la sobre-expresión de ERK5 también inducía un cambio en la localización subcelular de Cdc37, mediante la expresión en células HeLa de un vector que codifica para Cdc37 fusionado a GFP junto a ERK5 y/o MEK5DD. La **Figura 37** muestra que Cdc37 reside en el citosol de células HeLa que sobre-expresan ERK5, y que la sobreexpresión de MEK5DD (y activación de ERK5) resulta en una localización mayoritariamente (70%) nuclear de Cdc37.

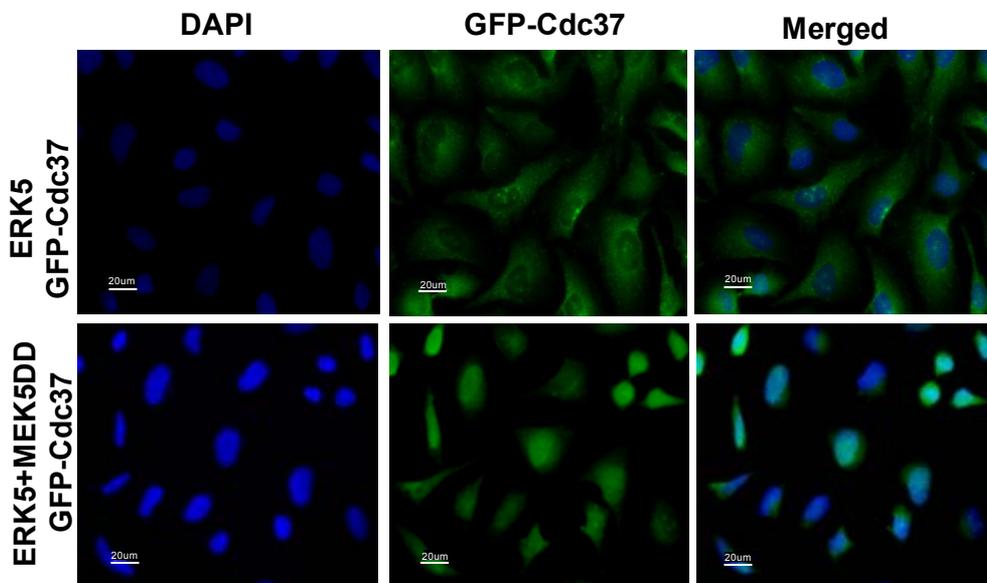


Figura 37. La activación de ERK5 induce la translocación nuclear de Cdc37. Microscopía de fluorescencia. Células HeLa que sobre-expresan GFP-Cdc37, ERK5 y/o MEK5DD fueron fijadas con paraformaldehído y visualizadas mediante microscopía de fluorescencia para GFP-ERK5 (verde) y tinción nuclear DAPI (azul). Los terceros paneles muestran la superposición de los dos anteriores (Merged). Para cuantificar el número de células que tienen GFP positivas nucleares se hicieron fotos a 50 campos diferentes tomados aleatoriamente. Resultados representativos de 3 cultivos independientes.

La sobre-expresión de Cdc37 no induce la actividad quinasa de ERK5.

El mecanismo molecular canónico de translocación nuclear de ERK5 descrito en la literatura ocurre como consecuencia de la fosforilación por MEK5 del motivo TEY de ERK5 a diferentes estímulos (Kondoh et al., 2006). Por ello se estudió si la translocación nuclear de ERK5 inducida por la sobre-expresión de Cdc37 era debida a un efecto activador de la actividad quinasa de ERK5.

Los resultados de la **Figura 35** indican que la translocación nuclear de ERK5 inducida por Cdc37 no es debida a la fosforilación de ERK5, por lo que se decidió confirmar este extremo mediante ensayos de actividad quinasa. En este experimento se utilizaron dos líneas celulares diferentes en las que se co-expresó GST-ERK5 con MEK5DD, Cdc37, Hsp90 o Cdc37/Hsp90. ERK5 se precipitó utilizando una resina de afinidad glutatión-*Sepharose* y la actividad ERK5 se determinó mediante ensayo radiométrico utilizando ^{32}P -ATP y el péptido PIMtide (**Figura 38.A**) o la proteína básica de mielina (MBP) como sustratos (**Figura 38.B**) como sustratos. La sobre-expresión de MEK5DD induce la actividad quinasa de ERK5, medida utilizando ambos sustratos, mientras que la sobre-expresión de Cdc37 y/o Hsp90 no tuvo efecto alguno en la actividad quinasa de ERK5. También se muestran los correspondientes inmunoblots utilizando el anticuerpo que reconoce el motivo TEY fosforilado, donde se observa que la sobre-expresión de las chaperonas no induce la fosforilación de ERK5 ni el retraso electroforético, como lo ocurre con la sobre-expresión de MEK5DD.

La sobre-expresión de Cdc37 induce la actividad transcripcional de ERK5.

ERK5 induce la actividad de diferentes factores de transcripción. Aunque inicialmente se mostró que este efecto ocurría por la fosforilación directa de ciertos factores, Kasler y col. demostraron que para alcanzar la máxima transactivación de los factores MEF2, sustrato canónico de ERK5, se requería de la larga cola C-terminal de ERK5 que posee una región de interacción con MEF2 (aa. 440-501) y un dominio de activación transcripcional (aa. 664-789) (Kasler et al., 2000). Posteriormente se demostró que este mismo dominio de ERK5 era necesario para la activación transcripcional de los factores c-Fos y Fra-1, miembros de la familia AP-1 (Terasawa et al., 2003). De manera que la determinación de la activación transcripcional de AP-1 es una aproximación válida para establecer la activación transcripcional mediada directamente por ERK5 (Terasawa et al., 2003; Morimoto et al., 2007).

Dados los resultados obtenidos, nos preguntamos si la translocación nuclear que produce la sobreexpresión de Cdc37 tenía efecto en la activación transcripcional mediada por ERK5. Para ello se analizó la actividad transcripcional de AP-1 mediada por ERK5, utilizando el vector *reporter* pGL4-AP1-luciferasa. En células HeLa y HEK-293T, la co-expresión de ERK5 y MEK5DD induce la actividad de AP-1 unas 25 veces con respecto a los controles (ERK5 o MEK5DD solas). La sobre-expresión de exceso de Cdc37 con ERK5 también logra inducir la actividad transcripcional de AP1 en aproximadamente la misma proporción que lo hace MEK5DD (**Figura 39**), a pesar de que la sobre-expresión de Cdc37 no resulta en aumento de la actividad quinasa de ERK5 (**Figura 38**). Por su parte, la co-expresión ERK5 con Hsp90 no provoca efecto alguno en la activación transcripcional de ERK5. Cabe destacar el efecto negativo que

tiene la sobreexpresión de Hsp90 en la actividad transcripcional de ERK5 inducida por Cdc37 (últimas columnas).

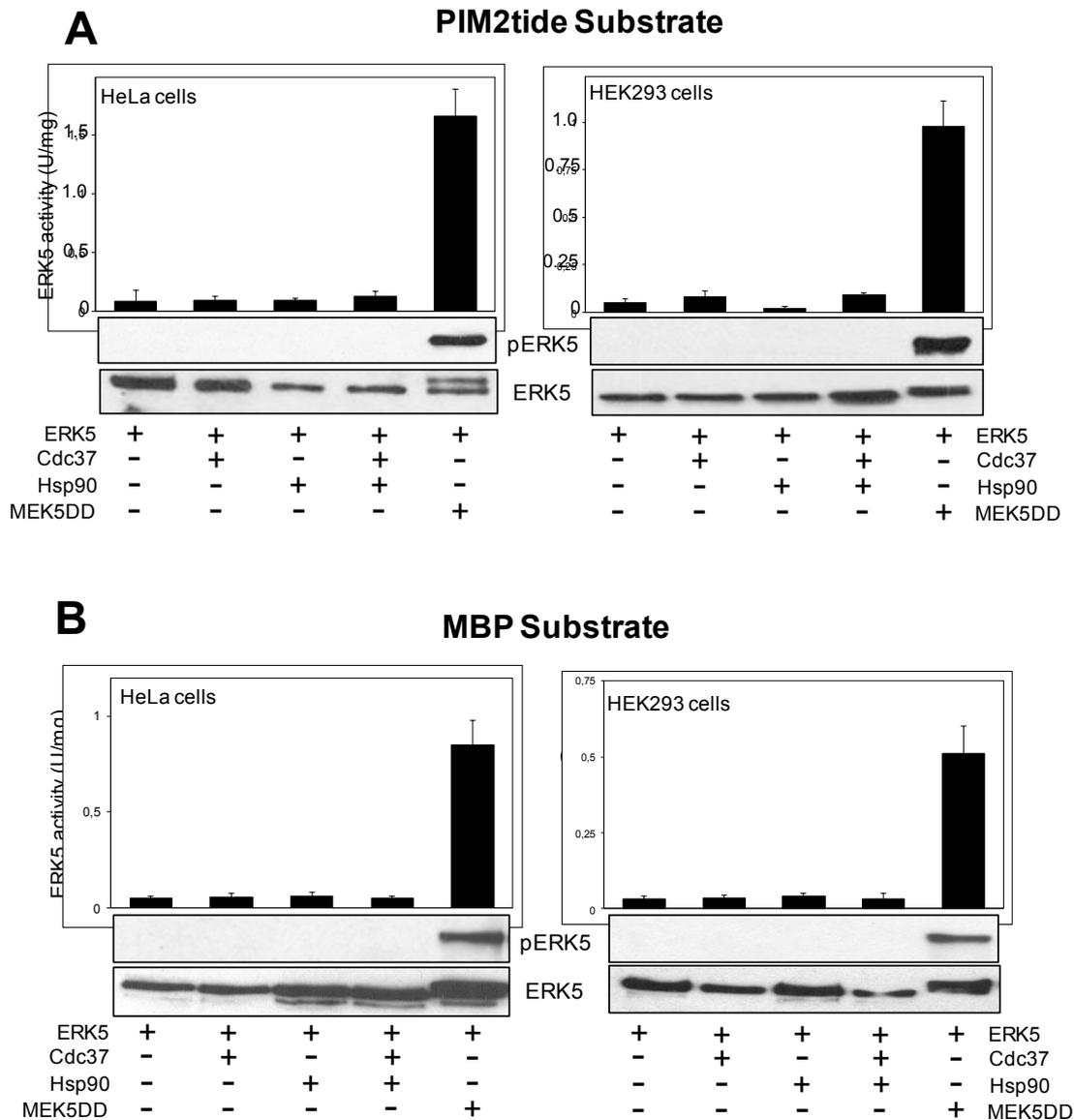


Figura 38. La sobreexpresión de Cdc37 y/o Hsp90 no afecta a la actividad quinasa de ERK5 Células HeLa y HEK-293T que sobre-expresan ERK5 fusionada a GST, Cdc37, Hsp90 y/o MEK5DD fueron lisadas, y ERK5 sobre-expresada fue purificada en resina de afinidad *glutión-Sepharose* según el protocolo descrito en *Materiales y Métodos*. La actividad específica de ERK5 se determinó mediante ensayo radiométrico utilizando como sustrato 100 μ M $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (500 cpm/pmol) y 500 μ M del péptido sustrato PIM2tide (**A**) o 10 μ g de la proteína básica de mielina MBP (**B**). Los valores son las medias \pm s.d. de un ensayo realizado por triplicado y representativo de tres experimentos independientes. 1 unidad (U) de actividad es la cantidad de enzima necesario para incorporar 1 nmol de ^{32}P por min. Como control de la sobreexpresión de las proteínas se muestran los inmunoblots para ERK5 recombinante (anti-GST) y ERK5 activa (anti-fosfo ERK5, pERK5).

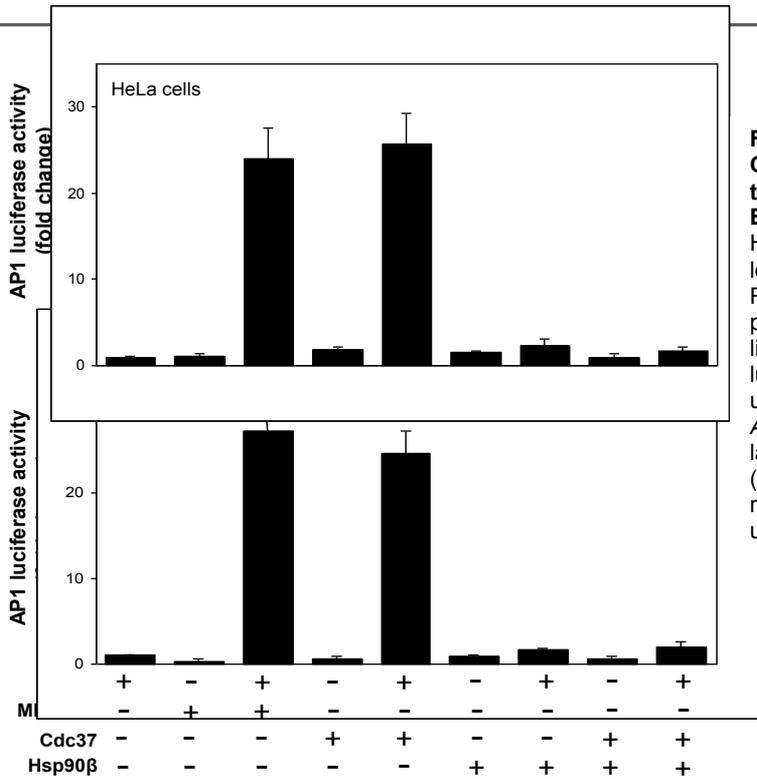


Figura 39. La sobreexpresión de Cdc37 induce la actividad transcripcional de AP-1 mediada por ERK5. Actividad luciferasa de células HeLa y HEK-293T co-transfectadas con los vectores pAP1-luciferasa, pRL-CMV-Renilla y los vectores indicados. 24 horas post-transfección las células fueron lisadas y se determinó la actividad luciferasa mediante ensayo gen *reporter* usando el kit *Dual Luciferase Reporter Assay System*). Los valores representan la media \pm s.d. de cuatro (HEK293) y tres (HeLa) experimentos diferentes, realizados en triplicado y normalizado utilizando los valores de la Renilla.

La sobre-expresión de Cdc37 induce la activación transcripcional mediada por una forma de ERK5 catalíticamente inactiva.

Los resultados anteriores sugieren que la translocación nuclear y activación transcripcional de ERK5 inducidas por la sobreexpresión de Cdc37 no ocurren como consecuencia de una activación de la actividad quinasa de ERK5, como es el mecanismo canónico para la vía MEK5-ERK5. Para confirmar este extremo se utilizaron 4 aproximaciones diferentes, con la finalidad de demostrar que Cdc37 promueve la entrada en el núcleo y la activación de la transcripción mediada por una forma catalíticamente inactiva de ERK5: 1) inhibición específica de la actividad de ERK5 con el compuesto XMD8-92; 2) expresión de la forma mutada de ERK5 catalíticamente inactiva ERK5(D200A); 3) expresión del mutante deficiente en fosforilación de la cola C-terminal ERK5(5A); y 4) localización subcelular de ERK5 en células MEF MEK5^{-/-}.

Para inhibir la vía ERK5/MEK5 se han utilizado clásicamente varios compuestos como el PD184352 que también son inhibidores de la cascada MEK1/2 y ERK1/2. Recientemente el grupo del Dr. Gray desarrolló un nuevo inhibidor específico de ERK5, el XMD8-92 que bloquea su actividad y autofosforilación y que ha demostrado su especificidad y potencia tanto en líneas celulares (Deng et al., 2011) como en animales (Yang et al., 2010). En primer lugar se llevó a cabo una caracterización de este inhibidor, mediante el cálculo de los valores de IC₅₀ para la inhibición de una preparación activa de ERK5 recombinante (purificada a partir de la co-infección de células de insecto Sf9 con baculovirus que codifican para ERK5 y

MEK5DD) en ensayo radiométrico utilizando ^{32}P -ATP y PIM2tide como sustratos. La **Figura 40** muestra las curvas de competición obtenidas en los ensayos radiométricos correspondientes, que sirvieron para que el XMD8-92 presenta una IC_{50} de 339 nM frente a 50 μM de ATP y de 910 nM frente a 100 μM de ATP. El valor de la constante de inhibición (K_i) para el XMD8-92 calculado mediante la ecuación de Cheng-Prusoff que relaciona la IC_{50} frente a la concentración del sustrato y la K_m fue de 294 nM.

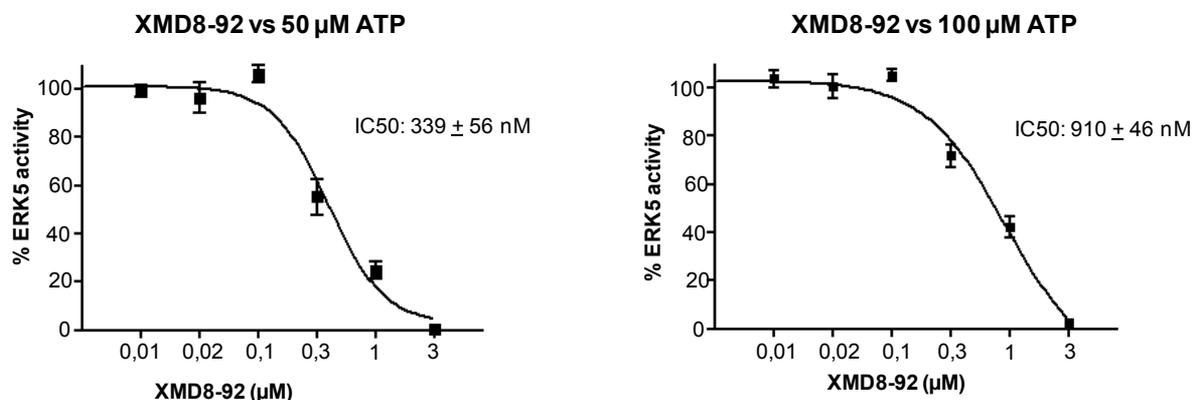


Figura 40. Determinación de los valores de IC_{50} para el inhibidor de la actividad quinasa ERK5 XMD8-92. 50 ng de ERK5 pura activa fueron incubados con las concentraciones indicadas del compuesto XMD8-92 y la actividad quinasa ERK5 fue determinada utilizando 250 μM PIMtide y ^{32}P - γ -ATP (50 ó 100 μM) como sustratos. Los valores corresponden a las medias \pm s.d. de ensayos realizados en triplicados, y representativo de dos experimentos independientes.

Se procedió a evaluar el efecto del inhibidor XMD8-92 en la translocación nuclear de ERK5. Células HeLa que sobre-expresan GFP-ERK5 solo o junto a MEKDD ó Cdc37 fueron tratadas a las 4 horas post-transfección con 10 μM XMD8-92 y la localización de ERK5 fue analizada mediante microscopía de fluorescencia. Tal y como se esperaba, el tratamiento con el inhibidor bloqueó la translocación nuclear de ERK5 inducida en respuesta a la activación por MEK5DD (**Figura 41.A**), debido a que este compuesto impide que ERK5 la activación y autofosforilación de la cola C-terminal, requisito para su migración al núcleo. De acuerdo con los resultados que mostraban que la sobre-expresión de CDC37 no resulta en la activación de ERK5, el tratamiento con 10 μM XMD8-92 no previno la translocación nuclear de ERK5 inducida por Cdc37 (**Figura 41.A**).

A continuación se evaluó el efecto del XMD8-92 en la activación transcripcional de AP-1 mediada por ERK5. De acuerdo con los resultados mostrado en la **Figura 41.A** el XMD8-92 inhibe la actividad de AP-1 inducida por la co-expresión de ERK5 y MEK5DD, pero en no presenta efecto alguno en la actividad transcripcional mediada por ERK5 e inducida por la sobreexpresión de Cdc37 (**Figura 41.B**).

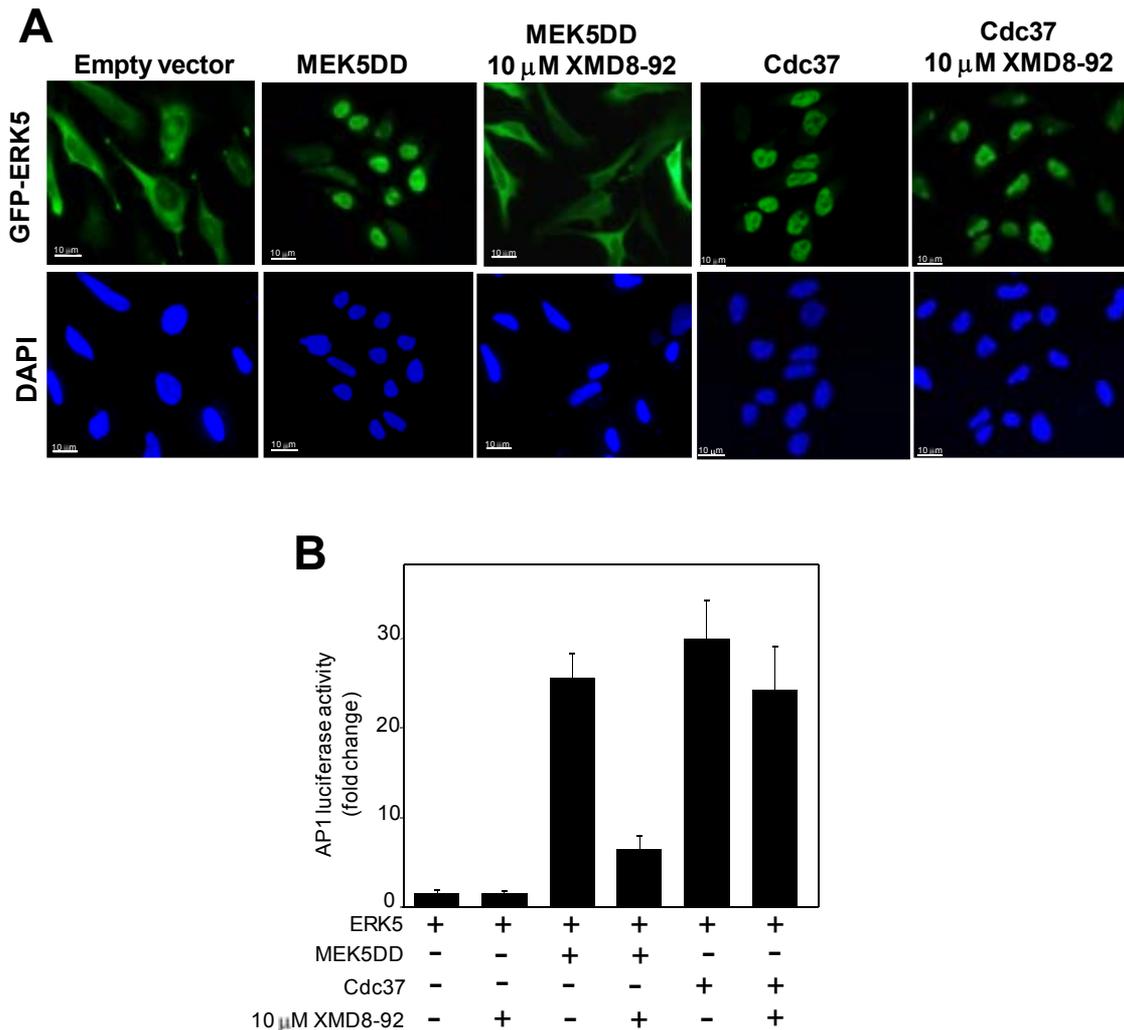


Figura 41. El inhibidor de ERK5 XMD8-92 no bloquea la translocación nuclear y activación de AP-1 inducidas por la sobreexpresión de Cdc37 (A) Microscopía de fluorescencia. Células HeLa fueron transfectadas con vectores de expresión que codifican para GFP-ERK5 y/o MEK5DD o FLAG-Cdc37. 4 horas después de la transfección las células fueron tratadas con 10 μ M del inhibidor de ERK5 XMD8-92, y 36 horas después fueron fijadas y visualizadas en microscopio de fluorescencia para ERK5 (verde). Los paneles inferiores muestran la tinción nuclear (DAPI). Resultados representativos de 2 cultivos independientes. (B) Ensayo de actividad luciferasa en células HeLa co-transfectadas con los vectores pAP1-luciferase, pRL-CMV-Renilla y los plásmidos indicados. En los casos indicados las células fueron tratadas con XMD8-92 4 horas post-transfección, y 24 horas después se determinó la actividad luciferasa mediante ensayo gen *reporter* usando el kit *Dual Luciferase Reporter Assay System*). Los resultados son medias \pm s.d.. de experimentos realizados por triplicado, normalizado utilizando los valores de la Renilla, y representativos de dos experimentos independientes.

La segunda aproximación utilizada fue el estudio del efecto de la sobreexpresión de Cdc37 en la localización subcelular y activación transcripcional del mutante de ERK5 quinasa catalíticamente inactivo (ERK5-D200A). Células HeLa fueron transfectadas con el plásmido que codifica ERK5(D200A) solo o junto con MEK5DD o Cdc37. Mediante un ensayo de inmunofluorescencia se determinó que el mutante de que carece de actividad catalítica ERK5(D200A) se encuentra en el citosol y que su fosforilación en el T-loop por MEK5 no induce cambios en su distribución subcelular. Por el contrario, la sobre-expresión de

exceso de Cdc37 sí promueve la entrada en el núcleo de este mutante catalíticamente inactivo (**Figura 42.A**). En paralelo se estudió el efecto del mutante ERK5(D200A) sobre la activación transcripcional de AP-1, mediante la transfección de células HEK-293 con este mutante junto a MEK5DD o Cdc37. En consonancia con los resultados obtenidos en los experimentos de localización subcelular (**Figura 42.A**), la co-expresión de MEK5 y el mutante ERK5(D200A) no tuvo efecto alguno en la actividad transcripcional de AP-1, mientras que la sobreexpresión de ERK5(D200A) y Cdc37 resultó en un aumento de unas 20 veces de la actividad transcripcional de AP-1 (**Figura 42.B**), similar al obtenido al co-expresar Cdc37 y la forma salvaje de ERK5 (**Figuras 40 y 41**).

En síntesis, los resultados mostrados en las **Figuras 41 y 42** indican que la sobreexpresión de exceso de Cdc37 induce la translocación nuclear de una forma de ERK5 catalíticamente inactiva que retiene su efecto activador sobre la actividad transcripcional de AP-1.

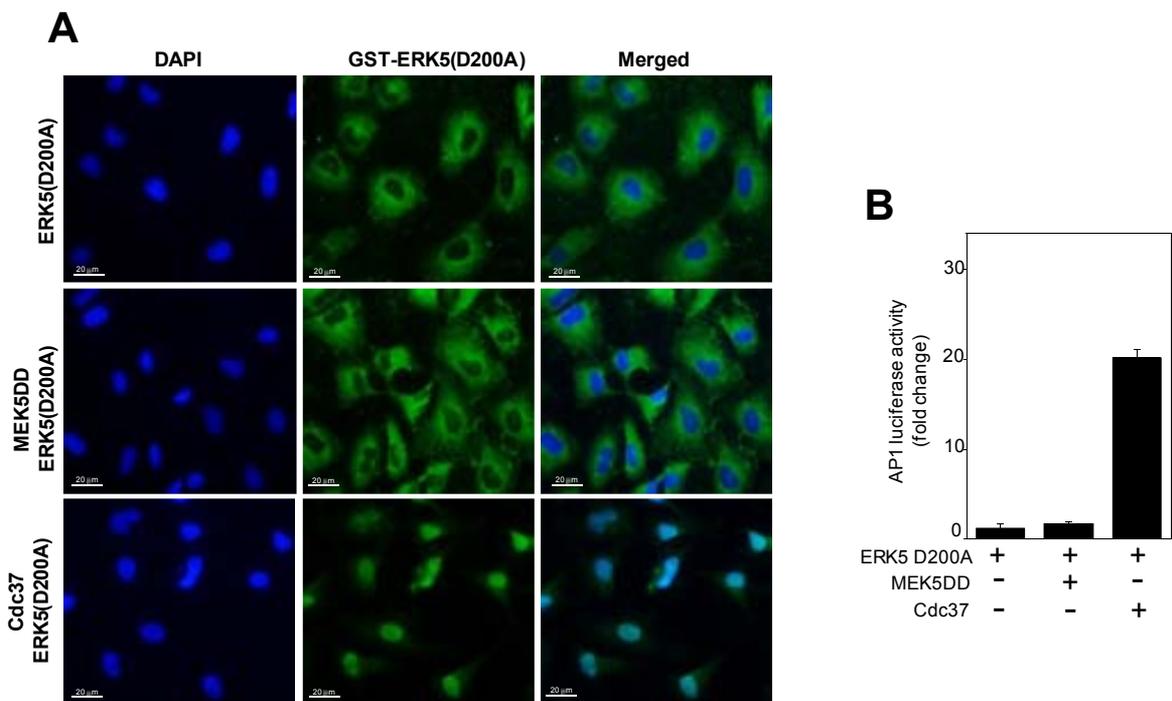


Figura 42. La sobre-expresión de Cdc37 induce la translocación nuclear y la actividad transcripcional del mutante catalíticamente inactivo de ERK5 (D200A). (A) Microscopía de fluorescencia. Células HeLa transfectadas con los plásmidos indicados fueron fijadas y visualizadas en microscopio de inmunofluorescencia para ERK5 (verde) y tinción nuclear DAPI (azul). Los terceros paneles muestran la superposición de los dos anteriores (Merged). Resultados representativos de 2 cultivos independientes. (B) Células HeLa fueron co-transfectadas con los vectores pAP1-luciferase, pRL-CMV-Renilla y los plásmidos indicados. 24 horas post-transfección las células fueron lisadas y se determinó la actividad luciferasa mediante ensayo de gen reporter usando el kit *Dual Luciferase Reporter Assay System*. Los valores representan la media \pm s.d. de tres experimentos diferentes (realizados en triplicado) y normalizados con los valores de Renilla.

Como se ha indicado con anterioridad, el mecanismo canónico (activación por MEK5) que gobierna la translocación nuclear de ERK5 requiere de la autofosforilación de la cola C-terminal. Por ello se decidió evaluar el rol de esta autofosforilación en la migración al núcleo e inducción de la actividad transcripcional de AP-1 inducidas por la sobre-expresión de Cdc37, utilizando el mutante deficiente en autofosforilación ERK5(5A) y visualizando la localización subcelular mediante microscopía de fluorescencia. La **Figura 43.A** muestra que el mutante ERK5(5A) reside en el citosol y que la sobre-expresión de MEK5DD no tiene efecto alguno en su localización subcelular. Por el contrario, la sobre-expresión de exceso de Cdc37 indujo la translocación nuclear del mutante de ERK5 deficiente en autofosforilación. A continuación, a través de un ensayo de *gen reporter* luciferasa se demostró que la co-expresión del mutante ERK5 y MEK5DD no produce efecto en la activación transcripcional de AP-1. Mientras que la sobreexpresión de Cdc37 con el mutante ERK5 5A incrementa en casi 15 veces la activación de AP-1 con respecto a los controles ERK5 y Cdc37 solos (**Figura 43.B**). Los resultados sugieren que la autofosforilación del dominio C-terminal no es un prerequisite para la translocación nuclear de ERK5 o su activación transcripcional inducidas por Cdc37.

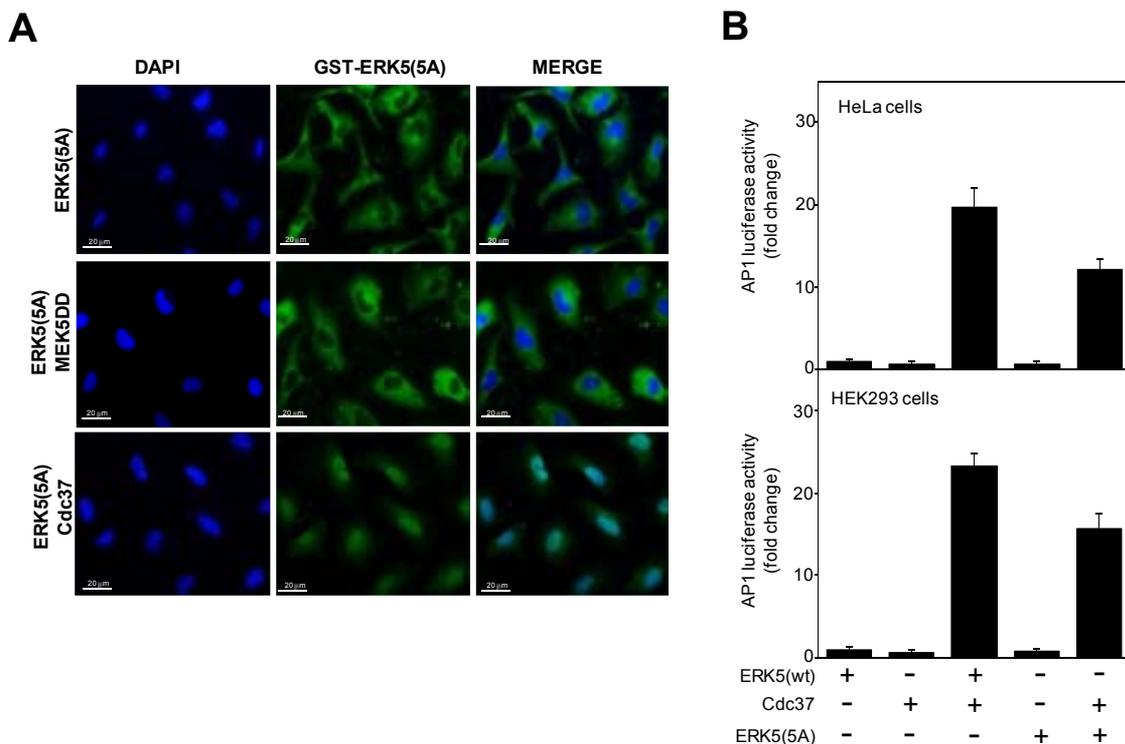


Figura 43. La sobreexpresión de Cdc37 induce la translocación nuclear y la activación transcripcional del mutante de ERK5 (ERK5-5A) que no se autofosforila en la cola C-terminal. Células HeLa fueron transfectadas con GST-ERK5 5A (panel superior) o co-expresada con HA-MEK5DD (panel intermedio) o con Flag-Cdc37 (panel inferior). 24 horas después de la transfección las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% y mediante inmunofluorescencia usando anticuerpo anti-GST (verde) se analizó la localización subcelular de este mutante, los núcleos se tiñeron con DAPI (azul), en los terceros paneles se superpusieron los dos anteriores. Resultados representativos de 2 cultivos independientes. **(B)** Células HeLa y HEK-293T fueron transfectadas con pAP1-luciferasa, pRL-CMV-Renilla, GST-ERK5 wt y GST-ERK5(5^a) con y sin Flag-Cdc37. 24 horas después se realizó el ensayo con el kit *Dual Luciferase Reporter Assay System* (Promega). Los resultados son medias \pm s.d. de experimentos realizados por triplicado y representativos de dos experimentos independientes.

La última aproximación utilizada fue la evaluación del efecto de la sobreexpresión de Cdc37 en la localización subcelular de ERK5 de células MEF MEK5 (-/-). Dado que MEK5 es la única quinasa activadora de ERK5, ERK5 no puede ser activada en estas células (Wang et al., 2005). En primer lugar se realizaron estudios de co-inmunoprecipitación de las proteínas endógenas que mostraron la presencia del complejo trimérico ERK5-Cdc37-Hsp90 en las células MEF MEK5 (-/-) (**Figura 44**), lo que indica que no es necesaria la presencia de MEK5 para la formación de este complejo trimérico

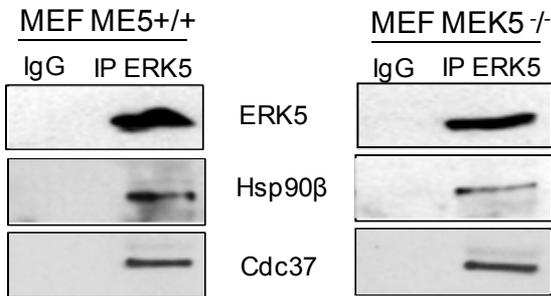


Figura 44. MEK5 no es necesaria en la interacción ERK5-Cdc37-Hsp90. Se utilizó 1 mg de lisados de células MEF MEK5^{+/+} y MEF MEK5^{-/-} para inmunoprecipitar ERK5 y se analizó la presencia de ERK5, Cdc37 y HSp90 en los inmunoprecipitados mediante inmunoblot. Resultados representativos de 3 cultivos independientes.

A continuación se estudió si en las células MEF MEK5 (-/-) la sobreexpresión de Cdc37 inducía la translocación nuclear de ERK5. Para ello estas células fueron transfectadas con ERK5 fusionada a la proteína fluorescente GFP (GFP-ERK5) sola o en combinación con Cdc37 y se monitorizó la localización subcelular de ERK5 mediante microscopía de fluorescencia. La **Figura 45.A** muestra la localización citosólica de ERK5 en condiciones basales, y que la sobre-expresión de Cdc37 resulta en la localización nuclear de ERK5.

En paralelo, se realizaron experimentos con la finalidad de demostrar que Cdc37 también provoca la translocación nuclear de la ERK5 endógena, mediante la sobre-expresión de GFP-Cdc37. Los paneles superiores de la **Figura 45.B** muestran que la ERK5 endógena de células MEF MEK5 (-/-) se encuentra en el citosol y que la sobreexpresión de Cdc37 promueve su entrada al núcleo (paneles inferiores). Cabe destacar que las células MEF presentan una baja eficiencia de transfección, de un 30% como máximo. Interesantemente, en el panel central inferior se aprecia la localización nuclear de ERK5 únicamente en las células que sobre-expresan GFP-Cdc37 (**Figura 45.B**).

Estos resultados, en su conjunto, demuestran que la sobre-expresión de Cdc37 induce la translocación nuclear y activación transcripcional mediada por una forma de ERK5 catalíticamente inactiva.

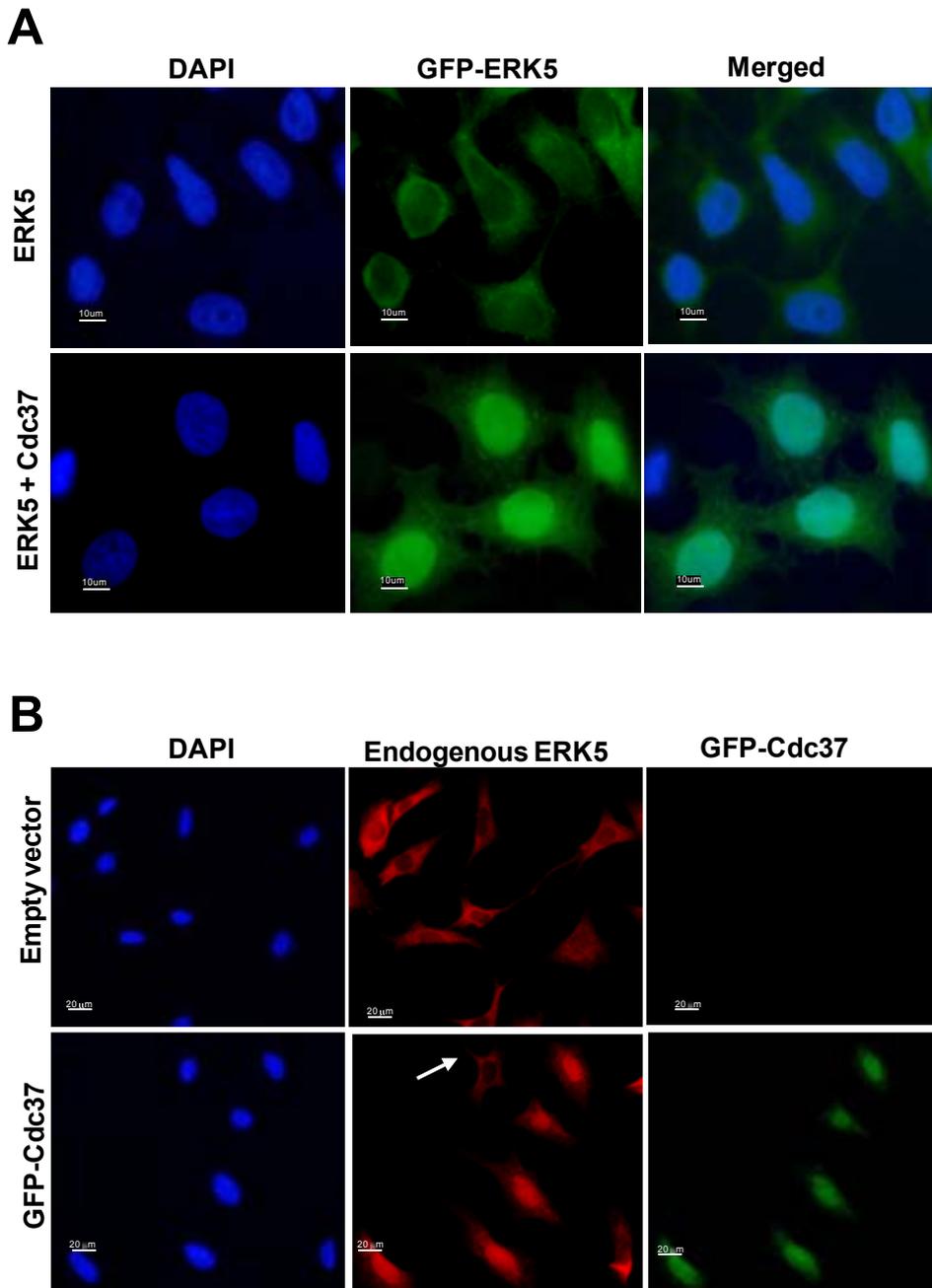


Figura 45. La sobre-expresión de Cdc37 induce la translocación nuclear de ERK5 en células MEF que carecen de MEK5 (A) Células MEF MEK5^{-/-} fueron transfectadas con GFP-ERK5 (paneles superiores) o co-transfectadas con GFP-ERK5 y Cdc37 (paneles inferiores). Las células fueron fijadas con paraformaldehído y visualizadas en microscopio de fluorescencia para GFP-ERK5 (verde) y tinción nuclear DAPI (azul). Los terceros paneles muestran la superposición de los dos anteriores (Merged). **(B)** Células MEF MEK5^{-/-} fueron transfectadas con el vector pcDNA3.1 vacío (paneles superiores) o codificante para GFP-Cdc37 (paneles inferiores). Las células fueron fijadas con paraformaldehído y visualizadas en microscopio de inmunofluorescencia para ERK5 (rojo) y tinción nuclear DAPI (azul). Cdc37 fue visualizada directamente (verde). Resultados representativos de 3 cultivos independientes.

5. La activación de ERK5 y la sobre-expresión de Cdc37 inducen la SUMOilación de ERK5, previamente a su translocación nuclear.

Dentro de los sistemas que modifican las proteínas a nivel postraduccional se encuentra la SUMOilación, que consiste en la unión covalente de la proteína SUMO (*Small ubiquitin-like modifier*) a las cadenas laterales de residuos de lisina de las proteínas sustrato. La modificación covalente por SUMOilación de una proteína afecta a su función de diversas maneras, provocando cambios en la localización subcelular, modulación de la interacción con otras proteínas o antagonizando otras modificaciones que involucren ramificaciones en lisinas, como la ubiquitinación. Entre ellos destaca el papel esencial que juega SUMO en el importe y exporte nuclear, dado que modula la actividad del sistema de transporte nucleocitoplasmático gobernado por importina-13 (Mingot et al., 2001) y RanGAP1 (Seeler and Dejean, 2003; Zhao, 2007).

En 2008 el grupo de Jun-ichi Abe describe por primera vez la SUMOilación de ERK5. Los autores demostraron que la actividad transcripcional de MEF2 dependiente de ERK5 era inhibida por la SUMOilación de ERK5 en dos lisinas situadas en el extremo N-terminal (Lys6 y Lys22) de ERK5, inmediatamente antes del inicio del dominio quinasa, y que esta SUMOilación estaba favorecida por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de productos de glicosilación avanzados (AGE; *advanced glycation end products*) en células endoteliales (Shishido et al., 2008) y cardiomiocitos (Woo et al., 2008). Sin embargo, no hay estudios sobre la SUMOilación de ERK5 en respuesta a su activación por MEK5 en respuesta, por ejemplo, a la exposición a factores de crecimiento. Por ello, y dados los resultados descritos en esta memoria, a continuación se estudió si la activación y posterior translocación de ERK5 en respuesta a la activación por MEK5 o la sobre-expresión de Cdc37 eran la consecuencia de una SUMOilación de ERK5. Para ello se utilizó un vector de expresión que codifica por la isoforma SUMO2, descrita previamente como la responsable de la SUMOilación de ERK5 (Woo et al., 2008).

Células HEK-293 fueron co-transfectadas con vectores de expresión que codifican para His-SUMO2 (contiene un cola de 6 histidinas en el N-terminal) y la E2 ligasa Ubc9, en combinación con formas de ERK salvaje y deficiente en SUMOilación (ERK5 K6/K22R, en las Lisinas 6 y 22 han reemplazadas por Argininas). En los casos indicados las células también fueron transfectadas con vectores que codifican para MEK5 activa (MEK5DD) y Cdc37. A continuación se purificaron las proteínas SUMOiladas mediante ensayo de *pull down* en resina de afinidad Ni²⁺-agarosa, y la presencia de ERK5 SUMOilada fue detectada mediante inmunoblot de los precipitados. La **Figura 46.A** muestra que tanto la activación de ERK5 por MEK5DD como la sobre-expresión de Cdc37 inducen la SUMOilación de ERK5, que consiste en la aparición de varias bandas por encima del peso molecular de ERK5, debidas a las diferentes especies de ERK5 SUMOiladas (SUMO2, a diferencia de SUMO1, es capaz de ramificarse mediante la conjugación de otras moléculas de SUMO e incluso ubiquitina (Seeler and Dejean, 2003).

Este patrón no fue observado cuando se utilizó el mutante de ERK5 deficiente en SUMOilación K6/K22R, a pesar de que MEK5DD lo fosforila en el TEY y se produce el correspondiente *band shift* que indica la

actividad autofosforilante de ERK5. Estos resultados indican que la activación de ERK5 por MEK5 o la sobre-expresión de Cdc37 inducen la SUMOilación de ERK5 en las lisinas 6 y 22 (**Figura 46.A**). Dado que estas lisinas se encuentran en el inicio del dominio N-terminal de ERK5 a continuación se evaluó si la SUMOilación de ERK5 requería de la cola C-terminal de la proteína, sobre-expresando en células HEK-293T el vector que codifica para ERK5-Nterm(1-490) solo o junto MEK5DD o Cdc37. Tal y como muestra la **Figura 45.B**, el extremo N-terminal de ERK5 es suficiente para que ocurra la SUMOilación inducida en respuesta a la activación por MEK5 o a la sobre-expresión de Cdc37.

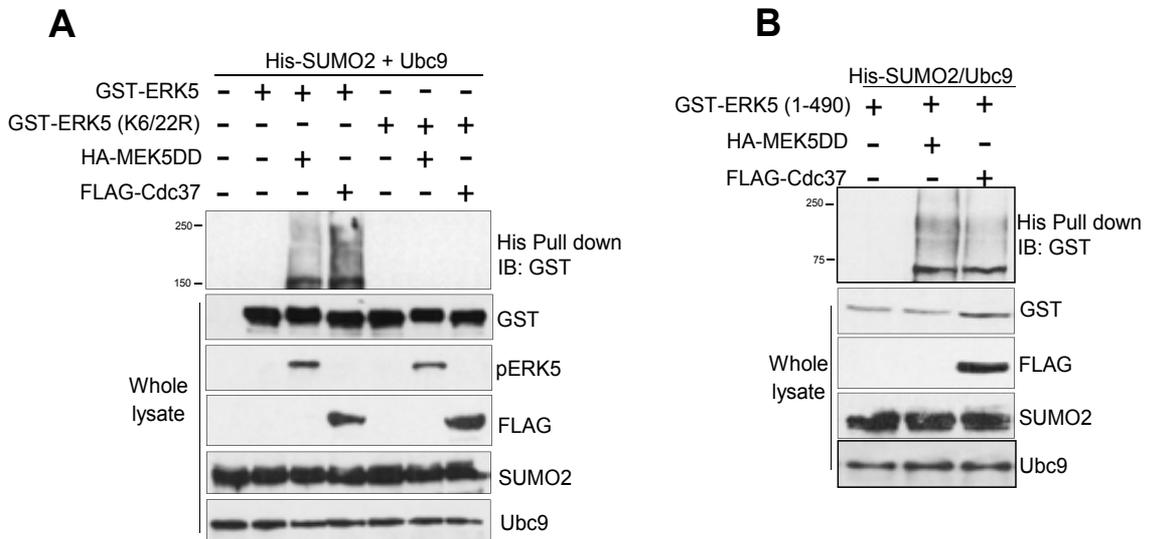


Figura 46. La activación de ERK5 por MEK5 y la sobre-expresión de Cdc37 inducen la SUMOilación de ERK5. Siendo el dominio quinasa de ERK5 suficiente para que ocurra este efecto. Análisis de la SUMOilación *in vivo* de ERK5 mediante ensayo de *pull down* en resina Ni²⁺-agarosa de lisados de células HEK-293T que sobre-expresan His-SUMO2, la enzima ligasa E2 de SUMO (Ubc9), y las proteínas ERK5 salvaje, ERK5 deficiente en SUMOilación (K6/K22R), MEK5DD y Cdc37. Las células fueron lisadas en condiciones desnaturalizantes en presencia del inhibidor específico de la peptidasa de SUMO N-ethylmaleimide (NEM) y las especies SUMOiladas fueron purificadas y detectadas por inmunoblot como se describe en Materiales y Métodos. El panel superior muestra el *pull down* de SUMO2 en el que se detecta la SUMOilación de ERK5 con anticuerpo anti-GST. Los paneles inferiores muestran los niveles de expresión de ERK5, fosfo-ERK5 (pERK5), SUMO2, Cdc37 y Ubc9. Resultados representativos de 2 cultivos independientes. **(B)** Células HEK-293T que sobre-expresan His-SUMO2/Ubc9, GST-ERK5 N-terminal (1-490), MEK5DD y Cdc37, fueron lisadas en condiciones desnaturalizantes en presencia del inhibidor NEM, y las especies SUMOiladas fueron purificadas como se describe en Materiales y Métodos. El panel superior muestra el *pull down* de SUMO2 en el que se detecta la SUMOilación de ERK5 con anticuerpo anti-GST. Como control de transfección, los paneles inferiores muestran los niveles de las proteínas sobre-expresadas, utilizando los anticuerpos indicados.

A continuación, se estudió el rol de la SUMOilación en la translocación nuclear de ERK5, mediante ensayos de inmunofluorescencia en células PC-3 (adenocarcinoma prostático). La **Figura 47** muestra los ensayos de inmunofluorescencia correspondientes a la localización subcelular de las proteína ERK5 salvaje y ERK5 deficiente en SUMOilación (K6/K22R). En esta línea celular, y como pasa en células SH-SY5Y y HeLa, ERK5 reside en el citosol y la activación por MEK5 o la sobre-expresión de Cdc37 inducen su translocación al núcleo. Sin embargo, el mutante deficiente en SUMOilación no transloca al núcleo en respuesta a ambos factores (paneles inferiores de la **Figura 47**). Estos resultados indican que la

translocación nuclear de ERK5 en respuesta a la activación por MEK5 o la sobre-expresión de Cdc37 requiere de la SUMOilación de la proteína.

La SUMOilación es una reacción reversible controlada por la acción de las peptidasas específicas de SUMO SENP (*Sentrin-specific proteases*). Estas enzimas rompen el enlace entre la Gly del extremo C-terminal de SUMO y la Lys de la proteína sustrato (Hickey et al., 2012). En mamíferos se han descrito 6 SENPs (designadas SENP1-3 y SENP5-7), que exhiben diferente especificidad para las formas de SUMO y presentan diferente patrón de localización celular (Hay, 2007; Drag and Salvesen, 2008). Dado que los resultados obtenidos sugieren que la SUMOilación de ERK5 es necesaria para su translocación nuclear, a continuación se evaluó el efecto que tiene la des-SUMOilación de ERK5 mediada por proteasas SENP en los dos mecanismos de translocación estudiados en este trabajo. Se eligió la SENP2 por estar descrita como la proteasa implicada en la vía de ERK5 (Heo et al., 2013). En primer lugar se estudió si la sobre-expresión de SENP2 afectaba a la translocación nuclear de la ERK5 endógena en respuesta a la activación por EGF (modelo canónico de activación de la vía MEK5-ERK5). Inicialmente fue necesario poner a punto el tiempo de estimulación con EGF que es necesario para inducir la translocación nuclear de la ERK5 endógena en células PC-3. Se trataron estas células tratadas con EGF 50ng/ml durante 15, 30 y 60 min y se analizó la localización subcelular de ERK5 mediante inmunofluorescencia. La **Figura 48.A** muestra que la estimulación con EGF induce la migración nuclear de la ERK5 endógena a los tres tiempos de estimulación evaluados, y que la mayor tasa de localización nuclear se consigue a los 30 min de incubación de las células con EGF. A continuación, se sobre-expresó la proteasa SENP2 y se estimuló con EGF durante 30 min. La **Figura 48.B** muestra que la sobre-expresión de SENP2 bloquea translocación nuclear de ERK5 inducida por la activación celular con EGF.

Se realizó un experimento análogo para evaluar el mecanismo de translocación de ERK5 inducido por Cdc37. Para ello se sobre-expresó en células PC-3 transfectadas con Cdc37 y/o SENP2 y se analizó la localización subcelular de ERK5 mediante ensayo de inmunofluorescencia. La **Figura 49** muestra que expresión de la SENP2 también bloquea la entrada de ERK5 en el núcleo en respuesta a la sobre-expresión de Cdc37. Estos resultados redundan en el sentido de que la translocación nuclear de ERK5 inducida por MEK5 y Cdc37 requiere de la SUMOilación de la proteína.

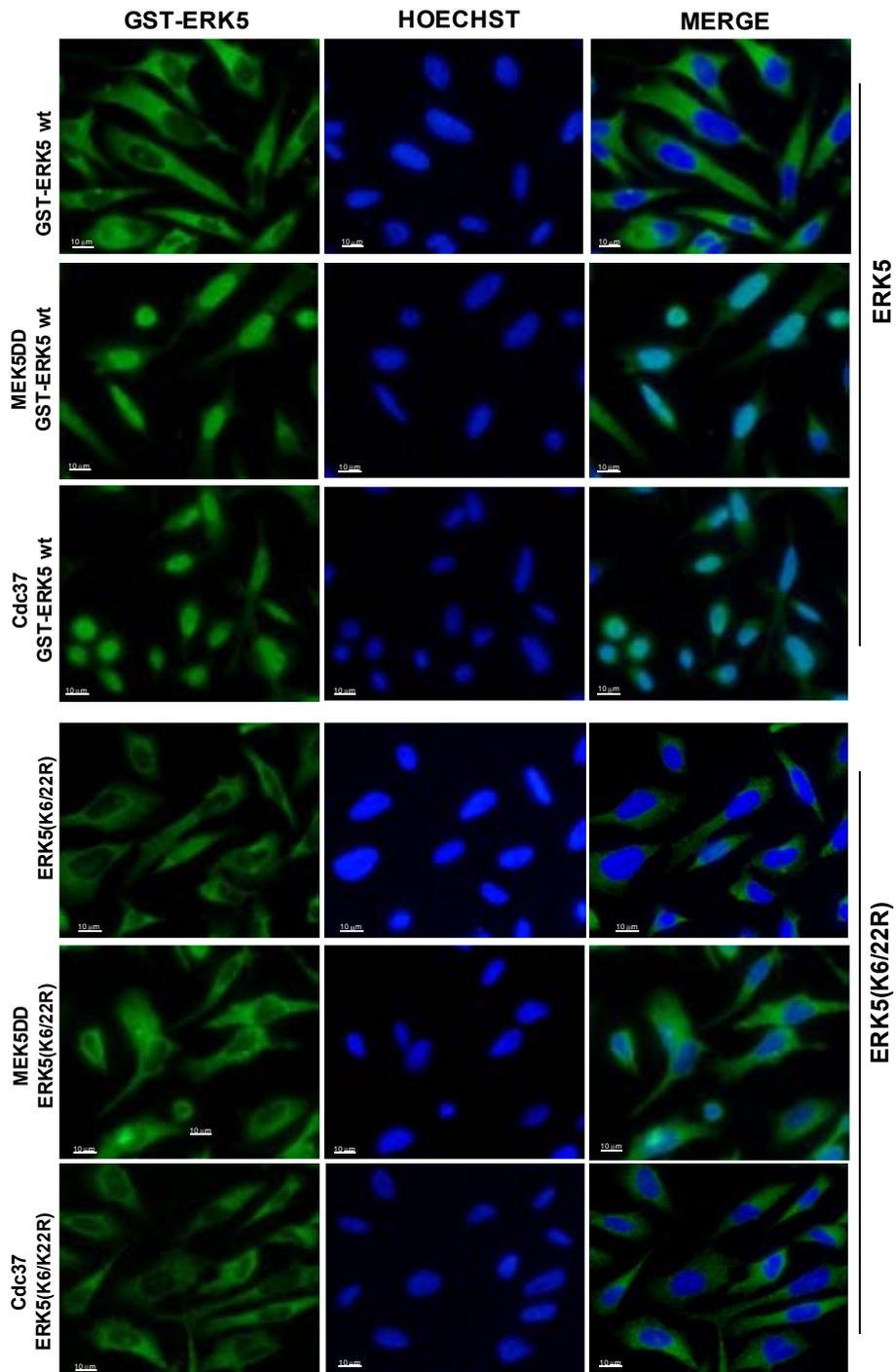


Figura 47. La SUMOilación de ERK5 es necesaria para la translocación nuclear núcleo de ERK5 inducida por MEK5 y la sobre-expresión de Cdc37. Microscopía de fluorescencia de células PC-3 que sobre-expresan las formas de ERK5 salvaje (WT) o deficiente en SUMOilación (K6/K22R), solas o co-expresadas con MEK5DD o exceso de Cdc37. 24 horas después de la transfección las células fueron fijadas con paraformaldehído y visualizadas en microscopio de inmunofluorescencia para ERK5 (verde) y tinción nuclear Hoechst (azul). Los terceros paneles muestran la superposición de los dos anteriores (Merged). Resultados representativos de 3 cultivos independientes.

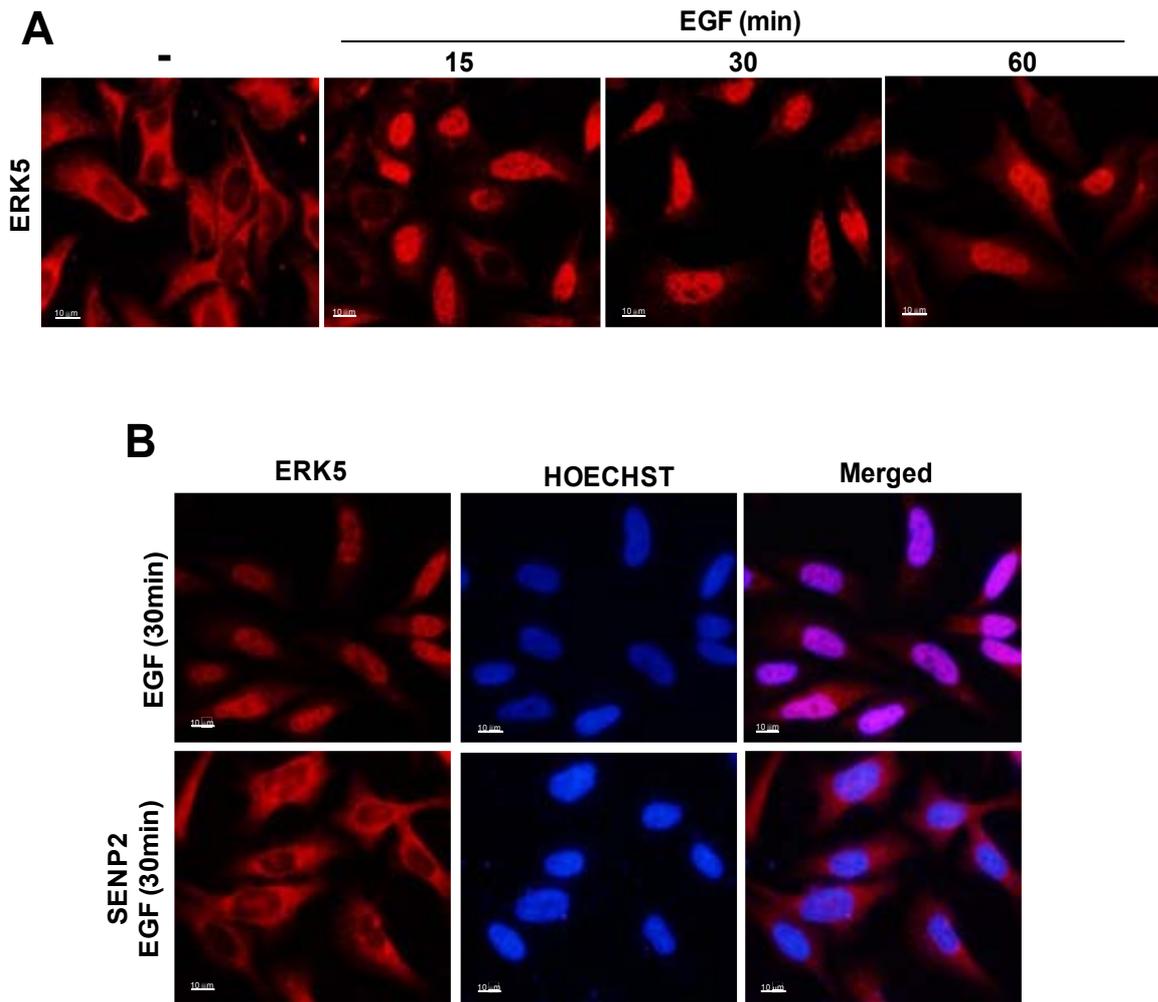


Figura 48. La sobre-expresión de la peptidasa específica de SUMO SENP2 bloquea la translocación nuclear de ERK5 en respuesta a EGF. (A) Células PC-3 fueron deprivadas de suero por 16 horas e incubadas con 50 ng/ml EGF durante los tiempos indicados, fijadas con 4% de paraformaldehído, y la localización subcelular de la ERK5 endógena fue determinada mediante inmunofluorescencia utilizando anticuerpo anti-ERK5. Los núcleos se tiñeron con Hoechst (azul) y el panel de la izquierda muestra la superposición de los dos anteriores. **(B)** Como (A), pero las células PC-3 fueron transfectadas con el vector que codifica para SENP2 y estimuladas con 50 ng/ml EGF durante 30 minutos. Resultados representativos de dos cultivos independientes.

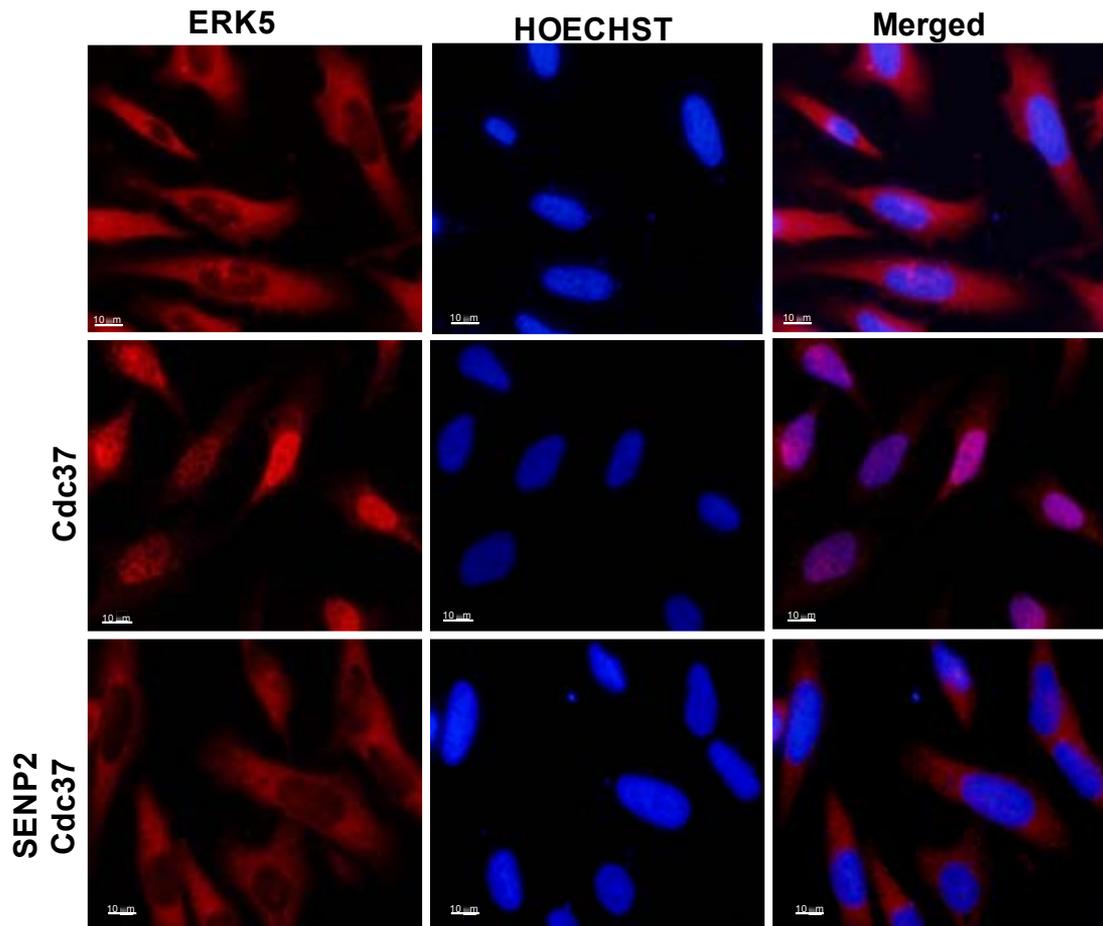


Figura 49. La sobre-expresión de la peptidasa específica de SUMO SENP2 bloquea la translocación al núcleo de ERK5 inducida en respuesta a la sobre-expresión de Cdc37. Células PC-3 fueron transfectadas con vectores que codifican Cdc37 y SENP2. 24 horas post-transfección las células fueron fijadas con paraformaldehído y se determinó mediante inmunofluorescencia la localización subcelular de ERK5 (rojo). Los núcleos se tiñeron con Hoechst (azul) y el panel de la izquierda muestra la superposición de los dos anteriores. Resultados representativos de dos cultivos independientes.

Como se ha mostrado en este trabajo, la activación por MEK5 induce la autofosforilación de ERK5 en su cola C-terminal y este evento es necesario para la translocación nuclear. Por ello, a continuación se comprobó si el efecto inhibitorio de SENP2 sobre la localización nuclear de ERK5 era debido a una inhibición de la actividad quinasa de ERK5, mediante ensayos radiométricos de actividad quinasa de inmunoprecipitados celulares. La **Figura 50** muestra el correspondiente ensayo radiométrico, utilizando ^{32}P -ATP/Mg $^{2+}$ y PIM2tide como sustratos, donde se observa que tanto la ERK5 salvaje como la forma deficiente en SUMOilación (K6/22R) celulares son fosforiladas igualmente por MEK5 (panel pERK5) y presentan la misma actividad quinasa. Por lo tanto, el mutante deficiente en SUMOilación es funcionalmente activo.

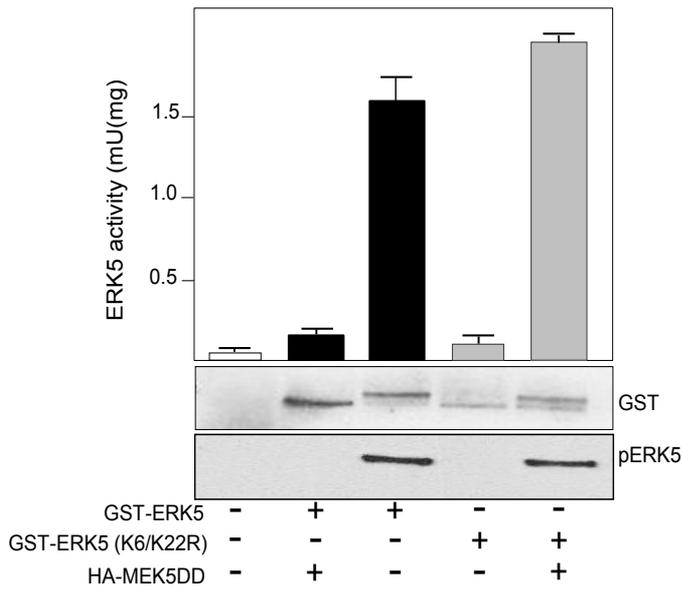


Figura 50. La SUMOilación de ERK5 no afecta a su actividad quinasa. Células HEK-293T que sobreexpresan las formas de ERK5 salvaje o deficiente en SUMOilación (K6/22R), solas o en combinación con MEK5DD, fueron lisadas y la proteína ERK5 recombinante purificada en resina glutatión-*sepharose*, según se describe en Material y Métodos. La actividad específica de ERK5 se determinó en los precipitados mediante ensayo radiométrico, utilizando 200 μ M del péptido PIM2tide y 100 μ M [γ - 32 P]-ATP como sustratos. Los valores son medias \pm s.d. de ensayos realizados por triplicado y representativo de dos experimentos independientes. Los paneles inferiores muestran los inmunoblots correspondientes a los niveles totales (GST-ERK5) y de fosfo-ERK5 (pERK5)

A la vista de los resultados anteriores, a continuación se estudió cómo afectaba la SUMOilación a la actividad transcripcional de ERK5, monitorizada mediante ensayo gen reportero para Luciferasa-AP1. Para ello se transfectaron células HEK-293T con el vector pGL4-AP1-luciferasa, juntamente con ERK5 salvaje o la forma deficiente en SUMOilación K6/K22R, en presencia o ausencia de MEK5DD o Cdc37. En consonancia con los resultados que mostraban que el mutante ERK5-K6/22R no transloca al núcleo (**Figura 47**), el mutante deficiente en SUMOilación no induce la activación transcripcional de AP-1 mediada por ERK5, ni al co-expresarse con MEK5 activa ni con exceso de Cdc37 (**Figura 51**).

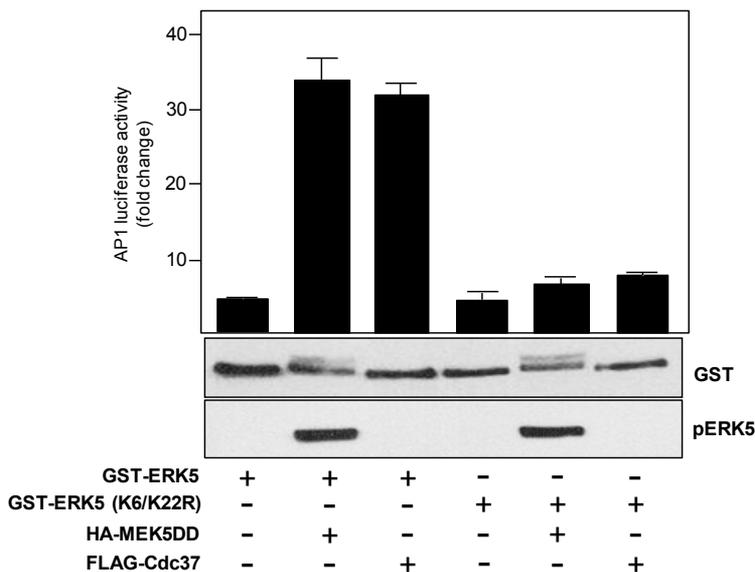


Figura 51. La activación por MEK5 o la sobre-expresión de Cdc37 no inducen la actividad transcripcional de la forma de ERK5 deficiente en SUMOilación (K6/22R) Células HeLa fueron co-transfectadas con los vectores pAP1-luciferasa, pRL-CMV-Renilla y los plásmidos indicados. 24 horas post-transfección las células fueron lisadas y se determinó la actividad luciferasa mediante ensayo de gen reportero usando el kit *Dual Luciferase Reporter Assay System*. Los valores representan la media \pm s.d. de tres experimentos diferentes (realizados en triplicado) y normalizados con los valores de Renilla.

Como se ha indicado con anterioridad, los resultados obtenidos en este trabajo apuntan hacia la idea de que la chaperona Hsp90 operaría como una proteína de anclaje citoplasmático para ERK5. Dado que la forma de ERK5 deficiente en SUMOilación (K6/K22R) no transloca a núcleo bajo ninguno de los dos mecanismos estudiados en este trabajo (MEK5 o Cdc37), se planteó la posibilidad de que la SUMOilación de ERK5 fuera requerida como primer paso para la disociación de Hsp90 y, en consecuencia, para la migración al núcleo. Para ello se evaluó la interacción de Hsp90 y el mutante de ERK5 deficiente en SUMOilación (K6/K22R) y Hsp90, en condiciones basales o de activación por MEK5.

La **Figura 52** muestra los correspondientes ensayos de *pull down*, en donde se precipitó la GST-ERK5 sobre-expresada con resina glutatión-*sepharose*, y los ensayos análogos donde se inmunoprecipitó la Hsp90 sobre-expresada. En condiciones basales, tanto la ERK5 salvaje como la forma deficiente en SUMOilación interaccionan con Hsp90. En condiciones de activación (sobre-expresión de MEK5 activa) Hsp90 se disocia de la ERK5 salvaje activa, mientras que el mutante deficiente en SUMOilación K6/22R sigue interaccionando con la chaperona. De manera análoga, los experimentos de inmunoprecipitación de Hsp90 muestran el mutante K6/K22R en los precipitados independientemente de su estado de activación. Este resultado se ajusta a la hipótesis planteada anteriormente e indica que la activación de ERK5 por MEK5, además de inducir la autofosforilación de su cola C-terminal y los correspondientes cambios conformacionales, también induce la unión de moléculas de SUMO que probablemente compitan y desplacen a Hsp90 (ancla citosólica), facilitando así el transporte de ERK5 al núcleo.

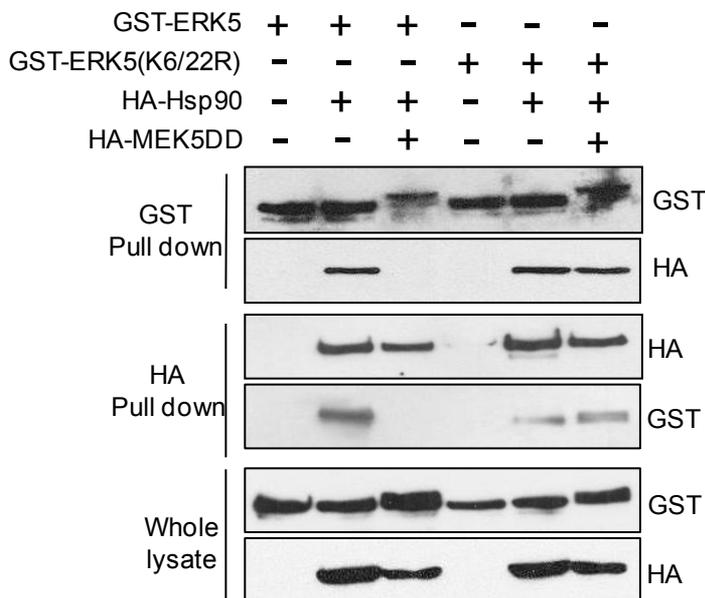


Figura 52. El mutante de ERK5 deficiente en SUMOilación inactivo y activo interacciona con Hsp90. Células HEK-293T fueron transfectadas con los vectores indicados. Las proteínas ERK5 y Hsp90 fueron purificadas en resina *glutathione-sepharose* (paneles superiores) y HA-agarosa (paneles intermedios), respectivamente, y la presencia de ERK5 y Hsp90 en los precipitados fue analizada mediante inmunoblot. Los paneles inferiores (*whole lysate*) muestran los niveles de expresión para cada proteína. Se obtuvieron resultados similares en 3 experimentos independientes.

Se realizaron experimentos análogos con la finalidad de evaluar el efecto de la sobre-expresión de Cdc37 en la interacción entre el mutante ERK5(K6/K22R) y Hsp90. Como se ha mostrado con anterioridad, la expresión de cantidades iguales de ERK5, Hsp90 y Cdc37 propician la formación del complejo ternario, mientras que la expresión de Cdc37 en exceso provoca la disociación de Hsp90 del complejo ERK5-Cdc37 (Figura 34). En un experimento análogo se expresó en células HEK-293 se expresaron cantidades equivalentes de Hsp90 y ERK5 salvaje o ERK5 K6/K22R (1 µg), y dos cantidades de Cdc37 (1-4µg) y se analizó la presencia del complejo trimérico mediante ensayos de precipitación de ERK5 y análisis de la presencia de Hsp90 y Cdc37 en los precipitados. La Figura 53 muestra que, independientemente del estado de activación, la expresión de exceso de Cdc37 induce la disociación de Hsp90 del complejo que forma Cdc37 con la ERK5 salvaje como el mutante K6/22R. Este resultado indica que la sobre-expresión de exceso de Cdc37 debe de desplazar directamente a Hsp90, y que en estas condiciones la disociación de Hsp90 no requeriría la SUMOilación de ERK5 (Hsp90 también se disocia del mutante K6/22R), y muestra un mecanismo diferente al de la activación por MEK5.

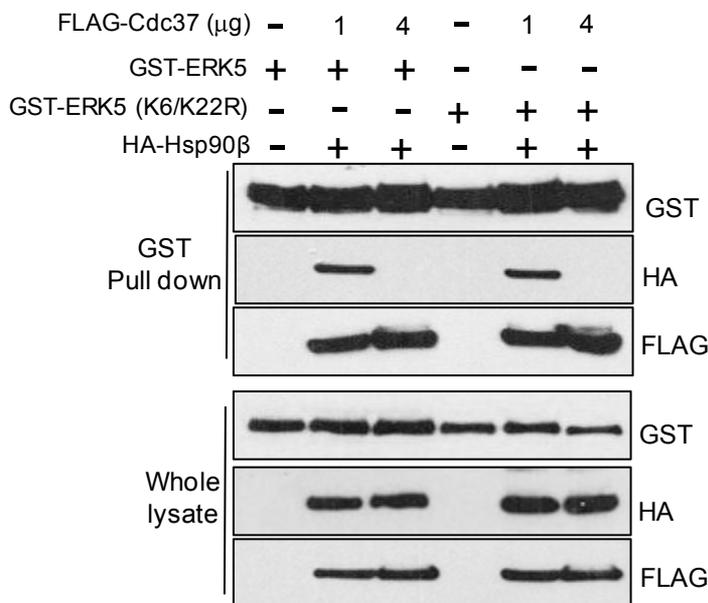


Figura 53. La sobreexpresión de Cdc37 induce la pérdida de interacción entre Hsp90 y el mutante de ERK5 deficiente en SUMOilación. Células HEK-293T fueron transfectadas con los plásmidos indicados y 48 horas post-transfección las células fueron lisadas. ERK5 fue purificada en resina glutatión--sepharose (paneles superiores) y la presencia de ERK5, Hsp90 y Cdc37 en los precipitados fue analizada mediante inmunoblot. Los paneles inferiores (*whole lysate*) muestran los niveles de expresión para cada proteína. Se obtuvieron resultados similares en 3 experimentos independientes.

Finalmente se estudió si se requería la actividad catalítica de ERK5 para su SUMOilación. Para ello se transfectaron células HEK-293 con vectores de expresión para His-SUMO2 y Ubc9 juntamente con ERK5 salvaje o la forma catalíticamente inactiva ERK5(D200A), en presencia/ausencia de MEK5DD o Cdc37, y se realizó el ensayo del *pull down* para observar las formas SUMOiladas de ERK5

La Figura 54.A muestra que la expresión de MEK5DD y Cdc37 logran inducir la SUMOilación tanto de la forma salvaje de ERK5 como del mutante catalíticamente inactivo (D200A), lo que indica que la SUMOilación de ERK5 no requiere de la quinasa de ERK5: por otra parte, y dado que sólo la expresión

de MEK5 indujo la fosforilación del motivo TEY de ERK5, estos resultados también descartan la fosforilación el T-loop como evento necesario para la SUMOilación de ERK5.

En paralelo se analizó el efecto de la expresión de MEK5 activa y de exceso de exceso de Cdc37 en la interacción de Hsp90 con las formas salvaje y catalíticamente inactivas de ERK5. Como muestra la **Figura 54.B**, y a diferencia con lo que pasa para MEK5DD, la expresión de CDC37 resulta en la disociación de Hsp90 de la forma inactiva de ERK5 D200A. Estos resultados redundan en las observaciones anteriores, que muestran mecanismos diferentes para la SUMOilación de ERK5 y para disociación de Hsp90 en respuesta a su activación por MEK5 o a la sobre-expresión de Cdc37.

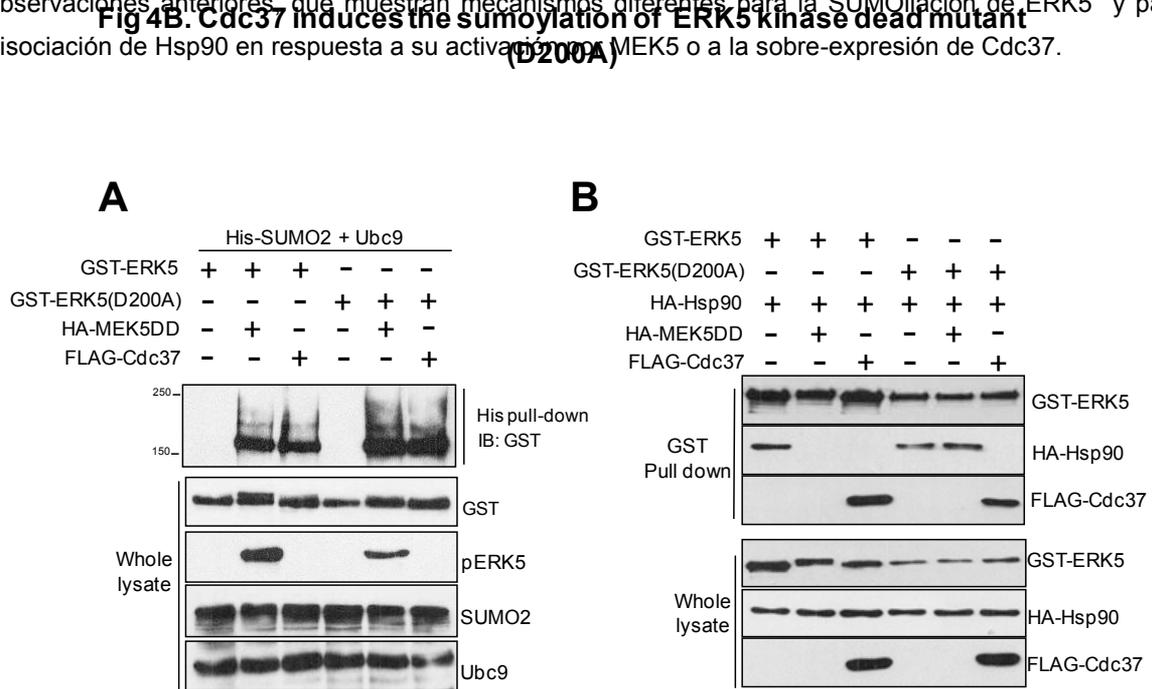


Figura 54. La activación por MEK5 o la sobre-expresión de Cdc37 inducen la SUMOilación del mutante de ERK5 que catalíticamente inactivo. Pero solo la sobre-expresión de Cdc37 induce la disociación de Hsp90. (A) Células HEK-293T que sobre-expresan His-SUMO2 y Ubc9, y las formas de ERK5 salvaje o catalíticamente inactiva (ERK5 D200A), juntamente con MEK5 activa o Cdc37 fueron lisadas en condiciones desnaturalizantes en presencia del inhibidor específico de la peptidasa de SUMO NEM, y las especies SUMOiladas fueron purificadas como se describe en Materiales y Métodos. El panel superior muestra el *pull down* de SUMO2 en el que se detecta la SUMOilación de ERK5 con anticuerpo anti-GST. Como control de transfección, los paneles inferiores (*Whole lysate*) muestran los niveles de las proteínas sobre-expresadas, utilizando los anticuerpos indicados. **(B)** Células HEK-293T fueron transfectadas con los vectores indicados, la ERK5 sobre-expresada fue purificada en resina glutatión-*Sepharose* (paneles superiores) y la presencia de ERK5, Hsp90 y Cdc37 en los precipitados fue analizada mediante inmunoblot. Los paneles inferiores (*whole lysate*) muestran los niveles de expresión para cada proteína. Se obtuvieron resultados similares en 3 experimentos independientes.

RESULTADOS – CAPÍTULO 2:

Rol de ERK5 y Cdc37 en la proliferación celular

Rol de ERK5 y Cdc37 en la proliferación y migración celular

2.1 Cdc37 coopera con ERK5 en promover la proliferación de células de adenocarcinoma de próstata PC-3.

Hasta el momento se ha descrito que la sobre-expresión de la co-chaperona Cdc37 da lugar a un nuevo mecanismo, no canónico, de translocación nuclear de ERK5, que consiste en la entrada a núcleo de una forma catalíticamente inactiva capaz de inducir la activación transcripcional de factores de transcripción como AP-1. Para ello se utilizaron las líneas HeLa y HEK-293T como modelos celulares. Dado que se ha descrito la sobre-expresión de Cdc37 en varios tipos de tumores, a continuación se procedió a caracterizar la posible funcionalidad de la interacción ERK5-Cdc37 en un modelo celular tumoral.

ERK5 juega un papel importante en el control de la proliferación celular en respuesta a varios estímulos (Kato et al., 1995; Lochhead et al., 2012). Dados los resultados descritos en el capítulo anterior se decidió estudiar si la sobre-expresión de Cdc37 (como ocurre para la sobre-expresión de MEK5) tiene algún efecto sobre la proliferación celular inducida por ERK5. En primer lugar se evaluaron los niveles de expresión de ERK5 y Cdc37 en un panel de nueve líneas celulares, en su mayoría tumorales. La **Figura 55** muestra cómo la mayor parte de las líneas tumorales analizadas presentan elevados niveles de expresión de las proteínas endógenas ERK5 y Cdc37. Destacan las dos líneas de adenocarcinoma de próstata, PC-3 y LnCap, que presentan niveles altos tanto de ERK5 como de Cdc37. Esta observación está en consonancia con los trabajos publicados por diferentes autores que muestran niveles de expresión elevados para ERK5 y Cdc37 en las neoplasias prostáticas (Metha et al., 2003; McCracken et al., 2008; Stepanova et al., 2000).

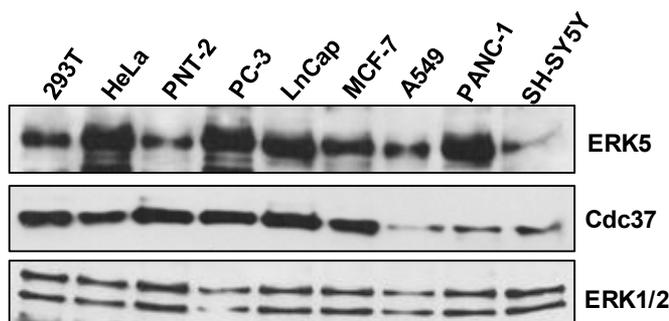


Figura 55. Análisis de los niveles de expresión de ERK5 y Cdc37 en diferentes líneas celulares humanas. Se utilizaron 10 µg de lisados de células HEK-293T (riñón de embrión), HeLa (carcinoma epidermoide de cérvix uterino), PNT-2 (epitelio normal de próstata), PC-3 (adenocarcinoma de próstata), LnCap (adenocarcinoma de próstata andrógeno sensible), MCF-7 (adenocarcinoma de mama), A549 (adenocarcinoma de pulmón), PANC-1 (carcinoma humano de páncreas) y SH-SY5Y (neuroblastoma). Los niveles de las proteínas estudiadas fueron monitorizados mediante inmunoblot, utilizando los anticuerpos indicados. Los niveles de ERK1/2 se muestran como control de carga. Se obtuvieron resultados similares en dos baterías independientes de lisados celulares.

Así pues, se escogió como modelo celular la línea PC-3 de adenocarcinoma prostático para el estudiar la posible colaboración de ERK5 y Cdc37 en la proliferación celular, mediante la realización de dos tipos de experimentos: a) recuento de células a lo largo del tiempo; y b) determinación de la tasa de proliferación mediante ensayo de incorporación de BrdU. Para el primer caso, se transfectaron células PC-3 con vectores de expresión que codifican para GFP (control). GFP-ERK5, MEK5DD o Cdc37 (co-expresadas con GFP) y combinaciones de GFP-ERK5 con MEK5DD o Cdc37, y las células GFP positivas viables fueron cuantificadas mediante citometría de flujo durante diferentes días post-transfección. No hubo cambios morfológicos aparentes en las diferentes condiciones de transfección. La sobre-expresión de MEK5DD y Cdc37 deja un leve pero significativo ($p < 0.01$) incremento en la proliferación de células PC-3 después de cuatro días, como ya había sido descrito previamente (Mehta et al., 2003; Schwarze et al., 2003). De manera interesante, la sobre-expresión de ERK5 no tiene efecto pero sí su co-expresión con MEK5DD y Cdc37 que resulta en un fuerte incremento de la proliferación celular ($p < 0.001$) (ver **Figura 56**

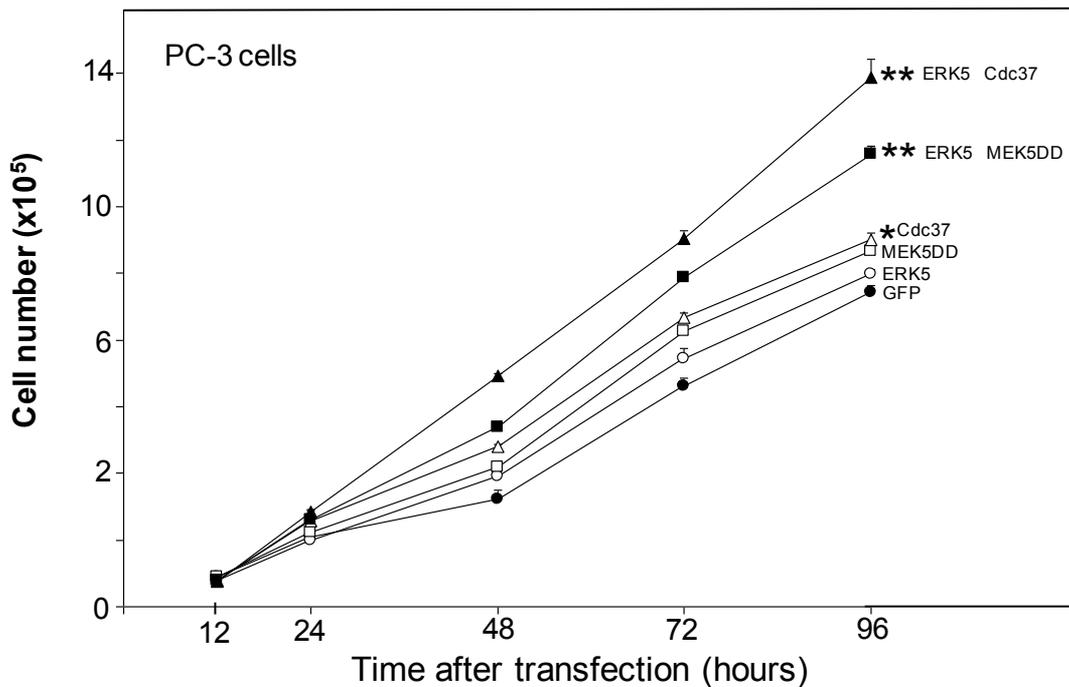


Figura 56. La activación de ERK5 por MEK5 o la sobre-expresión de Cdc37 resulta en un aumento de la proliferación celular. Se sembraron 10^5 células PC-3 y 24 horas después fueron transfectadas con vectores que codifican para GFP (●), GFP-ERK5 (○), MEK5-DD y GFP (□), Cdc37 y GFP (Δ), GFP-ERK5 y MEK5-DD (■) o GFP-ERK5 y Cdc37 (▲). Las células fueron recogidas a las horas de cultivo indicadas y el número de células verdes fluorescentes viables fue cuantificado mediante el citometría de flujo. Los valores representan la media \pm s.d. de triplicados (tres pocillos) para cada condición de transfección, y son representativos de tres experimentos independientes.

A continuación, se determinó el porcentaje de células en fase S mediante ensayos de incorporación del análogo de timidina 5-Bromo-2-desoxiuridina (BrdU), que es una aproximación utilizada ampliamente para

cuantificar el número de células que se encuentra en la fase de replicación del DNA (proliferación). En consonancia con los resultados de la **Figura 56**, la sobre-expresión de ERK5, MEK5DD y Cdc37 tiene un efecto escaso en el número de células BrdU positivas, aunque es significativo para la expresión de Cdc37 ($p < 0,01$). Sin embargo, la activación de ERK5 sobre-expresada con MEK5DD o su co-expresión con exceso de Cdc37 resulta en un aumento significativo en el número de células proliferantes ($p < 0.001$) (**Figura 57**). En síntesis, nuestros resultados demuestran que Cdc37 coopera con ERK5 en promover la proliferación de células PC-3.

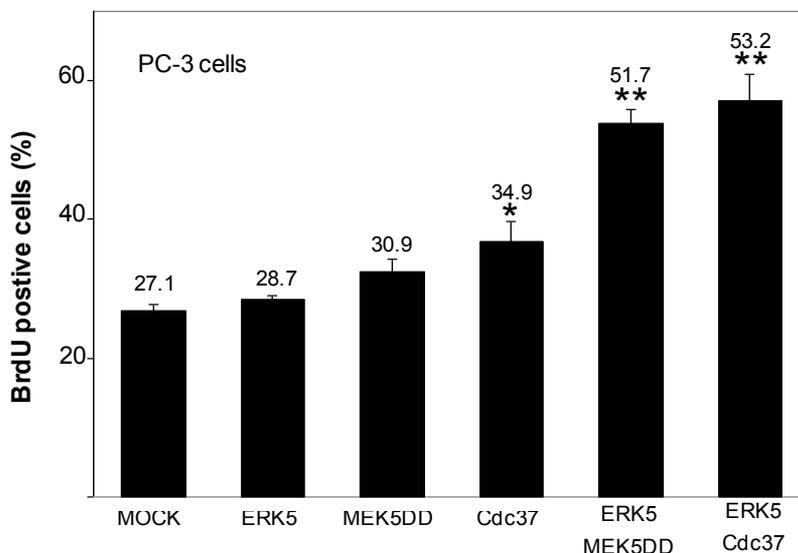


Figura 57. Cdc37 colabora con ERK5 en la inducción de la proliferación celular. Células PC-3 fueron transfectadas con el vector vacío (mock) o con los plásmidos indicados. 36 horas después, las células fueron tratadas con BrdU y la incorporación de BrdU fue cuantificada mediante citometría utilizando anticuerpo anti-BrdU de flujo, según se describe en la sección Material y Métodos. Se muestra el porcentaje de células BrdU positivas vivas obtenido de dos experimentos diferentes (media \pm s.d.), cada uno realizado en triplicado. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ respecto al control (mock).

2.2 Cdc37 coopera con ERK5 en promover la proliferación y migración celular en líneas estables PC-3

En vista de los resultados obtenidos se decidió generar líneas celulares que sobre-expresaran establemente ERK5 y Cdc37. Estas líneas constituirán una herramienta fundamental para la caracterización de los mecanismos moleculares implicados en la cooperación de ERK5 y Cdc37 en promover la proliferación celular. También se utilizarán para caracterizar el papel que juega la sobre-expresión de estas proteínas en el cáncer de próstata: en ensayos, por ejemplo, de migración e invasividad celular, o generación de xenografts en ratones inmunodeprimidos.

Se utilizaron en células PC-3 los vectores pcMV4-FLAG-ERK5 y/o pcDNA3.1-FLAG-Cdc37, y las células transfectadas fueron seleccionadas utilizando el correspondiente antibiótico, siguiendo el protocolo descrito en la sección Materiales. Las colonias generadas fueron recogidas, expandidas y los diferentes

clones obtenidos fueron analizados mediante inmunoblot para valorar el nivel de expresión de las diferentes proteínas. En la **Figura 58.A** se muestran los niveles de expresión de ERK5 y Cdc37 en las líneas estables generadas: PC3 parentales, PC3-ERK5, PC3-Cdc37 y PC3-ERK5/Cdc37, donde se aprecia que ERK5 fue sobre-expresada 4 veces con respecto a la proteína endógena y Cdc37 entre 2 veces (PC3-Cdc37) y 5 veces (PC3-ERK5/Cdc37).

Adicionalmente, la localización subcelular de las proteínas objeto del estudio en las líneas estables generadas fue estudiada mediante fraccionamiento subcelular que permite obtener las fracciones citosólicas y nucleares de las cuatro líneas. En la **Figura 58.B** se observa que las líneas parental y PC3-ERK5 muestran una ERK5 citosólica, mientras que las líneas en que poseen Cdc37 sobre-expresada (PC3-Cdc37 y PC3-ERK5/Cdc37) presentan una localización de ERK5 mayoritariamente nuclear.

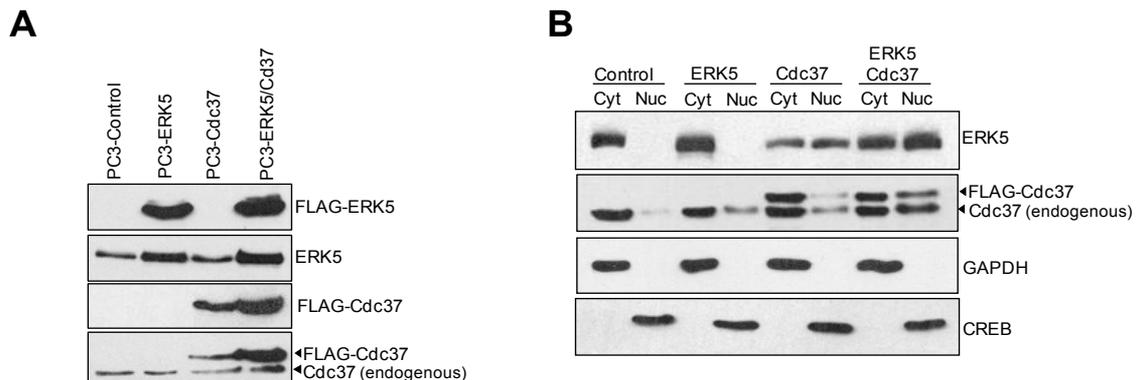


Figura 58. Caracterización de las líneas estables generadas PC3-ERK5, PC3-Cdc37 y PC3-ERK5/Cdc37 (A), Se generaron células PC-3 que expresan establemente el vector vacío (lineal parental), ERK5 (sobre-expresa FLAG-ERK5), Cdc37 (sobre-expresa FLAG-Cdc37) o ERK5 y Cdc37, según la metodología descrita en la sección Material y Métodos. Se muestra el análisis por inmunoblot de los niveles de expresión de las proteínas indicadas. **(B)** Fraccionamiento subcelular. Se prepararon las fracciones citosólica (Cyt) y nuclear (Nuc) de las líneas estables PC-3 indicadas, según la metodología descrita en la sección Material y Métodos. Se utilizaron 20 µg de cada fracción para analizar la presencia de las proteínas indicadas mediante inmunoblot. GAPDH y CREB marcadores de la fracción citosólica y nuclear, respectivamente. Se obtuvieron resultados similares en dos experimentos independientes.

Seguidamente se comparó la tasa de proliferación celular de las cuatro líneas estables generadas. Mediante citometría de flujo se contó el número de células viables a 24, 48, 72 y 96 horas post-siembra (se sembraron 10^5 células para cada línea). La **Figura 59.A** muestra que a 72 horas de cultivo las tres líneas celulares generadas presentan un incremento significativo en la proliferación con respecto a las PC3 parentales. Estas diferencias se hacen más evidentes a las 96 horas post-siembra, donde las líneas PC3-ERK5 y PC3-Cdc37 presentan aproximadamente el doble de células que la línea parental, mientras que la línea PC3-ERK5/Cdc37 cuatricula esa tasa de proliferación. Con la finalidad de corroborar estos resultados se realizaron los correspondientes experimentos medición de tasa de proliferación mediante la

monitorización de la incorporación de BrdU. En consonancia con los resultados de las curvas de proliferación mostrados en la **Figura 59.A**, las células PC3-ERK5 y PC3-Cdc37 duplican la tasa de proliferación (porcentaje de células en fase S) de las células parentales, mientras que la que sobre-expresa ERK5 y Cdc37 (PC3-ERK5/Cdc37) lo hace 4 veces (**Figura 59.B**). Estos resultados muestran en su conjunto que ERK5 colabora con Cdc37 en promover la proliferación celular en las líneas estables generadas.

Se llevaron a cabo experimentos con el fin de describir preliminarmente el mecanismo molecular por el cual ERK5 y Cdc37 cooperan en la promoción de la proliferación. Para ello se evaluó si la co-expresión de ambas proteínas tenía algún efecto en la expresión de algunas proteínas claves en el control del ciclo celular. La **Figura 59.C** muestra los inmunoblots de extractos celulares de líneas PC-3 estables generadas, donde se observa que las células que sobre-expresan tanto ERK5 como Cdc37 presentan un claro aumento en la expresión de la Ciclina D1, comparados con los niveles de la línea PC-3 parental. A su vez, no se encontraron diferencias significativas en la expresión del protooncogén c-Myc en las cuatro líneas celulares.

Dado que ha sido descrito que la Cdc37 y ERK5 de manera independiente inducen la movilidad e invasión de diferentes líneas celulares (El et al., 2012; Spiering et al., 2009; Ramsay et al., 2011), se llevaron a cabo ensayos de migración (*wound healing*) para comparar la tasa de movilidad celular de las líneas estables generadas. Para ello 24 horas post-siembra, cuando las células se encontraban al 100% de confluencia se realizó una “herida” en cada pocillo, y la migración fue monitorizada a través de fotografías hechas cada 30 minutos durante aproximadamente 32 horas. La **Figura 60** muestra las imágenes representativas de la migración celular de cada línea de PC-3 a los tiempos indicados. Las células PC-3 control no lograron cerrar la herida aún pasadas 32 horas, mientras que las líneas PC3-ERK5 y PC3-Cdc37 lograron cubrir el área casi completamente al tiempo final evaluado (32 h). La línea PC3-ERK5/Cdc37 presentó la mayor tasa de migración, a 24 h se observa como las células se han desplazado a lado y lado de la herida hasta quedar completamente cubierta a las 32 h.

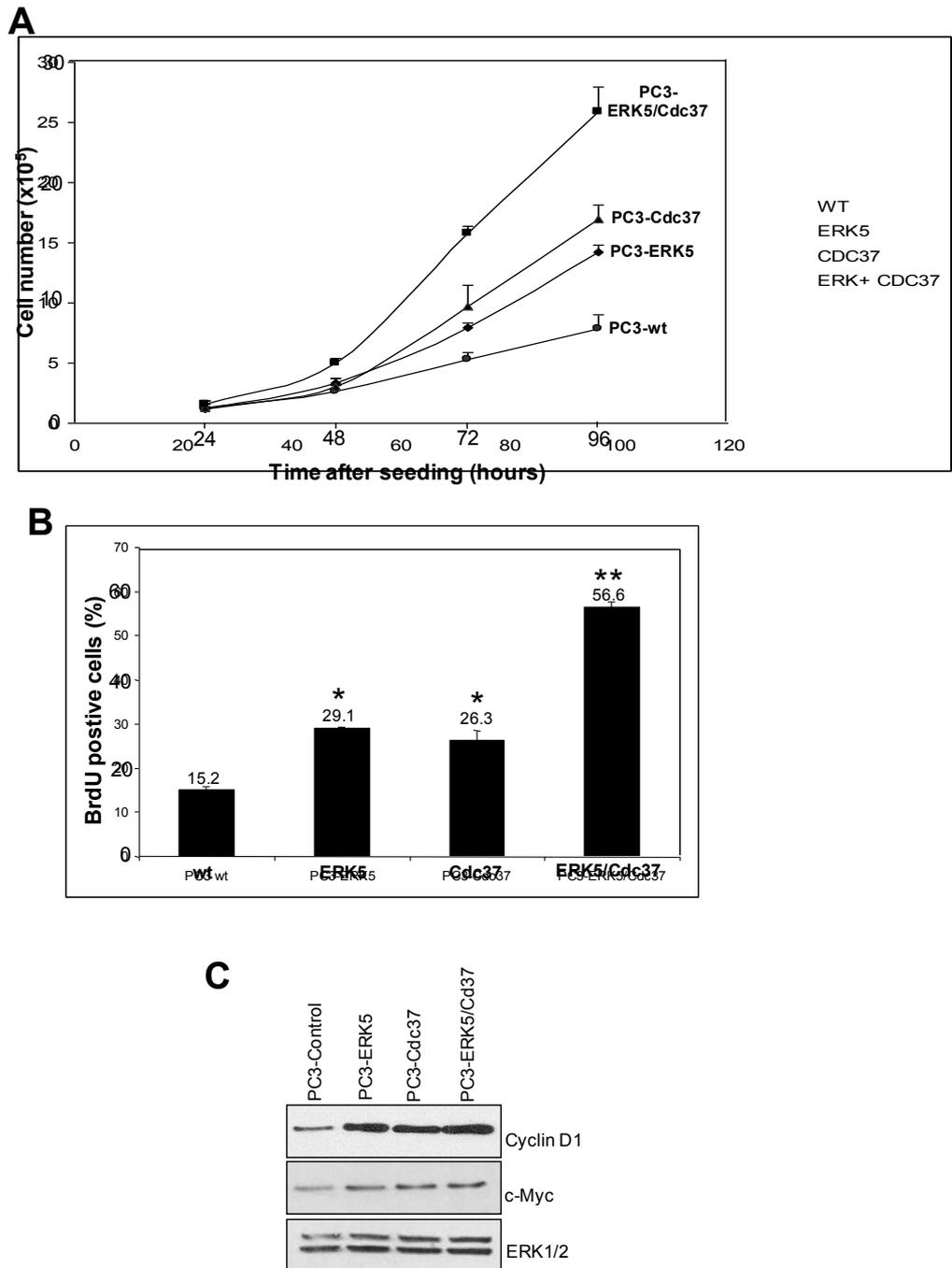


Figura 59. ERK5 y Cdc37 cooperan en la promoción de la proliferación celular de líneas estables de células PC-3, e inducen la expresión de la Ciclina D1. (A) Se sembraron 10^5 células de cada una de las 4 líneas estables generadas. Las células fueron recogidas a las 24, 48, 72 y 96 horas de cultivo y el número de células viables fue cuantificado por el citometría de flujo. Los valores representan la media \pm s.d. de triplicados (tres pocillos) por cada línea, y son representativos de tres experimentos independientes. (B) Las líneas PC-3 estables fueron sembradas en placas de 12 pocillos y 72 horas después se incubaron con BrdU durante 3 horas, la incorporación de BrdU fue cuantificada mediante citometría de flujo utilizando anticuerpo anti-BrdU, según el protocolo descrito en la sección Material y Métodos. Se muestra el porcentaje de células BrdU positivas vivas obtenido en dos experimentos diferentes (media \pm s.d.), cada uno realizado en triplicado. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ respecto al PC-3 parental (wt). (C) Las líneas estables generadas fueron lisadas en tampón RIPA 1% y la expresión de las proteínas Ciclina D1, c-Myc y ERK1/2 (como control de carga) fueron analizadas mediante inmunoblot utilizando anticuerpos específicos.

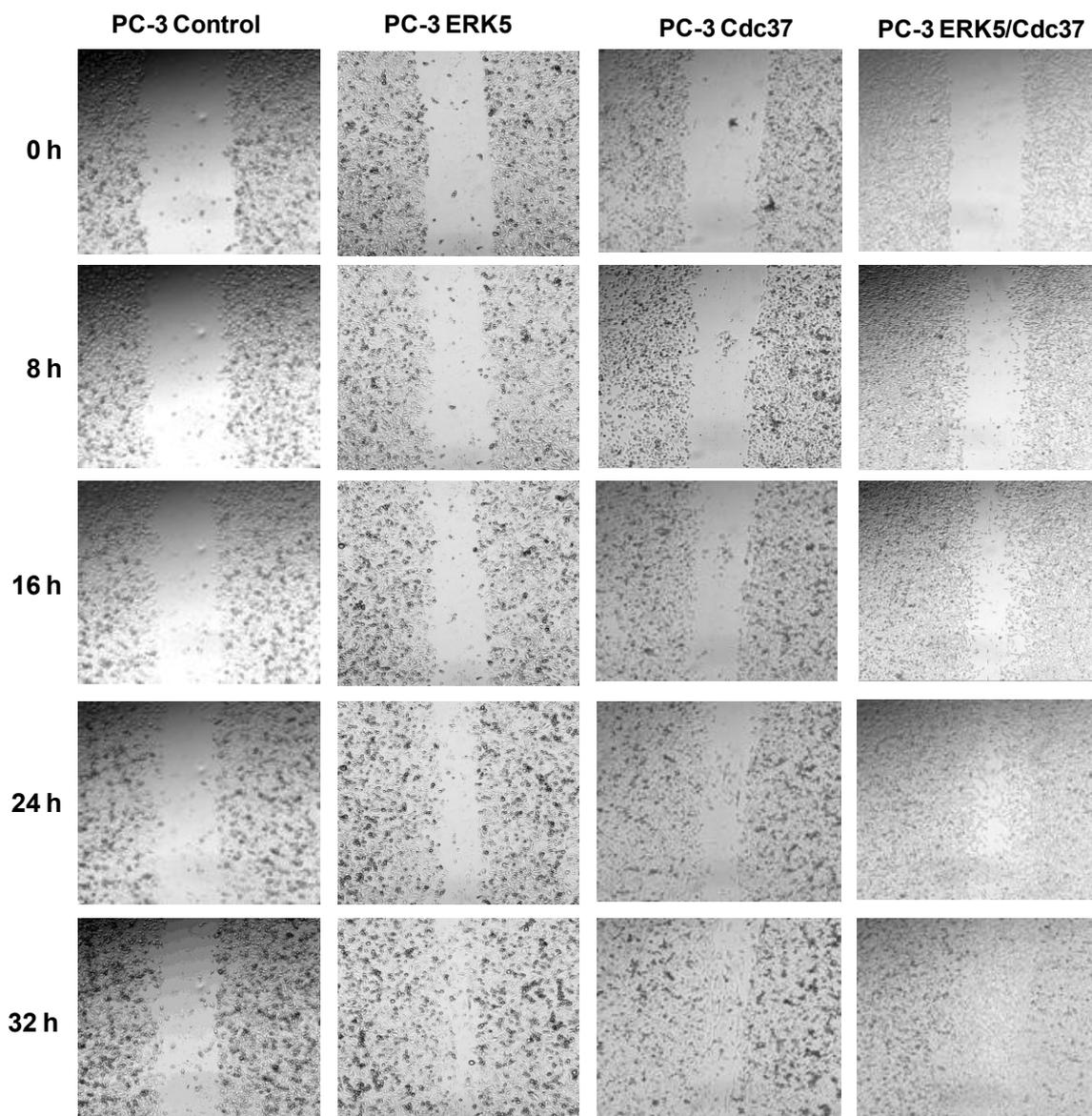


Figura 60. ERK5 y Cdc37 cooperan en la promoción de la migración celular de líneas estables de células PC-3. Ensayos de migración celular (*wound healing*). En placas de 12 pocillos se sembraron las cuatro líneas estables generadas por triplicado. A las 24 horas después de haber sido sembradas se comprobó que todas las células se encontraran a un 100% de confluencia y se realizó la herida en cada pocillo con punta de micropipeta de 200 μ l. Se escogieron aleatoriamente 3 campos por pocillo y hizo fotos cada 30 min durante aproximadamente 32 h. Las imágenes son representativas de dos cultivos diferentes. Las imágenes fueron analizadas mediante el software ImageJ.

RESULTADOS – CAPÍTULO 3:

Caracterización molecular y funcional de la interacción de ERK5 y el receptor de andrógenos (AR)

3. Caracterización molecular y funcional de la interacción de ERK5 y el receptor de andrógenos (AR)

3.1 ERK5 y Cdc37 forman complejo *in vivo* con el receptor de andrógenos (AR)

Los resultados descritos en los capítulos anteriores ponían de manifiesto que ERK5 presenta varias características comunes con el Receptor de Andrógenos. Ambas proteínas interactúan con el complejo superchaperona Hsp90-Cdc37 y, más interesantemente, presentan en estado basal una localización citosólica y en respuesta a su activación específica por MEK5 o andrógenos ambas proteínas se disocian de Hsp90 previamente a su translocación nuclear. Por otra parte, tanto el Receptor de Andrógenos como ERK5 juegan un papel esencial en la proliferación y transformación celular del cáncer de próstata, posiblemente debido en parte a su habilidad de interactuar con Cdc37, un chaperón oncogénico sobreexpresado en todos los adenocarcinomas prostáticos estudiados (Rao et al., 2001; Robzyk et al., 2007; Gray, Jr et al., 2008).

Por todo lo anterior se decidió evaluar la posible interacción entre ERK5 y el receptor de andrógenos. Para ello se utilizó la línea de adenocarcinoma prostático LnCap, que expresa altos niveles de AR funcional, para inmunoprecipitar las proteínas endógenas: se inmunoprecipitó ERK5 y se analizó la presencia de AR y Cdc37 en los inmunoprecipitados mediante inmunoblot. La **Figura 60.A** muestra que ERK5, AR y Cdc37 forman un complejo *in vivo*. Esta es la primera vez que se describe una interacción entre ERK5 y el receptor de andrógenos. A continuación se evaluó la interacción entre la ERK5 y el AR recombinantes, en células de adenocarcinoma prostático PC-3 que no expresan AR. Estas células fueron transfectadas con vectores de expresión que codifican para ERK5, AR y/o MEK5DD. Tras precipitar ERK5 en resina *glutación-Sepharose* se observa que el AR interactúa tanto con la ERK5 basal y activada (**Figura 60.B**). Este resultado indica que la interacción de las proteínas endógenas también se da cuando se utilizan proteínas recombinantes, y que el AR y la quinasa forman un complejo independientemente del estado de activación de ERK5

Para definir la región de ERK5 implicada en la interacción con el AR, se utilizaron células PC-3 que sobreexpresaban el AR y las formas de ERK5 N-terminal (aa 1-490) o ERK5 C-terminal (aa 401-816). Al purificar GST-ERK5 con la resina *glutación-Sepharose*, se observó la presencia del AR en los precipitados del dominio N-terminal de ERK5, pero no en los de la cola C-terminal (**Figura 60.C**). El mismo resultado se obtuvo al inmunoprecipitar el AR y en su conjunto estos resultados muestran que ERK5 interactúa con el AR a través de su mitad N-terminal, tal y como se ha descrito en el Capítulo 1 de Resultados para la interacción de ERK5 con Cdc37 y Hsp90.

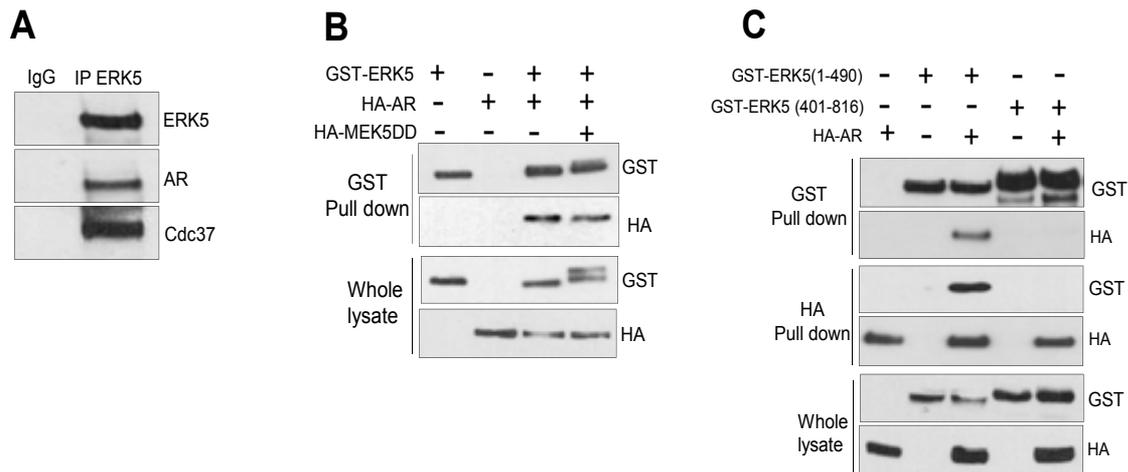


Figura 60. ERK5 y el Receptor de Andr6genos (AR) forman un complejo *in vivo*. (A) 1 mg de prote6na de c6lulas LnCap fue inmunoprecipitado con anticuerpo anti-ERK5 y se analiz6 mediante inmunoblot la presencia del AR y Cdc37 en los inmunoprecipitados. IgG, control correspondiente a lisados celulares incubados con resina prote6na G-Sepharose sin anticuerpo. (B) C6lulas PC-3 fueron transfectadas con vectores que codifican para las prote6nas indicadas, ERK5 purificada en resina de afinidad *glutati6n-Sepharose* y la presencia en los precipitados de ERK5 y AR analizada mediante inmunoblot. Los paneles inferiores (*whole lysate*) muestran los niveles de expresi6n para cada prote6na. Se obtuvieron resultados similares en 3 experimentos independientes. (C) C6lulas PC-3 fueron transfectadas con vectores que codifican para el receptor de andr6geno y/o las formas de ERK5 N-terminal (1-490) o C-terminal (401-816). Las prote6nas ERK5 y AR sobre-expresadas fueron purificadas en resina de afinidad *glutati6n-sepharose* (ERK5) o anti-HA-agarosa (AR), respectivamente, y la presencia en los precipitados de ERK5 y AR se analiz6 mediante inmunoblot. Los paneles inferiores (*whole lysate*) muestran los niveles de transfecci6n de cada prote6na. Se obtuvieron resultados similares en 2 experimentos independientes.

ERK5 y el Receptor de Andr6genos residen en el citosol, y una vez se encuentran activos por sus respectivos est6mulos ambas prote6nas translocan al n6cleo. Dada la interacci6n ERK5-AR, a continuaci6n se estudi6 si la actividad del AR o de EK5 induc6a la translocaci6n simult6nea de ambas prote6nas. En primer lugar, y mediante experimentos de inmunofluorescencia, se estudi6 s6i la estimulaci6n con andr6genos promov6a la entrada al n6cleo del AR y de ERK5. Se utilizaron c6lulas LnCap, cuyo AR fue activado mediante la incubaci6n durante 24 horas con el andr6geno dihidrotestosterona (DHT), previa privaci6n de los esteroides basales utilizando medio libre de rojo fenol, y las c6lulas fueron inmunote6idas utilizando anticuerpos espec6ficos. LA **Figura 61.A** muestra que en condiciones basales ERK5 y AR se encuentran en el citosol de las c6lulas LnCap, mientras que la estimulaci6n con la hormona DHT adem6s de induce la translocaci6n al n6cleo del AR y de ERK5.

Esto resultados fueron corroborados mediante ensayos bioqu6micos. La **Figura 61.B** muestra el fraccionamiento subcelular donde se separaron las fracciones citos6lica y nuclear de c6lulas LnCap en condiciones basales y de activaci6n del AR con el andr6geno DHT. Como se esperaba, en condiciones basales todas las prote6nas estudiadas (AR, ERK5, Cdc37 y Hsp90) presentan una localizaci6n citoplasm6tica. En consonancia con los resultados de la **Figura 61.A**, la estimulaci6n con DHT provoca la entrada al n6cleo de la mayor6a del AR y de la ERK5. Por otra parte, aproximadamente la mitad de la

Cdc37 transloca la núcleo en respuesta a la estimulación con DHT, mientras que toda la Hsp90 celular permanece citosólica.

Como experimento control de translocación nuclear de ERK5 se estimuló las células LnCap con el factor de crecimiento EGF. Como se esperaba, este tratamiento indujo la translocación al núcleo de ERK5, pero no tuvo efecto alguno sobre la localización subcelular del AR. De interés, al analizar los niveles de Cdc37 se observó que el tratamiento con EGF resulta en la localización nuclear de una gran proporción de Cdc37 sin afectar a al Hsp90, que permanece en el citosol (**Figura 61.B**). Esta es la primera vez que se muestra que la estimulación por EGF resulta en la translocación nuclear de la chaperona Cdc37

Ya que la activación por andrógenos induce la translocación nuclear de tanto el Receptor de Andrógenos como de ERK, a continuación se estudió la interacción de ambas proteínas en función de su estado de activación. La **Figura 61.C** muestra los ensayos de co-inmunoprecipitación, donde se inmunoprecipitaron cantidades iguales de ERK5 de los compartimentos citosólico y nuclear de las células LnCap descritas en la **Figura 61.B**. ERK5 interacciona con el AR, Cdc37 y Hsp90 β en el citosol de células no estimuladas, mientras que después del tratamiento con el andrógeno DHT ERK5 interacciona con Cdc37 y el AR en el núcleo, pero no con Hsp90. Por su parte ERK5 activada por EGF también forma complejo nuclear con Cdc37 y AR, aunque con este último la interacción con el AR es más sutil.

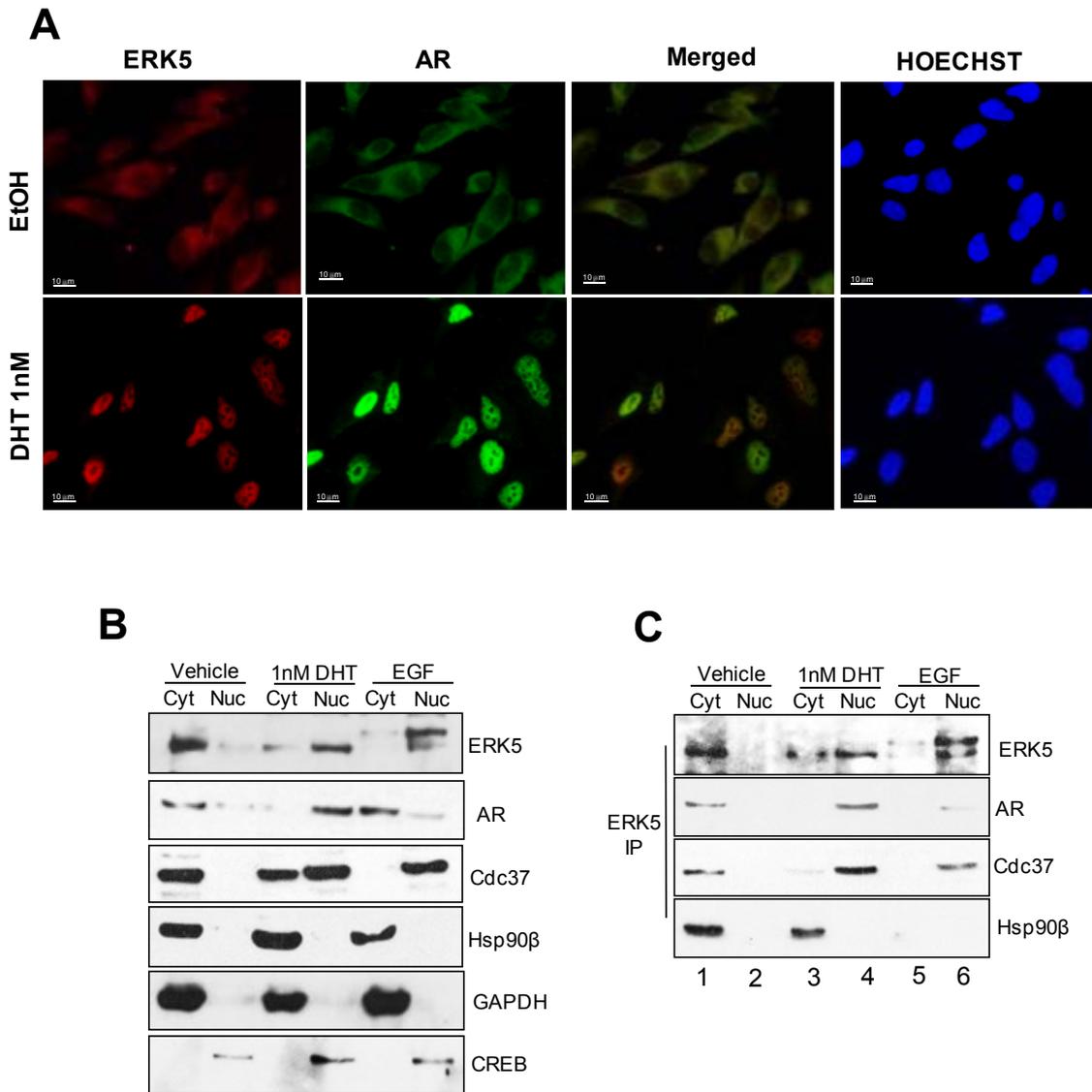


Figura 61. ERK5 y el Receptor de Andr6genos (AR) interactan en el citosol en condiciones basales y la estimulaci3n con andr6genos induce la translocaci3n nuclear de ambas prote3nas. (A) C3lulas LnCap fueron tratadas con etanol al 0.1% (vehicle) o con DHT 1nM. Al cabo de 24 h las c3lulas fueron fijadas con paraformaldeh3do y visualizadas en microscopio de inmunofluorescencia para ERK5 (rojo), receptor de andr6genos (verde). Los terceros paneles muestran la superposici3n de los dos anteriores (Merged). Los cuartos paneles corresponden a la tinci3n nuclear Hoechst (azul). Resultados representativos de 3 cultivos independientes. **(B)** Fraccionamiento subcelular de c3lulas LnCap. Se prepararon fracciones citos3licas (Cyt) y nucleares (Nuc) de c3lulas LnCap tratadas con etanol al 0.1% (vehicle) o tratadas durante 24 h con dihidrotestosterona (DHT) 1nM, o con EGF 20 ng/ml durante 4 h, seg3n se describe en la secci3n *Material y M3todos*. Se utilizaron 20 μg de cada fracci3n para analizar mediante inmunoblot la presencia de las prote3nas indicadas. GAPDH y CREB, marcadores de la fracci3n citos3lica y nuclear, respectivamente. Se obtuvieron resultados similares en dos experimentos independientes. **(C)** 500 μg de las preparaciones del fraccionamiento subcelular descrito en la **Figura 60B** fueron utilizados para inmunoprecipitar ERK5, y se analiz3 la presencia de ERK5, AR, Cdc37 y Hsp90 en los inmunoprecipitados mediante inmunoblot. Resultados representativos de 2 experimentos independientes.

ERK5 no interacciona con el receptor de estrógenos alfa (ER α)

A continuación se procedió a evaluar si ERK5 interacciona con otro receptor de hormonas esteroides. Para ello se utilizó la línea celular de adenocarcinoma de mama MCF-7 que expresa el Receptor de Estrógenos alfa (ER α). Estas células fueron cultivadas en medio libre de esteroides durante 48 horas, el ER α activado mediante el tratamiento con la hormona 17- β estradiol (E2), y sometidas a fraccionamiento subcelular, y se realizaron experimentos de co-inmunoprecipitación en las fracciones obtenidas.

La **Figura 62** muestra en primer lugar que el receptor de estrógenos alfa se encuentra principalmente localizado en el núcleo tanto en condiciones basales como bajo estimulación con estrógenos (segundo panel del lisado total), en consonancia con las observaciones de otros autores que muestran que el ER α pertenece al grupo de receptores de esteroides que se encuentra constitutivamente en el núcleo (Kocanova et al., 2010). Con respecto a ERK5 y Cdc37, ambas proteínas presentan una localización citosólica incluso después del tratamiento con 17- β estradiol.

Los ensayos de inmunoprecipitación de ERK5 muestran que ERK5 no interacciona con el ER α , en las condiciones que sí lo hace con Cdc37. A falta de realizar ensayos con otros tipos de receptores de hormonas esteroides, estos resultados apuntan a la idea de la interacción de ERK5 con receptores esteroides sería específica para el receptor de andrógenos, única proteína no quinasa que interacciona con la chaperona Cdc37. También sugerirían que la translocación nuclear de ERK5 que se induce en respuesta a la estimulación con andrógenos no es un efecto generalizado para cualquier tipo de ligando, ya que no ocurre en presencia del estrógeno 17- β estradiol.

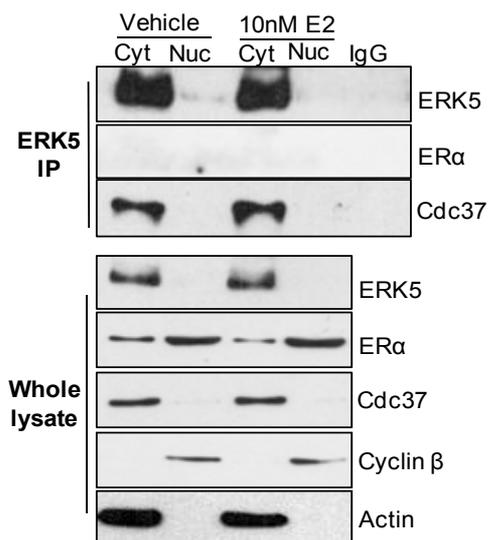


Figura 62. ERK5 no interacciona con el receptor de estrógenos alfa (ER α) ni transloca al núcleo en respuesta a la activación del receptor. Paneles superiores: fraccionamiento subcelular de células MCF-7 tratadas con etanol al 0.1% (*vehicle*) o con 10 nM del estrógeno 17- β estradiol (E2) durante 24 h, según se describe en la sección *Material y Métodos*. Se utilizaron 20 μ g de cada fracción para analizar la presencia de las proteínas indicadas mediante inmunoblot (*Whole lysate*). Actina y ciclina B, marcadores de la fracción citosólica y nuclear, respectivamente. Paneles superiores: se inmunoprecipitó ERK5 a partir de 1 mg de proteína de cada fracción, y se analizó la presencia de ERK5, ER α y Cdc37 en los inmunoprecipitados mediante inmunoblot. Se obtuvieron resultados similares en dos experimentos independientes.

ERK5 fosforila *in vitro* el receptor de andrógenos

Como se mencionó en la Introducción, la MAPK kinasas ERK1/2 fosforilan el receptor de andrógenos en ciertos contextos celulares. Dados los resultados que mostraban la interacción ERK5-AR a continuación se evaluó si ERK5 fosforila a este receptor. Para ello se inmunopurificó el AR sobre-expresado sólo o con Hsp90 en células HEK-293T, y las proteínas inmunoprecipitadas fueron incubadas con una preparación de ERK5 activa pura. La **Figura 63** muestra los resultados preliminares de la tinción Coomassie Blue y de la correspondiente autorradiografía de las proteínas resueltas por gel SDS-PAGE. Se observa una señal de fosforilación alrededor de 110 kDa que coincide con el peso molecular del AR aunque esta señal es un ~50% de la alcanzada para la autofosforilación de ERK5. Será necesarios efectuar estos ensayos utilizando preparaciones de AR purificadas a partir de su expresión en bacterias, para asegurar la completa desfosforilación del receptor previa a su incubación con la ERK5 activa. Estos resultados, además, permitirían calcular la estequiometría del proceso e identificar por espectrometría de masas los putativos residuos de AR fosforilados por ERK5.

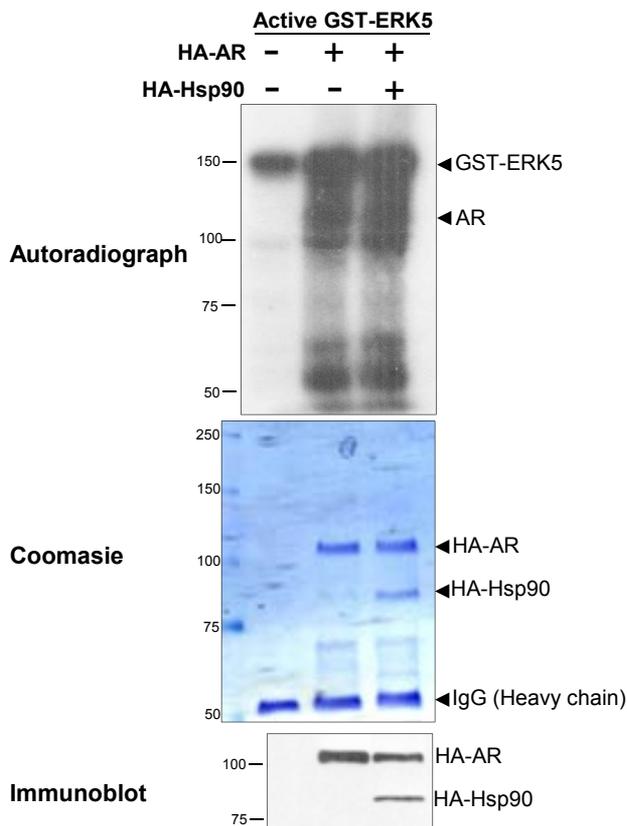


Figura 63. Fosforilación *in vitro* del receptor de andrógenos por ERK5. Para cada condición se utilizaron 3 discos de 10 cm de células HEK-293T que sobreexpresaban el vector vacío, el receptor de andrógenos (AR) sólo o con la chaperona Hsp90 fusionados al péptido HA. Las proteínas recombinantes fueron purificadas en resina de afinidad anti-HA-agarosa y los inmunoprecipitados fueron incubados con 1 µg de GST-ERK5 activa pura, 10 mM de acetato de magnesio y 200 µM [γ - 32 P]-ATP durante 1 hora a 30°C. Las proteínas fueron resueltas en gel de SDS-PAGE, visualizadas mediante tinción Coomassie Blue (panel central), y el 32 P incorporado fue detectado por autorradiografía (panel superior). El panel inferior muestra los niveles de las proteínas sobre-expresadas, mediante inmunoblot utilizando anticuerpo anti-HA. Se obtuvieron resultados similares en dos experimentos independientes.

2. Validación funcional de la interacción de ERK5 con el receptor de andrógenos: activación transcripcional del antígeno prostático específico PSA.

La proteína Antígeno Prostático Específico (PSA) es un biomarcador clínicamente relevante en el diagnóstico del cáncer de próstata. El PSA constituye uno de los principales sustratos del receptor de andrógenos, dado que el promotor del PSA presenta una serie de elementos de respuesta a andrógenos (AREs) a los que se une el AR, induciendo así su transcripción (Kim and Coetzee, 2004).

Dada la interacción ERK5-AR su co-localización celular, se evaluó si ERK5 podía afectar directamente la activación transcripcional del PSA mediada por la activación del receptor de andrógenos. En primer lugar se definieron las concentraciones a la que los agonistas usados en este trabajo, DHT y R1881, inducían la actividad del PSA. Se expresó en células LnCap el gen reportero pGL4.10-PSA-luciferasa (que contiene el promotor del PSA fusionado a Luciferasa). La **Figura 64** muestra que se obtuvo una inducción de ~130 veces de la actividad del PSA en respuesta al tratamiento con DHT 1nM, que no aumentó cuando se utilizó una concentración de DHT de 10 nM. Por su parte, el agonista R1881 indujo una activación del PSA de ~30 veces, que aumentó a ~105 veces cuando se utilizó R1881 a 10 nM. Se eligieron las concentraciones 1 nM DHT y 10 nM R1881 para los experimentos diseñados a continuación.

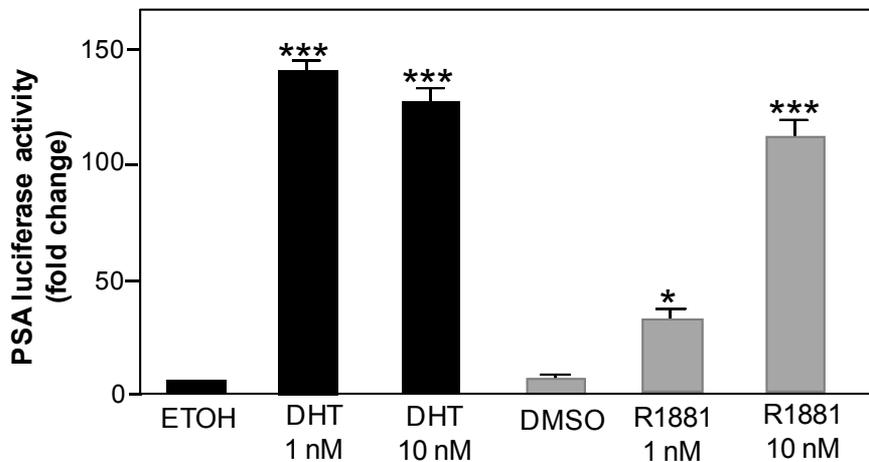


Figura 64. Activación transcripcional del antígeno prostático específico PSA en respuesta a la activación del receptor de andrógenos. Actividad luciferasa de células LnCap transfectadas con el vector reportero pGL4.10-PSA-Luciferasa (contiene el promotor del PSA fusionado a Luciferasa) y el vector pRL-CMV-Renilla. Las células se mantuvieron en medio libre de rojo fenol y 2% de *stripped serum*, previo tratamiento 24 horas post-transfección con las dosis indicadas de dihidrotestosterona (DHT) o del agonista de andrógenos R1881, o los vehículos etanol 0.1% (ETOH) o DMSO. 24 horas después del tratamiento se determinó la actividad luciferasa mediante el uso del kit *Dual Luciferase Reporter Assay System*. Los valores representan la media \pm s.d. de tres experimentos diferentes (realizados en triplicado) y normalizados con los valores de Renilla. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$

La sobre-expresión de ERK5 y Cdc37 o su activación por MEK5DD aumenta la actividad transcripcional del receptor de andrógenos sobre el PSA.

Con la finalidad de valorar el posible efecto de ERK5 sobre la actividad transcripcional del receptor de andrógenos sobre el PSA se transfectaron transitoriamente células LnCap con el vector pGL4.10-PSA-luciferase junto a ERK5 sola o en combinación con MEK5DD o Cdc37, y se estimuló la translocación nuclear del receptor con el agonista R1881. La **Figura 65** muestra que la estimulación de las células control con 10 nM R1881 resultó en una estimulación de unas ~130 veces de la actividad luciferasa del PSA, y que ésta aumentó ligeramente (aunque significativamente, $p < 0.05$) en las células que sobre-expresan ERK5 o Cdc37. Más interesantemente, la sobre-expresión de ERK5 con MEK5DD o con Cdc37 resultó en un claro aumento en la actividad transcripcional del AR sobre el PSA ($p < 0.001$). No obstante, la sobre-expresión de estas proteínas *per se* fue incapaz de inducir la activación transcripcional del AR en ausencia de ligando. Este resultado sugiere que el efecto de ERK5 operaría de forma ligando-dependiente, y solo produciría un incremento acumulativo en presencia de la hormona. Otra explicación plausible consistiría en que la tasa de transfección baja que se obtiene en las células LnCap fuera insuficiente para evaluar esta hipótesis.

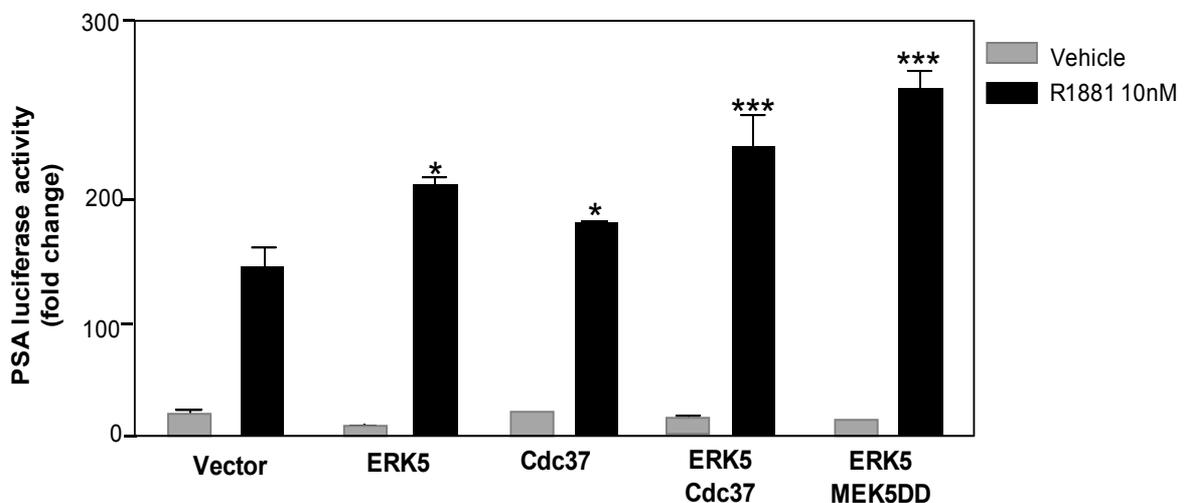


Figura 65. La sobre-expresión de ERK5 con Cdc37 o su activación con MEK5DD aumenta la actividad transcripcional del PSA. Actividad luciferasa de células LnCap que fueron transfectadas transitoriamente con el gen *reporter* pGL4.10-PSA-luciferase, pRL-CMV-Renilla y los plásmidos indicados. Se trataron durante 24 horas con R1881 10 nM. Los resultados de actividad luciferasa se normalizaron por los valores de la actividad luciferasa de la renilla. Los valores corresponden a las medias \pm s.d de tres experimentos hechos por triplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ respecto a la actividad luciferasa del vector vacío tratado con 10 nM R1881.

A continuación se utilizó otra aproximación experimental con la finalidad de establecer si ERK5 media en la actividad transcripcional del receptor de andrógenos, mediante el silenciamiento de la ERK5 celular. Para ello se consiguió un panel de cinco shRNA's comerciales validados (Sigma), que interfieren en la expresión de la proteína ERK5 humana, que fueron validados inicialmente en células HEK293T. Como

muestra la **Figura 66.A**, los shRNA 4 y 5, disminuyeron en aproximadamente un 80% los niveles de expresión de ERK5 a los 5 días, mientras que los otros 3 no lograron silenciarla significativamente.

Dado que las LnCap tienen baja eficiencia de transfección y los experimentos a realizar requerían un número elevado de días de cultivo, con lo que podría perderse el efecto de los shRNA, se decidió introducir los shRNA's 4 y 5 en sendos vectores lentivirales utilizando el protocolo descrito en la sección Materiales y Métodos. Células LnCap fueron infectadas durante 4 días con los lentivirus Lenti4 y Lenti5 generados, y como control se infectaron células con un lentivirus shRNA *scramble*. La **Figura 66.B** muestra los niveles de expresión de ERK5, AR y ERK1/2 después de 4 días desde la infección con los dos lentivirus shRNA para ERK5. Tanto en lentivirus 4 como el 5 redujeron de manera drástica la expresión de ERK5, aunque el Lenti 5 provocó la pérdida prácticamente total de la expresión de ERK5, sin afectar los niveles de expresión del Receptor de Andrógenos o de ERK1/2. Estos resultados validan el uso de los lentivirus generados para el silenciamiento específico de la ERK5 de células LnCap.

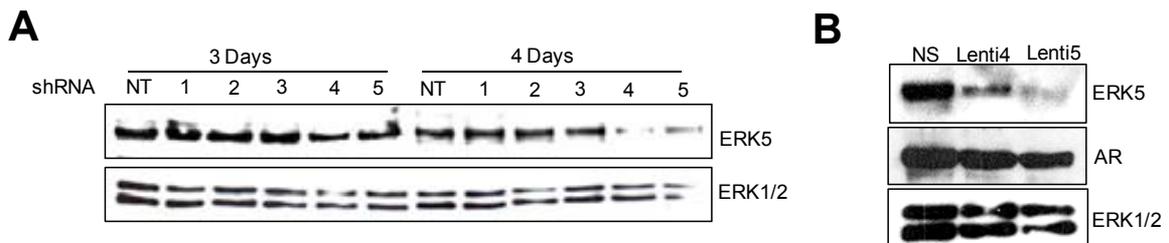


Figura 66. Optimización del silenciamiento de ERK5 celular. (A) Evaluación de cinco shRNAs comerciales (Sigma Mission shRNA, ver Ref. en Apartado M.9). Células HEK-293T fueron transfectadas con cinco plásmidos validados comerciales (Sigma) que codifican para secuencias diferentes que interfieren en la expresión de ERK5. A día 3 y 4 post-transfección se lisaron las células y se analizaron los niveles de ERK5 mediante inmunoblot. NT, células transfectadas con el vector de transfección PEI. Como control, el panel inferior muestra los niveles de ERK1/2. (B) Silenciamiento de ERK5 celular con los lentivirus shRNA 4 y 5 generados a partir de los shRNAs 4 y 5. Células LnCap fueron dejadas sin tratar o infectadas con el lentivirus-shRNAi 4 (Lenti 4) o 5 (Lenti5) generados, según el protocolo descrito en la sección Material y Métodos. Después de 4 días las células fueron lisadas y los niveles de ERK5, receptor de andrógeno (AR) y ERK1/2 analizados mediante inmunoblot.

A continuación se infectaron células LnCap con los lentivirus 4 y 5, y al tercer día post-infección se transfectó el vector reportero PSA-luciferasa y 24 horas después las células fueron estimuladas con DHT 1 nM. En las células infectadas con el lentivirus control (*Nonspecific* – NS) y tratadas con DHT se indujo la actividad del PSA ~110 veces. El silenciamiento de ERK5 mediante la infección de estas células con los lentivirus Lenti4 o Lenti5 rindió una clara inhibición en la activación transcripcional del receptor de andrógeno sobre el PSA: el lentivirus 4 lo hizo en un 53% ($p < 0.001$) y el L5 en un 73% ($p < 0.001$) está activación (**Figura 68**). Como control los correspondientes inmunoblots muestran que el silenciamiento de ERK5 es específico y no redujo los niveles del AR, por lo que la disminución en la transactivación del PSA no ocurre como consecuencia de la pérdida de expresión del receptor. También muestran que el lentivirus Lenti5, que fue más eficiente en el *knockdown* de la ERK5 celular, genera un efecto mayor en la reducción de la actividad del AR sobre el PSA (**Figura 67**, paneles inferiores).

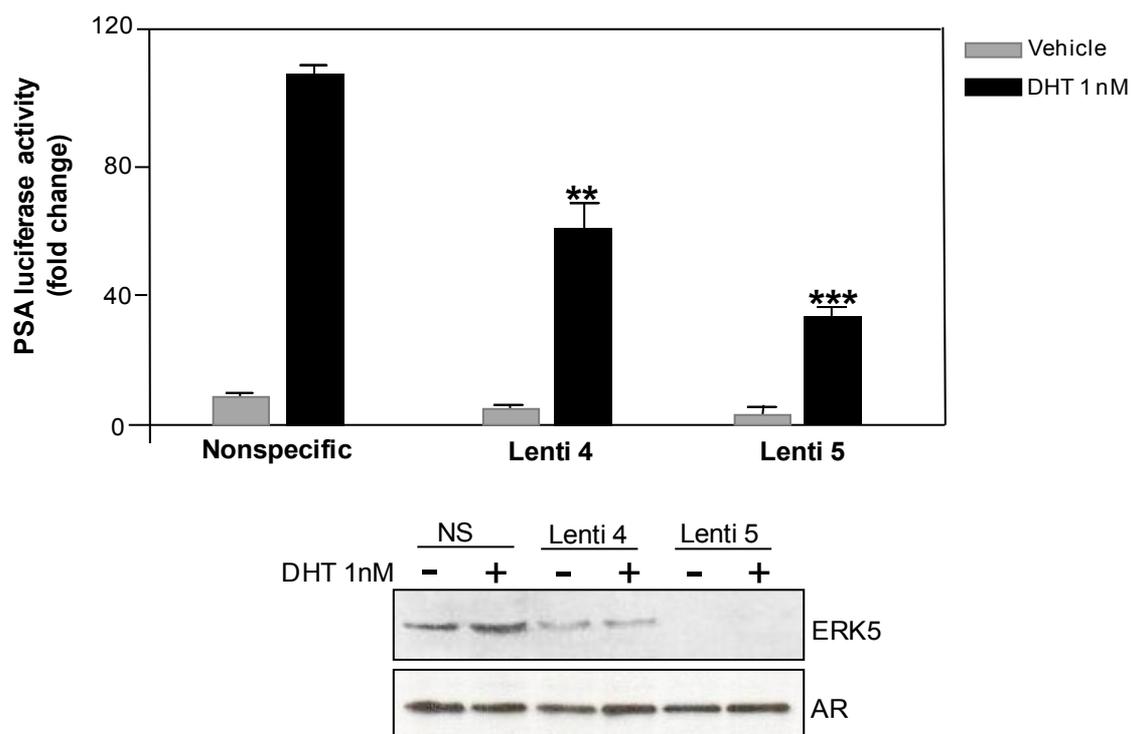


Figura 67. El silenciamiento de ERK5 reduce la activación transcripcional del PSA. Células LnCap cultivadas en medio con suero tratado con carbón vegetal al 2% y libre de rojo fenol fueron infectadas con un lentivirus no específico (NS), o con los lentivirus 4 ó 5 que codifican para los shRNAi 4 '0 5 de la Figura 65. Tres días después de la infección, la células fueron transfectadas con los plásmidos pGL4.10-PSA-*luciferase* y pRL-CMV-Renilla y tratadas (24 horas después) con 1 nM de dihidrotestorana (DHT) o etanol al 0.1% (Vehicle). 24 horas después del tratamiento se determinó la actividad luciferasa mediante el uso del kit *Dual Luciferase Reporter Assay System*. Los valores representan la media \pm s.d. de tres experimentos diferentes (realizados en triplicado) y normalizados con los valores de Renilla. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ respecto a la actividad luciferasa de las células transfectadas con el vector vacío (NS) y tratadas con 1nM de DHT. Los paneles inferiores muestran los niveles de expresión de ERK5 y del receptor de andrógenos (AR), que fueron analizados mediante inmunoblot.

V.

Discusión

1. Regulación de la estabilidad, la localización subcelular y actividad transcripcional de ERK5 por las chaperonas Hsp90 y Cdc37

ERK5 también conocida como *Big MAP Kinase 1* (BMK1) es la última MAP quinasa descrita, en 1995 dos grupos de investigación independientes la identificaron (Zhou et al., 1995; Lee et al., 1995). ERK5 tiene el doble del tamaño que las otras MAPKs. Su extremo N-terminal contiene el dominio quinasa, que posee el motivo de activación TEY que es fosforilado exclusivamente por la MAPKK, MEK5 en respuesta a la estimulación con factores de crecimiento y diferentes tipos de estrés (Mody et al., 2003). El dominio C-terminal de ERK5 es único entre las MAPKs, y posee un dominio de transactivación, que regula la activación transcripcional de factores como MEF2, c-Fos y Fra1 (Kasler et al., 2000; Terasawa et al., 2003). La vía de señalización de ERK5/MEK5 contribuye a la adquisición de varios de los *hallmarks* en cáncer, entre ellos el control de la proliferación, metástasis y angiogénesis en diferentes tejidos, en especial mama y próstata (Lochhead et al., 2012). A pesar de la relevancia de ERK5 en el desarrollo y la progresión del cáncer, se desconocen los mecanismos implicados en la regulación de su expresión y/o actividad. Dado lo anterior la hipótesis de trabajo que dio inicio a la línea de investigación de ERK5 en nuestro fue que mediante la identificación de las proteínas con las que ERK5 interacciona y forma complejos *in vivo* se podrían dilucidar los mecanismos moleculares que regulan a esta MAPK.

Resultados previos de nuestro grupo indicaban que ERK5 formaba complejos en condiciones nativas. Mediante la técnica *Tandem Affinity Purification* (TAP) se identificaron un total de 12 proteínas asociadas a ERK5. Entre las proteínas identificadas se destaca la *heat shock protein* 90 β (Hsp90 β) con la mayor puntuación de asocio y un total del 33% de la secuencia de la proteína identificada unida a ERK5 *full lenght* y un 55% a ERK5 N-terminal (aa. 1-490) (Ana Moreno, UAB., 2008).

1. Control de la estabilidad de ERK5

Hsp90 es una proteína chaperona que regula la conformación, estabilidad y activación de más de 200 proteínas (Hartson and Matts, 2012). Truman y colaboradores fueron los primeros en describir que Hsp90 y ERK5 interaccionan. Mediante la técnica de doble híbrido en levadura encontraron que la para la asociación entre estas proteínas se requería la fosforilación en el dominio TEY de ERK5 (Truman et al., 2006). Dicha interacción es relevante para la funcionalidad de ERK5, ya que la inhibición farmacológica de Hsp90 suprime por completo la actividad quinasa *in vitro* de ERK5 (Piper et al., 2006). Por otro lado, la expresión de una forma mutada de Hsp90 (T22I) en cepas de levaduras induce la pérdida de la actividad *in vivo* de ERK5, de manera que en estas cepas ERK5 es incapaz de promover la expresión de genes involucrados en el mantenimiento de la integridad celular en respuesta a diferentes tipos de estrés (Truman et al., 2006).

Mediante ensayos de co-inmunoprecipitación y *pull down* demostramos por primera vez que las proteínas tanto endógenas como recombinantes ERK5 y Hsp90 β interaccionan en células de mamífero.

La importancia de esta interacción fue establecida por el hecho de que dos inhibidores específicos de Hsp90 estructuralmente diferentes (geldanamicina y radicicol) generaron el mismo efecto de degradación dosis-dependiente de ERK5. No obstante, anteriormente otros autores habían excluido a ERK5 del grupo de quinasas cliente de Hsp90 debido a que el tratamiento con el derivado de geldanamicina 17-AAG en células COS-7 no afecta la expresión de esta MAPK (Citri et al., 2006). Lo anterior podría deberse probablemente a que en este trabajo se usó una dosis baja de inhibidor (1 μ M), que en nuestro sistema tampoco produce cambios en ERK5 pero sí altera a otras proteínas cliente. Por ejemplo, el tratamiento de células con 1 μ M de geldanamicina induce la degradación de las quinasas LKB1 (Boudeau et al., 2003), JAK1/JAK2 (Shang and Tomasi, 2006), CHK1 (Nomura et al., 2005) o IRAK-1 (De et al., 2005) tras 4 horas de tratamiento, mientras que dicha concentración no tiene efecto en ERK5 aún pasadas 24 horas de incubación. Para conseguir la completa degradación de ERK5 en células HeLa y SH-SY5Y fue necesario un tratamiento con 5 μ M tanto de radicicol como de geldanamicina (GA), siendo el primero más efectivo en la disminución de los niveles de ERK5, a 8 horas de tratamiento frente a las 16 horas de incubación requeridas para la acción de la GA.

Lo anterior no es sorprendente ya que como ha sido reportado incluso dentro de los miembros de una misma familia de quinasas pueden haber diferentes niveles de sensibilidad a la inhibición de Hsp90. Este es caso de los receptores tirosina quinasa ErbB1 y ErbB2, pese a que ambos receptores requieren de Hsp90 para el correcto plegamiento de las cadenas sintetizadas *de novo* tan solo ErbB2 es dependiente de Hsp90 aún en su estado maduro. Por ello el tratamiento con 3 μ M de geldanamicina degrada rápidamente a ErbB2 a las 4 horas mientras que los niveles de expresión de ErbB1 solo son afectados pasadas 20 horas (Xu et al., 2001). Varias evidencias han mostrado que una sutil diferencia de cargas es la responsable de la sensibilidad diferencial entre estos receptores. ErbB1 posee un aspártico expuesto en la superficie del bucle α C- β 4 (sitio de unión del complejo de chaperonas), mientras que ErbB2 posee una glicina en la misma posición lo que la hace extremadamente lábil frente a la inhibición de Hsp90 (Xu et al., 2005). Otro ejemplo de diferencias en la sensibilidad a los inhibidores de Hsp90 es el que ocurre con B-Raf y su forma mutada B-Raf^{V600E} comúnmente expresada en los tumores de melanoma. La forma salvaje B-Raf no requiere a Hsp90 para su estabilidad, sin embargo la sustitución de Val600 por Glu induce un cambio conformacional en el dominio N-terminal de este mutante que hace que los sitios de unión a chaperonas estén expuestos y sea más sensible al tratamiento con 17-AGG (Grbovic et al., 2006).

Una de las principales funciones de Hsp90 es estabilizar a sus proteínas diana y prevenir su degradación en el complejo proteosomal. En acuerdo con lo anterior se observó que en células SH-SY5Y el tratamiento con el inhibidor del proteosoma MG-132, previo al uso de geldanamicina, revertía la degradación de ERK5, y conllevaba la aparición de ERK5 mal plegada en el precipitado celular. Se sabe que los inhibidores de Hsp90 provocan la disociación de la chaperona de sus proteínas cliente, exponiendo lugares que pueden ser marcados por ubiquitina y en consecuencia ser reconocidos por el proteosoma, como ocurre con las quinasas SGK1 (Belova et al., 2008) y Akt (Basso et al., 2002). Mediante ensayos de *pull down* se estableció que los lisados celulares que sobreexpresaban ERK5 y ubiquitina, y que habían sido tratados con geldanamicina y MG-132 presentan formas ubiquitinadas de

ERK5 que consiste en la acumulación de bandas de migración lenta por encima de su peso molecular. El extremo N-terminal (dominio quinasa) de ERK5 es el dominio de la proteína que se ubiquitina. De hecho aún en ausencia de inhibidor del proteosoma se detecta la ubiquitinación de esta región, lo cual puede ser debido a que la falta de la cola C-terminal haga que este dominio sea menos estable y por tanto más susceptible a ser degradado. En síntesis, estas evidencias demuestran que Hsp90 β es necesaria para el correcto plegamiento y mantenimiento estructural de ERK5.

Cdc37 actúa como co-chaperona de Hsp90 en la estabilización de ERK5

La función de Hsp90 depende de una batería de proteínas co-chaperonas que regulan su actividad ATPásica o que dirigen su interacción con proteínas cliente específicas (Johnson and Brown, 2009). Una de estas co-chaperonas es la Cdc37 que interviene específicamente en el plegamiento de quinasas cliente entre ellas, Cdk4 (Dai et al., 1996), Raf-1 (Grammatikakis et al., 1999) y MOK (Miyata and Nishida, 2005). Ensayos de co-inmunoprecipitación a partir de extractos de dos líneas celulares (HeLa y SH-SY5Y) así como tejido de rata permitieron corroborar que ERK5 forma un complejo trimérico con Hsp90 β y Cdc37 *in vivo*. La unión de este complejo ternario se da a través del dominio N-terminal de ERK5 (aa. 1-490). Como ha sido demostrado para varias quinasas cliente entre ellas IKK (Chen et al., 2002), HRI (Shao et al., 2001) y Raf-1 (Silverstein et al., 1998) las chaperonas Cdc37 y Hsp90 se asocian a estas proteínas directamente a través del dominio catalítico, probablemente porque en esta región existe un bucle conservado rico de glicina (GXGXXG) que es reconocido por Cdc37 (Terasawa et al., 2006).

El silenciamiento de Cdc37 bloquea el reclutamiento de las quinasas cliente hacia Hsp90 lo que compromete el proceso de maduración de estas e induce su degradación mediada por el proteosoma (Smith et al., 2009). La pérdida de expresión de Cdc37 mediante la transfección de un siRNA resultó en la desaparición de ERK5. Este resultado permitió corroborar que Cdc37 actúa como co-chaperona de Hsp90 en la estabilización de ERK5.

La unión a ATP durante el proceso de fosforilación de las quinasas cliente promueve la adquisición de una conformación cerrada que resulta en la estabilización del dominio N-terminal de las quinasas y la disociación del complejo Hsp90/Cdc37. Es por ello que la mayor parte de quinasas interaccionan con estas chaperonas únicamente bajo su estado inactivo, algunas de ellas son la Raf-1, Cdc28 y eIF2 α (Pearl and Prodromou, 2006). Sin embargo, se ha encontrado que Akt y la MAP quinasa Slt2/Mpk1 interaccionan con el complejo Hsp90/Cdc37 en su estado activo para prevenir la desfosforilación (Sato et al., 2000; Millson et al., 2005). Con el objetivo establecer el efecto de la activación de ERK5 en la interacción con las chaperonas se realizaron experimentos de inmunoprecipitación. Se demostró que la activación de ERK5 en respuesta a la estimulación con EGF induce la disociación de Hsp90 del complejo ERK5-Cdc37, mientras que en el caso de Akt como ha sido reportado continúa unida a las chaperonas en todos sus estados de activación. Este interesante resultado es consistente con lo reportado. Por ejemplo, la unión de los receptores esteroides entre ellos el de glucocorticoides y de dioxina con su ligando provocan una serie de cambios conformacionales en los receptores y la disociación de Hsp90 (Pratt and Toft, 1997). Un mecanismo similar también ha sido

descrito para la quinasa dependiente de ciclina, Cdk4. En su estado inactivo es un monómero inestable que requiere de la estabilización de Hsp90 y Cdc37. Para su completa activación, Cdk4 requiere ser fosforilada en el *loop* de activación y encontrarse acoplada a la Ciclina D, esta ciclina induce cambios conformacionales en el dominio N-terminal de Cdk4 que la hacen más estable, lo que deriva en la disociación de Cdk4 activa de Hsp90-Cdc37. De manera que estas chaperonas solo asisten a Cdk4 hasta que la Ciclina D se une a ella y se encarga de su estabilización y activación (Stepanova et al., 1996).

Considerando el resultado anterior se quiso comprobar que la forma activa de ERK5 no requería ser estabilizada por Hsp90. Como cabía esperar ERK5 activa es insensible tanto al tratamiento con Radicolol (inhibidor de Hsp90) como con Celastrol (inhibidor de Cdc37). Estos resultados ponen de manifiesto que la activación de ERK5 le confiere a la proteína la estabilidad necesaria para prescindir de la función como chaperonas de Hsp90 y Cdc37. Teniendo en cuenta lo anterior, sería interesante corroborar que ERK5 activa no es ubiquitinada con fines de degradación en respuesta a la inhibición de Hsp90.

Existen evidencias de que la fosforilación de Hsp90 se encuentra acoplada a la liberación de sus proteínas diana (Zhao et al., 2001), por esa razón se evaluó si ERK5 activa era capaz de fosforilar a Hsp90 y con ello provocar su separación del complejo ternario. Mediante ensayos de actividad quinasa se demostró que ERK5 no fosforila a ninguna de las dos chaperonas, por lo que esta hipótesis fue descartada.

Dentro del dominio quinasa de ERK5 se encuentra el motivo TEY que es fosforilado específicamente por la MAPKK MEK5, dando lugar a un aumento de su actividad catalítica (English et al., 1995). Una vez que ERK5 está activa ocurre un cambio conformacional en su estructura que le permite autofosforilarse en varios residuos de la cola C-terminal y finalmente activar a sus sustratos (Morimoto et al., 2007a). Con el fin de discernir el rol que juega la activación en el *T-loop* y la actividad quinasa de ERK5 en la pérdida de interacción de Hsp90 con el complejo ERK5-Cdc37 se realizaron ensayos de *pull down* con varias formas mutadas de ERK5. Primero, el constructo de ERK5 (aa. 1-490) que carece de la cola C-terminal, continua unido a Hsp90 tanto al encontrarse inactivo como activado por MEK5DD. Segundo, el mutante que carece de actividad quinasa ERK5 (D200A) permanece unido a Hsp90 tras ser fosforilado en el TEY por MEK5DD. Tercero, un mutante de ERK5 constitutivamente autofosforilado en cinco residuos de la cola C-terminal (ERK5 5E) no une a Hsp90 en condiciones basales, mientras que el mutante ERK5 5A incapaz de autofosforilarse interacciona con Hsp90 a pesar de ser fosforilado en el TEY. Todos estos resultados indican que es la autofosforilación del extremo C-terminal de ERK5 y no la fosforilación en el TEY lo que induce la liberación de Hsp90 del complejo Cdc37-ERK5. Es posible que el dominio C-terminal actúe de manera análoga a la Ciclina D en el caso de Cdk4, de manera que el cambio conformacional que promueve la autofosforilación del dominio C-terminal de ERK5 tras su activación haga que esta parte de la proteína sea la responsable de dar la estabilidad al dominio quinasa activo por lo que induce la liberación de Hsp90.

Resulta llamativo que en el modelo descrito en este trabajo la activación de ERK5 produzca la disociación de Hsp90 pero no de Cdc37. Lo que probablemente está indicando que la Cdc37 cumple un rol adicional en su asociación con ERK5 más allá de su estabilización. Como se explicó en la Introducción (Apartado 3.2) existen evidencias de que la Cdc37 puede llevar a cabo funciones de forma independiente de Hsp90. Kimura y colaboradores demostraron que la sobreexpresión de Cdc37 es capaz de revertir la pérdida de actividad *in vivo* de v-Scr ocasionada por una mutación puntual de Hsp90 (Kimura et al., 1997). En otro trabajo se describió que la sobreexpresión de Cdc37 *full length* o del mutante Cdc37¹⁻¹⁴⁸ (que carece del dominio C-terminal y no une Hsp90) fue suficiente para mantener la viabilidad celular y la actividad quinasa de v-Scr en levaduras (Lee et al., 2002).

Cabe destacar que la sobreexpresión de Cdc37 no solo se da ectópicamente en ciertos contextos celulares también hay sobreexpresión de la Cdc37 endógena. Ha sido reportado que los niveles de expresión de Cdc37 incrementan de manera drástica en los tejidos tumorales de próstata comparados con los relativamente bajos encontrados en el epitelio prostático normal. Además la sobreexpresión de Cdc37 es suficiente para inducir la formación de hiperplasias y displasias en ratones transgénicos (Stepanova et al., 2000). Al estudiar la formación del complejo trimérico ERK5/Cdc37/Hsp90, nos dimos cuenta que en los ensayos en los que se usaban proteínas sobreexpresadas (o recombinantes) el complejo únicamente se formaba cuando se expresaban concentraciones equivalentes de las tres proteínas, pero que un exceso de Cdc37 provocaba la pérdida de Hsp90. Este resultado es inesperado ya que en el proceso de maduración de las quinasas cliente el modelo en general aceptado es que la co-chaperona Cdc37 reconoce e interacciona inicialmente con la quinasa y posteriormente recluta a Hsp90. La discrepancia de nuestros resultados con el modelo de plegamiento pueden ser debido a que la sobreexpresión de Cdc37 produce una pérdida de la relación estequiométrica que ocurre en los complejos de chaperonas con sus quinasas cliente, que consiste en (Hsp90)₂-quinasa-Cdc37. Vaughan y colaboradores demostraron que en los complejos entre las quinasas y estas chaperonas se cumple una relación asimétrica 2:1:1, donde un dímero de Hsp90 se une a un monómero de Cdc37 y un monómero de la quinasa cliente (Vaughan et al., 2006). Por lo que el exceso de Cdc37 seguramente induciría el desplazamiento de Hsp90 del complejo ternario. Esta hipótesis podría ser evaluada mediante ensayos de *pull down* usando lisados de células que sobreexpresan GST-ERK5 y HA-Hsp90, con cantidades crecientes de dos constructos diferentes de Cdc37 (Flag y Myc-Cdc37). Estas muestras permitirán realizar purificaciones secuenciales donde se podría demostrar que una segunda molécula de Cdc37 desplaza a Hsp90 de la superficie de ERK5.

Tomando en consideración este resultado se planteó evaluar que efecto tenía en ERK5 la sobreexpresión de Cdc37. En primer lugar, se estudió la localización subcelular de ERK5, que es un aspecto abordado en múltiples investigaciones pero que sigue sin estar completamente esclarecido. Inicialmente, se aceptaba que ERK5 residía en el citosol de las células HeLa y la sobreexpresión de MEK5DD inducía su migración al núcleo (Kato et al., 1997; Yan et al., 2001). Posteriormente, se ha demostrado que la localización subcelular de ERK5 varía dependiendo del tipo celular y que existen varias líneas celulares que presentan ERK5 nuclear en su forma inactiva (Buschbeck and Ullrich, 2005; Borges et al., 2007). El

Dr. Nishida y colaboradores han propuesto el mecanismo hipotético que explica el tránsito entre citoplasma y núcleo de ERK5 basándose en su forma inactiva o activa. En condiciones basales (forma inactiva de la quinasa), los dominios N-terminal y C-terminal interaccionan entre sí, manteniendo a la molécula en un estado plegado y localizada en el citoplasma. Esta interacción produce una señal de exporte nuclear (NES) o bien un dominio de unión para una proteína de anclaje citoplasmático. Una vez activada, ERK5 se autofosforila en su extremo C-terminal, lo que promueve la disociación intramolecular de sus dominios, la pérdida de la actividad NES, la exposición de un motivo de localización nuclear (NLS) y finalmente su translocación nuclear (Kondoh et al., 2006).

A través de ensayos de fraccionamiento subcelular e inmunofluorescencia se estableció que en células HeLa ERK5 reside en el citosol y su activación por MEK5DD induce su translocación al núcleo. De manera interesante, la sobreexpresión de Cdc37 provocaba el mismo efecto de migración al núcleo. Este resultado es consistente con lo reportado para otras quinasas cliente, por ejemplo la sobreexpresión de Cdc37 incrementa los niveles de expresión y promueve la translocación nuclear del dominio intracelular (ICD) del receptor tirosina quinasa Ryk (Ryk ICD) después de ser clivado por la γ -secretasa (Lyu et al., 2009). Dadas las discrepancias en la distribución subcelular de ERK5 dependiendo del tipo celular sería importante evaluar un amplio panel de líneas celulares para determinar si ERK5 es citosólica o nuclear en función de los niveles de expresión de Cdc37. Por ejemplo, en las líneas de carcinoma de próstata Du-145 y C4-2 que expresan elevados niveles de Cdc37, ERK5 podría encontrarse constitutivamente en el núcleo.

Basados en varias evidencias nosotros proponemos que Hsp90 podría ser la proteína de anclaje citoplasmático de ERK5. Primero, tanto la activación de ERK5 por MEK5 como la sobreexpresión de Cdc37 producen por mecanismos diferentes dos eventos comunes, la disociación de Hsp90 del complejo ERK5-Cdc37 y luego la entrada al núcleo de ERK5. Segundo, una forma mutada de ERK5 (5E) constitutivamente localizada en el núcleo no se encuentra unida a Hsp90 pero sí a Cdc37. Hsp90 es la proteína de anclaje al citosol de la mayor parte de los receptores de esteroides, entre ellos el de glucocorticoides, progesterona, andrógenos y mineralocorticoides. Hsp90 es la encargada de estabilizar la forma inactiva de estos receptores en el citosol, manteniéndolos en un estado de plegamiento menos compacto con la cavidad hidrofóbica del dominio de unión a la hormona (HBD) accesible a la hormona (Pearl and Prodromou, 2006). Con la unión al ligando Hsp90 libera los receptores y se producen una serie de cambios conformacionales que permiten su migración al núcleo, primero el desenmascaramiento del dominio de unión al DNA (DBD) y de los sitios de dimerización y por último la exposición del NLS que poseen todos estos receptores (Pratt and Toft, 1997). De manera análoga, el complejo ERK5-Hsp90 reside en el citosol y la activación de ERK5 induce la separación de Hsp90 y la translocación al núcleo de la quinasa, configurando un transporte dependiente de la actividad quinasa. En este paradigma, Hsp90 podría mantener la ERK5 correctamente plegada en citosol hasta que sea reconocida y activada por MEK5. En el segundo modelo de translocación nuclear de ERK5 descrita en este trabajo queda por esclarecer cómo la sobreexpresión de Cdc37 logra inducir la disociación de Hsp90 y por qué ERK5 continúa unida a la co-chaperona Cdc37.

Con el objetivo de caracterizar este nuevo mecanismo de translocación de ERK5 no asociado a su activación por MEK5 se evaluaron varias hipótesis, la primera de ellas fue si la sobreexpresión de Cdc37 podría provocar la activación de ERK5. Esta hipótesis fue descartada ya que ensayos de actividad quinasa utilizando dos sustratos diferentes (PIMtide y MBP) revelaron que ni la sobreexpresión de Cdc37 y/o Hsp90 tienen efecto sobre la activación, fosforilación en el T-loop o autofosforilación de ERK5. Lo que es corroborado por inmunoblot ya que en los lisados de células que sobreexpresan Cdc37 y/o Hsp90 no se detecta señal de fosforilación de ERK5 en el TEY o retraso electroforético.

Una vez ERK5 ha entrado en el núcleo es capaz de controlar la transcripción de sus efectores *downstream* para obtener la respuesta celular deseada. Originalmente, se atribuía este efecto a una fosforilación directa de los factores de transcripción mediada por ERK5 activa. Sin embargo, fue establecido que ERK5 posee un mecanismo único de regulación transcripcional, su larga cola C-terminal, ausente en las otras MAPK. Esta región es requerida para la máxima activación de factores de la familia MEF2, el receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma 1 (PPAR γ 1) y los miembros de la familia AP-1, c-Fos y Fra1 (Kasler et al., 2000; Terasawa et al., 2003; Akaike et al., 2004). La activación de ERK5 por MEK5 es importante porque induce la autofosforilación del dominio C-terminal que es un elemento clave para incrementar la transcripción de estos factores (Mody et al., 2003). No obstante, la sola presencia del dominio C-terminal es determinante ya que por sí solo activa transcripcionalmente a los factores mencionados y su delección disminuye significativamente esta inducción (Kasler et al., 2000; Morimoto et al., 2007). Dada la relevancia que tiene la activación transcripcional en el control que ejerce ERK5 sobre sus sustratos, procedimos a evaluar el efecto de la sobreexpresión de Cdc37 en esta función. Para esto se realizaron experimentos de *gene reporter luciferase* donde se determinó la activación transcripcional del factor AP-1. Se demostró en dos líneas celulares diferentes que la activación de ERK5 por MEK5DD o su co-expresión con Cdc37 incrementan significativamente la activación de la transcripción de AP-1, aproximadamente 25 veces con respecto a los controles (cada una de las proteínas expresadas por separado). De manera interesante se encontró que al co-expresar el complejo trimérico, ERK5/Hsp90/Cdc37, esta activación es bloqueada, lo que sugiere que posiblemente la Hsp90 actúa como regulador negativo de la activación transcripcional de ERK5. Estos resultados ponen de manifiesto un nuevo mecanismo molecular que controlaría la activación de la transcripción mediada por ERK5, que no está relacionada con la fosforilación directa de AP-1 y que no requiere la autofosforilación del dominio C-terminal de ERK5. Sería interesante comprobar que este nuevo mecanismo es generalizado y produce el mismo efecto de incremento en la transcripción de otros factores, por ejemplo el MEF-2D sustrato canónico de ERK5.

En este trabajo se ha propuesto que la sobreexpresión de Cdc37 representa un mecanismo alternativo y no canónico de translocación nuclear y de activación transcripcional de ERK5 (**Figura 68**). Varias evidencias permitieron soportar nuestra idea de que Cdc37 promueve estos efectos sobre una forma catalíticamente inactiva de ERK5. i) El inhibidor de ERK5 XMD8-92 que bloquea la actividad quinasa de la proteína fue capaz de impedir la translocación nuclear de ERK5 y el aumento en la activación

transcripcional de AP-1 inducida por la co-expresión con MEK5DD. Sin embargo, no produjo ningún efecto en las acciones mediadas por la sobreexpresión de Cdc37. ii) Los mutantes de ERK5 D200A (catalíticamente inactivo) y ERK5 5A (que no se autofosforila en la cola C-terminal) solo migran al núcleo e inducen la activación de AP-1 al encontrarse co-expresados con Cdc37, mientras que la fosforilación del T-loop por MEK5DD resulta insuficiente para inducir estos efectos en estos mutantes. iii) Cdc37 promueve la entrada en el núcleo de ERK5 en las células MEF MEK5 *-/-* que carecen de expresión MEK5. La falta de expresión de MEK5, la única quinasa que fosforila a ERK5, garantiza que estas células expresan una ERK5 catalíticamente inactiva.

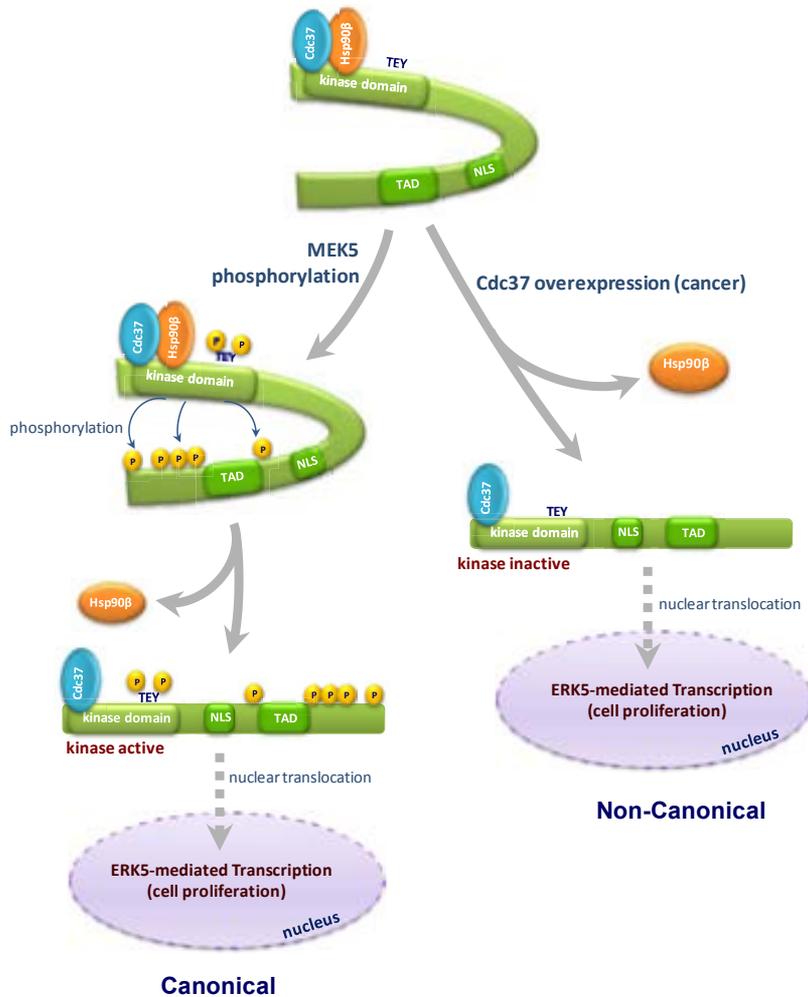


Figura 68. Modelo propuesto explicar el papel de las chaperonas Hsp90 y Cdc37 en el control del transporte citosol-núcleo de ERK5. En condiciones de reposo, el dominio N-terminal de ERK5 interactúa intramolecularmente con la cola C-terminal, generando una región de interacción con la proteína de anclaje citoplasmático Hsp90. Esta interacción mantiene a ERK5 en el citosol, a pesar de la presencia de la señal de localización nuclear (NLS) en el dominio C-terminal de ERK5. La fosforilación del motivo TEY mediada por MEK5 induce la activación de ERK5 y la autofosforilación de la cola C-terminal de manera que se interrumpe la interacción intramolecular entre los dominios de la quinasa, induciendo un cambio conformacional que resulta en la disociación de la Hsp90, exposición de la NLS, y translocación nuclear de ERK5. Por el contrario, la sobreexpresión de Cdc37 (como sucede en algunos tipos de cáncer) induce la translocación nuclear de una forma catalíticamente inactiva de ERK5 que es capaz de inducir la activación transcripcional. TAD, dominio de activación transcripcional

2.1 La SUMOilación de ERK5 es requerida para la translocación al núcleo de la quinasa

Uno de los objetivos de este trabajo ha sido el de diseccionar y caracterizar los mecanismos moleculares implicados en la migración núcleo-citoplasmática de ERK5. Después de caracterizar el papel de las chaperonas en el cambio conformacional que debe sufrir ERK5 para su translocación al núcleo, estudiamos las modificaciones post-traduccionales que podrían estar implicadas en este evento. Una de ellas, la SUMOilación de proteínas, está implicada en el transporte nucleo-citoplasmático de numerosas proteínas, y dado que previamente el laboratorio del Dr. Jun-Ichi Abe había descrito la conjugación por SUMO de ERK5, se decidió estudiar cómo esta modificación afectaba al cambio de localización celular que sufre ERK5 en los dos paradigmas estudiados, la activación por MEK5 y la sobre-expresión de Cdc37. Como muestra la **Figura 46**, tanto la activación de ERK5 por MEK5DD como la sobre-expresión de Cdc37 inducen la SUMOilación de ERK5, evento que no requiere de la cola C-terminal.

Dentro de los sistemas que modifican las proteínas a nivel postraduccionales se encuentra la SUMOilación, que consiste en la unión covalente de la proteína SUMO (*Small ubiquitin-like modifier*) a las cadenas laterales de residuos de lisina de las proteínas sustrato. La modificación covalente por SUMOilación de una proteína afecta a su función de diversas maneras, provocando cambios en la localización subcelular, modulación de la interacción con otras proteínas o antagonizando otras modificaciones que involucren ramificaciones en lisinas, como la ubiquitinación. Entre ellos destaca el papel esencial que juega SUMO en el importe y exporte nuclear, dado que modula la actividad del sistema de transporte nucleocitoplasmático gobernado por importina-13 (Mingot et al., 2001) y RanGAP1 (Seeler and Dejean, 2003; Zhao, 2007). Así, la modificación por SUMO que sufre la GTPasa RanGAP1 citosólica permite su interacción con la nucleoporina RanBP2 y su consiguiente importe nuclear (Matunis et al., 1998; Lee et al., 1998; Pichler and Melchior, 2002).

Existen cuatro isoformas de SUMO en mamíferos: SUMO1, SUMO2, SUMO3 y SUMO4. Las proteínas SUMO tienen un peso molecular de ~ 10 kDa y se asemejan en su estructura tridimensional a la Ubiquitina (Mossesso and Lima, 2000). Todas las proteínas SUMO contienen un clúster de 10-25 aminoácidos no estructurados en su N-terminal que no se encuentra en otras proteínas *Ubiquitin-like* (Ubl). Las formas maduras de SUMO2 y SUMO3 presentan un 97% de homología y ambas comparten sólo un 50% de identidad con SUMO1 (Saitoh and Hinchey, 2000). La conjugación de SUMO a sus proteínas sustrato ocurre por una cascada enzimática que involucra en primer lugar una enzima activadora específica de SUMO, un heterodímero de las proteínas SAE1 y SAE2 en mamíferos. Esta reacción requiere ATP para la formación de un intermediario SUMO-adenilato, en el que el extremo C-terminal de SUMO está covalentemente unido a AMP. La ruptura de la unión SUMO-AMP es seguida de la formación de un enlace tioéster entre el grupo carboxilo del C-terminal de SUMO y el grupo -SH de la cisteína catalítica en SAE2. En el segundo paso de la reacción, SUMO activo es transferido desde SAE2 a la enzima conjugadora E2, Ubc9, formando un nuevo enlace tioéster, esta vez entre la cisteína catalítica de Ubc9 y el grupo carboxilo de la glicina C-terminal de SUMO. Una característica que diferencia a Ubc9

de las enzimas E2 del resto de las Ubls es su capacidad de reconocer al sustrato directamente. De manera que Ubc9 cataliza la formación de la unión isopeptídica entre SUMO y el grupo e-amino de la lisina de su proteína sustrato. Si bien Ubc9 es capaz de transferir SUMO directamente al sustrato *in vitro*, este proceso es facilitado *in vivo* por las ligasas E3 de SUMO. Las E3 ligasas aceleran la transferencia de SUMO a la proteína diana, regulan la selección de sustrato y el grado de SUMOilación *in vivo*. Las E3 ligasas caracterizadas hasta la fecha incluyen a miembros de la familia de las PIAS (*Protein inhibitor of activated stat*), la proteína del complejo del poro nuclear RanBP2 y PC2 (Pichler et al., 2002; Hay, 2005; Yang and Sharrocks, 2010).

La activación de ERK5 por MEK5 y la sobreexpresión de Cdc37 confluyen en un efecto similar, ambas inducen de manera clara la SUMOilación de ERK5. En consonancia con los trabajos del grupo de Jun-Ichi Abe (Woo et al., 2008) esta SUMOilación ocurre en las lisinas 6 y 22 de la quinasa, ya que la expresión de un constructo de ERK5 con estos dos residuos mutados a arginina (ERK5 K6/22R) provocó la pérdida de esta modificación (Figura 46).

Nuestro principal interés en el estudio de la SUMOilación de ERK5 estaba relacionado con la posibilidad de establecer una relación entre esta modificación post-traduccional y los dos modelos de translocación nuclear de ERK5 descritos en esta tesis. Al contrario de lo que pasa para la ERK5 salvaje, la forma de ERK5 deficiente en SUMOilación (K6/K22R) no migra al núcleo en respuesta a la activación por MEK5 o a la sobreexpresión de Cdc37 (Figura 47). Además, la sobre-expresión de la proteasa de SUMO SENP-2 bloquea la translocación nuclear de ERK5 inducida por EGF o por la sobreexpresión de Cdc37 (Figuras 48 y 49). La necesidad de la conjugación con SUMO para la translocación de ERK5 está en consonancia con los resultados obtenidos para otras proteínas dianas de SUMO, para los que la mutación de los residuos donde se conjuga SUMO es suficiente para provocar una localización constitutivamente citosólica. Entre ellas, el receptor de factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1R) y la proteína S100A4 (Sehat et al., 2010; Miranda et al., 2010).

Como cabía esperar (dada su localización constitutiva citosólica), la forma de ERK5 deficiente en SUMOilación es incapaz de inducir la activación transcripcional de AP-1 al ser activado por MEK5DD o co-expresado con Cdc37. Este resultado es opuesto a lo descrito en los dos trabajos publicados por el grupo de J-I Abe, en los que se reporta que la SUMOilación de ERK5 inhibe la activación transcripcional de MEF2 inducida por la exposición de las células endoteliales a dos tipos de estrés, productos de glicosilación avanzados (AGEs) y estrés oxidativo (H₂O₂) (Woo et al., 2008; Sishido et al., 2008). Estos trabajos muestran que la co-expresión de MEK5 con el mutante de ERK5 K6/K22R activan transcripcionalmente a MEF2. Sin embargo, estos resultados están en conflicto con la observación de los autores de que tanto los AGEs como el peróxido de hidrógeno inducen la activación de ERK5, por lo que sería más factible que sea la forma salvaje de ERK5 activa y SUMOilable la que induzca la activación de MEF2. Frente a esta discrepancia los autores proponen que el dominio N-terminal de ERK5 cumple una función inhibitoria sobre el dominio de transactivación de ERK5 (C-terminal). Para ellos la presencia de

las dos lisinas susceptibles a ser SUMOiladas en el dominio quinasa en la región de localización citoplasmática explica que puedan ejercer como reguladores negativos de la transcripción (Woo et al., 2008; Shishido et al., 2008). De todas formas es posible que estas discrepancias en los se deban a que los estudios se han llevado a cabo en tipos celulares diferentes y monitorizando la activación de diferentes factores de transcripción: actividad AP-1 en células HeLa en nuestro caso, actividad MEF2 en células endoteliales en el caso del grupo de J-I Abe.

En definitiva, nuestros resultados muestran que la SUMOilación de ERK5 es indispensable para la translocación nuclear y la activación transcripcional de AP-1 mediada por ERK5. Serán necesarios futuros experimentos para comprobar si esto ocurre para otros factores de transcripción diana de ERK5, como los MEF2, aunque se ha descrito un efecto para el factor nuclear activado en células T NFAT. Esta proteína localiza en el citosol de las células T en reposo pero el incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} promueve su activación y rápida translocación nuclear. Este proceso está modulado por la SUMOilación en su Lys⁶⁸⁴, requerida para la activación transcripcional de sus sustratos, y la subsecuente SUMOilación de la Lys⁸⁹⁷, necesaria para el anclaje nuclear del factor (Terui et al., 2004).

Por otra parte, se estudió la posible relación entre los dos eventos observados que estaban implicados en la translocación nuclear de ERK5: la disociación de Hsp90 del complejo ERK5-Cdc37 y la SUMOilación de la quinasa. Con respecto al mecanismo canónico de activación de ERK5 salvaje la activación por MEK5 resulta en la disociación de Hsp90 y en su SUMOilación, mientras que Hsp90 no se disocia de la forma deficiente en SUMOilación K6/22R en respuesta a la activación por MEK5 (**Figura 52**), a pesar de que presentar el motivo TEY fosforilado y de poseer una actividad quinasa similar a la de la proteína salvaje (**Figura 50**). Estos resultados sugieren que la SUMOilación de ERK5 es un evento previo a la disociación de Hsp90, y plantean la posibilidad de que la conjugación con SUMO en dos residuos adyacentes al dominio quinasa (aa. 54-356) desplace a la molécula de Hsp90 (unida al extremo N-terminal del dominio quinasa). Por otra parte, la observación de que el mutante catalíticamente inactivo de ERK5 (D200A) sufre SUMOilación en respuesta a la fosforilación por MEK5 (**Figura 54A**) redundante en la idea de que no se requeriría la actividad quinasa de ERK5 para su modificación por SUMO. Este resultado también sugiere que la fosforilación del motivo TEY de ERK5 sería el mecanismo desencadenante de la conjugación con SUMO (ver Figura 69).

Por su parte, la sobre-expresión de exceso de Cdc37 resulta en la disociación de Hsp90 y en su SUMOilación de ERK5, tanto para la quinasa salvaje como para la forma deficiente en SUMOilación K6/22R (Figura 53). En este caso, la SUMOilación de ERK5 no sería un evento previo a la disociación de Hsp90, sino que más bien estos resultados indican que la sobre-expresión de Cdc37 es capaz de desplazar a Hsp90 de tanto EKR5 libre como de ERK5 SUMOilada (**ver Figura 69**).

Por último, los experimentos realizados con la forma de ERK5 catalíticamente inactiva (ERK5 D200A) muestran que este mutante sufre SUMOilación en respuesta a la fosforilación de su motivo TEY por MEK5 como en respuesta a la sobre-expresión de Cdc37. Ese mutante, no transloca al núcleo en respuesta a su fosforilación por MEK5 (Figura 42), una fosforilación que induce su SUMOilación pero que

no provoca la disociación de Hsp90 (Figura 54). Estos resultados sugieren que la SUMOilación de ERK5 y la disociación de Hsp90 son eventos necesarios pero no suficientes *per se* para la translocación nuclear de ERK5. En consonancia con esta observación, la sobre-expresión de Cdc37 provoca la translocación nuclear de la forma de ERK5 catalíticamente inactiva D200A (Figura 42), dado que induce su SUMOilación y la disociación de Hsp90 (Figura 54).

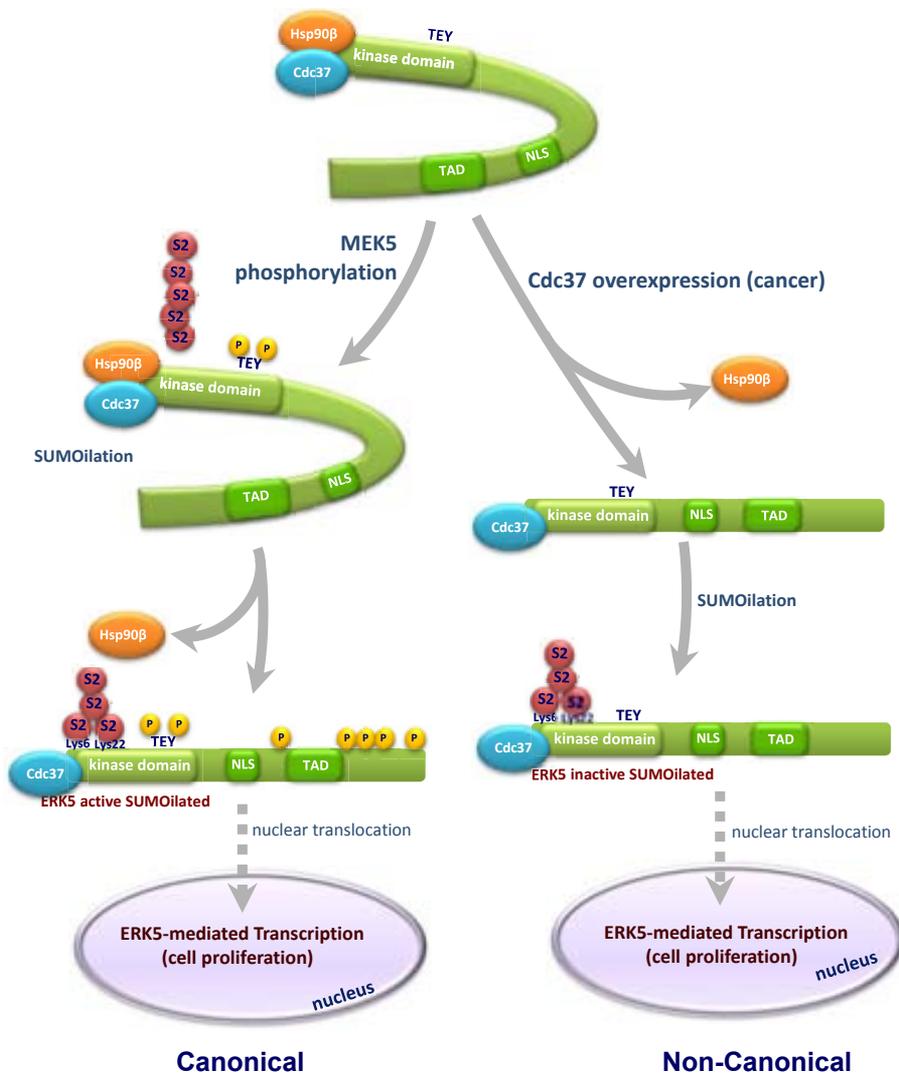


Figura 69. Modelo propuesto de SUMOilación de ERK5 inducida por la activación mediada por MEK5 o por la sobreexpresión de Cdc37. En condiciones de reposo ERK5, Hsp90 y Cdc37 forman un complejo trimérico. La activación de ERK5 por MEK5 promueve en primer lugar la conjugación de SUMO-2 en el dominio N-terminal de ERK5 (Lys 6 y 22) lo que induce un cambio conformacional en la quinasa que promueve la disociación de Hsp90 y la entrada en el núcleo de ERK5 activa. La expresión de exceso de Cdc37 desplaza directamente a Hsp90 e induce la SUMOilación de ERK5 como paso previo a la entrada en el núcleo de la MAPK.

Dado que siguen sin esclarecerse varios aspectos acerca de cómo la sobreexpresión de MEK5 y Cdc37 inducen la SUMOilación de ERK5 sería interesante realizar algunos experimentos en el futuro: i) Dado que el mutante ERK5(5E) se localiza constitutivamente en el núcleo, se podrían mutar las Lys6 y 22 a Arg en esta forma de ERK5 y evaluar mediante ensayos de inmunofluorescencia si estas mutaciones son suficientes para inducir su exporte nuclear.

ii) Hay varios ejemplos de la importancia de SUMO en el importe nuclear. La proteína de sp100 localizada en los cuerpos nucleares PML, presenta un NLS entre los aa. 444-450. SUMO-1 se une covalente a la Lys²⁹⁷ y la forma mutada Sp100(K297R) presenta una distribución citoplasmática principalmente. Además, se encontró que una mutación puntual Sp100(447E) que deja una NLS no funcional también logra bloquear la SUMOilación de esta proteína, este resultado indica que si bien SUMO-1 se conjuga en la Lys²⁹⁷ esta modificación es dependiente de la funcionalidad de la señal de localización nuclear (Sternsdorf et al., 1999). Dado que en la translocación nuclear de ERK5 se requiere del NLS sería interesante mutar algún residuo de esta secuencia dejándolo no funcional y analizar el estado de la SUMOilación en este mutante.

2. Rol de ERK5 en cáncer de próstata

2.1 ERK5 y Cdc37 cooperan en la inducción de la proliferación y migración de las células de adenocarcinoma de próstata.

ERK5 induce la proliferación de diferentes líneas celulares, entre ellas HeLa, las líneas de adenocarcinoma de próstata LnCap y C4-2 y células de vejiga T24 (Kato et al., 1998; Clape et al., 2009; Noguchi et al., 2011). De la misma forma, la sobreexpresión de Cdc37 es especialmente relevante en el tejido prostático, porque promueve la proliferación celular tanto de las células epiteliales normales como de las líneas tumorales de este tejido Du-145 y PC-3 (Schwarze et al., 2003; Gray, Jr. et al., 2007). *In vivo* la sobreexpresión de esta co-chaperona induce la proliferación de tumores de próstata (Stepanova et al., 2000). Estos antecedentes nos condujeron a evaluar la proliferación celular como el posible enlace funcional entre ERK5 y Cdc37.

Para el análisis de la proliferación se escogió como modelo celular la línea PC-3 porque además de presentar un alto potencial metastásico fue una de las líneas celulares analizadas con mayores niveles de expresión tanto de ERK5 como de Cdc37. La hipótesis que planteamos para llevar a cabo estos experimentos fue que la co-expresión de ERK5 con Cdc37 resultara en un efecto sinérgico en la proliferación de la línea celular PC-3. Inicialmente, la línea celular PC-3 fue transfectada transitoriamente con los vectores GFP vacío y GFP-ERK5 solos o junto a MEK5DD o Cdc37. La sobreexpresión de Cdc37 sola produce un débil pero significativo ($p < 0.01$) incremento en la proliferación de las células PC-3, de acuerdo con otras observaciones previamente publicadas (Gray, Jr. et al., 2007; Wu et al., 2013). Por su parte, la sobreexpresión de ERK5 no generó ningún efecto, pero en cambio su activación por MEK5 o su co-expresión con Cdc37 produjeron un sólido aumento en la proliferación celular ($p < 0.001$). Este resultado fue corroborado mediante la tinción con bromodesoxiuridina (BrdU), que es un método usado para la estimación de las células que se encuentran proliferando o en fase de síntesis de DNA. En acuerdo con lo descrito antes, la sobreexpresión de ERK5, Cdc37 y MEK5DD tiene un pobre efecto en la inducción de la proliferación. Sin embargo, la activación de ERK5 o su expresión junto a Cdc37 duplica la tasa de células en fase S. Lo anterior pone de manifiesto que ERK5 y Cdc37 tienen un efecto cooperativo en la proliferación celular.

Estos prometedores resultados nos condujeron a la generación de tres líneas celulares estables, PC3-ERK5, PC3-Cdc37 y PC3-ERK5/Cdc37. El parámetro usado para la validación de las líneas celulares generadas fue que la sobreexpresión de Cdc37 indujera la localización nuclear de ERK5. Mediante fraccionamiento subcelular se estableció que en las líneas PC-3 parental y PC3-ERK5, ERK5 se encuentra en el citosol, mientras que las líneas PC3-Cdc37 y PC3-ERK5/Cdc37, ERK5 se distribuye mayoritariamente en el núcleo. Tanto por citometría de flujo como por tinción con BrdU se observó un efecto cooperativo en la promoción de la proliferación de las células PC-3 que produce la co-expresión de

ERK5 y Cdc37. En la línea celular PC3-ERK5/Cdc37 la tasa de proliferación se triplica con respecto a la línea PC-3 control.

La colaboración de ERK5 y Cdc37 en la inducción de la proliferación podría estar relacionado con la regulación de una o varias de las proteínas involucradas en el control del ciclo celular. Los niveles de expresión de la Ciclina D1 en la línea PC-3 parental son especialmente bajos, pero tal como ha sido reportado la sobreexpresión de ERK5 y Cdc37 son capaces de inducir un incremento de esta proteína (Mulloy et al., 2003; Katayama et al., 2004). No obstante, la PC3-ERK5/Cdc37 es la que presenta la máxima expresión de esta ciclina, este resultado es relevante ya que la expresión y actividad de esta ciclina es clave para la progresión del ciclo celular de fase G1a S. Sería interesante evaluar cómo se encuentran los niveles de algunas de las quinasas dependientes de ciclinas Cdk4/6, que forman complejo con la Ciclina D1 y son especialmente abundantes en los tejidos en proliferación. También deberían analizarse los niveles de p-retinoblastoma (pRb), sustrato de ciclina D1. La hiperfosforilación de Rb es clave en la detención del ciclo celular, las ciclinas son las encargadas de mantener a Rb en su estado Rb hiperfosforilado hasta la salida de mitosis, donde vuelve a encontrarse hipofosforilado hasta la próxima G1 (Sherr and Roberts, 1999).

Tanto Cdc37 como ERK5 promueven la migración e invasividad celular. Ha sido descrito que la Cdc37 se encuentra sobre-expresada en la superficie celular de las líneas tumorales de mama MDA-MB-453 y MDA-MB-231 e incrementa la migración de estas células en un mecanismo que requiere la interacción con Hsp90 y con los receptores HER2 y EGFR (El et al., 2012). Por otro lado, en varias investigaciones se ha descrito que ERK5 controla la migración celular a través de la regulación de la activación de la quinasa de adhesión focal (FAK) (Sawhney et al., 2009) y de la inducción de la expresión de las metaloproteasas en especial la MMP-9 (Ramsay et al., 2011; Kim et al., 2012). En consonancia con estos antecedentes nuestros resultados de ensayos de migración celular (*wound healing*) de las cuatro líneas estables generadas demuestran que la sobre-expresión de Cdc37 y ERK5 aumentan drásticamente la migración celular de las células de adenocarcinoma de próstata PC-3.

Los resultados obtenidos en el estudio de la proliferación de las líneas estables generadas (PC3-ERK5, PC3-Cdc37 y PC3-ERK5/Cdc37) son la base para la continuación de este proyecto en el futuro. A partir de estas líneas se podrá estudiar como la sobreexpresión de ERK5 y Cdc37 afectan la capacidad de formación de tumores en ratones xenograts. Para conseguir una clara evidencia de la correlación entre la expresión de estas proteínas y el crecimiento de tumores se analizarán mediante inmunohistoquímica los tumores desarrollados para establecer parámetros como la proliferación, mediante el uso del marcador Ki67 y angiogénesis con el marcador CD31.

2.2 ERK5 interacciona con el Receptor de Andrógenos y regula su activación transcripcional

El Receptor de andrógenos (AR) es un factor de transcripción dependiente de ligando que pertenece a la superfamilia de receptores nucleares. Los andrógenos, como la testosterona, se unen específicamente al AR provocando su activación y este a su vez activa la transcripción de genes necesarios para el desarrollo normal de los órganos reproductivos masculinos. Numerosas investigaciones demuestran que este receptor también cumple un papel fundamental en la progresión del cáncer de próstata. Aproximadamente entre 80-90% de los tumores de próstata son dependientes de andrógenos al momento del diagnóstico, razón por la cual las terapias endocrinas van dirigidas hacia la reducción de los niveles séricos de andrógenos y la inhibición del AR (Heinlein and Chang, 2004; Dreicer et al., 2011). Sin embargo, cada vez son más las evidencias de que la terapia de privación de andrógenos es insuficiente y resulta en la progresión de los tumores a un estado hormono-refractario. De hecho los pacientes con estos tumores independientes de andrógenos continúan expresando el AR activo (Mao et al., 2009; Koochekpour, 2010).

Basados en la literatura encontramos evidencias de que ERK5 y el AR tienen varias características en común: i) Tanto ERK5 como el AR son proteínas cliente de la co-chaperona Cdc37, de hecho el AR es la única proteína cliente de Cdc37 no quinasa encontrada hasta el momento. En experimentos llevados a cabo en levaduras se determinó que la expresión de la forma Cdc37-34 (no fosforilable por CK2) inhibe la transactivación del AR en respuesta al tratamiento con DHT en forma dependiente de temperatura, de manera que a 25°C disminuye 5 veces la inducción de la activación del AR que media la Cdc37 salvaje y a 37°C es 80 veces menor. El efecto de este mutante es específico para el AR ya que no afecta la activación del estrechamente relacionado receptor de glucocorticoides (GR) (Fliss et al., 1997). En células CV-1 (células renales de mono) fue demostrado que Cdc37 se une al dominio de unión al ligando (LBD) del AR y que un mutante dominante negativo de Cdc37 (Cdc37¹⁻¹⁷³) parcialmente inhibe la activación del AR (Rao et al., 2001).

En el proceso de plegamiento del AR como pasa con los otros receptores de hormonas participan complejos de multi-chaperonas, entre ellas Hsp90/Hsp70/Hsp40, que ayudan a mantener al receptor en un estado de alta afinidad por el ligando. La Cdc37 no hace parte de estos complejos, lo que da paso a una serie de cuestiones acerca de cuál es la función exacta de la interacción entre Cdc37 y el AR y en qué punto de la vía de señalización del receptor podría participar esta co-chaperona. La única hipótesis respecto es que la Cdc37 se acoplaría al AR durante la activación por la hormona (*downstream* de la vía), ya que ha sido demostrado que la interacción entre ambas proteínas persiste aún en presencia de DHT (dihidrotestosterona) (Rao et al., 2001). Cdc37 podría ser la responsable de los cambios conformacionales que sufre el AR y que permiten la interacción entre sus dominios N y C-terminal. La asociación intramolecular de estos dominios es indispensable para que ocurra una óptima activación del receptor. Lo que concuerda con la observación de la disminución en la transactivación dependiente de la hormona del AR como consecuencia de la expresión de un mutante inactivo de Cdc37.

ii) La activación de ERK5 y el AR inducen su disociación de Hsp90 y posterior translocación al núcleo. En 1992 Mulder y colaboradores a través de experimentos de inmunoprecipitación con un anticuerpo monoclonal demostraron que en condiciones basales el AR citosólico coprecipita con el complejo de chaperonas Hsp90, Hsp70 y Hsp56. La incubación con el agonista sintético R1881 inducía la pérdida de la co-precipitación con el complejo de chaperonas y el AR se concentraba en la fracción nuclear mayoritariamente. En este trabajo se generó un anticuerpo específico contra el dominio DBD del AR, este anticuerpo reconoce específicamente la forma activa del receptor, pero no la unida a las chaperonas (receptor inactivo). Estos resultados permitieron establecer que el complejo de chaperonas bloquea físicamente la unión del receptor al DNA y que para que ocurra el proceso de activación del receptor este debe disociarse de las chaperonas (Veldscholte et al., 1992).

iii) Una vez han entrado en el núcleo, tanto ERK5 como el AR inducen la activación transcripcional de AP-1. Dado que los factores de transcripción AR y AP-1 regulan el crecimiento tanto de las células normales como tumorales de próstata se ha estudiado el asocio entre ellos. Se determinó que la exposición de células LnCap al agonista 1nM de R1881 durante 24 y 96 horas inducía la activación de AP-1 generando cambios específicos en la composición del complejo de AP-1 y DNA. A las 24 h de incubación con R1881 incrementaban los niveles de expresión de Fra-2 y a las 96 h aumentaba JunD. Este efecto era bloqueado por el anti-andrógeno bicalutamida y en células Du-145 que no expresan el AR endógeno la estimulación con R1881 no producía cambios en la activación de AP-1. Lo anterior sugiere que la activación de AP-1 en respuesta a la estimulación con agonistas es una consecuencia directa de la activación del AR (Church et al., 2005).

iv) Ambas proteínas juegan un papel importante en el desarrollo del cáncer de próstata.

Todas estas coincidencias entre ERK5 y AR nos parecieron evidencias suficientes para justificar el estudio de una posible asociación entre ambas proteínas.

En el inicio de esta fase de la investigación la primera pregunta planteada fue sí ERK5 y el AR interaccionan. Mediante ensayos de inmunoprecipitación a partir de células LnCap que expresan ambas proteínas, pudimos demostrar que ERK5, el AR y Cdc37 forman un complejo *in vivo*. A continuación, mediante un ensayo de *pull down* de las proteínas recombinantes demostramos que la activación de ERK5 por MEK5DD no afecta la interacción entre la ERK5 y el AR recombinantes. Este resultado nos permite sugerir que la Hsp90 no ejerce como proteína puente entre el AR y ERK5, ya que cuando ERK5 está activa no se encuentra unida a la chaperona. Nuevamente, la asociación entre ambas proteínas ocurre a través del dominio quinasa de ERK5, que es la misma región de la proteína a la que se une la Cdc37. El AR posee cuatro dominios principales: el dominio N-terminal, que controla la activación transcripcional dependiente de ligando y contiene el motivo para dimerización (FXXFL); el dominio de unión al DNA (DBD), que se une a las secuencias denominadas elementos de respuesta a andrógenos (AREs) de sus sustratos; la región bisagra que contiene el NLS y por último el dominio de unión al ligando (LBD) localizado en la porción C-terminal del receptor (Germann, 2002). Dado que el AR no tiene un dominio exclusivo involucrado en la interacción con proteínas, sería interesante en futuros experimentos

establecer cuál de estos cuatro dominios del AR es el sitio de unión con ERK5. Para ello se deberían generar mutantes de delección de cada uno de los dominios del AR, co-expresarlos junto a ERK5 y mediante ensayos de co-IP evaluar el estado de la asociación entre ambas proteínas.

En condiciones basales el AR inactivo reside en el citosol, pero la estimulación con andrógenos promueve varios cambios estructurales en el receptor que resultan en su migración al núcleo. Bajo la unión al ligando, el AR es liberado del complejo de chaperonas y en su estado fosforilado adquiere una conformación cerrada en la que sus dominio NTD y LBD interaccionan, esta asociación es la que confiere la máxima activación al receptor. Por último se expone la señal NLS, que al parecer interacciona con importinas y facilita la entrada del AR en el núcleo (Schaufele et al., 2005; Haelens et al., 2007). Todo este proceso de transporte nuclear ocurre rápidamente, entre 15 a 60 minutos después de la exposición a la hormona (Tyagi et al., 2000).

Los experimentos de fraccionamiento subcelular en los que se separaron las fracciones nucleares y citosólicas de células LnCap se estudió el efecto de la activación de ERK5 y el AR en la inducción de una translocación recíproca. Como primera medida observamos que el AR, ERK5 y Cdc37 se distribuyen en el citosol de las células LnCap y que mediante el tratamiento con 1nM de la hormona dihidrotestosterona (DHT), logramos inducir la activación y translocación nuclear del AR. Por primera vez describimos que activación del AR promueve también la translocación nuclear de ERK5 y de Cdc37. Al inducir la activación y translocación nuclear de ERK5 en respuesta al EGF, de manera inesperada encontramos que también se indujo la translocación nuclear de Cdc37. Por su parte, la estimulación con el EGF no produjo efectos en la localización del AR, que continúa estando mayoritariamente en el citosol. Este resultado podría resultar contradictorio con lo demostrado en la Figura. 60 donde se observa que ERK5 activa interacciona con el AR, esta diferencia en los resultados podría deberse a qué en estos experimentos usamos dos métodos diferentes de activación, por co-expresión con MEK5DD (Figura 60) y EGF (Figura 61). Es posible que el tiempo escogido (4 horas) de estimulación no fuera el correcto para evaluar este efecto, sería necesario realizar una cinética de tratamiento con EGF para evaluar la localización subcelular del AR a diferentes tiempos a los que ERK5 se encuentra activa en respuesta a este estímulo. Adicionalmente, es necesario realizar un experimento de fraccionamiento de células LnCap en las que se haya expresado MEK5DD, ya que esta es la manera más directa de evaluar como la activación de ERK5 puede influir en la distribución subcelular del AR. En este mismo experimento también se encontró que la Hsp90 no varió su distribución citosólica en respuesta a la activación de ERK5 o del AR. A partir de un experimento de co-IP de las fracciones antes descritas se estableció que ERK5, AR, Cdc37 y Hsp90 forman un complejo *in vivo* en el citosol en condiciones basales. Bajo la estimulación con DHT las proteínas ERK5, AR y Cdc37 se asocian en el núcleo. Con la estimulación por EGF, ERK5 únicamente se encuentra asociada con Cdc37 en el núcleo.

La ruta de señalización de ERK5/MEK5 es importante en la proliferación de las células tumorales de mama. ERK5 esta constitutivamente activada en varias líneas de carcinoma mamario y además sobreexpresada en tumores primarios (Esparis-Ogando et al., 2002; Montero et al., 2009). Estos antecedentes nos condujeron a evaluar una posible interacción entre ERK5 y el Receptor de estrógenos

alfa (ER α), este receptor también juega un papel importante en la progresión del cáncer de mama. Mediante experimentos de fraccionamiento subcelular de células MCF-7 y co-IP establecimos que el ERK5 no interacciona con ER α , de hecho ambas proteínas exhiben una distribución celular diferente. En condiciones de reposo tanto ERK5 como Cdc37 se localizan en el citosol de las células MCF-7 mientras que el ER α inactivo y activo se encuentra en el núcleo. La estimulación con β -estradiol (E2) no indujo la entrada en el núcleo de ERK5 y Cdc37. Dentro de los receptores de esteroides existen dos grupos: los que en condiciones basales son citosólicos, como el AR y el receptor de glucocorticoides (GR) y los nucleares, a este grupo pertenece el ER α y el receptor de progesterona (PR). Este resultado sugiere en primer lugar que el rol preponderante de ERK5 en cáncer de mama no es la consecuencia de una asociación directa con el receptor de estrógenos. Además, dado que la estimulación con E2 no modifica la localización subcelular de ERK5, posiblemente la translocación al núcleo que promueve la estimulación con DHT que hemos descrito, no es un efecto generalizado que produzca cualquier tipo de hormona sino que esta específicamente relacionado con la vía del AR. Sería conveniente evaluar si existe interacción entre ERK5 y el receptor de glucocorticoides que además de tener una función clave en el desarrollo del cáncer de mama y de próstata, presenta un modelo de translocación nuclear similar al de ERK5 y el AR.

El receptor de andrógenos es fosforilado en múltiples sitios en respuesta a la unión de la hormona o ligandos como el EGF y el IGF. Múltiples quinasas como CKII, Akt, PKA y PKCs fosforilan al AR al menos *in vitro*. También ERK1/2 fosforila la Ser⁵¹⁵ del AR. El tratamiento con el inhibidor de ERK-MEK, PD98059 disminuye sustancialmente la activación del AR mediada por ErbB2 (HER2/neu) (Yeh et al., 1999). Por su parte, Gioeli y colaboradores mostraron que las MAPKs activadas por estrés, p38 y JNK pueden actuar como reguladoras negativas del AR. Bajo estrés celular tanto p38 como JNK fosforilan al AR en Ser⁶⁵⁰. Esta fosforilación ocurre en el núcleo y provoca el rápido transporte del AR al citosol. Dicha activación tiene profundas implicaciones porque actúa como un mecanismo de control de las concentraciones nucleares del receptor y de la expresión de los genes AR-dependientes (Gioeli et al., 2006). Dado que prácticamente todas las MAPKs fosforilan al AR era importante evaluar por primera vez si ERK5 también lo hacía. Mediante un ensayo radiométrico se analizó la fosforilación del AR procedente de precipitados celulares incubados con una preparación pura de ERK5 activa. Aunque los resultados son preliminares y poco concluyentes, sirvieron de indicio para plantearnos estudiar más a fondo esta posible fosforilación. En la actualidad estamos generando AR pura expresada en células de *E. coli* para evaluar de manera definitiva si el AR es sustrato de ERK5. En función de los resultados que se obtengan en experimentos futuros la prioridad será la identificación del putativo residuo del AR fosforilado por ERK5. En la última fase de la investigación se procedió a evaluar la funcionalidad de la interacción de ERK5 con el AR, mediante el estudio del efecto de ERK5 sobre la activación del promotor de la PSA (antígeno prostático específico) por parte del AR. El PSA es una serin proteasa que se expresa exclusivamente en las células epiteliales de la próstata, y es considerado el principal marcador tumoral específico de próstata, ya que existe una correlación positiva entre el incremento de los niveles séricos de esta proteína, el volumen del tumor y el estado clínico de la enfermedad. La expresión del PSA es activada por andrógenos y regulada a nivel transcripcional por el AR (Kim et al., 2004). Tras la unión a la hormona

el AR entra en el núcleo y se une a los elementos de respuesta a andrógenos (AREs) localizados en el promotor del PSA, que consisten en repeticiones de motivos hexaméricos palindrómicos separados por 3 nucleótidos (GGTACAnnnTGTTCT) localizados en el promotor de sus genes diana, lo que inicia la transcripción de estos. Uno de los principales sustratos de AR es el PSA cuyo promotor presenta tres AREs, AREI en la región proximal del promotor (-170), AREII (-394) y AREIII en la parte distal de región iniciadora (-4200) (La et al., 2007).

La sobreexpresión de ERK5 y Cdc37 produce un ligero aumento, pero significativo, en la activación del PSA en respuesta a la estimulación con el agonista R1881 (10nM), adicional al que rinde el vector vacío. La co-expresión de ERK5 con Cdc37 o su activación por MEK5DD incrementan de manera significativa ($p < 0.001$) la activación del PSA inducida por el R1881 (**Figura 65**). Dado que la transactivación del PSA que promueve la co-expresión de ERK5 con MEK5 o con Cdc37 solo se produce en presencia del agonista es posible que estas proteínas actúen como co-activadoras del AR y mediante un mecanismo desconocido ejerzan un efecto sinérgico en la activación dependiente de andrógenos. Lo anterior es importante si se tiene en cuenta que proteínas como MEKK1 y NF- κ B inducen la activación transcripcional del PSA en condiciones independientes de andrógenos y sin la intervención directa del AR (Abreu-Martin et al., 1999; Chen and Sawyers, 2002).

A continuación se evaluó la acción de ERK5 en la activación transcripcional del PSA mediante el silenciamiento de la quinasa. Para ello se generaron dos lentivirus shRNA específicos contra ERK5. Los ensayos de gen reportero luciferasa muestran que el silenciamiento de ERK5 reduce de manera significativa la activación transcripcional del promotor del PSA inducida por la activación del AR con el ligando: el lentivirus que disminuye parcialmente la expresión de ERK5 reduce en un 53% la activación del PSA, mientras que el lentivirus que provocó la desaparición del 90% de ERK5 inhibe la activación del PSA en un 73% (**Figura 67**). El efecto negativo que tiene el silenciamiento de ERK5 sobre la actividad del PSA fue no fue debido a una reducción en la expresión del AR, como ha sido reportado para ERK1/2. El silenciamiento de esta MAPK o su inhibición con el compuesto U0126 afecta la estabilidad del AR reduciendo drásticamente los niveles de su mRNA (Agoulnik et al., 2008). Se requieren nuevos experimentos para confirmar este resultado. Por ejemplo, sería conveniente evaluar si el silenciamiento de ERK5 induce cambios en los niveles de expresión del PSA. Además, dado que ERK5 y el AR forman un complejo *in vivo* es importante establecer si el silenciamiento de ERK5 puede afectar el proceso de activación y posterior translocación al núcleo del receptor, lo que explicaría la inhibición observada de la actividad transcripcional del PSA en respuesta a la estimulación con andrógenos.

VI.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. Mediante ensayos de co-inmunoprecipitación y *pull down* de las proteínas endógenas y recombinantes demostramos que ERK5, Hsp90 β y Cdc37 forman un complejo trimérico *in vivo*.
2. Hsp90 y Cdc37 son necesarias para el correcto plegamiento y estabilización de ERK5. La inhibición farmacológica de Hsp90 o de Cdc37 inducen la ubiquitinación y degradación proteosomal de ERK5. Por lo tanto, ERK5 es una nueva proteína cliente de las chaperonas Hsp90 y Cdc37, que son necesarias para el correcto plegamiento y mantenimiento de la estructura de ERK5.
3. La activación canónica de ERK5 en respuesta a EGF o a la expresión de su activador MEK5 induce la disociación de Hsp90 del complejo ERK5-Cdc37, como paso previo a la translocación nuclear de ERK5, mediante un mecanismo que requiere la autofosforilación de la cola C-terminal. Una vez en el núcleo, ERK5 activa la transcripción mediada por el factor de transcripción AP-1.
4. La sobre-expresión de Cdc37 induce la disociación de Hsp90 y la migración al núcleo de una forma catalíticamente inactiva de ERK5 pero que actúa de co-activadora transcripcional de AP-1. Este punto se ha demostrado a través de diferentes aproximaciones: i) La inhibición específica de la actividad de ERK5 por el compuesto XMD8-92 bloquea la translocación nuclear y activación transcripcional de ERK5 inducida por MEK5 pero no por Cdc37. ii) La sobre-expresión de Cdc37 induce la translocación nuclear y la activación transcripcional de la forma de ERK5 catalíticamente inactiva ERK5(D200A) y del mutante deficiente en autofosforilación de la cola C-terminal ERK5(5A). iii) La sobre-expresión de Cdc37 promueve la translocación nuclear de ERK5 en células MEF MEK5^{-/-}. Estos resultados proveen evidencias que apuntan a un nuevo mecanismo de translocación nuclear de ERK5, no canónico, que podría ocurrir en ciertos tipos de cáncer, donde se ha encontrado Cdc37 sobre-expresada.
5. Proponemos que la chaperona Hsp90 actúa como proteína de anclaje citoplasmático de ERK5, dado que los dos mecanismos de translocación nuclear de ERK5 (canónico y no canónico) requieren de la disociación de Hsp90 para la migración al núcleo y posterior activación transcripcional.
6. La activación de ERK5 y la expresión de exceso de Cdc37 inducen la SUMOilación de ERK5, que es necesaria para la entrada en el núcleo de ERK5. Así, la forma de ERK5 deficiente en SUMOilación ERK5(K6/22R) no entra en el núcleo en respuesta a la activación o la sobre-expresión de Cdc37, mientras que la sobre-expresión de la proteasa de SUMO SENP-2 bloquea la translocación nuclear de ERK5 inducida por EGF o por la sobreexpresión de Cdc37.

7. Mediante ensayos bioquímicos y de inmunofluorescencia demostramos que la SUMOilación de ERK5 y la disociación de Hsp90 son eventos necesarios pero no suficientes *per se* para la translocación nuclear de ERK5.
8. Mediante ensayos de contaje celular e incorporación de BrdU demostramos que ERK5 y Cdc37 cooperan en la inducción de la proliferación de células de adenocarcinoma de próstata PC-3. Se han generado líneas celulares que sobre-expresan establemente ERK5 y/o Cdc37 y a través de ensayos de proliferación y migración celular (*wound healing*) demostramos que la co-expresión de ambas proteínas promueve un drástico incremento en la proliferación y la migración celular de las líneas estables generadas.
9. Mediante ensayos de inmunoprecipitación demostramos por primera vez que ERK5 interacciona con el receptor de andrógenos (AR) en células LnCap (adenocarcinoma de próstata). La activación del receptor de andrógenos en respuesta a la estimulación por la hormona DHT induce la entrada en el núcleo del receptor de andrógenos y de ERK5, donde siguen interaccionando. Mediante ensayos de gen reportero del promotor de la proteína antígeno prostático específico (PSA), regulado por el AR, demostramos que la activación de ERK5 por MEK5 y la sobre-expresión de Cdc37 incrementan la actividad ligando-dependiente del receptor de andrógenos, mientras que el silenciamiento de la ERK5 celular (lentivirus shRNA) bloquea dicha activación transcripcional.

VII.

Referencias

Reference List

- Abe, J., Kusuhashi, M., Ulevitch, R.J., Berk, B.C., and Lee, J.D. (1996). Big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) is a redox-sensitive kinase. *J. Biol. Chem.* *271*, 16586-16590.
- Abreu-Martin, M.T., Chari, A., Palladino, A.A., Craft, N.A., and Sawyers, C.L. (1999). Mitogen-activated protein kinase kinase 1 activates androgen receptor-dependent transcription and apoptosis in prostate cancer. *Mol. Cell Biol.* *19*, 5143-5154.
- Adachi, M., Fukuda, M., and Nishida, E. (1999). Two co-existing mechanisms for nuclear import of MAP kinase: passive diffusion of a monomer and active transport of a dimer. *EMBO J.* *18*, 5347-5358.
- Adachi, M., Fukuda, M., and Nishida, E. (2000). Nuclear export of MAP kinase (ERK) involves a MAP kinase kinase (MEK)-dependent active transport mechanism. *J. Cell Biol.* *148*, 849-856.
- Agoulnik, I.U., Bingman, W.E., III, Nakka, M., Li, W., Wang, Q., Liu, X.S., Brown, M., and Weigel, N.L. (2008). Target gene-specific regulation of androgen receptor activity by p42/p44 mitogen-activated protein kinase. *Mol. Endocrinol.* *22*, 2420-2432.
- Ahmad, I., Singh, L.B., Yang, Z.H., Kalna, G., Fleming, J., Fisher, G., Cooper, C., Cuzick, J., Berney, D.M., Moller, H., Scardino, P., and Leung, H.Y. (2013). Mir143 expression inversely correlates with nuclear ERK5 immunoreactivity in clinical prostate cancer. *Br. J. Cancer* *108*, 149-154.
- Akaike, M., Che, W., Marmarosh, N.L., Ohta, S., Osawa, M., Ding, B., Berk, B.C., Yan, C., and Abe, J. (2004). The hinge-helix 1 region of peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 (PPARgamma1) mediates interaction with extracellular signal-regulated kinase 5 and PPARgamma1 transcriptional activation: involvement in flow-induced PPARgamma activation in endothelial cells. *Mol. Cell Biol.* *24*, 8691-8704.
- Alessi, D.R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D.T., and Saltiel, A.R. (1995). PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* *270*, 27489-27494.
- Alvarez-Fernandez, S., Ortiz-Ruiz, M.J., Parrott, T., Zaknoen, S., Ocio, E.M., San, M.J., Burrows, F.J., Esparis-Ogando, A., and Pandiella, A. (2013). Potent antimyeloma activity of a novel ERK5/CDK inhibitor. *Clin. Cancer Res.*
- Anjum, R. and Blenis, J. (2008). The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 747-758.
- Arlander, S.J., Felts, S.J., Wagner, J.M., Stensgard, B., Toft, D.O., and Karnitz, L.M. (2006). Chaperoning checkpoint kinase 1 (Chk1), an Hsp90 client, with purified chaperones. *J. Biol. Chem.* *281*, 2989-2998.
- Avila, C., Hadden, M.K., Ma, Z., Kornilayev, B.A., Ye, Q.Z., and Blagg, B.S. (2006). High-throughput screening for Hsp90 ATPase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *16*, 3005-3008.
- Avruch, J. (2007). MAP kinase pathways: the first twenty years. *Biochim. Biophys. Acta* *1773*, 1150-1160.

Bain,J., Plater,L., Elliott,M., Shpiro,N., Hastie,C.J., McLauchlan,H., Klevernic,I., Arthur,J.S., Alessi,D.R., and Cohen,P. (2007). The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem. J.* **408**, 297-315.

Basso,A.D., Solit,D.B., Chiosis,G., Giri,B., Tschlis,P., and Rosen,N. (2002). Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function. *J. Biol. Chem.* **277**, 39858-39866.

Basso,A.D., Solit,D.B., Munster,P.N., and Rosen,N. (2002). Ansamycin antibiotics inhibit Akt activation and cyclin D expression in breast cancer cells that overexpress HER2. *Oncogene* **21**, 1159-1166.

Belova,L., Brickley,D.R., Ky,B., Sharma,S.K., and Conzen,S.D. (2008). Hsp90 regulates the phosphorylation and activity of serum- and glucocorticoid-regulated kinase-1. *J. Biol. Chem.* **283**, 18821-18831.

Blagg,B.S. and Kerr,T.D. (2006). Hsp90 inhibitors: small molecules that transform the Hsp90 protein folding machinery into a catalyst for protein degradation. *Med. Res. Rev.* **26**, 310-338.

Borges,J., Pandiella,A., and Esparis-Ogando,A. (2007). Erk5 nuclear location is independent on dual phosphorylation, and favours resistance to TRAIL-induced apoptosis. *Cell Signal.* **19**, 1473-1487.

Boudeau,J., Deak,M., Lawlor,M.A., Morrice,N.A., and Alessi,D.R. (2003). Heat-shock protein 90 and Cdc37 interact with LKB1 and regulate its stability. *Biochem. J.* **370**, 849-857.

Brugge,J.S. (1986). Interaction of the Rous sarcoma virus protein pp60src with the cellular proteins pp50 and pp90. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **123**, 1-22.

Buschbeck,M. and Ullrich,A. (2005). The unique C-terminal tail of the mitogen-activated protein kinase ERK5 regulates its activation and nuclear shuttling. *J. Biol. Chem.* **280**, 2659-2667.

Cameron,S.J., Abe,J., Malik,S., Che,W., and Yang,J. (2004). Differential role of MEK5alpha and MEK5beta in BMK1/ERK5 activation. *J. Biol. Chem.* **279**, 1506-1512.

Cameron,S.J., Malik,S., Akaike,M., Lerner-Marmarosh,N., Yan,C., Lee,J.D., Abe,J., and Yang,J. (2003). Regulation of epidermal growth factor-induced connexin 43 gap junction communication by big mitogen-activated protein kinase1/ERK5 but not ERK1/2 kinase activation. *J. Biol. Chem.* **278**, 18682-18688.

Carvajal-Vergara,X., Tabera,S., Montero,J.C., Esparis-Ogando,A., Lopez-Perez,R., Mateo,G., Gutierrez,N., Pardo-Cabanas,M., Teixido,J., San Miguel,J.F., and Pandiella,A. (2005). Multifunctional role of Erk5 in multiple myeloma. *Blood* **105**, 4492-4499.

Catalona,W.J., Smith,D.S., Ratliff,T.L., Dodds,K.M., Coplen,D.E., Yuan,J.J., Petros,J.A., and Andriole,G.L. (1991). Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* **324**, 1156-1161.

Center,M.M., Jemal,A., Lortet-Tieulent,J., Ward,E., Ferlay,J., Brawley,O., and Bray,F. (2012). International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. *Eur. Urol.* **61**, 1079-1092.

Chambard,J.C., Lefloch,R., Pouyssegur,J., and Lenormand,P. (2007). ERK implication in cell cycle regulation. *Biochim. Biophys. Acta* **1773**, 1299-1310.

Chang,C.S., Kokontis,J., and Liao,S.T. (1988). Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors. *Science* **240**, 324-326.

Chang,C.Y., Walther,P.J., and McDonnell,D.P. (2001). Glucocorticoids manifest androgenic activity in a cell line derived from a metastatic prostate cancer. *Cancer Res.* **61**, 8712-8717.

- Chen,C.D. and Sawyers,C.L. (2002). NF-kappa B activates prostate-specific antigen expression and is upregulated in androgen-independent prostate cancer. *Mol. Cell Biol.* 22, 2862-2870.
- Chen,G., Cao,P., and Goeddel,D.V. (2002). TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90. *Mol. Cell* 9, 401-410.
- Chen,R.H., Sarnecki,C., and Blenis,J. (1992). Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol. Cell Biol.* 12, 915-927.
- Chen,Y., Clegg,N.J., and Scher,H.I. (2009). Anti-androgens and androgen-depleting therapies in prostate cancer: new agents for an established target. *Lancet Oncol.* 10, 981-991.
- Chiariello,M., Marinissen,M.J., and Gutkind,J.S. (2000). Multiple mitogen-activated protein kinase signaling pathways connect the cot oncoprotein to the c-jun promoter and to cellular transformation. *Mol. Cell Biol.* 20, 1747-1758.
- Chuderland,D., Konson,A., and Seger,R. (2008). Identification and characterization of a general nuclear translocation signal in signaling proteins. *Mol. Cell* 31, 850-861.
- Church,D.R., Lee,E., Thompson,T.A., Basu,H.S., Ripple,M.O., Ariazi,E.A., and Wilding,G. (2005). Induction of AP-1 activity by androgen activation of the androgen receptor in LNCaP human prostate carcinoma cells. *Prostate* 63, 155-168.
- Citri,A., Harari,D., Shohat,G., Ramakrishnan,P., Gan,J., Lavi,S., Eisenstein,M., Kimchi,A., Wallach,D., Pietrokovski,S., and Yarden,Y. (2006). Hsp90 recognizes a common surface on client kinases. *J. Biol. Chem.* 281, 14361-14369.
- Clape,C., Fritz,V., Henriquet,C., Apparailly,F., Fernandez,P.L., Iborra,F., Avances,C., Villalba,M., Culine,S., and Fajas,L. (2009). miR-143 interferes with ERK5 signaling, and abrogates prostate cancer progression in mice. *PLoS. One.* 4, e7542.
- Clinckemalie,L., Vanderschueren,D., Boonen,S., and Claessens,F. (2012). The hinge region in androgen receptor control. *Mol. Cell Endocrinol.* 358, 1-8.
- Cobb,M.H. and Goldsmith,E.J. (1995). How MAP kinases are regulated. *J. Biol. Chem.* 270, 14843-14846.
- Comstock,C.E. and Knudsen,K.E. (2007). The complex role of AR signaling after cytotoxic insult: implications for cell-cycle-based chemotherapeutics. *Cell Cycle* 6, 1307-1313.
- Cooper,J.A., Bowen-Pope,D.F., Raines,E., Ross,R., and Hunter,T. (1982). Similar effects of platelet-derived growth factor and epidermal growth factor on the phosphorylation of tyrosine in cellular proteins. *Cell* 31, 263-273.
- Cowley,S., Paterson,H., Kemp,P., and Marshall,C.J. (1994). Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* 77, 841-852.
- Cude,K., Wang,Y., Choi,H.J., Hsuan,S.L., Zhang,H., Wang,C.Y., and Xia,Z. (2007). Regulation of the G2-M cell cycle progression by the ERK5-NFkappaB signaling pathway. *J. Cell Biol.* 177, 253-264.
- Culig,Z., Hobisch,A., Cronauer,M.V., Radmayr,C., Trapman,J., Hittmair,A., Bartsch,G., and Klocker,H. (1994). Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor. *Cancer Res.* 54, 5474-5478.
- D**ai,K., Kobayashi,R., and Beach,D. (1996). Physical interaction of mammalian CDC37 with CDK4. *J. Biol. Chem.* 271, 22030-22034.

Daub,H., Olsen,J.V., Bairlein,M., Gnad,F., Oppermann,F.S., Korner,R., Greff,Z., Keri,G., Stemmann,O., and Mann,M. (2008). Kinase-selective enrichment enables quantitative phosphoproteomics of the kinome across the cell cycle. *Mol. Cell* 31, 438-448.

Delaney,A.M., Printen,J.A., Chen,H., Fauman,E.B., and Dudley,D.T. (2002). Identification of a novel mitogen-activated protein kinase kinase activation domain recognized by the inhibitor PD 184352. *Mol. Cell Biol.* 22, 7593-7602.

De,N.D., Masendycz,P., Ho,S., Cross,M., Fleetwood,A.J., Reynolds,E.C., Hamilton,J.A., and Scholz,G.M. (2005). A central role for the Hsp90.Cdc37 molecular chaperone module in interleukin-1 receptor-associated-kinase-dependent signaling by toll-like receptors. *J. Biol. Chem.* 280, 9813-9822.

Deng,X., Yang,Q., Kwiatkowski,N., Sim,T., McDermott,U., Settleman,J.E., Lee,J.D., and Gray,N.S. (2011). Discovery of a benzo[e]pyrimido-[5,4-b][1,4]diazepin-6(11H)-one as a Potent and Selective Inhibitor of Big MAP Kinase 1. *ACS Med. Chem. Lett.* 2, 195-200.

Diaz-Rodriguez,E. and Pandiella,A. (2010). Multisite phosphorylation of Erk5 in mitosis. *J. Cell Sci.* 123, 3146-3156.

Diehl,M.C., Idowu,M.O., Kimmelshue,K., York,T.P., Elmore,L.W., and Holt,S.E. (2009). Elevated expression of nuclear Hsp90 in invasive breast tumors. *Cancer Biol. Ther.* 8, 1952-1961.

Dingwall,C., Robbins,J., Dilworth,S.M., Roberts,B., and Richardson,W.D. (1988). The nucleoplasmin nuclear location sequence is larger and more complex than that of SV-40 large T antigen. *J. Cell Biol.* 107, 841-849.

Dreicer,R., Gleave,M., Kibel,A.S., Thrasher,J.B., and Moul,J.W. (2011). Targeting the androgen receptor--theory and practice. *Urology* 78, S482-S484.

Ei,H.A., Grammatikakis,N., and Patsavoudi,E. (2012). Cell surface Cdc37 participates in extracellular HSP90 mediated cancer cell invasion. *PLoS. One.* 7, e42722.

English,J.M., Pearson,G., Baer,R., and Cobb,M.H. (1998). Identification of substrates and regulators of the mitogen-activated protein kinase ERK5 using chimeric protein kinases. *J. Biol. Chem.* 273, 3854-3860.

English,J.M., Pearson,G., Hockenberry,T., Shivakumar,L., White,M.A., and Cobb,M.H. (1999). Contribution of the ERK5/MEK5 pathway to Ras/Raf signaling and growth control. *J. Biol. Chem.* 274, 31588-31592.

English,J.M., Vanderbilt,C.A., Xu,S., Marcus,S., and Cobb,M.H. (1995). Isolation of MEK5 and differential expression of alternatively spliced forms. *J. Biol. Chem.* 270, 28897-28902.

Epstein,J.I., Allsbrook,W.C., Jr., Amin,M.B., and Egevad,L.L. (2006). Update on the Gleason grading system for prostate cancer: results of an international consensus conference of urologic pathologists. *Adv. Anat. Pathol.* 13, 57-59.

Esparis-Ogando,A., Diaz-Rodriguez,E., Montero,J.C., Yuste,L., Crespo,P., and Pandiella,A. (2002). Erk5 participates in neuregulin signal transduction and is constitutively active in breast cancer cells overexpressing ErbB2. *Mol. Cell Biol.* 22, 270-285.

Fan,M., Park,A., and Nephew,K.P. (2005). CHIP (carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein) promotes basal and geldanamycin-induced degradation of estrogen receptor- α . *Mol. Endocrinol.* 19, 2901-2914.

Favata, M.F., Horiuchi, K.Y., Manos, E.J., Daulerio, A.J., Stradley, D.A., Feese, W.S., Van Dyk, D.E., Pitts, W.J., Earl, R.A., Hobbs, F., Copeland, R.A., Magolda, R.L., Scherle, P.A., and Trzaskos, J.M. (1998). Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J. Biol. Chem.* **273**, 18623-18632.

Feldman, B.J. and Feldman, D. (2001). The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat. Rev. Cancer* **1**, 34-45.

Fukuda, M., Gotoh, I., Adachi, M., Gotoh, Y., and Nishida, E. (1997). A novel regulatory mechanism in the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade. Role of nuclear export signal of MAP kinase kinase. *J. Biol. Chem.* **272**, 32642-32648.

Fukuda, M., Gotoh, I., Gotoh, Y., and Nishida, E. (1996). Cytoplasmic localization of mitogen-activated protein kinase kinase directed by its NH₂-terminal, leucine-rich short amino acid sequence, which acts as a nuclear export signal. *J. Biol. Chem.* **271**, 20024-20028.

Gelmann, E.P. (2002). Molecular biology of the androgen receptor. *J. Clin. Oncol.* **20**, 3001-3015.

Gioeli, D., Black, B.E., Gordon, V., Spencer, A., Kesler, C.T., Eblen, S.T., Paschal, B.M., and Weber, M.J. (2006). Stress kinase signaling regulates androgen receptor phosphorylation, transcription, and localization. *Mol. Endocrinol.* **20**, 503-515.

Girio, A., Montero, J.C., Pandiella, A., and Chatterjee, S. (2007). Erk5 is activated and acts as a survival factor in mitosis. *Cell Signal.* **19**, 1964-1972.

Gleason, D.F. (1966). Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother. Rep.* **50**, 125-128.

Grammatikakis, N., Lin, J.H., Grammatikakis, A., Tschlis, P.N., and Cochran, B.H. (1999). p50(cdc37) acting in concert with Hsp90 is required for Raf-1 function. *Mol. Cell Biol.* **19**, 1661-1672.

Gray, P.J., Jr., Stevenson, M.A., and Calderwood, S.K. (2007). Targeting Cdc37 inhibits multiple signaling pathways and induces growth arrest in prostate cancer cells. *Cancer Res.* **67**, 11942-11950.

Gray, P.J., Jr., Prince, T., Cheng, J., Stevenson, M.A., and Calderwood, S.K. (2008). Targeting the oncogene and kinome chaperone CDC37. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 491-495.

Grbovic, O.M., Basso, A.D., Sawai, A., Ye, Q., Friedlander, P., Solit, D., and Rosen, N. (2006). V600E B-Raf requires the Hsp90 chaperone for stability and is degraded in response to Hsp90 inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 57-62.

Guo, Z., Clydesdale, G., Cheng, J., Kim, K., Gan, L., McConkey, D.J., Ullrich, S.E., Zhuang, Y., and Su, B. (2002). Disruption of Mek2 in mice reveals an unexpected role for MEKK2 in modulating T-cell receptor signal transduction. *Mol. Cell Biol.* **22**, 5761-5768.

Haelens, A., Tanner, T., Denayer, S., Callewaert, L., and Claessens, F. (2007). The hinge region regulates DNA binding, nuclear translocation, and transactivation of the androgen receptor. *Cancer Res.* **67**, 4514-4523.

Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674.

Hartson, S.D. and Matts, R.L. (2012). Approaches for defining the Hsp90-dependent proteome. *Biochim. Biophys. Acta* **1823**, 656-667.

Hatano,N., Mori,Y., Oh-hora,M., Kosugi,A., Fujikawa,T., Nakai,N., Niwa,H., Miyazaki,J., Hamaoka,T., and Ogata,M. (2003). Essential role for ERK2 mitogen-activated protein kinase in placental development. *Genes Cells* 8, 847-856.

Hayashi,M., Fearn,C., Eliceiri,B., Yang,Y., and Lee,J.D. (2005). Big mitogen-activated protein kinase 1/extracellular signal-regulated kinase 5 signaling pathway is essential for tumor-associated angiogenesis. *Cancer Res.* 65, 7699-7706.

Hayashi,M. and Lee,J.D. (2004). Role of the BMK1/ERK5 signaling pathway: lessons from knockout mice. *J. Mol. Med. (Berl)* 82, 800-808.

Hayashi,M., Tapping,R.I., Chao,T.H., Lo,J.F., King,C.C., Yang,Y., and Lee,J.D. (2001). BMK1 mediates growth factor-induced cell proliferation through direct cellular activation of serum and glucocorticoid-inducible kinase. *J. Biol. Chem.* 276, 8631-8634.

Hay,R.T. (2005). SUMO: a history of modification. *Mol. Cell* 18, 1-12.

Heinlein,C.A. and Chang,C. (2004). Androgen receptor in prostate cancer. *Endocr. Rev.* 25, 276-308.

Heo,K.S., Chang,E., Le,N.T., Cushman,H., Yeh,E.T., Fujiwara,K., and Abe,J. (2013). De-SUMOylation enzyme of sentrin/SUMO-specific protease 2 regulates disturbed flow-induced SUMOylation of ERK5 and p53 that leads to endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Circ. Res.* 112, 911-923.

Hickey, C. M., N. R. Wilson, and M. Hochstrasser. 2012. Function and regulation of SUMO proteases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13:755-766.

Hsieh,F.C., Cheng,G., and Lin,J. (2005). Evaluation of potential Stat3-regulated genes in human breast cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335, 292-299.

Huggins,C. (1967). Endocrine-induced regression of cancers. *Cancer Res.* 27, 1925-1930.

Ikedo,Y., Aihara,K., Sato,T., Akaike,M., Yoshizumi,M., Suzaki,Y., Izawa,Y., Fujimura,M., Hashizume,S., Kato,M., Yagi,S., Tamaki,T., Kawano,H., Matsumoto,T., Azuma,H., Kato,S., and Matsumoto,T. (2005). Androgen receptor gene knockout male mice exhibit impaired cardiac growth and exacerbation of angiotensin II-induced cardiac fibrosis. *J. Biol. Chem.* 280, 29661-29666.

Inesta-Vaquera,F.A., Campbell,D.G., Tournier,C., Gomez,N., Lizcano,J.M., and Cuenda,A. (2010). Alternative ERK5 regulation by phosphorylation during the cell cycle. *Cell Signal.* 22, 1829-1837.

Jaaro,H., Rubinfeld,H., Hanoch,T., and Seger,R. (1997). Nuclear translocation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1) in response to mitogenic stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 3742-3747.

Jackson,S.E. (2012). Hsp90: Structure and Function. *Top. Curr. Chem.*

Jinwal,U.K., Abisambra,J.F., Zhang,J., Dharia,S., O'Leary,J.C., Patel,T., Braswell,K., Jani,T., Gestwicki,J.E., and Dickey,C.A. (2012). Cdc37/Hsp90 protein complex disruption triggers an autophagic clearance cascade for TDP-43 protein. *J. Biol. Chem.* 287, 24814-24820.

Jones,J.O., Bolton,E.C., Huang,Y., Feau,C., Guy,R.K., Yamamoto,K.R., Hann,B., and Diamond,M.I. (2009). Non-competitive androgen receptor inhibition in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106, 7233-7238.

Johnson, J.L. and Brown, C. (2009). Plasticity of the Hsp90 chaperone machine in divergent eukaryotic organisms. *Cell Stress. Chaperones*. 14, 83-94.

Kalderon, D., Roberts, B.L., Richardson, W.D., and Smith, A.E. (1984). A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 39, 499-509.

Kamakura, S., Moriguchi, T., and Nishida, E. (1999). Activation of the protein kinase ERK5/BMK1 by receptor tyrosine kinases. Identification and characterization of a signaling pathway to the nucleus. *J. Biol. Chem.* 274, 26563-26571.

Kasler, H.G., Victoria, J., Duramad, O., and Winoto, A. (2000). ERK5 is a novel type of mitogen-activated protein kinase containing a transcriptional activation domain. *Mol. Cell Biol.* 20, 8382-8389.

Katayama, Y., Sakai, A., Okikawa, Y., Oue, N., Asaoku, H., Sasaki, A., Imanaka, F., Tsujimoto, T., Takimoto, Y., Masuda, R., Nakaju, N., Otsuki, T., Yasui, W., and Kimura, A. (2004). Cyclin D1 overexpression is not a specific grouping marker, but may collaborate with CDC37 in myeloma cells. *Int. J. Oncol.* 25, 579-595.

Kato, Y., Chao, T.H., Hayashi, M., Tapping, R.I., and Lee, J.D. (2000). Role of BMK1 in regulation of growth factor-induced cellular responses. *Immunol. Res.* 21, 233-237.

Kato, Y., Kravchenko, V.V., Tapping, R.I., Han, J., Ulevitch, R.J., and Lee, J.D. (1997). BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. *EMBO J.* 16, 7054-7066.

Kato, Y., Tapping, R.I., Huang, S., Watson, M.H., Ulevitch, R.J., and Lee, J.D. (1998). Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor. *Nature* 395, 713-716.

Keshet, Y. and Seger, R. (2010). The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods Mol. Biol.* 661, 3-38.

Kesler, C.T., Gioeli, D., Conaway, M.R., Weber, M.J., and Paschal, B.M. (2007). Subcellular localization modulates activation function 1 domain phosphorylation in the androgen receptor. *Mol. Endocrinol.* 21, 2071-2084.

Kim, J. and Coetzee, G.A. (2004). Prostate specific antigen gene regulation by androgen receptor. *J. Cell Biochem.* 93, 233-241.

Kim, S.M., Lee, H., Park, Y.S., Lee, Y., and Seo, S.W. (2012). ERK5 regulates invasiveness of osteosarcoma by inducing MMP-9. *J. Orthop. Res.* 30, 1040-1044.

Kimura, Y., Rutherford, S.L., Miyata, Y., Yahara, I., Freeman, B.C., Yue, L., Morimoto, R.I., and Lindquist, S. (1997). Cdc37 is a molecular chaperone with specific functions in signal transduction. *Genes Dev.* 11, 1775-1785.

Kocanova, S., M. Mazaheri, S. Caze-Subra, and K. Bystricky. 2010. Ligands specify estrogen receptor alpha nuclear localization and degradation. *BMC. Cell Biol.* 11:98.

Kondoh, K., Terasawa, K., Morimoto, H., and Nishida, E. (2006). Regulation of nuclear translocation of extracellular signal-regulated kinase 5 by active nuclear import and export mechanisms. *Mol. Cell Biol.* 26, 1679-1690.

Koochekpour, S. (2010). Androgen receptor signaling and mutations in prostate cancer. *Asian J. Androl* 12, 639-657.

- L**ee,G.W., Melchior,F., Matunis,M.J., Mahajan,R., Tian,Q., and Anderson,P. (1998). Modification of Ran GTPase-activating protein by the small ubiquitin-related modifier SUMO-1 requires Ubc9, an E2-type ubiquitin-conjugating enzyme homologue. *J. Biol. Chem.* *273*, 6503-6507.
- Lee,J.C., Laydon,J.T., McDonnell,P.C., Gallagher,T.F., Kumar,S., Green,D., McNulty,D., Blumenthal,M.J., Heys,J.R., Landvatter,S.W., and . (1994). A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* *372*, 739-746.
- Lee,J.D., Ulevitch,R.J., and Han,J. (1995). Primary structure of BMK1: a new mammalian map kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *213*, 715-724.
- Lee,P., Rao,J., Fliss,A., Yang,E., Garrett,S., and Caplan,A.J. (2002). The Cdc37 protein kinase-binding domain is sufficient for protein kinase activity and cell viability. *J. Cell Biol.* *159*, 1051-1059.
- Lennartsson,J., Burovic,F., Witek,B., Jurek,A., and Heldin,C.H. (2010). Erk 5 is necessary for sustained PDGF-induced Akt phosphorylation and inhibition of apoptosis. *Cell Signal.* *22*, 955-960.
- Lecker,S.H., Goldberg,A.L., and Mitch,W.E. (2006). Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J. Am. Soc. Nephrol.* *17*, 1807-1819.
- Lidke,D.S., Huang,F., Post,J.N., Rieger,B., Wilsbacher,J., Thomas,J.L., Pouyssegur,J., Jovin,T.M., and Lenormand,P. (2010). ERK nuclear translocation is dimerization-independent but controlled by the rate of phosphorylation. *J. Biol. Chem.* *285*, 3092-3102.
- Lochhead,P.A., Gilley,R., and Cook,S.J. (2012). ERK5 and its role in tumour development. *Biochem. Soc. Trans.* *40*, 251-256.
- Lubahn,D.B., Joseph,D.R., Sullivan,P.M., Willard,H.F., French,F.S., and Wilson,E.M. (1988). Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science* *240*, 327-330.
- Lyu,J., Wesselschmidt,R.L., and Lu,W. (2009). Cdc37 regulates Ryk signaling by stabilizing the cleaved Ryk intracellular domain. *J. Biol. Chem.* *284*, 12940-12948.
- M**acLean,H.E., Warne,G.L., and Zajac,J.D. (1997). Localization of functional domains in the androgen receptor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *62*, 233-242.
- MacLean,M. and Picard,D. (2003). Cdc37 goes beyond Hsp90 and kinases. *Cell Stress. Chaperones.* *8*, 114-119.
- Mahalingam,D., Swords,R., Carew,J.S., Nawrocki,S.T., Bhalla,K., and Giles,F.J. (2009). Targeting HSP90 for cancer therapy. *Br. J. Cancer* *100*, 1523-1529.
- Makridakis,N., Ross,R.K., Pike,M.C., Chang,L., Stanczyk,F.Z., Kolonel,L.N., Shi,C.Y., Yu,M.C., Henderson,B.E., and Reichardt,J.K. (1997). A prevalent missense substitution that modulates activity of prostatic steroid 5alpha-reductase. *Cancer Res.* *57*, 1020-1022.
- Mandal,A.K., Lee,P., Chen,J.A., Nillegoda,N., Heller,A., DiStasio,S., Oen,H., Victor,J., Nair,D.M., Brodsky,J.L., and Caplan,A.J. (2007). Cdc37 has distinct roles in protein kinase quality control that protect nascent chains from degradation and promote posttranslational maturation. *J. Cell Biol.* *176*, 319-328.
- Mao,H.L., Zhu,Z.Q., and Chen,C.D. (2009). The androgen receptor in hormone-refractory prostate cancer. *Asian J. Androl* *11*, 69-73.

- Matsumoto,T., Takeyama,K., Sato,T., and Kato,S. (2005). Study of androgen receptor functions by genetic models. *J. Biochem.* 138, 105-110.
- Matunis,M.J., Wu,J., and Blobel,G. (1998). SUMO-1 modification and its role in targeting the Ran GTPase-activating protein, RanGAP1, to the nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* 140, 499-509.
- McClellan,A.J., Xia,Y., Deutschbauer,A.M., Davis,R.W., Gerstein,M., and Frydman,J. (2007). Diverse cellular functions of the Hsp90 molecular chaperone uncovered using systems approaches. *Cell* 131, 121-135.
- McCracken,S.R., Ramsay,A., Heer,R., Mathers,M.E., Jenkins,B.L., Edwards,J., Robson,C.N., Marquez,R., Cohen,P., and Leung,H.Y. (2008). Aberrant expression of extracellular signal-regulated kinase 5 in human prostate cancer. *Oncogene* 27, 2978-2988.
- McDonough,H. and Patterson,C. (2003). CHIP: a link between the chaperone and proteasome systems. *Cell Stress. Chaperones.* 8, 303-308.
- McEwan,I.J. (2004). Molecular mechanisms of androgen receptor-mediated gene regulation: structure-function analysis of the AF-1 domain. *Endocr. Relat Cancer* 11, 281-293.
- Mehta,P.B., Jenkins,B.L., McCarthy,L., Thilak,L., Robson,C.N., Neal,D.E., and Leung,H.Y. (2003). MEK5 overexpression is associated with metastatic prostate cancer, and stimulates proliferation, MMP-9 expression and invasion. *Oncogene* 22, 1381-1389.
- Mertens,S., Craxton,M., and Goedert,M. (1996). SAP kinase-3, a new member of the family of mammalian stress-activated protein kinases. *FEBS Lett.* 383, 273-276.
- Millson,S.H., Truman,A.W., King,V., Prodromou,C., Pearl,L.H., and Piper,P.W. (2005). A two-hybrid screen of the yeast proteome for Hsp90 interactors uncovers a novel Hsp90 chaperone requirement in the activity of a stress-activated mitogen-activated protein kinase, Slt2p (Mpk1p). *Eukaryot. Cell* 4, 849-860.
- Mingot,J.M., Kostka,S., Kraft,R., Hartmann,E., and Gorlich,D. (2001). Importin 13: a novel mediator of nuclear import and export. *EMBO J.* 20, 3685-3694.
- Miranda,K.J., Loeser,R.F., and Yammani,R.R. (2010). Sumoylation and nuclear translocation of S100A4 regulate IL-1beta-mediated production of matrix metalloproteinase-13. *J. Biol. Chem.* 285, 31517-31524.
- Miyata,Y. and Nishida,E. (2005). CK2 binds, phosphorylates, and regulates its pivotal substrate Cdc37, an Hsp90-cochaperone. *Mol. Cell Biochem.* 274, 171-179.
- Miyata,Y. and Nishida,E. (2005). CK2 binds, phosphorylates, and regulates its pivotal substrate Cdc37, an Hsp90-cochaperone. *Mol. Cell Biochem.* 274, 171-179.
- Mody,N., Campbell,D.G., Morrice,N., Peggie,M., and Cohen,P. (2003). An analysis of the phosphorylation and activation of extracellular-signal-regulated protein kinase 5 (ERK5) by mitogen-activated protein kinase kinase 5 (MKK5) in vitro. *Biochem. J.* 372, 567-575.
- Mody,N., Leitch,J., Armstrong,C., Dixon,J., and Cohen,P. (2001). Effects of MAP kinase cascade inhibitors on the MKK5/ERK5 pathway. *FEBS Lett.* 502, 21-24.
- Mohler,M.L., Coss,C.C., Duke,C.B., III, Patil,S.A., Miller,D.D., and Dalton,J.T. (2012). Androgen receptor antagonists: a patent review (2008-2011). *Expert. Opin. Ther. Pat* 22, 541-565.
- Montero,J.C., Ocana,A., Abad,M., Ortiz-Ruiz,M.J., Pandiella,A., and Esparis-Ogando,A. (2009). Expression of Erk5 in early stage breast cancer and association with disease free survival identifies this kinase as a potential therapeutic target. *PLoS. One.* 4, e5565.
- Morimoto,H., Kondoh,K., Nishimoto,S., Terasawa,K., and Nishida,E. (2007). Activation of a C-terminal transcriptional activation domain of ERK5 by autophosphorylation. *J. Biol. Chem.* 282, 35449-35456.

Morishima,Y., Kanelakis,K.C., Murphy,P.J., Shewach,D.S., and Pratt,W.B. (2001). Evidence for iterative ratcheting of receptor-bound hsp70 between its ATP and ADP conformations during assembly of glucocorticoid receptor.hsp90 heterocomplexes. *Biochemistry* 40, 1109-1116.

Mossessova,E. and Lima,C.D. (2000). Ulp1-SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast. *Mol. Cell* 5, 865-876.

Mulloy,R., Salinas,S., Philips,A., and Hipskind,R.A. (2003). Activation of cyclin D1 expression by the ERK5 cascade. *Oncogene* 22, 5387-5398.

Nadeau,V., Bissonauth,V., and Charron,J. (2012). [Mek1 and Mek2 functions in the formation of the blood placental barrier]. *Med. Sci. (Paris)* 28, 409-415.

Nakamura,K. and Johnson,G.L. (2003). PB1 domains of MEKK2 and MEKK3 interact with the MEK5 PB1 domain for activation of the ERK5 pathway. *J. Biol. Chem.* 278, 36989-36992.

Neckers,L. and Workman,P. (2012). Hsp90 molecular chaperone inhibitors: are we there yet? *Clin. Cancer Res.* 18, 64-76.

Nekrasova,T., Shive,C., Gao,Y., Kawamura,K., Guardia,R., Landreth,G., and Forsthuber,T.G. (2005). ERK1-deficient mice show normal T cell effector function and are highly susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 175, 2374-2380.

Nelson,P.S. (2002). Identifying immunotherapeutic targets for prostate carcinoma through the analysis of gene expression profiles. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 975, 232-246.

Nishimoto,S. and Nishida,E. (2006). MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2. *EMBO Rep.* 7, 782-786.

Noguchi,S., Mori,T., Hoshino,Y., Maruo,K., Yamada,N., Kitade,Y., Naoe,T., and Akao,Y. (2011). MicroRNA-143 functions as a tumor suppressor in human bladder cancer T24 cells. *Cancer Lett.* 307, 211-220.

Nollen,E.A. and Morimoto,R.I. (2002). Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. *J. Cell Sci.* 115, 2809-2816.

Nomura,M., Nomura,N., and Yamashita,J. (2005). Geldanamycin-induced degradation of Chk1 is mediated by proteasome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335, 900-905.

Ohren,J.F., Chen,H., Pavlovsky,A., Whitehead,C., Zhang,E., Kuffa,P., Yan,C., McConnell,P., Spessard,C., Banotai,C., Mueller,W.T., Delaney,A., Omer,C., Sebolt-Leopold,J., Dudley,D.T., Leung,I.K., Flamme,C., Warmus,J., Kaufman,M., Barrett,S., Teclé,H., and Hasemann,C.A. (2004). Structures of human MAP kinase kinase 1 (MEK1) and MEK2 describe novel noncompetitive kinase inhibition. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 1192-1197.

Ory,S., Zhou,M., Conrads,T.P., Veenstra,T.D., and Morrison,D.K. (2003). Protein phosphatase 2A positively regulates Ras signaling by dephosphorylating KSR1 and Raf-1 on critical 14-3-3 binding sites. *Curr. Biol.* 13, 1356-1364.

Pages,G., Guerin,S., Grall,D., Bonino,F., Smith,A., Anjuere,F., Auberger,P., and Pouyssegur,J. (1999). Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science* 286, 1374-1377.

Pargellis,C., Tong,L., Churchill,L., Cirillo,P.F., Gilmore,T., Graham,A.G., Grob,P.M., Hickey,E.R., Moss,N., Pav,S., and Regan,J. (2002). Inhibition of p38 MAP kinase by utilizing a novel allosteric binding site. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 268-272.

Pearl,L.H. (2005). Hsp90 and Cdc37 -- a chaperone cancer conspiracy. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **15**, 55-61.

Pearl,L.H. and Prodromou,C. (2006). Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 271-294.

Perez-Madrigal,D., Finegan,K.G., Paramo,B., and Tournier,C. (2012). The extracellular-regulated protein kinase 5 (ERK5) promotes cell proliferation through the down-regulation of inhibitors of cyclin dependent protein kinases (CDKs). *Cell Signal.* **24**, 2360-2368.

Pichler,A., Gast,A., Seeler,J.S., Dejean,A., and Melchior,F. (2002). The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell* **108**, 109-120.

Pichler,A. and Melchior,F. (2002). Ubiquitin-related modifier SUMO1 and nucleocytoplasmic transport. *Traffic.* **3**, 381-387.

Piper,P.W., Truman,A.W., Millson,S.H., and Nuttall,J. (2006). Hsp90 chaperone control over transcriptional regulation by the yeast Slt2(Mpk1)p and human ERK5 mitogen-activated protein kinases (MAPKs). *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 783-785.

Plotnikov,A., Zehorai,E., Procaccia,S., and Seger,R. (2011). The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochim. Biophys. Acta* **1813**, 1619-1633.

Pratt,W.B. and Toft,D.O. (1997). Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.* **18**, 306-360.

Prescott,J. and Coetzee,G.A. (2006). Molecular chaperones throughout the life cycle of the androgen receptor. *Cancer Lett.* **231**, 12-19.

Prince,T. and Matts,R.L. (2004). Definition of protein kinase sequence motifs that trigger high affinity binding of Hsp90 and Cdc37. *J. Biol. Chem.* **279**, 39975-39981.

Prince,T., Sun,L., and Matts,R.L. (2005). Cdk2: a genuine protein kinase client of Hsp90 and Cdc37. *Biochemistry* **44**, 15287-15295.

Prodromou,C., Piper,P.W., and Pearl,L.H. (1996). Expression and crystallization of the yeast Hsp82 chaperone, and preliminary X-ray diffraction studies of the amino-terminal domain. *Proteins* **25**, 517-522.

Prodromou,C., Roe,S.M., O'Brien,R., Ladbury,J.E., Piper,P.W., and Pearl,L.H. (1997). Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell* **90**, 65-75.

Ramos,J.W. (2008). The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 2707-2719.

Ramos-Nino,M.E., Timblin,C.R., and Mossman,B.T. (2002). Mesothelial cell transformation requires increased AP-1 binding activity and ERK-dependent Fra-1 expression. *Cancer Res.* **62**, 6065-6069.

Ramsay,A.K., McCracken,S.R., Soofi,M., Fleming,J., Yu,A.X., Ahmad,I., Morland,R., Machesky,L., Nixon,C., Edwards,D.R., Nuttall,R.K., Seywright,M., Marquez,R., Keller,E., and Leung,H.Y. (2011). ERK5 signalling in prostate cancer promotes an invasive phenotype. *Br. J. Cancer* *104*, 664-672.

Ranganathan,A., Pearson,G.W., Chrestensen,C.A., Sturgill,T.W., and Cobb,M.H. (2006). The MAP kinase ERK5 binds to and phosphorylates p90 RSK. *Arch. Biochem. Biophys.* *449*, 8-16.

Raviv,Z., Kalie,E., and Seger,R. (2004). MEK5 and ERK5 are localized in the nuclei of resting as well as stimulated cells, while MEKK2 translocates from the cytosol to the nucleus upon stimulation. *J. Cell Sci.* *117*, 1773-1784.

Ray,L.B. and Sturgill,T.W. (1988). Insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase is phosphorylated on tyrosine and threonine in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *85*, 3753-3757.

Razmara,M., Eger,G., Rorsman,C., Heldin,C.H., and Lennartsson,J. (2012). MKP3 negatively modulates PDGF-induced Akt and Erk5 phosphorylation as well as chemotaxis. *Cell Signal.* *24*, 635-640.

Reed,S.I. (1980). The selection of *S. cerevisiae* mutants defective in the start event of cell division. *Genetics* *95*, 561-577.

Regan,C.P., Li,W., Boucher,D.M., Spatz,S., Su,M.S., and Kuida,K. (2002). Erk5 null mice display multiple extraembryonic vascular and embryonic cardiovascular defects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *99*, 9248-9253.

Roberts,O.L., Holmes,K., Muller,J., Cross,D.A., and Cross,M.J. (2010). ERK5 is required for VEGF-mediated survival and tubular morphogenesis of primary human microvascular endothelial cells. *J. Cell Sci.* *123*, 3189-3200.

Roberts,P.J. and Der,C.J. (2007). Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* *26*, 3291-3310.

Robzyk,K., Oen,H., Buchanan,G., Butler,L.M., Tilley,W.D., Mandal,A.K., Rosen,N., and Caplan,A.J. (2007). Uncoupling of hormone-dependence from chaperone-dependence in the L701H mutation of the androgen receptor. *Mol. Cell Endocrinol.* *268*, 67-74.

Roe,S.M., Ali,M.M., Meyer,P., Vaughan,C.K., Panaretou,B., Piper,P.W., Prodromou,C., and Pearl,L.H. (2004). The Mechanism of Hsp90 regulation by the protein kinase-specific cochaperone p50(cdc37). *Cell* *116*, 87-98.

Roskoski,R., Jr. (2012). ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol. Res.* *66*, 105-143.

Rossomando,A.J., Payne,D.M., Weber,M.J., and Sturgill,T.W. (1989). Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *86*, 6940-6943.

Rubinfeld,H., Hanoch,T., and Seger,R. (1999). Identification of a cytoplasmic-retention sequence in ERK2. *J. Biol. Chem.* *274*, 30349-30352

Saba-Ei-Leil,M.K., Vella,F.D., Vernay,B., Voisin,L., Chen,L., Labrecque,N., Ang,S.L., and Meloche,S. (2003). An essential function of the mitogen-activated protein kinase Erk2 in mouse trophoblast development. *EMBO Rep.* *4*, 964-968.

Saccani,S., Pantano,S., and Natoli,G. (2002). p38-Dependent marking of inflammatory genes for increased NF-kappa B recruitment. *Nat. Immunol.* *3*, 69-75.

Saitoh,H. and Hinchey,J. (2000). Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J. Biol. Chem.* *275*, 6252-6258.

- Saporita,A.J., Zhang,Q., Navai,N., Dincer,Z., Hahn,J., Cai,X., and Wang,Z. (2003). Identification and characterization of a ligand-regulated nuclear export signal in androgen receptor. *J. Biol. Chem.* 278, 41998-42005.
- Sato,S., Fujita,N., and Tsuruo,T. (2000). Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 10832-10837.
- Sawhney,R.S., Liu,W., and Brattain,M.G. (2009). A novel role of ERK5 in integrin-mediated cell adhesion and motility in cancer cells via Fak signaling. *J. Cell Physiol* 219, 152-161.
- Schaufele,F., Carbonell,X., Guerbadot,M., Borngraeber,S., Chapman,M.S., Ma,A.A., Miner,J.N., and Diamond,M.I. (2005). The structural basis of androgen receptor activation: intramolecular and intermolecular amino-carboxy interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 9802-9807.
- Scher,H.I., Beer,T.M., Higano,C.S., Anand,A., Taplin,M.E., Efstathiou,E., Rathkopf,D., Shelkey,J., Yu,E.Y., Alumkal,J., Hung,D., Hirmand,M., Seely,L., Morris,M.J., Danila,D.C., Humm,J., Larson,S., Fleisher,M., and Sawyers,C.L. (2010). Antitumour activity of MDV3100 in castration-resistant prostate cancer: a phase 1-2 study. *Lancet* 375, 1437-1446.
- Schramm,M., Ying,O., Kim,T.Y., and Martin,G.S. (2008). ERK5 promotes Src-induced podosome formation by limiting Rho activation. *J. Cell Biol.* 181, 1195-1210.
- Schwarze,S.R., Fu,V.X., and Jarrard,D.F. (2003). Cdc37 enhances proliferation and is necessary for normal human prostate epithelial cell survival. *Cancer Res.* 63, 4614-4619.
- Sears,R.C. (2004). The life cycle of C-myc: from synthesis to degradation. *Cell Cycle* 3, 1133-1137.
- Sehat,B., Tofigh,A., Lin,Y., Trocme,E., Liljedahl,U., Lagergren,J., and Larsson,O. (2010). SUMOylation mediates the nuclear translocation and signaling of the IGF-1 receptor. *Sci. Signal.* 3, ra10.
- Seruga,B. and Tannock,I.F. (2008). Intermittent androgen blockade should be regarded as standard therapy in prostate cancer. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 5, 574-576.
- Seyfried,J., Wang,X., Kharebava,G., and Tournier,C. (2005). A novel mitogen-activated protein kinase docking site in the N terminus of MEK5alpha organizes the components of the extracellular signal-regulated kinase 5 signaling pathway. *Mol. Cell Biol.* 25, 9820-9828.
- Shang,L. and Tomasi,T.B. (2006). The heat shock protein 90-CDC37 chaperone complex is required for signaling by types I and II interferons. *J. Biol. Chem.* 281, 1876-1884.
- Shao,J., Grammatikakis,N., Scroggins,B.T., Uma,S., Huang,W., Chen,J.J., Hartson,S.D., and Matts,R.L. (2001). Hsp90 regulates p50(cdc37) function during the biogenesis of the active conformation of the heme-regulated eIF2 alpha kinase. *J. Biol. Chem.* 276, 206-214.
- Sherr,C.J. and Roberts,J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13, 1501-1512.
- Shishido,T., Woo,C.H., Ding,B., McClain,C., Molina,C.A., Yan,C., Yang,J., and Abe,J. (2008). Effects of MEK5/ERK5 association on small ubiquitin-related modification of ERK5: implications for diabetic ventricular dysfunction after myocardial infarction. *Circ. Res.* 102, 1416-1425.
- Shukla,A., Hillegass,J.M., MacPherson,M.B., Beuschel,S.L., Vacek,P.M., Pass,H.I., Carbone,M., Testa,J.R., and Mossman,B.T. (2010). Blocking of ERK1 and ERK2 sensitizes human mesothelioma cells to doxorubicin. *Mol. Cancer* 9, 314.
- Shukla,A., Miller,J.M., Cason,C., Sayan,M., MacPherson,M.B., Beuschel,S.L., Hillegass,J., Vacek,P.M., Pass,H.I., and Mossman,B.T. (2013). Extracellular signal-regulated kinase 5: a potential therapeutic target for malignant mesotheliomas. *Clin. Cancer Res.* 19, 2071-2083.

Silverstein,A.M., Grammatikakis,N., Cochran,B.H., Chinkers,M., and Pratt,W.B. (1998). p50(cdc37) binds directly to the catalytic domain of Raf as well as to a site on hsp90 that is topologically adjacent to the tetratricopeptide repeat binding site. *J. Biol. Chem.* 273, 20090-20095.

Smith,J.R., Clarke,P.A., de,B.E., and Workman,P. (2009). Silencing the cochaperone CDC37 destabilizes kinase clients and sensitizes cancer cells to HSP90 inhibitors. *Oncogene* 28, 157-169.

Smith,J.R. and Workman,P. (2009). Targeting CDC37: an alternative, kinase-directed strategy for disruption of oncogenic chaperoning. *Cell Cycle* 8, 362-372.

Sohn,S.J., Sarvis,B.K., Cado,D., and Winoto,A. (2002). ERK5 MAPK regulates embryonic angiogenesis and acts as a hypoxia-sensitive repressor of vascular endothelial growth factor expression. *J. Biol. Chem.* 277, 43344-43351.

Solit,D.B., Zheng,F.F., Drobnjak,M., Munster,P.N., Higgins,B., Verbel,D., Heller,G., Tong,W., Cordon-Cardo,C., Agus,D.B., Scher,H.I., and Rosen,N. (2002). 17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin induces the degradation of androgen receptor and HER-2/neu and inhibits the growth of prostate cancer xenografts. *Clin. Cancer Res.* 8, 986-993.

Song,H., Jin,X., and Lin,J. (2004). Stat3 upregulates MEK5 expression in human breast cancer cells. *Oncogene* 23, 8301-8309.

Sorokin,A.V., Kim,E.R., and Ovchinnikov,L.P. (2007). Nucleocytoplasmic transport of proteins. *Biochemistry (Mosc.)* 72, 1439-1457.

Spiering,D., Schmolke,M., Ohnesorge,N., Schmidt,M., Goebeler,M., Wegener,J., Wixler,V., and Ludwig,S. (2009). MEK5/ERK5 signaling modulates endothelial cell migration and focal contact turnover. *J. Biol. Chem.* 284, 24972-24980.

Stepanova,L., Leng,X., Parker,S.B., and Harper,J.W. (1996). Mammalian p50Cdc37 is a protein kinase-targeting subunit of Hsp90 that binds and stabilizes Cdk4. *Genes Dev.* 10, 1491-1502.

Stepanova,L., Yang,G., DeMayo,F., Wheeler,T.M., Finegold,M., Thompson,T.C., and Harper,J.W. (2000). Induction of human Cdc37 in prostate cancer correlates with the ability of targeted Cdc37 expression to promote prostatic hyperplasia. *Oncogene* 19, 2186-2193.

Sternsdorf,T., Jensen,K., Reich,B., and Will,H. (1999). The nuclear dot protein sp100, characterization of domains necessary for dimerization, subcellular localization, and modification by small ubiquitin-like modifiers. *J. Biol. Chem.* 274, 12555-12566.

Sticht,C., Freier,K., Knopfle,K., Flechtenmacher,C., Pungs,S., Hofele,C., Hahn,M., Joos,S., and Lichter,P. (2008). Activation of MAP kinase signaling through ERK5 but not ERK1 expression is associated with lymph node metastases in oral squamous cell carcinoma (OSCC). *Neoplasia*. 10, 462-470.

Taipale,M., Krykbaeva,I., Koeva,M., Kayatekin,C., Westover,K.D., Karras,G.I., and Lindquist,S. (2012). Quantitative analysis of HSP90-client interactions reveals principles of substrate recognition. *Cell* 150, 987-1001.

Tatake,R.J., O'Neill,M.M., Kennedy,C.A., Wayne,A.L., Jakes,S., Wu,D., Kugler,S.Z., Jr., Kashem,M.A., Kaplita,P., and Snow,R.J. (2008). Identification of pharmacological inhibitors of the MEK5/ERK5 pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377, 120-125.

Tatebe,H. and Shiozaki,K. (2003). Identification of Cdc37 as a novel regulator of the stress-responsive mitogen-activated protein kinase. *Mol. Cell Biol.* 23, 5132-5142.

- Tatham, M.H., Rodriguez, M.S., Xirodimas, D.P., and Hay, R.T. (2009). Detection of protein SUMOylation in vivo. *Nat. Protoc.* 4, 1363-1371.
- Terasawa, K. and Minami, Y. (2005). A client-binding site of Cdc37. *FEBS J.* 272, 4684-4690.
- Terasawa, K., Okazaki, K., and Nishida, E. (2003). Regulation of c-Fos and Fra-1 by the MEK5-ERK5 pathway. *Genes Cells* 8, 263-273.
- Terasawa, K., Yoshimatsu, K., Iemura, S., Natsume, T., Tanaka, K., and Minami, Y. (2006). Cdc37 interacts with the glycine-rich loop of Hsp90 client kinases. *Mol. Cell Biol.* 26, 3378-3389.
- Terui, Y., Saad, N., Jia, S., McKeon, F., and Yuan, J. (2004). Dual role of sumoylation in the nuclear localization and transcriptional activation of NFAT1. *J. Biol. Chem.* 279, 28257-28265.
- Tolwinski, N.S., Shapiro, P.S., Goueli, S., and Ahn, N.G. (1999). Nuclear localization of mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MKK1) is promoted by serum stimulation and G2-M progression. Requirement for phosphorylation at the activation lip and signaling downstream of MKK. *J. Biol. Chem.* 274, 6168-6174.
- Tran, C., Ouk, S., Clegg, N.J., Chen, Y., Watson, P.A., Arora, V., Wongvipat, J., Smith-Jones, P.M., Yoo, D., Kwon, A., Wasielewska, T., Welsbie, D., Chen, C.D., Higano, C.S., Beer, T.M., Hung, D.T., Scher, H.I., Jung, M.E., and Sawyers, C.L. (2009). Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer. *Science* 324, 787-790.
- Tran, E.J. and Wente, S.R. (2006). Dynamic nuclear pore complexes: life on the edge. *Cell* 125, 1041-1053.
- Trapman, J., Klaassen, P., Kuiper, G.G., van der Korput, J.A., Faber, P.W., van Rooij, H.C., Geurts van, K.A., Voorhorst, M.M., Mulder, E., and Brinkmann, A.O. (1988). Cloning, structure and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153, 241-248.
- Traverse, S., Gomez, N., Paterson, H., Marshall, C., and Cohen, P. (1992). Sustained activation of the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade may be required for differentiation of PC12 cells. Comparison of the effects of nerve growth factor and epidermal growth factor. *Biochem. J.* 288 (Pt 2), 351-355.
- Trepel, J., Mollapour, M., Giaccone, G., and Neckers, L. (2010). Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 10, 537-549.
- Truman, A.W., Millson, S.H., Nuttall, J.M., King, V., Mollapour, M., Prodromou, C., Pearl, L.H., and Piper, P.W. (2006). Expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, human ERK5 is a client of the Hsp90 chaperone that complements loss of the Slit2p (Mpk1p) cell integrity stress-activated protein kinase. *Eukaryot. Cell* 5, 1914-1924.
- Turjanski, A.G., Vaque, J.P., and Gutkind, J.S. (2007). MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene* 26, 3240-3253.
- Tyagi, R.K., Lavrovsky, Y., Ahn, S.C., Song, C.S., Chatterjee, B., and Roy, A.K. (2000). Dynamics of intracellular movement and nucleocytoplasmic recycling of the ligand-activated androgen receptor in living cells. *Mol. Endocrinol.* 14, 1162-1174.
- Vaughan, C.K., Gohlke, U., Sobott, F., Good, V.M., Ali, M.M., Prodromou, C., Robinson, C.V., Saibil, H.R., and Pearl, L.H. (2006). Structure of an Hsp90-Cdc37-Cdk4 complex. *Mol. Cell* 23, 697-707.
- Veldscholte, J., Berrevoets, C.A., Ris-Stalpers, C., Kuiper, G.G., Jenster, G., Trapman, J., Brinkmann, A.O., and Mulder, E. (1992). The androgen receptor in LNCaP cells contains a mutation in the ligand binding domain which affects steroid binding characteristics and response to antiandrogens. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 41, 665-669.

Visakorpi,T., Hyytinen,E., Koivisto,P., Tanner,M., Keinanen,R., Palmberg,C., Palotie,A., Tammela,T., Isola,J., and Kallioniemi,O.P. (1995). In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat. Genet.* 9, 401-406.

Wagner,E.F. and Nebreda,A.R. (2009). Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat. Rev. Cancer* 9, 537-549.

Wagstaff,K.M. and Jans,D.A. (2009). Importins and beyond: non-conventional nuclear transport mechanisms. *Traffic.* 10, 1188-1198.

Wandinger,S.K., Richter,K., and Buchner,J. (2008). The Hsp90 chaperone machinery. *J. Biol. Chem.* 283, 18473-18477.

Wang,X., Merritt,A.J., Seyfried,J., Guo,C., Papadakis,E.S., Finegan,K.G., Kayahara,M., Dixon,J., Boot-Handford,R.P., Cartwright,E.J., Mayer,U., and Tournier,C. (2005). Targeted deletion of mek5 causes early embryonic death and defects in the extracellular signal-regulated kinase 5/myocyte enhancer factor 2 cell survival pathway. *Mol. Cell Biol.* 25, 336-345.

Wang,X. and Tournier,C. (2006). Regulation of cellular functions by the ERK5 signalling pathway. *Cell Signal.* 18, 753-760.

Wang,Y., Su,B., and Xia,Z. (2006). Brain-derived neurotrophic factor activates ERK5 in cortical neurons via a Rap1-MEKK2 signaling cascade. *J. Biol. Chem.* 281, 35965-35974.

Watanabe,N., Nagamatsu,Y., Gengyo-Ando,K., Mitani,S., and Ohshima,Y. (2005). Control of body size by SMA-5, a homolog of MAP kinase BMK1/ERK5, in *C. elegans*. *Development* 132, 3175-3184.

Weldon,C.B., Scandurro,A.B., Rolfe,K.W., Clayton,J.L., Elliott,S., Butler,N.N., Melnik,L.I., Alam,J., McLachlan,J.A., Jaffe,B.M., Beckman,B.S., and Burow,M.E. (2002). Identification of mitogen-activated protein kinase kinase as a chemoresistant pathway in MCF-7 cells by using gene expression microarray. *Surgery* 132, 293-301.

Whitesell,L. and Lindquist,S.L. (2005). HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 5, 761-772.

Woo,C.H., Shishido,T., McClain,C., Lim,J.H., Li,J.D., Yang,J., Yan,C., and Abe,J. (2008). Extracellular signal-regulated kinase 5 SUMOylation antagonizes shear stress-induced antiinflammatory response and endothelial nitric oxide synthase expression in endothelial cells. *Circ. Res.* 102, 538-545.

Wood,C.D., Thornton,T.M., Sabio,G., Davis,R.A., and Rincon,M. (2009). Nuclear localization of p38 MAPK in response to DNA damage. *Int. J. Biol. Sci.* 5, 428-437.

Wu,F., Peacock,S.O., Rao,S., Lemmon,S.K., and Burnstein,K.L. (2013). Novel interaction between the co-chaperone Cdc37 and Rho GTPase exchange factor Vav3 promotes androgen receptor activity and prostate cancer growth. *J. Biol. Chem.* 288, 5463-5474.

Xu,W., Mimnaugh,E., Rosser,M.F., Nicchitta,C., Marcu,M., Yarden,Y., and Neckers,L. (2001). Sensitivity of mature ErbB2 to geldanamycin is conferred by its kinase domain and is mediated by the chaperone protein Hsp90. *J. Biol. Chem.* 276, 3702-3708.

Xu,W., Yuan,X., Xiang,Z., Mimnaugh,E., Marcu,M., and Neckers,L. (2005). Surface charge and hydrophobicity determine ErbB2 binding to the Hsp90 chaperone complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 120-126.

- Yan,C., Luo,H., Lee,J.D., Abe,J., and Berk,B.C. (2001). Molecular cloning of mouse ERK5/BMK1 splice variants and characterization of ERK5 functional domains. *J. Biol. Chem.* 276, 10870-10878.
- Yan,L., Carr,J., Ashby,P.R., Murry-Tait,V., Thompson,C., and Arthur,J.S. (2003). Knockout of ERK5 causes multiple defects in placental and embryonic development. *BMC. Dev. Biol.* 3, 11.
- Yang,H., Chen,D., Cui,Q.C., Yuan,X., and Dou,Q.P. (2006). Celastrol, a triterpene extracted from the Chinese "Thunder of God Vine," is a potent proteasome inhibitor and suppresses human prostate cancer growth in nude mice. *Cancer Res.* 66, 4758-4765.
- Yang,Q., Deng,X., Lu,B., Cameron,M., Fearn,C., Patricelli,M.P., Yates,J.R., III, Gray,N.S., and Lee,J.D. (2010). Pharmacological inhibition of BMK1 suppresses tumor growth through promyelocytic leukemia protein. *Cancer Cell* 18, 258-267.
- Yang,S.H. and Sharrocks,A.D. (2010). The SUMO E3 ligase activity of Pc2 is coordinated through a SUMO interaction motif. *Mol. Cell Biol.* 30, 2193-2205.
- Yao,Z., Flash,I., Raviv,Z., Yung,Y., Asscher,Y., Pleban,S., and Seger,R. (2001). Non-regulated and stimulated mechanisms cooperate in the nuclear accumulation of MEK1. *Oncogene* 20, 7588-7596.
- Yeh,S., Lin,H.K., Kang,H.Y., Thin,T.H., Lin,M.F., and Chang,C. (1999). From HER2/Neu signal cascade to androgen receptor and its coactivators: a novel pathway by induction of androgen target genes through MAP kinase in prostate cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 5458-5463.
- Yeh,S., Tsai,M.Y., Xu,Q., Mu,X.M., Lardy,H., Huang,K.E., Lin,H., Yeh,S.D., Altuwajiri,S., Zhou,X., Xing,L., Boyce,B.F., Hung,M.C., Zhang,S., Gan,L., and Chang,C. (2002). Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: an in vivo model for the study of androgen functions in selective tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 13498-13503.
- Yoon,S. and Seger,R. (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 24, 21-44.
- Z**ehorai,E., Yao,Z., Plotnikov,A., and Seger,R. (2010). The subcellular localization of MEK and ERK--a novel nuclear translocation signal (NTS) paves a way to the nucleus. *Mol. Cell Endocrinol.* 314, 213-220.
- Zen,K., Yasui,K., Nakajima,T., Zen,Y., Zen,K., Gen,Y., Mitsuyoshi,H., Minami,M., Mitsufuji,S., Tanaka,S., Itoh,Y., Nakanuma,Y., Taniwaki,M., Arai,S., Okanoue,T., and Yoshikawa,T. (2009). ERK5 is a target for gene amplification at 17p11 and promotes cell growth in hepatocellular carcinoma by regulating mitotic entry. *Genes Chromosomes. Cancer* 48, 109-120.
- Zhang,D., Xu,L., Cao,F., Wei,T., Yang,C., Uzan,G., and Peng,B. (2010). Celastrol regulates multiple nuclear transcription factors belonging to HSP90's clients in a dose- and cell type-dependent way. *Cell Stress. Chaperones.* 15, 939-946.
- Zhang,T., Li,Y., Yu,Y., Zou,P., Jiang,Y., and Sun,D. (2009). Characterization of celastrol to inhibit hsp90 and cdc37 interaction. *J. Biol. Chem.* 284, 35381-35389.
- Zhang,T., Hamza,A., Cao,X., Wang,B., Yu,S., Zhan,C.G., and Sun,D. (2008). A novel Hsp90 inhibitor to disrupt Hsp90/Cdc37 complex against pancreatic cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 7, 162-170.
- Zhao,Y.G., Gilmore,R., Leone,G., Coffey,M.C., Weber,B., and Lee,P.W. (2001). Hsp90 phosphorylation is linked to its chaperoning function. Assembly of the reovirus cell attachment protein. *J. Biol. Chem.* 276, 32822-32827.

Referencias

Zheng,Q., Yin,G., Yan,C., Cavet,M., and Berk,B.C. (2004). 14-3-3beta binds to big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1/ERK5) and regulates BMK1 function. *J. Biol. Chem.* 279, 8787-8791.

Zhou,G., Bao,Z.Q., and Dixon,J.E. (1995). Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* 270, 12665-12669.

Zuehlke,A. and Johnson,J.L. (2010). Hsp90 and co-chaperones twist the functions of diverse client proteins. *Biopolymers* 93, 211-217.

VIII.

Anexos

Canonical and Kinase Activity-Independent Mechanisms for Extracellular Signal-Regulated Kinase 5 (ERK5) Nuclear Translocation Require Dissociation of Hsp90 from the ERK5-Cdc37 Complex

Tatiana Erazo,^a Ana Moreno,^a Gerard Ruiz-Babot,^a Arantza Rodríguez-Asiain,^a Nicholas A. Morrice,^b Josep Espadamala,^a Jose R. Bayascas,^a Nestor Gómez,^a Jose M. Lizcano^a

Institut de Neurociències and Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain^a; Beatson Institute for Cancer Research, Glasgow, United Kingdom^b

The mitogen-activated protein (MAP) kinase extracellular signal-regulated kinase 5 (ERK5) plays a crucial role in cell proliferation, regulating gene transcription. ERK5 has a unique C-terminal tail which contains a transcriptional activation domain, and activates transcription by phosphorylating transcription factors and acting itself as a transcriptional coactivator. However, the molecular mechanisms that regulate its nucleocytoplasmic traffic are unknown. We have used tandem affinity purification to identify proteins that interact with ERK5. We show that ERK5 interacts with the Hsp90-Cdc37 chaperone in resting cells, and that inhibition of Hsp90 or Cdc37 results in ERK5 ubiquitylation and proteasomal degradation. Interestingly, activation of cellular ERK5 induces Hsp90 dissociation from the ERK5-Cdc37 complex, leading to ERK5 nuclear translocation and activation of transcription, by a mechanism which requires the autophosphorylation at its C-terminal tail. Consequently, active ERK5 is no longer sensitive to Hsp90 or Cdc37 inhibitors. Cdc37 overexpression also induces Hsp90 dissociation and the nuclear translocation of a kinase-inactive form of ERK5 which retains transcriptional activity. This is the first example showing that ERK5 transcriptional activity does not require kinase activity. Since Cdc37 cooperates with ERK5 to promote cell proliferation, Cdc37 overexpression (as happens in some cancers) might represent a new, noncanonical mechanism by which ERK5 regulates tumor proliferation.

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are a family of protein serine/threonine (Ser/Thr) kinases that transduce a wide range of extracellular stimuli into intracellular responses, and are activated in response to growth factors and different forms of stress. Phosphorylating a broad range of substrates, MAPKs regulate many cellular functions, including cell proliferation, differentiation, metabolism, and apoptosis (1, 2). In mammals, four subfamilies of conventional MAPKs have been characterized: extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2), c-Jun N-terminal kinases (JNK), p38, and ERK5 (3).

ERK5 is activated in response to a wide range of growth factors and oxidative and hyperosmotic stresses (4, 5). ERK5 phosphorylates several transcription factors, including the members of the myocyte enhancer factor family, MEF2A, -C, and -D (4–6), and is required for epidermal growth factor (EGF)-induced cell proliferation and progression through the cell cycle (7).

ERK5 and its upstream activator, mitogen-activated protein kinase kinase 5 (MEK5), were independently cloned by different groups (8, 9). MEK5 activates ERK5 by dual phosphorylation of the Thr-Glu-Tyr (TEY) motif within the activation loop, and three findings indicate that MEK5 is the only kinase that activates ERK5: (i) MEK5 and ERK5 specifically interact with each other but not with other MAPKs (9); (ii) targeted deletion of the ERK5 and MEK5 genes renders identical phenotypes, with mice dying around embryonic day 10.5, due to angiogenic failure and cardiovascular defects (10–13); and (iii) in MEK5^{-/-} MEF cells, EGF and stress fail to activate ERK5 but not other MAPKs (13).

ERK5 is twice the size of the other mammalian MAPKs (816 amino acids [aa] for human ERK5). ERK5 has a kinase domain located in the N-terminal half of the protein, homologous to the ERK2 kinase domain. In contrast with other MAPKs, ERK5 has a

unique C-terminal tail that contains a transcriptional activation domain (residues 664 to 789 of the human protein [14]). Thus, ERK5 is able to activate transcription not only by direct phosphorylation of transcription factors but by acting itself as a transcriptional coactivator, as, for example, in the case for the activator protein 1 (AP-1) transcription factor (15). However, the molecular mechanisms that regulate nuclear-cytoplasmic localization of ERK5 are unknown, and different cellular localizations, depending on the cell type studied, have been previously reported (16).

Members of the heat shock protein 90 (Hsp90) family are essential molecular chaperones expressed in the cytoplasm of mammalian cells, where they regulate the folding and the maturation of a wide array of proteins, comprising kinases, transcription factors, and steroid hormone receptors (17, 18). Hsp90 family members contain an ATP-binding site, required for the folding and release of the client proteins. Hsp90 inhibitors block the interaction with ATP, inducing the release of client proteins and its subsequent unfolding and degradation by the proteasome (19). Since many Hsp90 clients (such as Akt, Raf, ERBB2, and epidermal growth factor receptor [EGFR]) are proteins which are mutated or dereg-

Received 10 October 2012 Returned for modification 12 November 2012

Accepted 11 February 2013

Published ahead of print 19 February 2013

Address correspondence to Jose M. Lizcano, josemiguel.lizcano@uab.es, or Nestor Gómez, nestor.gomez@uab.cat.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/MCB.01246-12

ulated in cancer, Hsp90 inhibitors exhibit anticancer activity. Among them, geldanamycin derivatives such as 17-AGG are in clinical trials for the treatment of a wide variety of cancers (20).

The cochaperone cell division-cycle 37 (Cdc37) promotes the association of Hsp90 with a protein kinase subset of client proteins (21); therefore, some kinases require Hsp90 and Cdc37 chaperones for maintaining their stability. Via its N-terminal domain, Cdc37 first interacts with the catalytic domain of the kinase client, and then its C-terminal domain recruits Hsp90, generating a Cdc37-kinase-Hsp90 ternary complex (22). The superchaperone Hsp90-Cdc37 keeps the client protein kinases either active or in a conformation competent for activation (23). Interestingly, Cdc37 acts as an oncogene by stabilizing other oncogenes which are mutated or overexpressed in cancer cells, and inhibition of the Cdc37 function with compounds such as celastrol represents a new therapy for cancer treatment (24, 25). This compound, by inhibiting the Cdc37-Hsp90 interaction, destabilizes kinase clients and sensitizes tumors to Hsp90 inhibitors (26).

In this report, we provide for the first time biochemical and pharmacological data showing that ERK5 interacts with the superchaperone Hsp90-Cdc37. We also show that the Cdc37-ERK5-Hsp90 complex resides in the cytosol of resting cells and that ERK5 activation results in Hsp90 dissociation and nuclear translocation of the kinase. Unexpectedly, we found that overexpression of Cdc37, an event occurring in several types of cancers, induces nuclear translocation of a catalytically inactive but transcriptionally active form of ERK5.

MATERIALS AND METHODS

Materials. MG-132, MDL28170, and Z-VAD inhibitors were from Calbiochem. Radicol, celastrol, G418 antibiotic, *N*-ethylmaleimide, rabbit IgG-agarose, antihemagglutinin (anti-HA)-agarose, anti-FLAG-agarose, MBP, and EGF were from Sigma; geldanamycin was from Serva; polyethyleneimine was from Polysciences; and protein G-Sepharose, glutathione-Sepharose, calmodulin-Sepharose 4B, p81 phosphocellulose paper, and [γ - 32 P]ATP were from GE Healthcare. Ni $^{2+}$ -nitrilotriacetic acid (NTA)-agarose was from Qiagen. The ERK5 competitive inhibitor XMD2-98 was kindly provided by N. Gray (Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA).

Antibodies. The polyclonal antibody anti-ERK5 raised in sheep against human protein was from the Division of Signal Transduction Therapy (Dundee, Scotland), and anti-phospho-ERK5-pT 18 EY 220 was from Biosource. Anti-ERK5 rabbit polyclonal antibody, anti-ERK1/2, anti-glutathione *S*-transferase (anti-GST), anti-FLAG, anti-HA, and antiactin monoclonal antibodies were from Sigma; anti-Cdc37, antiubiquitin, and anti-ERK5 antibody (catalog. no. Sc-5626) were from Santa Cruz Biotechnology; anti-Hsp90 β was from Merck Biosciences; and mouse monoclonal antibromodeoxyuridine (anti-BrdU) was from BD Pharmingen. Antibodies to CREB, Akt, and phospho-S473-Akt were from Cell Signaling Technology, and anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (anti-GAPDH) monoclonal antibody was from Ambion. Anti-MEK5 and secondary Alexa Fluor 594-conjugated antibodies were from Invitrogen.

DNA constructs. Recombinant DNA procedures were performed using standard protocols. We used the pEBGFP-C2-TAP vector previously described (63) to generate the pEBGFP-C2-TAP-ERK5 wild type (pEBGFP-C2-TAP-ERK5wt) and the pEBGFP-C2-TAP-ERK5(1–490) used in this work. The vector encoding human C-terminal FLAG-tagged ERK5 was generated by inserting the human ERK5 full-length coding sequence into a pCMV-Tag4 vector, using the restriction sites BamHI and XhoI. Human ERK5 C terminus (aa 401 to 816) was cloned into the BamHI and NotI sites of pEBG-2T. pCDNA3 vector encoding FLAG-tagged Cdc37 was a gift of C. Scheidreith (Center for Molecular Medicine, Berlin, Germany) (64), pCDNA3.1 vector encoding HA-

tagged Hsp90 β was from A. Papapetropoulos (University of Athens, Greece) (65), pRBG4 encoding HA-ubiquitin was from S. D. Conzen (University of Chicago) (66), pCMV vector encoding 6 \times His-tagged ubiquitin was from A. C. Vertegaal (Leiden University, Netherlands) (67), and pEBG-2T vectors encoding GST-tagged human ERK5 (full length and N terminus) (aa 1 to 490) were a gift from P. Cohen (University of Dundee, United Kingdom) (28), whereas those encoding GST-tagged human ERK5 in which residues Ser567, Ser720, Ser731, Thr733, and Ser803 were mutated to Ala (ERK5-5A) or Glu (ERK5-5D) were from A. Cuenda (Centro Nacional Biotecnología, Spain) (36). pCMV plasmid encoding HA-tagged MEK5-DD was from E. Nishida (Kyoto University, Japan) (35). AP-1-luciferase vector was purchased from Stratagene and pRL-CMV-Renilla from Promega.

Cell culture, transfection, and lysis. Cells were cultured at 37°C under conditions of humidified air (5% CO $_2$). Human HEK293, HeLa, PC-3, and MEF MEK5 $^{-/-}$ cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics, and human neuroblastoma SH-SY5Y cells were cultured in DMEM F-12 Ham containing 15% FBS and antibiotics. HEK293, HeLa, and PC3 cells were transfected using polyethyleneimine as described before (68). MEF MEK5 $^{-/-}$ cells (kindly provided by Cathy Tournier) were transfected using Lipofectamine 2000 and Opti-MEM medium supplemented with 2 mM L-glutamine. Three hours after transfection, the medium was changed to DMEM. Unless otherwise stated, cells were lysed in ice-cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1% [wt/vol] NP-40, 1 mM sodium orthovanadate, 10 mM sodium- β -glycerophosphate, 50 mM sodium fluoride, 5 mM sodium pyrophosphate, 0.27 M sucrose, 0.1% [vol/vol] 2-mercaptoethanol, and complete protease inhibitor cocktail). Lysates were centrifuged at 12,000 \times g for 12 min at 4°C, and supernatants were stored at –20°C. Protein concentrations were determined by the Bradford method (69).

Cell proliferation assays. For cell counting, PC-3 cells were plated in 12-well plates at a density of 10 5 per well. After 24 h, the cells were cotransfected with plasmids encoding GFP and the indicated proteins (0.33 μ g of each plasmid, except for Cdc37, for which 1 μ g was used), and cells were counted at 12, 24, 48, 72, and 96 h posttransfection. Briefly, cells were subjected to trypsinization, washed with FBS, and centrifuged at 1,000 \times g for 5 min. The pellets were resuspended in phosphate-buffered saline (PBS), and GFP-positive cells were counted in a Beckman Coulter FC 500 flow cytometer. Results are presented as means \pm standard deviations (SD) of the results of triplicates of a representative experiment. For BrdU labeling, PC-3 cells plated in 6-well plates were transfected with the indicated plasmids as described above. At 24 h after transfection, cells were incubated with 3 μ g/ml BrdU for 16 h, harvested, and processed using an anti-BrdU primary antibody followed by an Alexa Fluor 488–donkey anti-mouse fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated secondary antibody, according to the protocol of the manufacturer (Becton, Dickinson). Total and BrdU-positive cells were counted in a Beckman Coulter FC 500 flow cytometer.

Cdc37 knockdown (siRNA). A heterogeneous mixture of small interfering RNAs (siRNAs) that target the same human Cdc37 mRNA sequence was purchased from Sigma (Mission siRNA; EHU104551). HeLa cells were transfected with 1 μ g (per well of a six-well plate) of Cdc37 siRNAs or control (scrambled) siRNA.

Subcellular fractionation. Three 10-cm-diameter dishes of cells were homogenized in 0.5 ml of buffer (10 mM HEPES [pH 7.9], 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl $_2$) in a Potter-Elvehjem homogenizer, left 30 min at 4°C, and centrifuged at 15,000 \times g for 15 min at 4°C. Supernatants (cytosolic fractions) were kept at –20°C, and pellets were resuspended with 100 μ l of radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (25 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 0.1% [wt/vol] SDS, 1% [wt/vol] NP-40, 0.5% [wt/vol] deoxycholic acid, 1 mM EGTA, 5 mM sodium pyrophosphate) and homogenized by passing them through a 1-ml syringe with a 25-gauge needle. After centrifugation for 10 min at 20,000 \times g, supernatants (nuclear fractions) were saved and kept at –20°C until use.

Immunofluorescence microscopy. HeLa and MEF cells grown on polylysine-coated coverslips were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min and mounted in medium with 4,6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for DNA staining. To monitor endogenous ERK5, fixed cells were processed as described before (68) using anti-ERK5 antibody (C terminus; Santa Cruz) and the corresponding fluorescence-labeled secondary antibody. Cells were visualized by fluorescence microscopy in a Nikon Eclipse 90i epifluorescence microscope.

Generation of stable cell lines, tandem affinity purification (TAP), and nanoscale liquid chromatographic tandem mass spectrometry (nLC-MS/MS) analysis. SH-SY5Y cells cultured in 10-cm-diameter dishes were transfected with 5 μ g pEGFP-C2-TAP construct encoding no protein (control), full-length human ERK5, or human ERK5 aa 1 to 490 (N terminus). Transfected cells were selected by adding G418 antibiotic (300 μ g/ml) 24 h posttransfection. At 20 days after transfection, individual colonies were visualized, selected, and expanded. Cell lines expressing low levels of GFP were analyzed by immunoblotting to ensure that expressed proteins migrated as a single polypeptide at the expected molecular weight.

For ERK5-TAP, we followed the method described by Al-Hakim et al. (63), which is a modification of the original method (27). For each TAP procedure, 140 dishes (150-mm diameter) were cultured for each stable cell line. Each dish was washed three times with phosphate-buffered saline (PBS) and lysed in 0.5 ml of ice-cold TAP buffer (10 mM Tris-HCl [pH 8], 150 mM NaCl, 0.1% NP-40, and complete protease inhibitor cocktail). Combined lysates were then centrifuged for 45 min at 40,000 \times g, and the supernatant was incubated with 0.5 ml of rabbit IgG-agarose beads for 90 min at 4°C. IgG-agarose beads were then washed twice with buffer B (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM NaCl, 0.1% NP-40, and 1 mM dithiothreitol [DTT]), followed by two washes with buffer B containing 0.5 mM EDTA, prior incubation for 4 h at 4°C with 100 μ g of tobacco etch virus (TEV) protease. TAP-ERK5 released protein was diluted with 3 vol of buffer C (50 mM Tris-HCl, [pH 8.0], 150 mM NaCl, 0.1% NP-40, 1 mM Mg²⁺-acetate, 1 mM imidazole, 2 mM CaCl₂, and 1 mM DTT) and further incubated with 0.25 ml of calmodulin-Sepharose beads (pre-equilibrated in buffer C) for 1 h at 4°C. Beads were then washed three times with buffer C and twice with buffer C lacking NP-40 detergent. Then, 0.5 ml of 0.0125 \times NuPAGE-LDS sample buffer (6.8 mM Tris, 0.1% [wt/vol] LDS [lithium dodecyl sulfate], 0.5% [vol/vol] glycerol containing 1 mM DTT [final pH, 8.5]) was added to the washed beads, subjected to a vortex procedure, incubated 15 min at room temperature, and filtered through Spin-X filters (Costar) (0.45 μ m pore size). Finally, filtrates containing the eluted proteins were concentrated to 5 μ l by the use of a Speed Vacuum, resuspended in 25 μ l of H₂O Milli-Q containing 10 mM DTT, heated 5 min at 70°C, and subjected to electrophoresis on a precast 4%-to-12% Bis-Tris LDS-polyacrylamide gel (Invitrogen). Resolved proteins were stained with colloidal Coomassie blue (Pierce). All visible bands were excised, washed, and digested with trypsin as previously described (70). Protein digests were identified by LC-MS/MS on a 4000 Q-Trap system (Applied Biosystems) as described previously (71). Database searching was performed using Mascot 2.1 (Matrixscience) run on a local server, using both the Swiss-Prot and Celera human databases.

Immunoprecipitation and immunoblotting. A 10- μ l volume of protein G-Sepharose beads bound to 2 μ g of the corresponding antibody was incubated with 0.5 mg of cell lysate for 2 h at 4°C. The immunoprecipitates were washed twice with lysis buffer containing 0.15 M NaCl and twice with buffer A (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 0.1 mM EGTA, 0.1% 2-mercaptoethanol), and the immune complexes were eluted in 2 \times sample buffer. GST-, HA-, and FLAG-tagged overexpressed proteins were immunoprecipitated as described above, using the appropriate resin. Immunoblotting was performed as described previously (72).

ERK5 ubiquitylation *in vivo* assay. We followed the method described by Tatham et al. (73). Dishes (10-cm diameter) of HEK293 cells overexpressing His-tagged ubiquitin and the indicated form of ERK5 were resuspended in 5 ml of buffer 1 (6 M guanidinium-HCl, 10 mM Tris, 100

mM Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ buffer, pH 8), sonicated for 1 min, and centrifuged at 5,000 \times g for 5 min. The resulting supernatants were incubated with 20 μ l of Ni²⁺-NTA-agarose beads for 2 h at room temperature with rotation. Beads were successively washed as follows: twice with 4 ml of buffer 1 plus 10 mM 2-mercaptoethanol; three times with 4 ml of buffer 2 (8 M urea, 10 mM Tris, 10 mM 2-mercaptoethanol, 100 mM Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ buffer, pH 8); twice with 4 ml of buffer 3 (8 M urea, 10 mM Tris, 100 mM Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ buffer, pH 6.3) containing 10 mM 2-mercaptoethanol; once with 1 ml of buffer 3 containing 0.2% Triton X-100; once with 1 ml of buffer 3 containing 0.1% Triton X-100 and 0.5 M NaCl; and three times with 1 ml of buffer 3. Finally, proteins were eluted by incubating the beads with 200 mM imidazole in 5% SDS, 0.15 M Tris-HCl, pH 6.7, 30% (vol/vol) glycerol, 0.72 M 2-mercaptoethanol for 1 h at 37°C with mixing.

ERK5 kinase activity assay. HeLa or HEK293 cell extract (0.5 mg) overexpressing GST-ERK5 and the indicated proteins was incubated for 1 h at 4°C with 10 μ l of glutathione-Sepharose beads. Beads were then washed twice with lysis buffer containing 0.15 M NaCl, followed by two washes with buffer A. A kinase activity assay was performed in an assay volume of 50 μ l containing glutathione-Sepharose beads, buffer A, 10 mM magnesium acetate, and 0.1 mM [γ -³²P]ATP (500 cpm/pmol), with 500 μ M PIMtide (ARKKRRHPSGPPTA) or 10 μ g MBP as the substrate. Assays were carried out for 45 min at 30°C and terminated by applying the reaction mixture onto p81 paper, and the incorporated radioactivity was measured as described previously (70). The amount of enzyme that catalyzes the phosphorylation of 1 pmol of PIMtide in 1 min was defined as 1 mU of activity.

Reporter luciferase assay. Cells cultured in 12-well plates were transfected with 650 ng of DNA, which contained 100 ng of AP-1-driven luciferase reporter construct and 50 ng *Renilla* luciferase, and 100 ng of the indicated amounts of plasmids (except for Cdc37, for which 300 ng was used). After 24 h, a luciferase activity assay was performed using a dual-luciferase kit.

Gel filtration analysis. Rat brain or human HeLa cells were lysed in lysis buffer and centrifuged at 25,000 \times g for 15 min to remove cellular debris and insoluble material. One milligram of each sample was loaded onto a Superdex-200HR-10/30 column on an ÄKTA system and equilibrated in buffer A containing 0.15 M NaCl at a flow rate of 0.3 ml/min, and 0.33-ml fractions were collected. Aliquots of each fraction were analyzed for ERK5 and MEK5 by immunoblotting. The column was calibrated using blue dextran (void volume) and gel filtration standards (Bio-Rad).

Statistical analysis. Figures, tables, and statistical analyses were generated using Microsoft Excel, Prism 4.0, or Adobe Photoshop software. Statistical significance was determined using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test.

RESULTS

Isolation of ERK5-associated proteins by TAP. We subjected lysates of rat brain and human SH-SY5Y cells to size exclusion chromatography and immunoblotted the eluted fractions for ERK5 and its upstream activator MEK5. As expected, endogenous rat and human MEK5 protein eluted with a molecular mass of ~50 kDa (Fig. 1A). However, ERK5 eluted in two ranges: one corresponding to the expected molecular mass of ~100 to 120 kDa, and another corresponding to a high molecular mass range, above 679 kDa (Fig. 1A). Quantification of the immunoblots revealed that ~70% (rat brain) and 40% (human SH-SY5Y) of endogenous ERK5 eluted as a high-molecular-mass complex. This chromatographic analysis demonstrates that a pool of endogenous ERK5 exists as a high-molecular-mass protein complex.

To identify the putative ERK5-interacting proteins, we used TAP (27). We generated human SH-SY5Y cells stably expressing green fluorescent protein (GFP)-TAP empty vector (control) or a

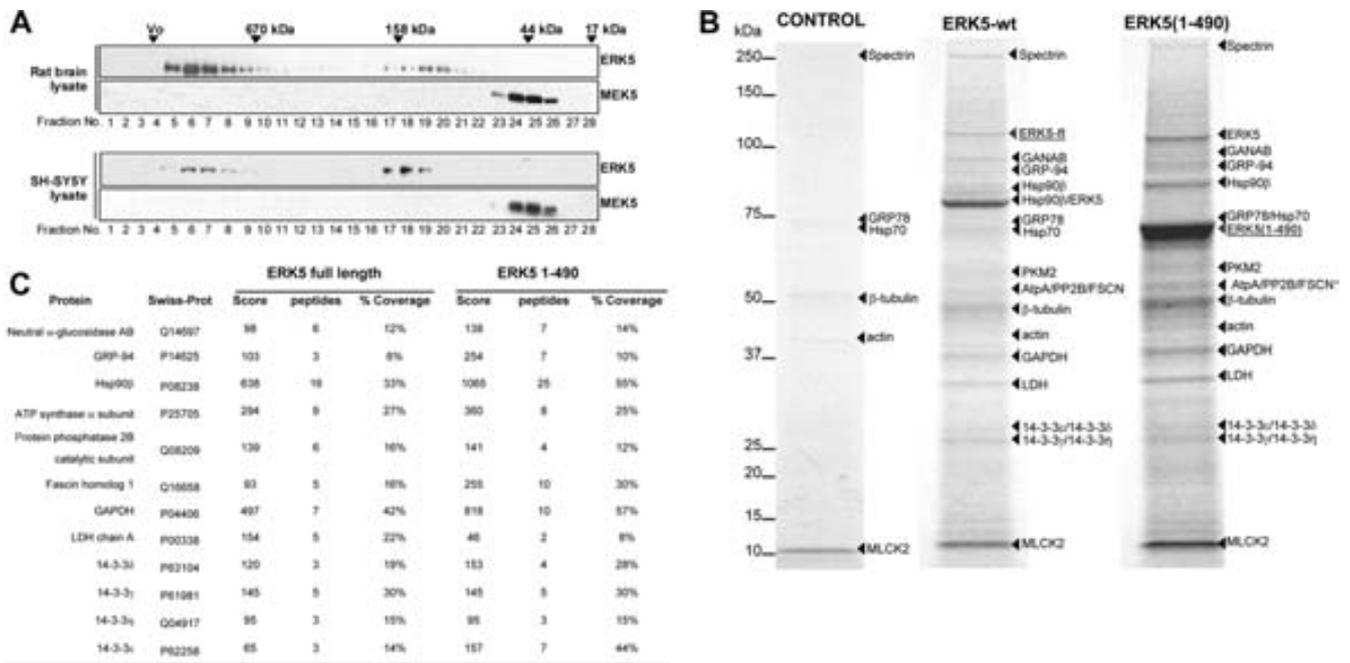


FIG 1 Gel filtration chromatography and tandem affinity purification for ERK5. (A) A 1-mg volume of rat brain or human SH-SY5Y cell lysates was loaded onto a Superdex 200HR 10/30 column. A 15- μ l volume of each fraction was immunoblotted for ERK5 or MEK5. The elution positions of protein standards are indicated as follows: thyroglobulin (670 kDa), gamma globulin (158 kDa), ovalbumin (44 kDa), and myoglobin (17 kDa). Vo, void volume. Similar results were obtained in three separate experiments. (B) Tandem affinity purification of ERK5. SH-SY5Y cells stably expressing empty TAP-GFP vector (control), TAP-GFP-ERK5 (full length), or TAP-GFP-ERK5(1–490) were subjected to TAP as described in Materials and Methods. Purified proteins were resolved in 4% to 12% LDS-PAGE gels and visualized by colloidal-Coomassie blue staining. Bands were cut, subjected to in-gel digestion with trypsin, and analyzed by nLC-MS/MS. The designations of the bait proteins used are underlined. (C) Details of mass spectrometry analysis. GANAB, neutral alpha-glycosidase antibody; GRP-94, glucose-regulated protein 94; GRP-78, glucose-regulated protein 78; AtpA, ATP synthase alpha; PP2B, protein phosphatase 2B catalytic subunit; FSCN1, fascin homolog 1; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; LDH, L-lactate dehydrogenase; MLCK2, skeletal myosin light-chain kinase 2. Scores refer to Mascot protein scores, and a value >70 was considered significant.

GFP-TAP-tagged fusion full-length human ERK5 and an N-terminal form (aa 1 to 490) that contains a functional kinase domain, which can be phosphorylated and activated by MEK5 (28). Clones overexpressing low levels of TAP-ERK5 were selected, expanded, and subjected to tandem affinity purification under mild conditions to preserve the integrity of ERK5 interactors. Purified proteins were resolved by LDS-PAGE (Fig. 1B), and bands were excised, subjected to tryptic digestion, and identified using tandem mass spectrometry. Twelve interacting proteins were identified for full-length and N-terminal ERK5s which were not detectable in the gel in the control purification, revealing the ERK5 N-terminal half as the region involved in the binding of those putative interactors. Six proteins also detected in the control sample were considered nonspecific contaminants.

Figure 1C summarizes the results obtained, which met the requirement of having three or more peptides matched to our data by the database-searching program. Importantly, four of those proteins correspond to different isoforms of the 14-3-3 protein, a known ERK5-interacting protein (29), thus validating the TAP approach for identification of physiological binding proteins. Of note, heat shock protein 90 β rendered the highest peptide score and sequenced peptides covered 33% (full-length ERK5) and 55% [ERK5(1–490)] of the Hsp90 β sequence. Therefore, we focused on Hsp90 β in the ensuing experiments.

Hsp90 β and Cdc37 interact with the N-terminal half of ERK5. The cochaperone Cdc37 promotes the association of Hsp90 with a protein kinase subset of client proteins; therefore,

many kinases require Hsp90 and Cdc37 chaperones for maintaining their stability. To check that Hsp90 β and Cdc37 interact with ERK5 *in vivo*, we performed immunoprecipitation assays of endogenous proteins from SH-SY5Y cells and immunoblotted for each protein. The three proteins were detected in the corresponding ERK5, Hsp90 β , and Cdc37 immunoprecipitates but not in control experiments lacking the antibody (Fig. 2A). We obtained identical results for human HeLa cells, mouse embryonic fibroblasts (MEF), and rat brain lysates (Fig. 2B), demonstrating that endogenous ERK5 is associated with Hsp90 and Cdc37 *in vivo*. We also observed the ERK5-Cdc37-Hsp90 trimeric complex in MEK5 $^{-/-}$ MEF-deficient cells (Fig. 2B), indicating that chaperones Hsp90 and Cdc37 do not require MEK5 to interact with ERK5.

To identify the region of ERK5 involved in the binding to Hsp90 and Cdc37, we transiently expressed these proteins in human HEK293 cells and performed immunoprecipitation assays. Overexpressed ERK5, Hsp90, and Cdc37 were detected in each of the pellets of the affinity-purified proteins (Fig. 2C). Thus, overexpressed ERK5, Hsp90, and Cdc37 proteins form a trimeric complex, as happens for the endogenous proteins. Next, we performed similar experiments in cells overexpressing ERK5 forms encoding either the N-terminal half (aa 1 to 490) or the C-terminal half (aa 401 to 816), in different combinations with Hsp90 β and Cdc37. ERK5 and Cdc37 were subjected to affinity purification and immunoblotting for the three proteins studied. Panels D and E of

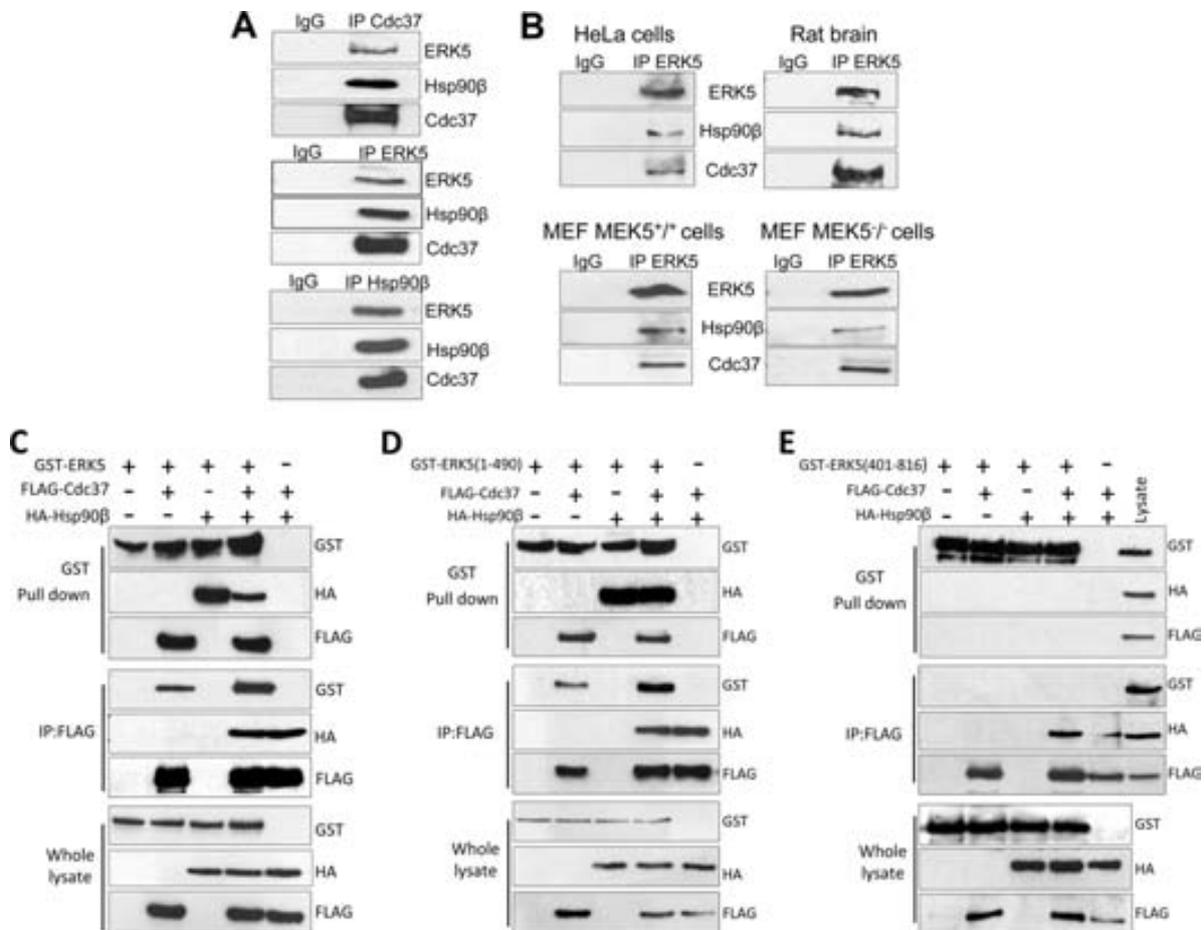


FIG 2 ERK5 associates with Hsp90 and cochaperone Cdc37 through its N-terminal half. (A) One milligram of SH-SY5Y lysates was immunoprecipitated (IP) with anti-Cdc37, anti-ERK5, or anti-Hsp90 β antibodies followed by immunoblotting of the immune complexes. (B) One-half milligram of the indicated cells and tissue lysates was immunoprecipitated with anti-ERK5 antibody and immunoblotted as described for panel A. (C to E) HEK293 cells were transfected with 1 μ g of each of the indicated expression plasmids, and overexpressed ERK5 and Cdc37 were purified using glutathione-Sepharose and anti-FLAG-agarose resins, respectively. Immune complexes were immunoblotted for ERK5, Hsp90, and Cdc37. Similar results were obtained in three independent experiments.

Fig. 2 show that Hsp90 and Cdc37 interact with the N-terminal half of ERK5 but not with the C-terminal half.

Hsp90 inhibition or Cdc37 silencing induces loss of ERK5 expression. The importance of Hsp90 for ERK5 stability was addressed by treating cells with two structurally unrelated Hsp90 inhibitors, geldanamycin and radicicol, which inhibit the chaperone function of Hsp90 by binding its ATP-binding pocket. Treatment of SH-SY5Y cells for 24 h with increasing amounts of either geldanamycin or radicicol resulted in a dose-dependent decrease in the expression of ERK5, which was completely abolished at 5 μ M concentrations (**Fig. 3A**), without affecting the expression of the non-Hsp90 client protein kinases ERK1 and ERK2. Identical results were obtained for HeLa cells (results not shown).

To confirm the role of Cdc37 in ERK5 stability, we undertook experiments to silence endogenous Cdc37. Transfection of a siRNA specific for Cdc37 resulted in complete knockdown of Cdc37 at day 5 posttransfection. Cdc37 depletion abolished the expression of ERK5 and Akt without affecting the levels of ERK1/2 (**Fig. 3B**). Control siRNA affected neither Cdc37 expression levels nor the levels of Akt and ERK5 proteins.

Hsp90 inhibition induces ERK5 ubiquitylation and proteasome-dependent degradation. Next we studied the effect of in-

hibitors of proteasome (MG-132), calpain (MDL-128), caspase (Z-VAD), and lysosomal function (ammonium chloride) in preventing the geldanamycin-induced degradation of ERK5. We analyzed the soluble and insoluble fractions of SH-SY5Y cells lysed in NP-40 buffer. In cells treated with geldanamycin, MG-132 prevented the loss of ERK5 expression, resulting in the accumulation in the NP-40 insoluble fraction (**Fig. 3C**). In contrast, caspase, calpain, and lysosome inhibitors had no effect on geldanamycin-induced loss of ERK5 expression. These findings are in agreement with those obtained for other Hsp90 client proteins, in which Hsp90 inhibition results in the ubiquitylation and proteasomal degradation of the client protein (17, 30–33).

To determine whether ERK5 is ubiquitylated prior to proteasomal degradation, we overexpressed ERK5 and His-tagged ubiquitin in cells that were treated with or without geldanamycin and MG-132. Levels of ubiquitylation were determined by pulling down His ubiquitin with Ni²⁺-NTA-agarose beads and immunoblotting for ERK5. ERK5 slow-migrating species (corresponding to ubiquitylated forms) were detected in the His-ubiquitin pull-downs from cells treated with MG-132 that were more apparent in those from cells treated with geldanamycin and MG-132 (**Fig. 3D**). To identify the region of ERK5 that had been ubiquity-

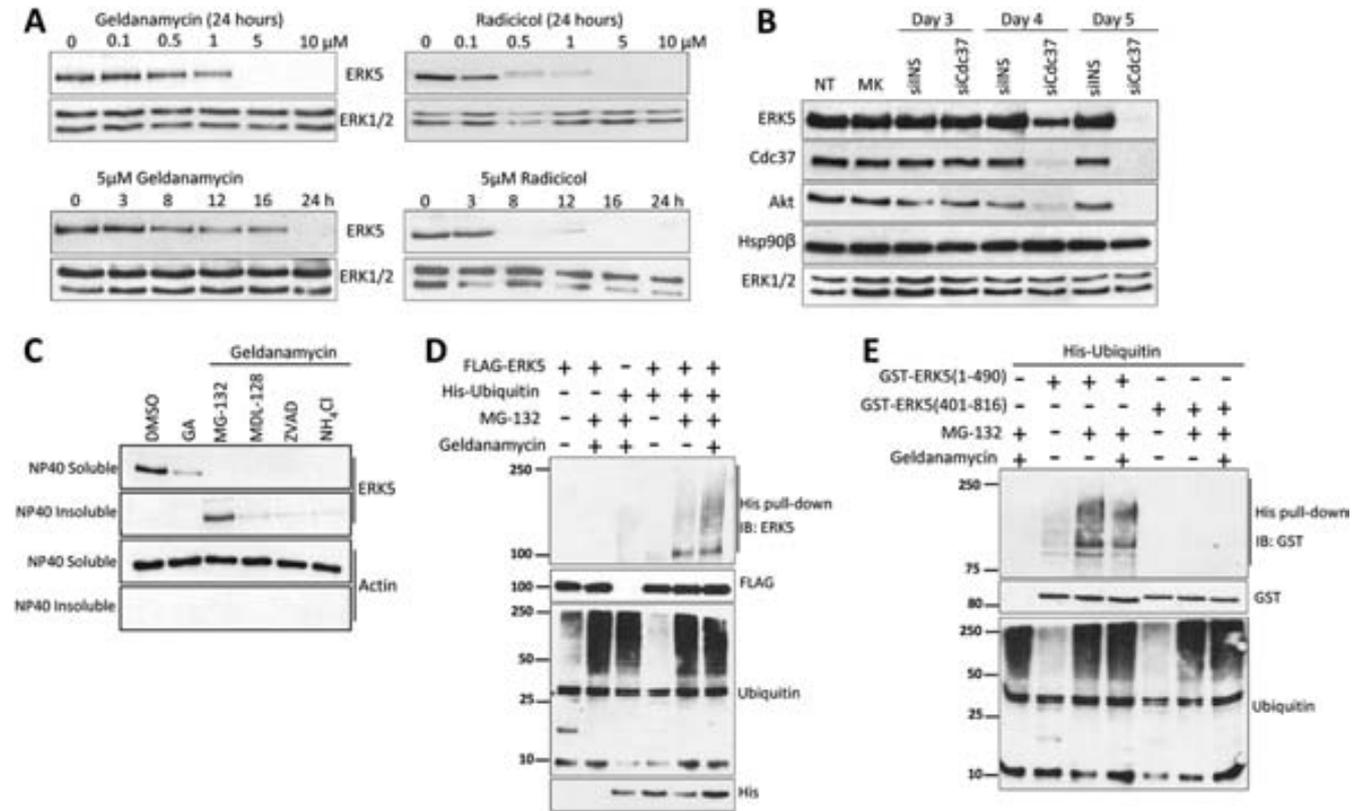


FIG 3 Hsp90 inhibition or Cdc37 silencing induces loss of ERK5 protein by promoting its ubiquitylation and proteasome-mediated degradation. (A) Hsp90 inhibition induces loss of ERK5 expression. SH-SY5Y cells were treated with the indicated concentrations of geldanamycin or radicicol for 24 h (upper panels) or with a 5 μ M concentration for the indicated times (lower panels). After the cells were subjected to lysis in buffer containing 1% SDS, protein levels were determined by immunoblotting. (B) Cdc37 silencing induces loss of ERK5 expression. HeLa cells transfected with 1 μ g of Cdc37 siRNA or nonspecific siRNA (siINS) were lysed at the times indicated in buffer containing 1% SDS. Lysates were immunoblotted with the indicated antibodies. NT, no transfection; MK, mock transfection. (C) Treatment with the proteasome inhibitor and geldanamycin (GA) results in ERK5 accumulation in insoluble cellular fractions. SH-SY5Y cells were pretreated for 3 h with 20 μ M proteasome inhibitor MG-132, 10 μ M calpain inhibitor MDL-28170, 10 μ M caspase inhibitor Z-VAD, or 20 mM ammonium chloride (inhibitor of lysosomal degradation), followed by 24 h of treatment with 5 μ M geldanamycin. Cells were lysed in Nonidet P-40 buffer and centrifuged, and the NP-40 insoluble fraction (pellet) was solubilized in 1% SDS buffer. ERK5 and actin levels were analyzed by immunoblotting. (D and E) Treatment with geldanamycin induces ERK5 ubiquitylation. HEK293 cells overexpressing the indicated proteins were treated with MG-132 alone or with geldanamycin, and His-tagged ubiquitins were purified using Ni²⁺-NTA-agarose beads and immunoblotted (IB) for ERK5. ERK5 and total ubiquitin expression levels are shown in the middle and bottom panels, respectively. Levels of overexpressed free His-tagged ubiquitin are also shown in panel D. Similar results were obtained in three separate experiments.

lated, we set out to perform similar experiments overexpressing the N-terminal or the C-terminal half of ERK5. The N-terminal half, but not the C-terminal tail, became ubiquitylated after treatment of cells with MG-132 at the same level as that used for cells treated with geldanamycin and MG-132 (Fig. 3E). Interestingly, untreated cells also rendered faint bands of slow-migrating (ubiquitylated) species for the N-terminal-half form. These results show for the first time that Hsp90 inhibition results in the ubiquitylation of ERK5 at its N-terminal half, prior to degradation at the proteasome.

Activation of ERK5 causes Hsp90 dissociation from the Cdc37-ERK5 complex, by a mechanism that requires autophosphorylation of the ERK5 C-terminal tail. Since inactive ERK5 associates with Hsp90 and Cdc37 in resting cells, we next asked if this was also the case for active ERK5. Treatment of HeLa cells with EGF activated ERK5, as measured by both electrophoretic mobility shift and phosphorylation of the T-loop (Fig. 4A, left panels). Unexpectedly, immunoprecipitation assays showed that activation of endogenous ERK5 by EGF resulted in Hsp90 β dissociation from the ERK5-Cdc37 complex. To our knowledge, this

is the first report showing that activation of a MAPK induces Hsp90 dissociation. As a control for a canonical Hsp90 protein kinase client, the right panels of Fig. 4A show that activation of Akt in response to EGF (measured by monitoring Ser473 phosphorylation [34]) did not induce Hsp90 dissociation.

To check if kinase activity was necessary for Hsp90 dissociation, we overexpressed in cells Hsp90, Cdc37, and ERK5 or a ERK5 mutant which lacks kinase activity (D200A) (28), alone or together with a constitutive active human MEK5 mutant (MEK5DD, in which residues S311 and S315 are replaced by Asp). ERK5 was affinity purified, and associated proteins were visualized by immunoblotting. MEK5DD induced T-loop phosphorylation of the overexpressed-ERK5 wild type and the kinase-inactive mutant, but only the wild-type form showed an electrophoretic mobility shift (Fig. 4B). More importantly, activation of ERK5 resulted in Hsp90 dissociation, whereas the phosphorylated dead kinase still interacted with Hsp90. This suggests the requirement of the ERK5 kinase activity for Hsp90 dissociation. To further study this, we set out to perform similar experiments using the ERK5 N-terminal half, shown to

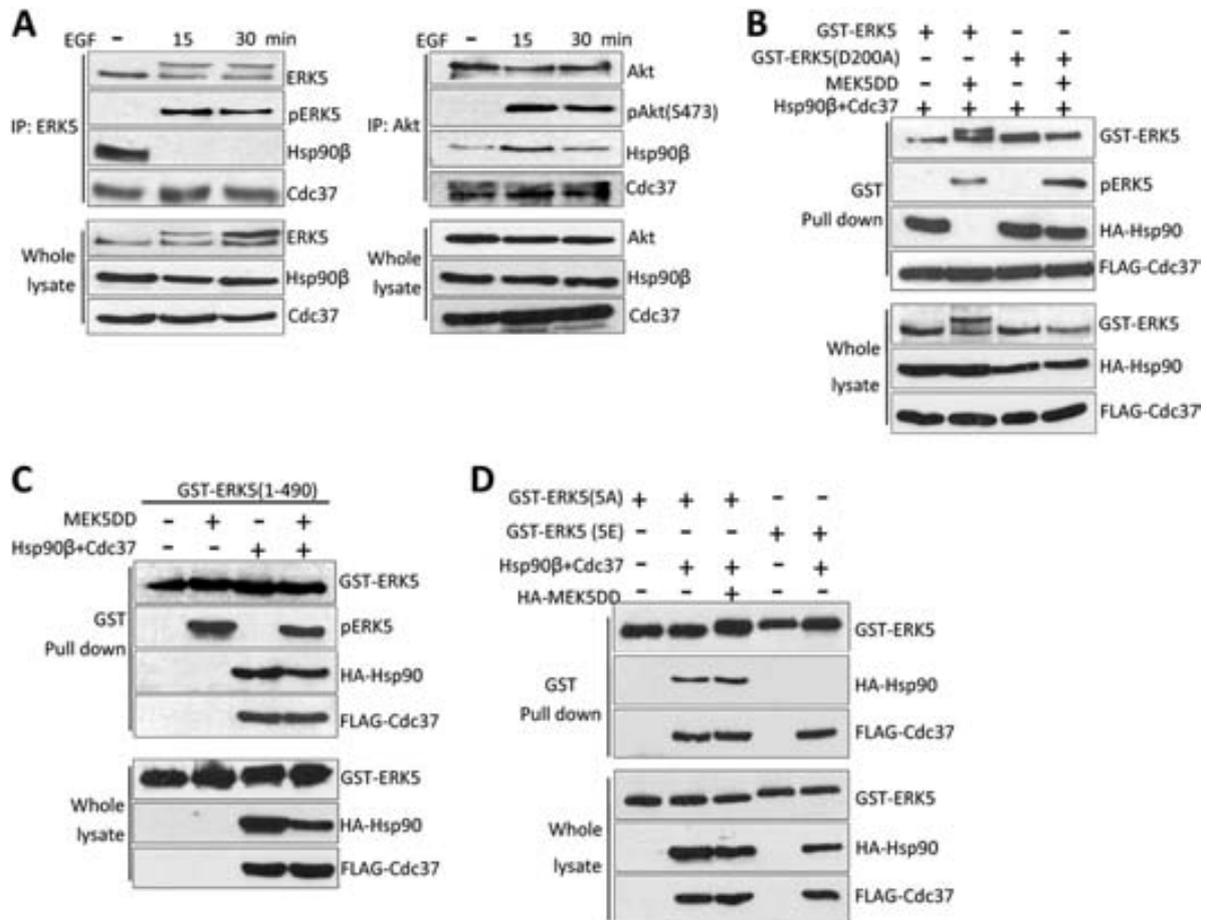


FIG 4 ERK5 activation induces Hsp90 β dissociation from the ERK5-Cdc37 complex. (A) HeLa cells were starved for 16 h prior to stimulation with EGF. One milligram of lysate was immunoprecipitated with anti-ERK5 (left panels) or anti-Akt (right panels) antibodies, and the immunoprecipitates were immunoblotted for the indicated proteins. (B to D) HeLa cells were transfected with 1 μ g of each of the indicated expression plasmids. (B and C) After 24 h, cells were lysed and GST-ERK5 complexes affinity purified and immunoblotted for the indicated protein. Panel B shows the results for ERK5 wt or the kinase-dead mutant (D200A), panel C shows the results obtained for the N-terminal half of ERK5, and panel D shows the results for a form of ERK5 in which the autophosphorylated residues at the C terminus are mutated to Ala (5A) or Glu (5E). Similar results were obtained in four separate experiments.

bind Hsp90 and Cdc37 in Fig. 2D. Although MEK5DD induced T-loop phosphorylation of the N-terminal half, it did not induce Hsp90 dissociation (Fig. 4C), indicating that Hsp90 release from the complex requires the C-terminal half of the kinase. Overall, these results suggest the requirement of ERK5 kinase activity for Hsp90 dissociation, perhaps due to the autophosphorylation of the C-terminal tail. Of note, we checked that ERK5 does not phosphorylate Hsp90 or Cdc37 (data not shown), discarding the possibility that phosphorylation of these proteins mediates the dissociation of Hsp90 from the ERK5-Cdc37 complex.

After phosphorylation of the TEY motif by MEK5, ERK5 becomes active and autophosphorylates several residues at the C-terminal tail, inducing a conformational change that results in an open conformation (35). To study the role of ERK5 autophosphorylation of its C-terminal tail, we overexpressed Hsp90, Cdc37, and/or MEK5DD proteins together with ERK5 mutants in which 5 autophosphorylated residues at the C-terminal were mutated to Glu (ERK5-5E, to mimic phosphorylation) or to Ala (ERK5-5A, to prevent phosphorylation). We previously showed in HeLa cells that the wild-type and ERK5-5A forms are cytosolic,

whereas ERK5-5E resides in the nucleus, mimicking ERK5 nuclear translocation after activation (36). The ERK5-5A mutant interacted with Cdc37 and Hsp90, even when active MEK5 was coexpressed, whereas in the ERK5-5E mutant, interaction with Hsp90 was lost (Fig. 4D). Taken together, these results show the requirement of the C-terminal autophosphorylation for Hsp90 dissociation from the ERK5-Cdc37 complex.

Active ERK5 is no longer sensitive to Hsp90 or Cdc37 inhibition. To confirm that active ERK5 does not interact with Hsp90, we used the Hsp90 inhibitor radicicol in cells overexpressing MEK5DD and ERK5. Expression of active endogenous and overexpressed ERK5 (as judged by the electrophoretic mobility shift) is not affected by treating cells with radicicol, at a concentration that abolished the expression of Akt or inactive ERK5 (Fig. 5A). These results further demonstrate that active ERK5 does not associate with Hsp90 and, therefore, that it is no longer sensitive to Hsp90 inhibition.

We next addressed the role of Cdc37 in ERK5 stability. We used celastrol, a compound that binds Cdc37 and disrupts the Cdc37-Hsp90 complex, leading to the proteasomal degradation of the client protein (37). Celastrol induced a decrease in ERK5 and Akt

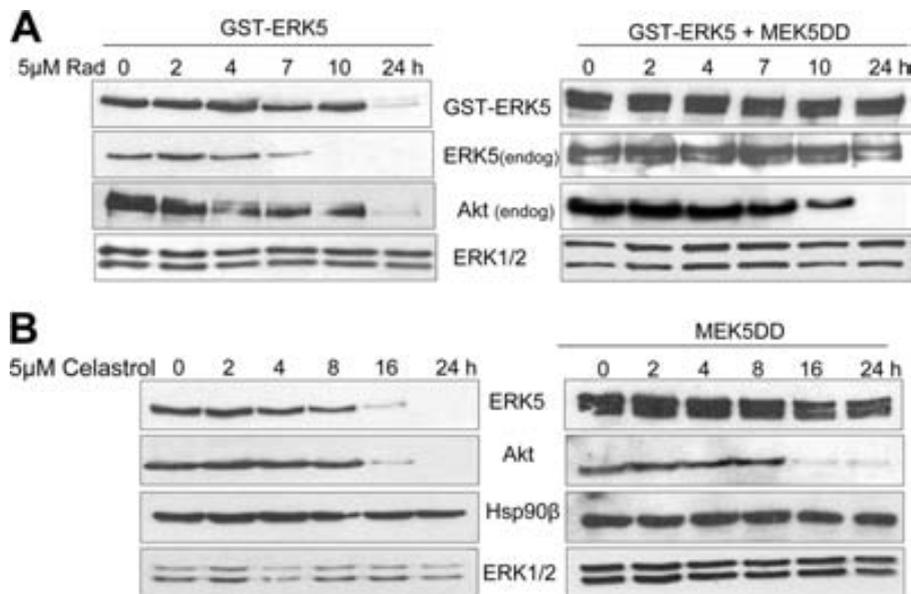


FIG 5 Active ERK5 is no longer sensitive to Hsp90 or Cdc37 inhibition. HeLa cells overexpressing GST-ERK5 and MEK5DD (A) or MEK5DD (B) were treated with 5 μ M radicicol (A) or celestrol (B) for the indicated times. After the cells were subjected to lysis with buffer containing 1% SDS, the levels of the indicated proteins were monitored by immunoblotting. Similar results were obtained in three independent experiments. endog, endogenous.

protein levels in a time-dependent manner, and completely abolished expression of both kinases at 24 h without affecting Hsp90 or nonclient kinases ERK1 and -2 (Fig. 5B). Interestingly, and as seen with Hsp90 inhibitors, celestrol did not induce degradation of active ERK5, at a concentration and time that induced Akt degradation.

Overexpression of high levels of Cdc37 induces Hsp90 β dissociation from the ERK5-Cdc37 complex and nuclear translocation of ERK5. Since Cdc37 is overexpressed in a number of cancers (38), we asked if Cdc37 overexpression had any effect on ERK5 activity or function. To do so, we overexpressed in cells ERK5, Hsp90, and increasing quantities of Cdc37. ERK5 was affinity purified, and associated proteins were visualized by immunoblotting. Figure 6A shows the presence of Hsp90 in pellets from cells cotransfected with 1 μ g of plasmid encoding Cdc37 (as shown in Fig. 2C) but not in those from cells cotransfected with 2 or 4 μ g of the plasmid encoding Cdc37. Thus, expression of high levels of Cdc37 induces Hsp90 dissociation from the ERK5-Cdc37 complex, similar to what happened when ERK5 became activated in response to EGF stimulation (Fig. 4A). Since EGF also induces ERK5 nuclear translocation (16), we next studied whether this is also the case for Cdc37 overexpression.

We first studied the cellular localization of exogenous and endogenous ERK5 in HeLa cells overexpressing Cdc37. Subcellular fractionation showed most of the ERK5 in the cytosolic fraction of resting cells, and cells coexpressing MEK5DD showed active ERK5 mainly located at the nuclear fraction (Fig. 6B). Overexpression of Cdc37 induced the nuclear localization of both exogenous and endogenous ERK5 proteins. We further confirmed these results by fluorescence microscopy. Both overexpressed ERK5 and endogenous ERK5 mainly localized throughout the cytoplasm of HeLa cells, while expression of MEK5DD induced ERK5 nuclear translocation (Fig. 6C and D). Consistent with results obtained by subcellular fractionation, overexpression of Cdc37 induced nuclear translocation of endogenous and exogenous ERK5. Finally, overexpression of Cdc37, but not of MEK5DD, induced nuclear trans-

location of the C-terminal autophosphorylation-defective mutant GST-ERK5(5A) (Fig. 6E).

Cdc37 overexpression enhances ERK5-mediated AP-1 transcriptional activity, without affecting ERK5 kinase activity. Activation of ERK5 induces its translocation to the nucleus, where, among other effects, it enhances the activity of the AP-1 transcriptional complex (39, 40). We tested if overexpression of Cdc37 and/or Hsp90 had any effect on AP-1 activity using a luciferase-based reporter assay. In HeLa and HEK293 cells, coexpression of ERK5 and MEK5DD enhanced AP-1 activity by \sim 25-fold over the levels seen with the control (ERK5 or MEK5DD alone) (Fig. 7A). Interestingly, coexpression of ERK5 with Cdc37, but not with Hsp90, increased AP-1 activity to the same extent as MEK5DD did (Fig. 7A). Overexpression of Hsp90 or Cdc37 had a negligible effect on AP-1 transcriptional activity. It is worth noting that coexpression of Hsp90 abolished the effect on Cdc37-induced AP-1 activity via ERK5, indicating that an excess of Cdc37 over Hsp90 is required to observe the effect. This is probably due to fact that the high levels of Hsp90 would sequester Cdc37 and therefore impair its action directed at the ERK5 protein. Importantly, Cdc37 overexpression also increases the AP-1 transcriptional activity of the ERK5 mutant defective for autophosphorylation of its C-terminal ERK5(5A) (Fig. 7B).

To check if ERK5 kinase activity mediates the increase of AP-1 transcriptional activity in cells overexpressing Cdc37, we expressed ERK5, Cdc37, and Hsp90 proteins in cells and performed kinase assays with affinity-purified ERK5 complexes using two different substrates (MBP and PIMtide). Overexpression of Cdc37 or/and Hsp90 had no effect on ERK5 activity, phosphorylation of the T-loop, or autophosphorylation (Fig. 7C). As a control, ERK5 phosphorylation and activation in response to MEK5DD overexpression are shown.

To further demonstrate that Cdc37 induces nuclear translocation of a catalytically inactive form of ERK5, we used MEK5^{-/-} MEF cells. As MEK5 is the only upstream kinase for ERK5, ERK5

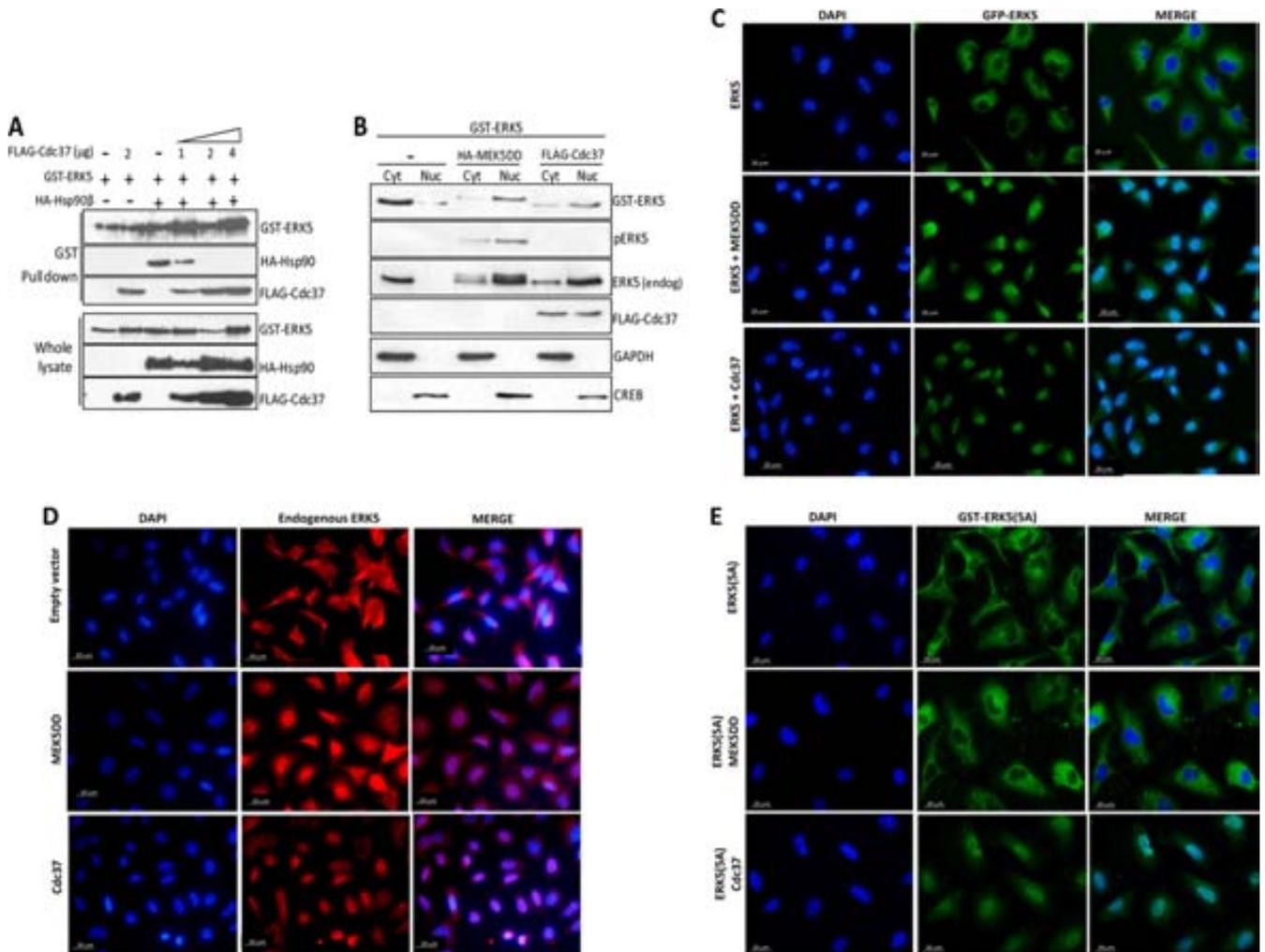


FIG 6 Cdc37 overexpression induces Hsp90 dissociation from the ERK5-Cdc37 complex and nuclear translocation of ERK5. (A) Cells were transfected with 1 μ g of plasmids encoding GST-ERK5 and/or Hsp90 β and the indicated amounts of plasmid encoding Cdc37. After 36 h, cells were lysed and GST-ERK5 was affinity purified, and precipitated proteins were immunoblotted using the indicated antibodies. The lower panels show the levels of overexpressed proteins (whole lysate). (B to E) HeLa cells were transfected with 1 μ g of plasmids encoding the indicated proteins, except for Cdc37, for which 3 μ g was used. (B) Cells overexpressing the indicated proteins were fractionated to obtain cytosolic (Cyt) and nuclear (Nuc) fractions, and each fraction was analyzed by immunoblotting. GAPDH and CREB proteins are used as markers of cytosolic and nuclear fractions, respectively. (C) Cells overexpressing GFP-ERK5 and MEK5DD or Cdc37 were fixed, and GFP-ERK5 (green) localization was visualized directly by GFP fluorescence. (D) HeLa cells transfected with the indicated plasmids were fixed and subjected to immunofluorescence staining for endogenous ERK5 (red). (E) HeLa cells overexpressing ERK5 C-terminal autophosphorylation-defective mutant GST-ERK5(5A) and MEK5DD or Cdc37 were fixed and subjected to immunofluorescence staining for GST (green). Nuclei are shown in blue (DAPI). Similar results were obtained in three independent experiments. Bars, 20 μ m.

cannot be activated in these cells (13). Cdc37 overexpression induced endogenous ERK5 nuclear translocation in MEK5^{-/-} MEF cells (Fig. 7D). We also used the ERK5 competitive inhibitor XMD8-92, which blocks ERK5 activity and autophosphorylation (41). XMD8-92 did not prevent Cdc37-induced ERK5 nuclear translocation, at a concentration that blocked the ERK5 nuclear entry induced by MEK5 (Fig. 7E). According to those results, XMD8-98 inhibited the AP-1 transcriptional activity induced by active MEK5 but had no significant effect on that induced by Cdc37 overexpression (Fig. 7F). Furthermore, Cdc37 also induced AP-1 transcriptional activity of the ERK5 kinase-dead mutant D200A (Fig. 7G).

All together, our results show that overexpression of Cdc37 induces ERK5 nuclear translocation and enhances ERK5-mediated

AP-1 transcriptional activity by a mechanism which does not require ERK5 kinase activity or C-terminal phosphorylation.

Cdc37 cooperates with ERK5 to promote cell proliferation.

As the ERK5 pathway is critical for cell proliferation, we next tested if overexpressed Cdc37 collaborates with ERK5 to promote cell proliferation. We used human prostate cancer PC-3 cells, since prostatic cells that overexpress MEK5 or ERK5 show an enhanced proliferation rate and enhanced efficiency in forming tumors *in vivo* (42–44). PC-3 cells were cotransfected with plasmids encoding GFP or GFP-ERK5, alone or together with those encoding MEK5DD or Cdc37, and GFP-positive cells were counted at different days in a flow cytometer. No morphological changes between the transfected cells and control cells were apparent (data not shown). Overexpression of MEK5DD or Cdc37 resulted in a

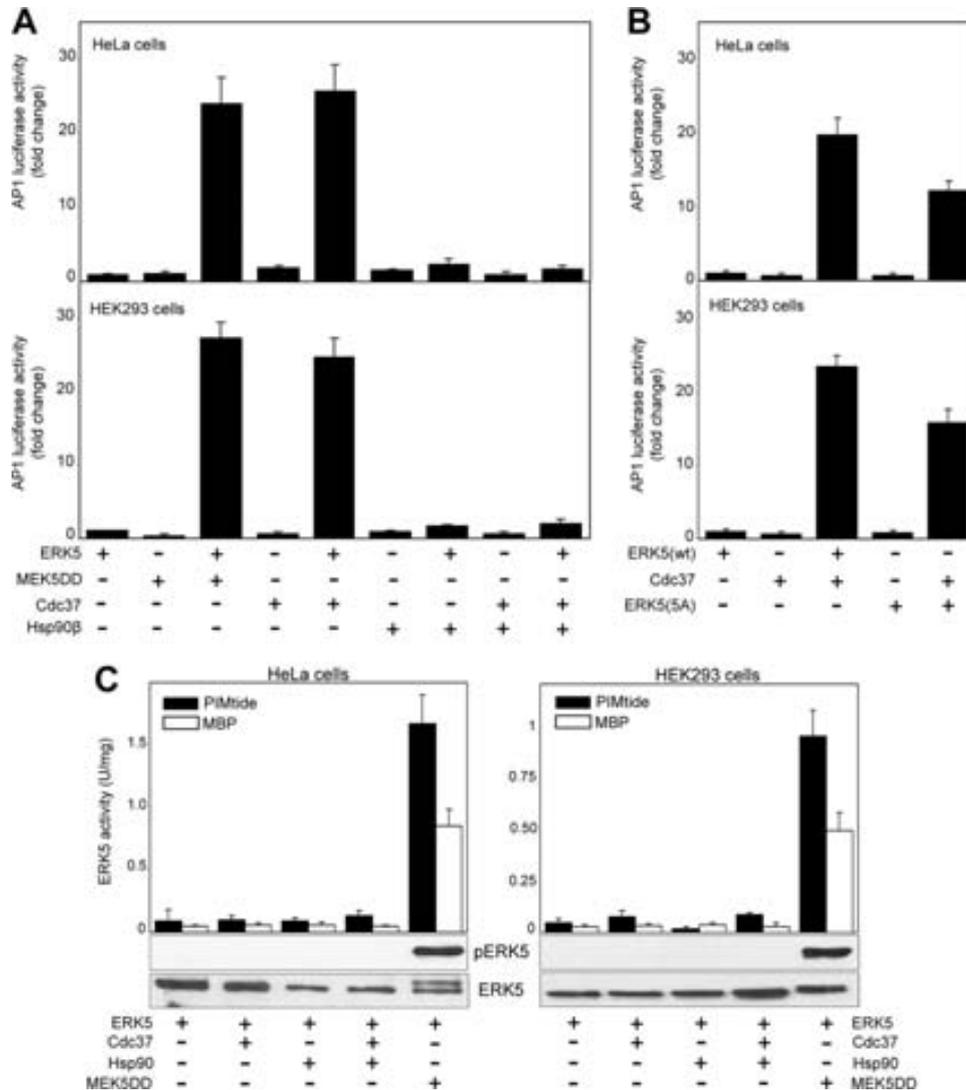


FIG 7 Cdc37 overexpression induces ERK5-mediated AP-1 transcriptional activity without affecting ERK5 kinase activity. (A and B) Cdc37 overexpression increases ERK5-mediated AP-1 transcriptional activity of ERK5 (A) and ERK5 C-terminal autophosphorylation-defective mutant ERK5(5A) (B). pAP-1-luciferase reporter and pRL-CMV-Renilla plasmids were cotransfected with the indicated plasmids (see Materials and Methods), and 24 h later, lysates were subjected to a dual-luciferase assay. Each value is the mean \pm SD of the results of four different determinations, each performed in triplicate, and normalized using the *Renilla* values. (C) Hsp90 β or Cdc37 has no effect on ERK5 kinase activity. Cells overexpressing the indicated proteins were lysed, and GST-ERK5 proteins were affinity purified and assayed for ERK5 activity, using 100 μ M [γ -³²P]ATP and 500 μ M PIMtide or 10 μ g MBP as the substrate. The activity data are the means \pm SD of the results of three separate experiments, with each determination performed in triplicate. Cell lysates were also immunoblotted for ERK5 and phospho-ERK5. (D) MEK5^{-/-} MEF cells were transfected with plasmid encoding GFP-Cdc37 or the empty vector, and 36 h later, cells were fixed and stained for immunofluorescence for endogenous ERK5 (red). GFP-Cdc37 (green) was visualized directly by GFP fluorescence. Nuclei are shown in blue (DAPI). The white arrow indicates an untransfected cell (that does not overexpress Cdc37) showing cytosolic ERK5. Similar results were obtained in three independent experiments. (E) HeLa cells transfected with plasmids encoding GFP-ERK5 (1 μ g) alone or in combination with MEK5DD (1 μ g) or Cdc37 (3 μ g) were fixed, and GFP-ERK5 was visualized directly by GFP fluorescence. Where indicated, 4 h after transfection, cells were treated with 10 μ M XMD8-92 (the ERK5 inhibitor). Similar results were obtained in three independent experiments. (F) pAP-1-luciferase reporter and pRL-CMV-Renilla plasmids were cotransfected in HEK293 cells with the indicated plasmids, and 24 h later, lysates were subjected to a dual-luciferase assay. Where indicated, cells were treated with 10 μ M XMD8-92 4 h after transfection. Each value is the mean \pm SD of the results of three different determinations, each performed in triplicate, and normalized using the *Renilla* values. (G) The pAP-1-luciferase reporter and pRL-CMV-Renilla plasmids were cotransfected in HEK293 cells with the ERK5 kinase-dead mutant D200A and/or MEK5DD and/or Cdc37, and 24 h later, lysates were subjected to the dual-luciferase assay. Each value is the mean \pm SD of the results of three different determinations, each performed in triplicate.

slight but significant ($P < 0.01$) increase in PC-3 cell proliferation after 4 days (Fig. 8A), as previously shown (42, 45). Interestingly, overexpression of ERK5 alone had no effect but its coexpression with MEK5 or Cdc37 resulted in a robust increase ($P < 0.001$) in cell proliferation (Fig. 8A).

To quantify the percentage of proliferating cells, PC-3 cells

overexpressing different combinations of proteins were labeled with the nucleotide analogue BrdU, a method used to quantify cells undergoing DNA synthesis. Similar to data shown in Fig. 8A, ERK5, MEK5, or Cdc37 overexpression had little or no effect on the number of BrdU-positive cells, whereas cells overexpressing both ERK5 and MEK5 or Cdc37 showed a consistent marked in-

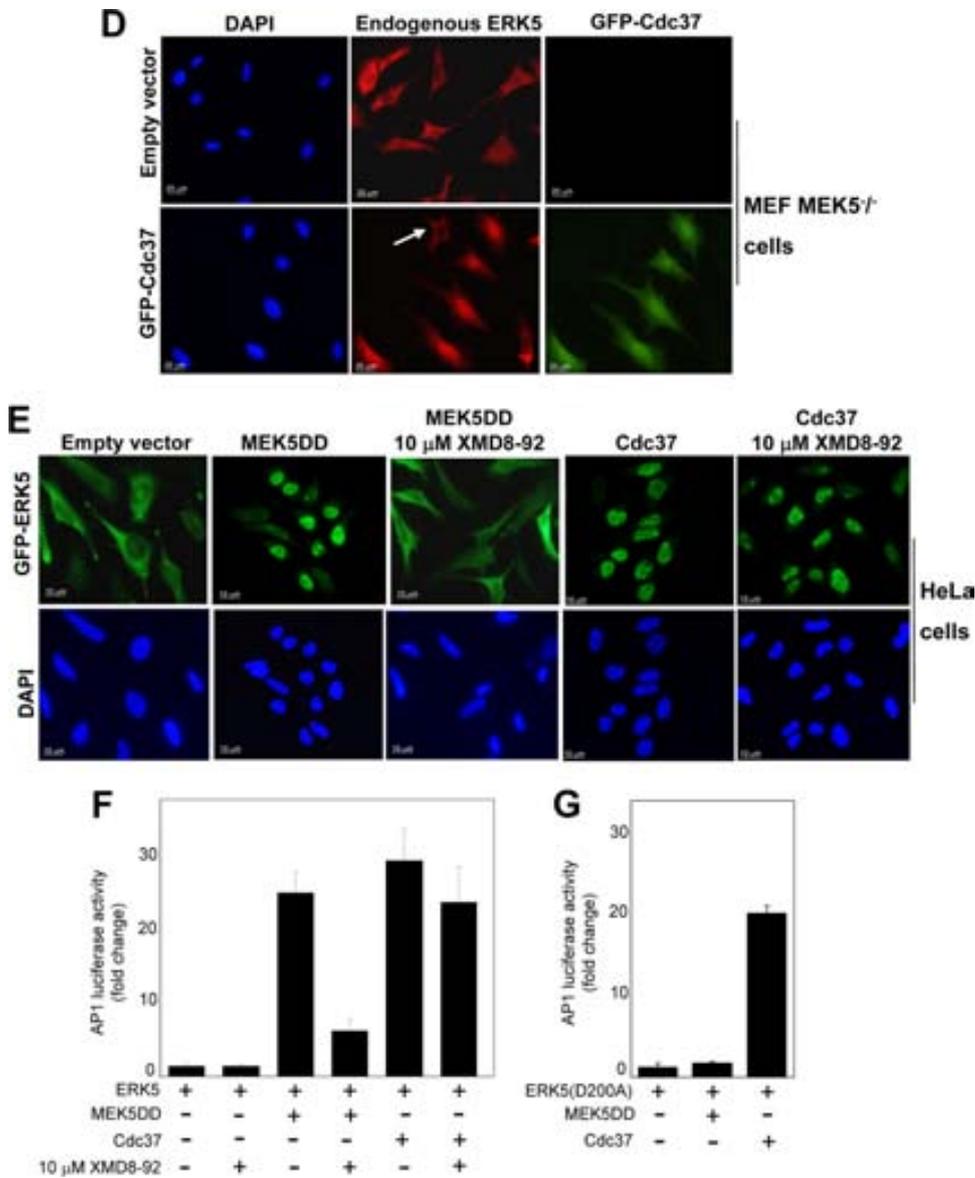


FIG 7 continued

crease of cell proliferation (Fig. 8B). All in all, our results show that Cdc37 cooperates with ERK5 to promote cell proliferation.

DISCUSSION

We used tandem affinity purification to identify ERK5-interacting proteins. This methodology identified the chaperone protein Hsp90 β as the major protein associated with ERK5 (Fig. 1). Immunoprecipitation assays revealed that endogenous Hsp90 and ERK5 proteins interact. Cdc37, the canonical Hsp90 cochaperone for many kinase clients, also interacted with ERK5, resulting in an Hsp90-Cdc37-ERK5 trimeric complex in cells (Fig. 2). Our analysis also identified other ERK5-interacting proteins, whose physiological relevance is being currently investigated.

The importance of the interaction of Hsp90 with ERK5 was established by the fact that two structurally unrelated Hsp90 inhibitors (geldanamycin and radicicol) promoted ERK5 degrada-

tion. Although Truman et al. observed that yeast Hsp90 binds human ERK5 (46), other authors excluded ERK5 as a client of mammalian Hsp90 since the expression of this kinase was not affected by treatment of COS7 cells with the Hsp90 inhibitor 17-AAG (47). This was probably due to the use of a relatively low dose (1 μ M) of inhibitor, since we noticed that ERK5 expression is not affected by low concentrations of Hsp90 inhibitors that alter other Hsp90 clients. For instance, 1 μ M geldanamycin induces degradation of LKB1 (48), JAK1/JAK2 (49), CHK1 (50), or IRAK-1 (51) kinases after 4 h of treatment, a concentration that has almost no effect on ERK5 after 18 h. The use of 5 μ M geldanamycin was necessary to induce complete degradation of ERK5 (Fig. 3A). This is not surprising, since closely related kinases show differential levels of sensitivity to geldanamycin, as is the case for the receptor tyrosine kinases ErbB1 and ErbB2. Both proteins require Hsp90 for proper folding, but only ErbB2

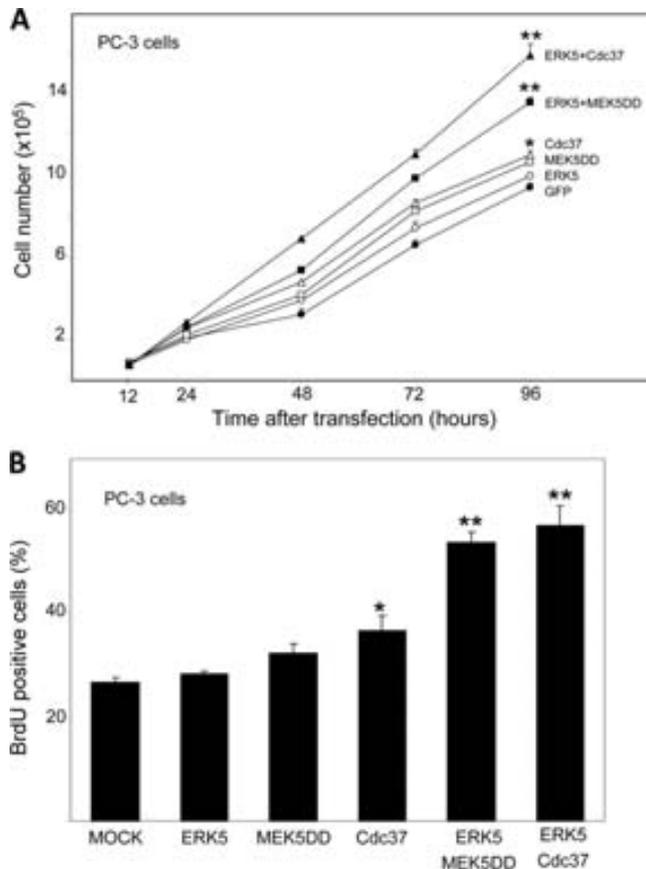


FIG 8 Cdc37 collaborates with ERK5 to promote cell proliferation. (A) PC3 prostate cancer cells were transfected with plasmids encoding proteins GFP, GFP-ERK5, MEK5-DD and GFP, Cdc37 and GFP, GFP-ERK5 and MEK5-DD, or GFP-ERK5 and Cdc37, as described in Materials and Methods. At the indicated times, green fluorescent cells were counted by flow cytometry. Each value is the mean \pm SD of the results determined for three different transfected cell dishes. Similar results were obtained in three independent experiments. *, $P < 0.01$; **, $P < 0.001$ (for values at 96 h after transfection compared with the GFP results at 96 h). (B) PC-3 cells were transfected with empty plasmid (MOCK) or with plasmids encoding the indicated proteins as described for panel A. Cells were treated with BrdU, and incorporation of BrdU was detected by flow cytometry. Ratios of numbers of BrdU-positive cells to total numbers of live cells were determined in triplicate samples, and data are expressed as the mean \pm SD of the results determined for two independent experiments. *, $P < 0.01$; **, $P < 0.001$ (in comparison to the mock transfection data).

binds Hsp90 in the mature state, making ErbB2 more sensitive to geldanamycin (52). We also show the requirement of Cdc37 for ERK5 stability. Treatment of cells with the *cdc37* inhibitor celastrol or silencing the Cdc37 protein results in loss of ERK5 expression (Fig. 3B and 5B). Celastrol inhibits Cdc37-Hsp90 interaction, preventing the recruitment of Hsp90 to the kinase domain of the client protein (22), therefore resulting in the proteasomal degradation of this protein (26).

ERK5 comprises two well-differentiated regions; the N-terminal region contains the kinase domain, and the C-terminal region contains a nuclear localization signal and a transcriptional transactivation domain. We show that Hsp90 and Cdc37 bind the N-terminal region but not the C-terminal tail (Fig. 2D and E). The fact that the N-terminal half is ubiquitinated in the absence of proteasomal inhibitor (Fig. 3E) suggests that this half becomes unstable in the absence of the C-terminal region.

Our most striking finding is the observation that activation of ERK5 (in response to either EGF stimulation or active MEK5 overexpression) results in Hsp90 dissociation from the ERK5-Cdc37 complex (Fig. 4A and B). According to this, active ERK5 is not sensitive to Hsp90 inhibitors (Fig. 5A). These results suggest that ERK5 is an unstable kinase in its inactive form and that binding to Hsp90 stabilizes it, whereas its activation results in a stable protein that does not require Hsp90 stabilization. Although unusual, a transient interaction of Hsp90 with certain kinase clients, such as the cyclin-dependent kinase CDK4, has been reported. Inactive CDK4 binds Hsp90 and Cdc37, and binding of cyclin D induces the release of the Hsp90-Cdc37 superchaperone and CDK4 activation (53). In this case, Hsp90-Cdc37 promotes stabilization until cyclin D takes over this activity by interacting with (and displacing Hsp90-Cdc37 from) the N-terminal lobe of the kinase domain. For other kinases, only the mutated forms show Hsp90 dependency. For instance, wild-type B-Raf does not bind Hsp90 but the mutant active form most commonly found in cancer B-Raf^{V600E} shows a strong Hsp90 dependence for its stability (30). The substitution of Val600 for Glu within the T-loop provokes a conformational change of the N-terminal lobe, exposing the chaperone binding site.

Here we show that a kinase-dead mutant of ERK5 (D200A) remains associated with Hsp90 even after being phosphorylated at the TEY motif by MEK5 (Fig. 4B). Thus, ERK5 kinase activity is necessary for the dissociation of Hsp90 but not the phosphorylation of its TEY motif. On the other hand, a functional form of ERK5(1–490) that lacks the C-terminal region remains associated with Hsp90 after MEK5 phosphorylation (Fig. 4C). Finally, an ERK5 mutant in which 5 autophosphorylatable residues are mutated to Glu does not bind Hsp90 under basal conditions (Fig. 4D). Taken together, these results indicate that autophosphorylation of the C-terminal region induces the release of Hsp90 from the ERK5-Cdc37 complex. The ERK5 C-terminal tail might work in a manner analogous to that of cyclin D for CDK4: upon ERK5 activation, autophosphorylation of its C-terminal region results in a conformational change of this tail that induces the release of Hsp90 and takes over its chaperone function in the stabilization of the N-terminal lobe of the kinase domain. However, and unlike what happens for CDK4, Cdc37 remains bound to active ERK5.

Unexpectedly, expression of high levels of Cdc37 in cells induced the release of Hsp90 from the ERK5-Cdc37 complex (Fig. 6A), by a mechanism that does not involve enzyme activation and C-terminal autophosphorylation (Fig. 7). Thus, Cdc37 mimics ERK5 C-terminal autophosphorylation, probably inducing a conformational change that results in the release of Hsp90. This was an unexpected result, since it is accepted that Cdc37 promotes the association of Hsp90 with client proteins (21, 22). One possibility might be that high levels of expression of Cdc37 result in the binding of a second molecule to the ERK5 protein, displacing the Hsp90 by an unknown, noncanonical mechanism. Interestingly, Fig. 6A shows that larger amounts of Cdc37 bound to ERK5 in those cells that overexpress higher levels of Cdc37. We are currently investigating the mechanism by which Cdc37 displaces Hsp90 from the trimeric complex.

We show that MEK5 activation or overexpression of Cdc37 results in three common events: (i) Hsp90 dissociation from the ERK5-Cdc37 complex; (ii) ERK5 nuclear translocation; and (iii) an increase of ERK5-mediated AP-1 transcriptional activity. Sev-

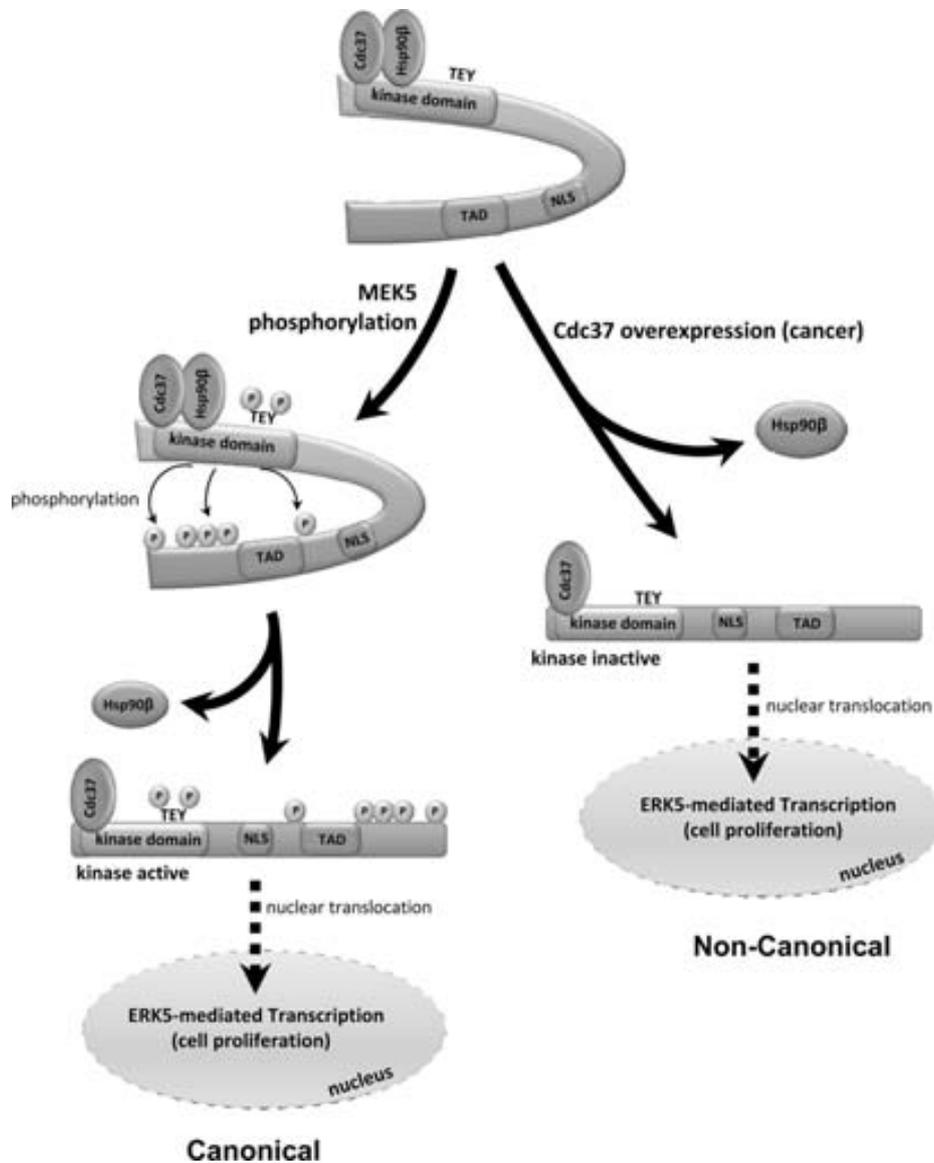


FIG 9 A model for the role of chaperones in the mechanism of nucleocytoplasmic transport of ERK5. In the resting state, the N-terminal half of ERK5 interacts intramolecularly with the C-terminal half, generating a region responsible for the interaction with the cytoplasmic anchor protein Hsp90. This interaction would keep ERK5 in the cytosol, even though the nuclear localization signal (NLS) is present at the ERK5 C-terminal tail. Upon MEK5-mediated phosphorylation of the TEY motif and activation, ERK5 autophosphorylation of its C-terminal half disrupts the intramolecular interaction, inducing a conformational change that results in dissociation of Hsp90, exposition of the NLS, and ERK5 nuclear translocation. In contrast, overexpression of Cdc37 (as happens in some cancers) induces the nuclear translocation of a catalytically inactive form of ERK5 that is transcriptionally active. TAD, transcriptional-activation domain.

eral studies have addressed the issue of subcellular location of ERK5. ERK5 resides in the cytosol of HeLa cells and migrates to the nuclei after activation in response to EGF (35, 54) or active MEK5 overexpression (55). However, other studies stated that the cellular location of ERK5 depends on the cell type and can even be nuclear in unstimulated cells (16, 56). Kondoh et al. proposed an accepted mechanism for the nucleocytoplasmic transport of ERK5 (35). The C-terminal region contains a nuclear export sequence (NES), and ERK5 itself has nuclear export (NES) activity, so subcellular localization of ERK5 depends on the balance between nuclear export and import: the N-terminal and C-terminal halves bind each other, and this binding is necessary for cyto-

plasmatic localization. Thus, in resting cells, the two halves would interact, forming either a putative NES or a domain that binds a cytoplasmic anchor protein. After activation, ERK5 autophosphorylates its C-terminal half, an event that would disrupt the intramolecular interaction between the C-terminal and N-terminal regions, resulting in the loss of the NES activity, exposition of the NLS, and nuclear translocation. Supporting the idea of a role of C-terminal phosphorylation in ERK5 nuclear localization, an ERK5 that is catalytically inactive (but phosphorylated at its C terminus) that resides in the nucleus during mitosis has been previously reported (36, 57).

Our results suggest that Hsp90 might be the proposed cytosolic

anchor, since dissociation of Hsp90 is the common event implicated in two different mechanisms that induce ERK5 nuclear translocation, i.e., MEK5 activation and Cdc37 overexpression (Fig. 9). Thus, Hsp90 might act as it does for steroid receptors. In the absence of the hormone, steroid receptors reside in the cytosol complexed with Hsp90 and this interaction maintains the receptor in a state capable of binding the hormone. Binding the steroid leads to dissociation of Hsp90 and receptor nuclear translocation (58). In an analogous way, the Hsp90-ERK5 complex resides in the cytosol and ERK5 activation induces Hsp90 dissociation and nuclear translocation of the kinase, configuring a kinase activity-dependent shuttling (Fig. 9). In this paradigm, it is likely that Hsp90 would keep cytosolic/basal ERK5 properly folded for MEK5 recognition and activation.

We propose that Cdc37 overexpression represents an alternative, noncanonical mechanism of ERK5 nuclear translocation. Unlike the results seen with MEK5, overexpression of Cdc37 does not result in activation of ERK5 (Fig. 7C) or in a shift of its electrophoretic mobility, and it induces the nuclear translocation of a catalytically inactive form of ERK5 that retains its transcriptional activity (Fig. 9). This finding is strongly supported by the genetic and pharmacological data (Fig. 7): (i) Cdc37 overexpression induces ERK5 nuclear translocation in MEF MEK5^{-/-} cells, (ii) ERK5 inhibitor XMD2-98 blocks ERK5 nuclear translocation and transcriptional activity induced by active MEK5 but not by Cdc37 overexpression, and (iii) overexpression of Cdc37 induces transcriptional activity of two ERK5 mutants unable to autophosphorylate, D200A and ERK5(5A). Interestingly, Cdc37 overexpression also increases nuclear translocation of other proteins, such as the intracellular domain of the tyrosine kinase receptor Ryk, after being cleaved by γ -secretase (59). How Cdc37 overexpression induces the release of Hsp90 remains to be studied, but it could be the consequence of Cdc37 either directly displacing Hsp90 or inducing a conformational change in ERK5 that results in Hsp90 dissociation. It is important to study if the different ERK5 cytosolic/nuclear localizations observed in several cell lines are, in fact, the consequence of a different Cdc37 expression level.

Cdc37 acts as an oncogene, stabilizing other oncogenes that are mutated or overexpressed in cancer cells (25); it is overexpressed in a number of cancers (60), and silencing Cdc37 reduces cell growth and invasive capability (24, 61). On the other hand, MEK5 and ERK5 represent a key pathway associated with some cancers, such as breast and prostate cancer. Tumors showing a strong nuclear ERK5 localization have a poor specific disease factor (42, 43, 54, 62), and silencing ERK5 or Cdc37 expression induces growth arrest and inhibits the invasive capability of cancer cells (44). In accordance with the results described above, we show that, in prostate cancer cells, Cdc37 cooperates with ERK5 to promote cell proliferation, as it does proliferation of active MEK5 (Fig. 8). It is important to establish if ERK5 and Cdc37 also cooperate to regulate the progression and invasiveness of cancer. If so, our observation that active ERK5 is no longer sensitive to Hsp90 or Cdc37 inhibitors supports the idea that the ERK5-Cdc37 interaction might represent a new target for therapeutic intervention in some cancers.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Philip Cohen and Maria Deak (MRC PPU, Dundee, United Kingdom) for ERK5 antibody and the generation of the TAP-tagged ERK5 vectors, respectively. We also thank Nathanael Gray (Dana-Farber

Cancer Institute, Boston, MA) for providing us with the ERK5 competitive inhibitor XMD2-98 and Cathy Tournier (The University of Manchester, United Kingdom) for the MEF MEK5^{-/-} cells. We are grateful to Ana Cuenda for helpful discussions, Cristina Gutierrez for tissue culture assistance, Anna Vilalta for technical support, and Isabelle Gelot for editorial assistance. We are grateful to the Servei de Genòmica from the UAB.

This work was supported by grants from the Spanish Ministerio Educación (BFU2004-00757 and BFU2007-60268).

REFERENCES

- Kyriakis JM, Avruch J. 2001. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol. Rev.* 81:807–869.
- Johnson GL, Lapadat R. 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298:1911–1912.
- Raman M, Chen W, Cobb MH. 2007. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 26:3100–3112.
- Kato Y, Tapping RI, Huang S, Watson MH, Ulevitch RJ, Lee JD. 1998. Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor. *Nature* 395:713–716.
- English JM, Pearson G, Baer R, Cobb MH. 1998. Identification of substrates and regulators of the mitogen-activated protein kinase ERK5 using chimeric protein kinases. *J. Biol. Chem.* 273:3854–3860.
- Yang CC, Ornatsky OI, McDermott JC, Cruz TF, Prody CA. 1998. Interaction of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) with a mitogen-activated protein kinase, ERK5/BMK1. *Nucleic Acids Res.* 26:4771–4777.
- Kamakura S, Moriguchi T, Nishida E. 1999. Activation of the protein kinase ERK5/BMK1 by receptor tyrosine kinases. Identification and characterization of a signaling pathway to the nucleus. *J. Biol. Chem.* 274:26563–26571.
- Lee JD, Ulevitch RJ, Han J. 1995. Primary structure of BMK1: a new mammalian map kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 213:715–724.
- Zhou G, Bao ZQ, Dixon JE. 1995. Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* 270:12665–12669.
- Sohn SJ, Sarvis BK, Cado D, Winoto A. 2002. ERK5 MAPK regulates embryonic angiogenesis and acts as a hypoxia-sensitive repressor of vascular endothelial growth factor expression. *J. Biol. Chem.* 277:43344–43351.
- Regan CP, Li W, Boucher DM, Spatz S, Su MS, Kuida K. 2002. Erk5 null mice display multiple extraembryonic vascular and embryonic cardiovascular defects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:9248–9253.
- Yan L, Carr J, Ashby PR, Murry-Tait V, Thompson C, Arthur JS. 2003. Knockout of ERK5 causes multiple defects in placental and embryonic development. *BMC Dev. Biol.* 3:11. doi:10.1186/1471-213X-3-11.
- Wang X, Merritt AJ, Seyfried J, Guo C, Papadakis ES, Finegan KG, Kayahara M, Dixon J, Boot-Handford RP, Cartwright EJ, Mayer U, Tournier C. 2005. Targeted deletion of mek5 causes early embryonic death and defects in the extracellular signal-regulated kinase 5/myocyte enhancer factor 2 cell survival pathway. *Mol. Cell. Biol.* 25:336–345.
- Kasler HG, Victoria J, Duramad O, Winoto A. 2000. ERK5 is a novel type of mitogen-activated protein kinase containing a transcriptional activation domain. *Mol. Cell. Biol.* 20:8382–8389.
- Chiariello M, Marinissen MJ, Gutkind JS. 2000. Multiple mitogen-activated protein kinase signaling pathways connect the cot oncoprotein to the c-jun promoter and to cellular transformation. *Mol. Cell. Biol.* 20:1747–1758.
- Borges J, Pandiella A, Esparis-Ogando A. 2007. Erk5 nuclear location is independent on dual phosphorylation, and favours resistance to TRAIL-induced apoptosis. *Cell Signal.* 19:1473–1487.
- Pearl LH, Prodromou C. 2006. Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu. Rev. Biochem.* 75:271–294.
- McClellan AJ, Xia Y, Deutschbauer AM, Davis RW, Gerstein M, Frydman J. 2007. Diverse cellular functions of the Hsp90 molecular chaperone uncovered using systems approaches. *Cell* 131:121–135.
- Prodromou C, Roe SM, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH. 1997. Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell* 90:65–75.
- Neckers L, Workman P. 2012. Hsp90 molecular chaperone inhibitors: are we there yet? *Clin. Cancer Res.* 18:64–76.
- Kimura Y, Rutherford SL, Miyata Y, Yahara I, Freeman BC, Yue L,

- Morimoto RI, Lindquist S. 1997. Cdc37 is a molecular chaperone with specific functions in signal transduction. *Genes Dev.* 11:1775–1785.
22. Roe SM, Ali MM, Meyer P, Vaughan CK, Panaretou B, Piper PW, Prodromou C, Pearl LH. 2004. The mechanism of Hsp90 regulation by the protein kinase-specific cochaperone p50(cdc37). *Cell* 116:87–98.
 23. Karnitz LM, Felts SJ. 2007. Cdc37 regulation of the kinome: when to hold 'em and when to fold 'em. *Sci. STKE* 2007:pe22. doi:10.1126/stke.3852007pe22.
 24. Gray PJ, Jr, Stevenson MA, Calderwood SK. 2007. Targeting Cdc37 inhibits multiple signaling pathways and induces growth arrest in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 67:11942–11950.
 25. Gray PJ, Jr, Prince T, Cheng J, Stevenson MA, Calderwood SK. 2008. Targeting the oncogene and kinome chaperone CDC37. *Nat. Rev. Cancer* 8:491–495.
 26. Smith JR, Clarke PA, de Billy E, Workman P. 2009. Silencing the cochaperone CDC37 destabilizes kinase clients and sensitizes cancer cells to HSP90 inhibitors. *Oncogene* 28:157–169.
 27. Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, Seraphin B. 1999. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat. Biotechnol.* 17:1030–1032.
 28. Mody N, Campbell DG, Morrice N, Pegg M, Cohen P. 2003. An analysis of the phosphorylation and activation of extracellular-signal-regulated protein kinase 5 (ERK5) by mitogen-activated protein kinase kinase 5 (MKK5) in vitro. *Biochem. J.* 372:567–575.
 29. Zheng Q, Yin G, Yan C, Cavet M, Berk BC. 2004. 14-3-3beta binds to big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1/ERK5) and regulates BMK1 function. *J. Biol. Chem.* 279:8787–8791.
 30. Grbovic OM, Basso AD, Sawai A, Ye Q, Friedlander P, Solit D, Rosen N. 2006. V600E B-Raf requires the Hsp90 chaperone for stability and is degraded in response to Hsp90 inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:57–62.
 31. Basso AD, Solit DB, Chiosis G, Giri B, Tschlis P, Rosen N. 2002. Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function. *J. Biol. Chem.* 277:39858–39866.
 32. Zsebk B, Citri A, Isola J, Yarden Y, Szollosi J, Vereb G. 2006. Hsp90 inhibitor 17-AAG reduces ErbB2 levels and inhibits proliferation of the trastuzumab resistant breast tumor cell line JIMT-1. *Immunol. Lett.* 104:146–155.
 33. Prince T, Sun L, Matts RL. 2005. Cdk2: a genuine protein kinase client of Hsp90 and Cdc37. *Biochemistry* 44:15287–15295.
 34. Lizcano JM, Alessi DR. 2002. The insulin signalling pathway. *Curr. Biol.* 12:R236–R238.
 35. Kondoh K, Terasawa K, Morimoto H, Nishida E. 2006. Regulation of nuclear translocation of extracellular signal-regulated kinase 5 by active nuclear import and export mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* 26:1679–1690.
 36. Iñesta-Vaquera FA, Campbell DG, Tournier C, Gomez N, Lizcano JM, Cuenda A. 2010. Alternative ERK5 regulation by phosphorylation during the cell cycle. *Cell Signal.* 22:1829–1837.
 37. Zhang T, Hamza A, Cao X, Wang B, Yu S, Zhan CG, Sun D. 2008. A novel Hsp90 inhibitor to disrupt Hsp90/Cdc37 complex against pancreatic cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 7:162–170.
 38. Stepanova L, Finegold M, DeMayo F, Schmidt EV, Harper JW. 2000. The oncoprotein kinase chaperone CDC37 functions as an oncogene in mice and collaborates with both c-myc and cyclin D1 in transformation of multiple tissues. *Mol. Cell. Biol.* 20:4462–4473.
 39. Terasawa K, Okazaki K, Nishida E. 2003. Regulation of c-Fos and Fra-1 by the MEK5-ERK5 pathway. *Genes Cells* 8:263–273.
 40. Morimoto H, Kondoh K, Nishimoto S, Terasawa K, Nishida E. 2007. Activation of a C-terminal transcriptional activation domain of ERK5 by autophosphorylation. *J. Biol. Chem.* 282:35449–35456.
 41. Yang Q, Deng X, Lu B, Cameron M, Fearn C, Patricelli MP, Yates JR, III, Gray NS, Lee JD. 2010. Pharmacological inhibition of BMK1 suppresses tumor growth through promyelocytic leukemia protein. *Cancer Cell* 18:258–267.
 42. Mehta PB, Jenkins BL, McCarthy L, Thilak L, Robson CN, Neal DE, Leung HY. 2003. MEK5 overexpression is associated with metastatic prostate cancer, and stimulates proliferation, MMP-9 expression and invasion. *Oncogene* 22:1381–1389.
 43. McCracken SR, Ramsay A, Heer R, Mathers ME, Jenkins BL, Edwards J, Robson CN, Marquez R, Cohen P, Leung HY. 2008. Aberrant expression of extracellular signal-regulated kinase 5 in human prostate cancer. *Oncogene* 27:2978–2988.
 44. Ramsay AK, McCracken SR, Soofi M, Fleming J, Yu AX, Ahmad I, Morland R, Machesky L, Nixon C, Edwards DR, Nuttall RK, Seywright M, Marquez R, Keller E, Leung HY. 2011. ERK5 signalling in prostate cancer promotes an invasive phenotype. *Br. J. Cancer* 104:664–672.
 45. Schwarze SR, Fu VX, Jarrard DF. 2003. Cdc37 enhances proliferation and is necessary for normal human prostate epithelial cell survival. *Cancer Res.* 63:4614–4619.
 46. Truman AW, Millson SH, Nuttall JM, King V, Mollapour M, Prodromou C, Pearl LH, Piper PW. 2006. Expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, human ERK5 is a client of the Hsp90 chaperone that complements loss of the Slp2p (Mpk1p) cell integrity stress-activated protein kinase. *Eukaryot. Cell* 5:1914–1924.
 47. Citri A, Harari D, Shohat G, Ramakrishnan P, Gan J, Lavi S, Eisenstein M, Kimchi A, Wallach D, Pietrokovski S, Yarden Y. 2006. Hsp90 recognizes a common surface on client kinases. *J. Biol. Chem.* 281:14361–14369.
 48. Boudeau J, Deak M, Lawlor MA, Morrice NA, Alessi DR. 2003. Heat-shock protein 90 and Cdc37 interact with LKB1 and regulate its stability. *Biochem. J.* 370:849–857.
 49. Shang L, Tomasi TB. 2006. The heat shock protein 90-CDC37 chaperone complex is required for signaling by types I and II interferons. *J. Biol. Chem.* 281:1876–1884.
 50. Nomura M, Nomura N, Yamashita J. 2005. Geldanamycin-induced degradation of Chk1 is mediated by proteasome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335:900–905.
 51. De Nardo D, Masendycz P, Ho S, Cross M, Fleetwood AJ, Reynolds EC, Hamilton JA, Scholz GM. 2005. A central role for the Hsp90. Cdc37 molecular chaperone module in interleukin-1 receptor-associated-kinase-dependent signaling by toll-like receptors. *J. Biol. Chem.* 280:9813–9822.
 52. Xu W, Yuan X, Xiang Z, Mimnaugh E, Marcu M, Neckers L. 2005. Surface charge and hydrophobicity determine ErbB2 binding to the Hsp90 chaperone complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12:120–126.
 53. Jeffrey PD, Russo AA, Polyak K, Gibbs E, Hurwitz J, Massague J, Pavletich NP. 1995. Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* 376:313–320.
 54. Esparis-Ogando A, Diaz-Rodriguez E, Montero JC, Yuste L, Crespo P, Pandiella A. 2002. Erk5 participates in neuregulin signal transduction and is constitutively active in breast cancer cells overexpressing ErbB2. *Mol. Cell. Biol.* 22:270–285.
 55. Kato Y, Kravchenko VV, Tapping RI, Han J, Ulevitch RJ, Lee JD. 1997. BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. *EMBO J.* 16:7054–7066.
 56. Raviv Z, Kalie E, Seger R. 2004. MEK5 and ERK5 are localized in the nuclei of resting as well as stimulated cells, while MEK2 translocates from the cytosol to the nucleus upon stimulation. *J. Cell Sci.* 117:1773–1784.
 57. Diaz-Rodriguez E, Pandiella A. 2010. Multisite phosphorylation of Erk5 in mitosis. *J. Cell Sci.* 123:3146–3156.
 58. Picard D. 2006. Chaperoning steroid hormone action. *Trends Endocrinol. Metab.* 17:229–235.
 59. Lyu J, Wesselschmidt RL, Lu W. 2009. Cdc37 regulates Ryk signaling by stabilizing the cleaved Ryk intracellular domain. *J. Biol. Chem.* 284:12940–12948.
 60. Stepanova L, Yang G, DeMayo F, Wheeler TM, Finegold M, Thompson TC, Harper JW. 2000. Induction of human Cdc37 in prostate cancer correlates with the ability of targeted Cdc37 expression to promote prostatic hyperplasia. *Oncogene* 19:2186–2193.
 61. Pang X, Yi Z, Zhang J, Lu B, Sung B, Qu W, Aggarwal BB, Liu M. 2010. Celestrol suppresses angiogenesis-mediated tumor growth through inhibition of AKT/mammalian target of rapamycin pathway. *Cancer Res.* 70:1951–1959.
 62. Montero JC, Ocana A, Abad M, Ortiz-Ruiz MJ, Pandiella A, Esparis-Ogando A. 2009. Expression of Erk5 in early stage breast cancer and association with disease free survival identifies this kinase as a potential therapeutic target. *PLoS One* 4:e5565. doi:10.1371/journal.pone.0005565.
 63. Al-Hakim AK, Goransson O, Deak M, Toth R, Campbell DG, Morrice NA, Prescott AR, Alessi DR. 2005. 14-3-3 cooperates with LKB1 to regulate the activity and localization of QSK and SIK. *J. Cell Sci.* 118:5661–5673.
 64. Hinz M, Broemer M, Arslan SC, Otto A, Mueller EC, Dettmer R, Scheidereit C. 2007. Signal responsiveness of IkappaB kinases is deter-

- mined by Cdc37-assisted transient interaction with Hsp90. *J. Biol. Chem.* 282:32311–32319.
65. Papapetropoulos A, Zhou Z, Gerassimou C, Yetik G, Venema RC, Roussos C, Sessa WC, Catravas JD. 2005. Interaction between the 90-kDa heat shock protein and soluble guanylyl cyclase: physiological significance and mapping of the domains mediating binding. *Mol. Pharmacol.* 68:1133–1141.
 66. Belova L, Brickley DR, Ky B, Sharma SK, Conzen SD. 2008. Hsp90 regulates the phosphorylation and activity of serum- and glucocorticoid-regulated kinase-1. *J. Biol. Chem.* 283:18821–18831.
 67. Schimmel J, Larsen KM, Matic I, van Hagen M, Cox J, Mann M, Andersen JS, Vertegaal AC. 2008. The ubiquitin-proteasome system is a key component of the SUMO-2/3 cycle. *Mol. Cell. Proteomics* 7:2107–2122.
 68. Rodríguez-Asiain A, Ruiz-Babot G, Romero W, Cubi R, Erazo T, Biondi RM, Bayascas JR, Aguilera J, Gomez N, Gil C, Claro E, Lizcano JM. 2011. Brain specific kinase-1 BRSK1/SAD-B associates with lipid rafts: modulation of kinase activity by lipid environment. *Biochim. Biophys. Acta* 1811:1124–1135.
 69. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–254.
 70. Lizcano JM, Deak M, Morrice N, Kieloch A, Hastie CJ, Dong L, Schutkowski M, Reimer U, Alessi DR. 2002. Molecular basis for the substrate specificity of NIMA-related kinase-6 (NEK6). Evidence that NEK6 does not phosphorylate the hydrophobic motif of ribosomal S6 protein kinase and serum- and glucocorticoid-induced protein kinase in vivo. *J. Biol. Chem.* 277:27839–27849.
 71. Williamson BL, Marchese J, Morrice NA. 2006. Automated identification and quantification of protein phosphorylation sites by LC/MS on a hybrid triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer. *Mol. Cell. Proteomics* 5:337–346.
 72. Lizcano JM, Alrubaie S, Kieloch A, Deak M, Leever SJ, Alessi DR. 2003. Insulin-induced *Drosophila* S6 kinase activation requires phosphoinositide 3-kinase and protein kinase B. *Biochem. J.* 374:297–306.
 73. Tatham MH, Rodriguez MS, Xirodimas DP, Hay RT. 2009. Detection of protein SUMOylation in vivo. *Nat. Protoc.* 4:1363–1371.