



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 681**

51 Int. Cl.:
C12N 9/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06818202 .1**

96 Fecha de presentación : **09.06.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1899461**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.03.2008**

54 Título: **Nuevo sitio de fosforilación de proteínas quinasas activadas por mitógeno, proteínas fosforiladas y aplicaciones.**

30 Prioridad: **10.06.2005 ES 200501404**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.04.2011

73 Titular/es: **Universidad Autónoma de Madrid
c/ Einstein, 3
28049 Madrid, ES**

72 Inventor/es: **Murga Montesinos, Cristina;
Mayor Menéndez, Federico;
Jurado Pueyo, María;
Campo Muelas, Pedro Manuel y
Peregrin Pedrique, Sandra**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 357 681 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nuevo sitio de fosforilación de proteínas quinasas activadas por mitógeno, proteínas modificadas y aplicaciones.

5 **Campo de la invención**

La invención se relaciona con un nuevo sitio de fosforilación de proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK), a las MAPKs fosforiladas en dicho sitio de fosforilación y a sus aplicaciones, en la que dicha proteína MAPK es una proteína p38.

10 **Antecedentes de la invención**

Proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK, del inglés, Mitogen-Activated Protein Kinase)

15 El término MAPK incluye tres cascadas de quinasas, ERK, JNK y p38, y sus respectivas isoformas [Pearson G., *et al.*, 2001, "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: Regulation and Physiological Functions", *Endocrine Reviews* 22(2):153-183]. Los efectos celulares mediados por estas quinasas son muy numerosos y abarcan todo el ciclo de vida de una célula: crecimiento, división, diferenciación, motilidad, respuestas osmóticas, respuesta al estrés, inflamación, cáncer, etc.

20 La detección de un determinado estímulo extracelular se transmite a una primera quinasa, denominada MAPKKK cuya diana son las serinas y treoninas de otra quinasa, MAPKK. Esta fosforilación determina la activación de MAPKK fosforilando restos de serina y treonina en una tríada T-Xaa-Y (en donde T es treonina, Y es tirosina y Xaa es el resto de un aminoácido tal como, por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico, glutamina, glicina o prolina) acotada, llamada
25 segmento de activación, que porta la diana final de esta cascada trimodular. MAPK es la quinasa efectora encargada de fosforilar en serina y treonina a numerosos sustratos, tales como factores de transcripción, otras quinasas, elementos estructurales, etc.

30 **P38**

La proteína p38 MAPK, o p38, es una enzima que pertenece a la familia de las serina/treonina quinasas que juega un importante papel en la respuesta celular a señales de estrés externas, tales como luz ultravioleta, shock osmótico, calor, etc. Por este motivo, esta proteína es también conocida como proteína quinasa activada por estrés o SAPK (del inglés, Stress-Activated Protein Kinase). p38 ejerce su papel regulador controlando la expresión génica a través
35 de la fosforilación y activación de factores de transcripción, de otras quinasas y también regulando la estabilidad de importantes ARN mensajeros.

Existen cuatro isoformas de p38 que difieren en su distribución en los diferentes tejidos y en su sensibilidad a los distintos inhibidores de p38, aunque la más estudiada y por lo tanto mejor conocida es la isoforma alfa, cuya activación se ha observado en muchos tipos celulares (tanto de tejido hematopoyético como no hematopoyético) tras el tratamiento con un estímulo apropiado. Sin embargo, a pesar de estas diferencias, todas las isoformas de p38 poseen un dominio de activación compuesto por 12 aminoácidos que contiene el segmento de activación Thr-Gly-Tyr que es fosforilado por MKK6/MKK3, enzimas de la familia de las quinasas que se encuentran por encima de p38 en la cascada de señalización celular.

45 p38 es un regulador esencial de las funciones celulares que media la producción de citoquinas y otras moléculas responsables del desarrollo de procesos inflamatorios, participa en distintas situaciones fisiológicas inducidas por estrés celular, como es el caso de algunas cardiopatías y fenómenos inflamatorios, y en el control del ciclo celular.

50 A lo largo de varios años, se ha analizado la implicación que p38 tiene en el desarrollo o evolución de distintas enfermedades. La importancia de la activación de p38 en el establecimiento y desarrollo de un fallo cardíaco ya ha sido establecida. Se ha observado una activación constitutiva tras constricción aórtica en modelos experimentales de ratón y en un modelo de ratas hipertensas con dietas altas en sal. En humanos, p38 se encuentra activada en corazón afectado por un fallo cardíaco secundario a enfermedad coronaria avanzada. La regulación de la activación de p38
55 parece ser clave en el desarrollo de la patología cardíaca, ya que varios grupos han observado una reducción de la actividad p38 en estadios terminales de fallo cardíaco en miocardio humano y de rata. Empleando inhibidores de p38 MAPK, también se ha descrito en el estado de la técnica la implicación de p38 MAPK en otras patologías distintas de enfermedades cardíacas, tales como enfermedades inflamatorias, pulmonares o neuronales. Todas estas patologías se caracterizan por presentar p38 en su forma activa, es decir, con los restos Thr180 y Tyr182 fosforilados.

60 Por otra parte, se ha observado en pacientes con cáncer que tanto la quimioterapia como la radioterapia producen una activación de la p38 que parece ser la responsable de la señal que induce la muerte de las células tumorales.

65 La estrategia más extendida en el tratamiento de las distintas enfermedades caracterizadas por la presencia de p38 activa consiste en la inhibición farmacológica de su actividad o en la inhibición de su activación, como se menciona en WO 2005/032551, WO 2004/021988, EP1534282 o CA2497448, en combinación con otros agentes terapéuticos.

GRKs

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) median las acciones de diversos mensajeros que desempeñan un papel esencial en la función del sistema cardiovascular o del sistema inmune. Además de interactuar con proteínas G heterotriméricas, los GPCR activados interactúan con quinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs) y con las proteínas moduladoras denominadas arrestinas. Basados en similitudes estructurales, los siete miembros de la familia de GRKs (GRK1-7) se han clasificado en cuatro subfamilias, GRK1, GRK2/3, GRK4/5/6 y GRK7, donde GRK2/3 y GRK5/6 presentan una distribución ubicua en el organismo. Sin embargo, no se conoce el mecanismo que altera la señalización por GPCRs y contribuye al desencadenamiento y/o progresión de estas patologías.

Estas proteínas desempeñan un papel clave en la rápida modulación de la funcionalidad y la dinámica intracelular de receptores tras la activación por ligandos, además de permitir el reclutamiento y regulación de otras proteínas celulares, iniciando nuevas vías de señalización, por lo que son tanto moduladores como componentes esenciales de la transducción de señales mediada por GPCR. Los niveles y funcionalidad de algunas GRKs están alteradas en situaciones patológicas tales como el fallo cardíaco congestivo, la hipertrofia cardíaca, la hipertensión o procesos inflamatorios tales como la artritis reumatoide.

Por otro lado, se conoce el importante papel que las SAPKs tienen en el desarrollo de cardiomiopatías y fallo cardíaco y que, la activación selectiva de GPCRs promueve la activación crónica de esas quinasas en músculo cardíaco, siendo este un paso esencial en el desarrollo de fallo cardíaco a partir de una hipertrofia ventricular.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra que GRK2 fosforila directamente a p38 *in vitro*. La Figura 1A muestra que p38 se fosforila por GRK2. Se incubó GRK2 recombinante purificada por el sistema de Baculovirus (50 nM) con 50 nM de p38 recombinante (GST-p38) en el tampón de fosforilación de p38 (Hepes 25 mM pH 7,5, acetato de magnesio 10 mM, ATP 50 μ M, [γ -³²P]ATP 2000-3000 cpm/pmol) en un volumen final 40 μ l durante 30 minutos a 30°C, sin o con heparina (50 ng/ μ l) con el fin de inhibir la actividad de GRK2. Los controles de autofosforilación de las quinasas se llevaron a cabo en las mismas condiciones. Se paró la reacción por adición de tampón de carga-SDS, se separaron las proteínas en un gel de poliacrilamida-SDS al 8% y se revelaron por autorradiografía. La Figura 1B muestra que GRK2 fosforila directamente p38 y no promueve su autofosforilación. Las reacciones de fosforilación se llevaron a cabo como se ha indicado en relación con la Figura 1A. Los compuestos heparina y SB203580, inhibidores de GRK2 y de p38 respectivamente, se utilizaron a concentraciones de diez veces la IC₅₀ para asegurar la completa inhibición de sendas quinasas, esto es a 1,5 μ M para la heparina y a 0,5 μ M para el SB203580. Los sustratos empleados fueron MBP (14 μ g por punto) para p38 y caseína (7,5 μ g por punto). Se paró la reacción por adición de tampón de carga-SDS, se separaron las proteínas en un gel de poliacrilamida-SDS al 10% y se revelaron por autorradiografía. La Figura 1C muestra que GRK2 no fosforila a p38 en su segmento de activación. Se iniciaron reacciones de fosforilación en ausencia de ATP radiactivo, en las condiciones anteriormente descritas. Se empleó 40 ng de MKK6_{CAM} (MKK6/MKK3, Upstate) para fosforilar a GST-p38 *in vitro*. Los anticuerpos utilizados para el revelado tras separación electroforética reconocen, en el caso de las proteínas superiores, GRK2 y GST-p38 (Anticuerpo anti-PF2, suero policlonal, generado en el laboratorio de los inventores, con anticuerpos contra la proteína de fusión GST-PF2, donde PF2 es un fragmento C-terminal de GRK2). El anticuerpo fosfoespecífico de T180/Y182 utilizado para revelar el estado de activación de p38 es de Cell Signaling. La Figura 1D muestra la dependencia temporal de la fosforilación de p38 por GRK2. La fosforilación se dejó transcurrir en las mismas condiciones que las descritas anteriormente, excepto en el tiempo de incubación, que, como está indicado, varió de 0 a 90 minutos. Se muestra mediante flechas la movilidad de ambas proteínas (GRK2 79,6 kDa; GST-p38 68 kDa). A la derecha se representan los datos obtenidos tras cuantificación por Cerenkov de las bandas escindidas de los geles. En la Figura 1E se presentan los parámetros cinéticos de la fosforilación. A la vista de los datos del apartado D, se tomaron 15 minutos de reacción como periodo de tiempo para determinar las constantes cinéticas de la fosforilación en condiciones de velocidad inicial. Las reacciones de fosforilación se llevaron a cabo como ya se ha descrito, dejando la concentración de GRK2 fija (25 nM) y variando la concentración de p38 de 12,5 a 400 nM. Se paró la reacción por adición de tampón de carga-SDS, se separaron las proteínas en un gel de poliacrilamida-SDS al 8%, se revelaron por autorradiografía y se cuantificaron por Cerenkov. Se confeccionó el gráfico con el programa Kaleidagraph, dotado de un algoritmo capaz de deducir los parámetros cinéticos: constante de Michaelis-Menten (Km = 79,56 nM) y velocidad máxima (Vmax = 0,9 nmol de PO₄³⁻ incorporado por mg GRK2⁻¹ minuto⁻¹).

La Figura 2 pone de manifiesto que GRK2 y p38 se asocian dependientemente de la estimulación del receptor β_2 -adrenérgico (β_2 -AR). Figura 2A: Se transfectaron transitoriamente células HEK 293 con los vectores pCDNA3-GRK2, pBC12BI- β_2 -AR y pCDNA3-Flag-p38 α (1 μ g de cada ADN por p60). A las 48 horas post-transfección, y tras un ayuno en medio sin suero de 2 horas, se estimularon las células con el agonista adrenérgico isoproterenol (ISO, 10 μ M) durante 5 o 10 minutos o no se estimularon (0 min ISO). Asimismo, células sin receptor β_2 -AR sobreexpresado se estimularon con NaCl 0,5 M durante 15 minutos. Se solubilizaron las células en el tampón adecuado para la inmunoprecipitación con el anticuerpo M2 anti-Flag unido a agarosa y tras tomar alícuotas de estos lisados (10%) para control de sobreexpresión (paneles de lisados), se incubaron los complejos inmunes toda la noche a 4°C. Las proteínas inmunoprecipitadas (anti-Flag IP) se resuspendieron en tampón de ruptura de electroforesis y las proteínas unidas se resolvieron en un gel de poliacrilamida-SDS del 10%. Tras electrotransferencia, se detectaron las proteínas con anti-p38 y con el anticuerpo contra GRK2, anti-PF2 (panel superior e inferior, respectivamente). En la Figura se incluyen además los controles negativos de inmunoprecipitación (Cneg), en ausencia de Flag-p38 α y de estimulación con 10 μ M isoproterenol. En los paneles de lisados se detectaron, arriba GRK2 y abajo el estado de activación de p38

mediante el anticuerpo anti-fosfo-p38 (ver Tabla I). Figura 2B: En aproximaciones idénticas a las descritas en 2A, se inmunoprecipitaron las proteínas sobreexpresadas con el anticuerpo contra GRK2 anti-PF2 y se reveló con anti-p38 la co-inmunoprecipitación de ésta en cada punto de estimulación (0 y 5 minutos de isoproterenol, panel superior izquierdo). En los paneles adyacentes se presentan los controles de expresión de Flag-p38 (arriba) y de GRK2 (abajo) y la GRK2 total inmunoprecipitada (panel inferior izquierdo). De nuevo, se detecta asociación entre ambas proteínas, estimulada a los 5 minutos de exposición a 10 μ M isoproterenol. Figura 2C: Esta vez se introdujeron, en las células HEK293, únicamente los vectores que codificaban β_2 -AR y Flag-p38 α con el fin de aseverar que la GRK2 endógena era co-inmunoprecipitada con una cantidad total menor de p38 (0,5 μ g de ADN). La asociación máxima entre Flag-p38 α y GRK2 se produce a los 5 minutos de tratamiento con isoproterenol 10 μ M (ver paneles superior e inferior de la izquierda). Los paneles de la derecha confirman la expresión de GRK2 (arriba, anti-PF2) y de p38 (abajo, anti-p38) en los lisados celulares. Figura 2D: En experimentos idénticos a los descritos en el apartado A, se puso a prueba la capacidad del mutante catalíticamente inactivo GRK2-K220R de co-inmunoprecipitarse con Flag-p38. Los dos paneles superiores muestran respectivamente, la co-inmunoprecipitación de las dos isoformas de GRK2 y la p38 inmunoprecipitada total. Los dos paneles de lisados atestiguan, la sobreexpresión de GRK2 y GRK2-K220R (arriba, anti-PF2) así como el estado de activación de Flag-p38 en cada punto (abajo, anti-fosfo-p38). Como se ha descrito en A, se llevaron a cabo controles de inmunoprecipitación inespecífica (Cneg) del anticuerpo M2 anti-Flag-agarosa.

En la Figura 3 se ve cómo GRK2 es capaz de atenuar la activación de p38 por MKK6_{CAM}. Figura 3A: Se transfectaron transitoriamente células HEK 293, sembradas normalmente en placas multipocillo de 6 o de 12 pocillos (M6 o M12) con pCDNA3-Flag-p38 α , pCDNA3-MKK6_{CAM}, y con cantidades crecientes del vector pCDNA3-GRK2. En este experimento se emplearon placas M6 y las cantidades de ADN introducidas fueron: 100 ng de Flag-p38, 100 ng de MKK6_{CAM}, y de 0 a 1 μ g de GRK2. En todos los puntos se completó la cantidad total de ADN con pCEFL-EGFP y con pCDNA3 vacío, en sustitución de pCDNA3-MKK6_{CAM}, en el caso del control (CTRL). A las 48 horas, se cosecharon las células, lisándolas en tampón M2. El panel superior muestra la dosis de GRK2 sobreexpresada. El estado de activación de p38 se evaluó con anti-fosfo-p38, de Cell Signaling y tras desprender los anticuerpos de la primera inmunodetección, se reveló con anti-p38 total, de la misma casa comercial. Nótese que, para evitar saturaciones poco resolutivas del revelado, se presentan autorradiografías muy levemente expuestas. Figura 3B: Dos cultivos masivos de células EBNA 293, establemente transfectados con pCDNA3-GRK2 y que por tanto sobreexpresan dos niveles diferentes de GRK2, se transfectaron con Flag-p38 y MKK6_{CAM}. Se procedió como se ha descrito anteriormente en A para determinar el estado de activación de Flag-p38. Además, se aseguró la correcta expresión de MKK6_{CAM} con el anticuerpo anti-MKK6/SKK3 de Upstate Biotechnology.

En la Figura 4 los experimentos muestran que GRK2 reduce la actividad catalítica de p38. Figura 4A: Se transfectaron transitoriamente células HEK 293, sembradas en p60, con 0,5 μ g de pCDNA3-Flag-p38 α , 0,5 μ g pCDNA3-MKK6_{CAM} (o 0,5 μ g de pCDNA3 vacío en el control, CTRL), y con 1 ó 2 μ g del vector pCDNA3-GRK2 (+), realizando cada punto por duplicado. Los controles se llevaron en paralelo, sustituyendo los μ g de pCDNA3-GRK2 por pCEFL-EGFP (-). Se completó la cantidad total de ADN con pCDNA3 vacío. A las 48 horas, se lisaron las células, se tomaron alícuotas de lisados y se inmunoprecipitó de ellas Flag-p38. Los paneles en A evidencian la sobreexpresión de GRK2 (anti-PF2) y de MKK6_{CAM} (anti-MKK6), y la activación de Flag-p38 (anti-fosfo-p38). Figura 4B: Los inmunoprecipitados se lavaron tres veces con 15 ml de tampón M2 y dos veces con otros 15 ml tampón de fosforilación sin ATP (NaF 15 mM, Hepes 25 mM pH 7,5 y acetato magnésico 10 mM). En el último lavado, se resuspendieron los complejos inmunes-agarosa en 1 ml de tampón y separó un 10% de cada punto (100 μ l) para controlar la inmunoprecipitación de Flag-p38 (panel insertado en la gráfica del apartado B). Con Flag-p38 inmunoprecipitada, se llevaron a cabo ensayos-quinasa, utilizando como sustrato el péptido APRTPGGRR (inicialmente proporcionado por Calbiochem y posteriormente sintetizado por el Servicio de Química de Proteínas del CBMSO). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 μ l, en un tampón de fosforilación compuesto por Hepes 25 mM pH 7,5; acetato magnésico 10 mM, NaF 15 mM, ATP 50 μ M y [γ -³²P]ATP 500-1000 cpm/pmol y 2 mM del péptido sustrato. Cuando se específica (+SB), se añadió SB203580 a la reacción *in vitro* a una concentración final de 0,5 μ M. Se dejó transcurrir la fosforilación durante 30 minutos a 30°C, tras lo cual se detuvo por adición de 15 μ l de TCA al 30%. Se precipitaron las proteínas por centrifugación (25 000 xg, 15 minutos, 4°C) y se recuperó, de cada reacción, el sobrenadante que contenía el péptido fosforilado. Recortes cuadrados (1 cm x 1 cm) de papel Whatman P81 se impregnaron con el péptido en solución. Se dejaron secar, se lavaron abundantemente con ácido fosfórico 75 mM y se cuantificó la radiactividad incorporada por el péptido adsorbido por Cerenkov. Los niveles de actividad se refirieron a la fosforilación del péptido sustrato por Flag-38 en ausencia de MKK6_{CAM} (CTRL).

En la Figura 5 se observa que la reducción de los niveles de GRK2 permite una mayor activación de p38 por MKK6_{CAM} *in situ*. Figura 5A: Se transfectaron transitoriamente células HEK 293, sembradas en placas M6 con 150 ng de pCDNA3-Flag-p38 α , 50 ng de pCDNA3-MKK6_{CAM}, y con cantidades crecientes del vector pCEFL-GRK2 antisentido (AS): de 0,5 μ g a 2 μ g o las mismas cantidades de pCEFL-EGFP como control (C). En todos los puntos se completó la cantidad total de ADN con el vector pCEFL vacío. Se lisaron las células y se procedió a la inmunodetección de la cantidad total de GRK2 (panel superior, anti-PF2), la activación de p38 (panel intermedio, anti-fosfo-p38), y p38 total (panel inferior, anti-p38N) en cada punto. En el gráfico se recogen los datos procedentes del punto de 2 μ g (de GFP y Antisentido) de un experimento representativo. Los niveles de activación de p38 en cada una de las dos condiciones se refieren a sus respectivos controles sin MKK6_{CAM}. Figura 5B: La activación basal de p38 está modulada por la cantidad de GRK2. Placas M6 de células HEK 293 fueron transfectadas transitoriamente, con 100 ng de pCDNA3-Flag-p38 α , y con 0,5 μ g a 2 μ g de pCEFL-GRK2 antisentido o de pCEFL-EGFP. Se completó la cantidad total de ADN en cada punto con pCEFL. Se evaluó en estas condiciones, por electrotransferencia e inmunodetección, la cantidad total de GRK2 (anti-PF2, panel superior), el estado de activación de p38 (panel intermedio,

anti-fosfo-p38, autorradiografía sobre-expuesta durante el revelado quimioluminiscente), y p38 total (panel inferior, anti-p38). En el gráfico de la parte inferior de la Figura se recopilan las medias (\pm SEM) de datos procedentes de tres experimentos independientes, por duplicado. Para determinar la significatividad se aplicó el estadístico de prueba t de Student bilateral, con $*p < 0,005$.

5

La Figura 6 demuestra que sólo p38, con sus determinantes estructurales íntegros, es sustrato de GRK2. Figura 6A: Se purificaron, de bacterias transformadas con los plásmidos pGEX2T- p38 α , pGEX4T-Mxi2 y pGEX4T-Mxi2 Δ 17, las proteínas de fusión a GST (rectángulo negro en los esquemas de las proteínas): p38 α , Mxi2 y Mxi2 Δ 17. Las isoformas Mxi2 se utilizaron a modo de mutantes truncados en el C-terminal para intentar acotar el sitio de fosforilación de GRK2. Se incubó GRK2 recombinante (200 nM) con 0,5 μ g de cada una de las proteínas de fusión, en tampón de fosforilación (Hepes 25 mM pH 7,5, acetato de magnesio 10 mM, ATP 50 μ M, [γ - 32 P]ATP 2000-3000 cpm/pmol) durante 30 minutos a 30°C. Se incluyó la heparina (150 nM) como inhibidor específico de GRK2. Se pararon las reacciones por adición de tampón de ruptura con SDS. Se resolvieron las muestras en SDS-PAGE 8%. Con el fin de asegurar la inclusión de cantidades idénticas de proteína, primero se visualizaron en el gel por tinción con Azul de Coomassie (CBB). A continuación se secó el gel y se detectó la radiactividad incorporada a las proteínas (32 P). Figura 6B: Se generó la proteína truncada GST-280-360p38, correspondiente a los 80 últimos aminoácidos de p38 α , mediante el sistema de Gateway de Invitrogen. Se hicieron ensayos de fosforilación con Mxi2 Δ 17 como N-terminal de p38, 280-360 p38 como C-terminal y con p38 α entera en las mismas condiciones que las detalladas en el apartado A. Se detectó la fosforilación por autorradiografía (32 P) y concomitantemente se hicieron controles por Western blot, con el anticuerpo anti-GST, de la cantidad de proteína utilizada en los ensayos. Se observa claramente la presencia de la proteína GST-280-360p38 que no resulta fosforilada. STD, migración de proteínas estándares de peso molecular.

La Figura 7 muestra que GRK2 fosforila a p38 en un único residuo. Figura 7A: Se analizó en electroforesis bidimensional la fosforilación de p38 por GRK2 y se dejó transcurrir en las mismas condiciones que las descritas anteriormente. Se paró la reacción por adición de tampón de carga para isoelectroenfoque. La primera dimensión electroforética tenía un gradiente de anfólitos de pH 3 a 10. La segunda dimensión se resolvió mediante un gel de poliacrilamida al 8%. Se muestra mediante flechas la movilidad de ambas proteínas (GRK2 79,6 kDa; GST-p38 68 kDa). Figura 7B: Se corrieron las muestras procedentes de un ensayo de fosforilación no radiactivo en un gel destinado a secuenciación proteómica. Se tiñó el gel para visualizar las bandas, y la correspondiente a GST-p38 fue escindida del gel y sometida a digestión triptica. Se analizaron los péptidos resultantes por MALDI-TOF. Se presenta la ampliación de la zona del espectro de masas obtenido donde se detectó el péptido fosforilado (masa correspondiente a 1.954,330) únicamente presente en la muestra procedente de la fosforilación por GRK2.

La Figura 8 demuestra que GRK2 fosforila a p38 en un único residuo. Con los datos obtenidos en MALDI-TOF (modelo Autoflex de Broker), se llegó a la identificación de un péptido triptico candidato de portar la fosforilación: LTDDHVQFLIYQILR. Para corroborar estos indicios se resolvió la muestra por HPLC-ESI-IT (modelo Deca-XP de Thermo-Finnigan), trabajando en modo SIM (monitorización de iones aislados), de manera que el analizador sólo fragmentara el péptido candidato. A las masas peptídicas reconocibles se les asignó su serie (denominada b_n o y''_n , en función del transcurso de la fragmentación). En el espectro inferior, procedente de la muestra fosforilada, se encuentra una masa correspondiente a la serie Δb_8 (en el disco naranja) indicativa de la fosforilación en la treonina presente en el péptido analizado. Se identificó asimismo la masa total del péptido (dentro del óvalo amarillo) en ambos casos. En la ventana en miniatura insertada en la parte derecha de la Figura, se recoge la información acerca de la elución diferencial, de la columna de HPLC, del mismo péptido procedente de la muestra fosforilada y la control. Dada su mayor hidrofilia, el péptido fosforilado eluye unas décimas de segundo antes.

La Figura 9 muestra que los mutantes de p38 T123A y T123D no son fosforilados por GRK2 *in vitro*. Figura 9A: Se confeccionaron mediante mutagénesis dirigida las proteínas p38T123A y p38T123D, fusionadas a GST, en los plásmidos de expresión procariotas pGEX2T. Se ensayó, en las condiciones ya descritas de fosforilación, la capacidad de las proteínas recombinantes GST-p38T123A y GST-p38T123D de ser sustrato de GRK2, en comparación con la proteína silvestre GST-p38WT y a las concentraciones finales indicadas en la Figura. Los paneles superiores son representativos de la fosforilación obtenida (32 P) y los paneles inferiores muestran, por WB anti-p38N, la cantidad de proteína recombinante utilizada en los ensayos. Figura 9B: Esquema representativo de p38 α donde se resaltan características funcionales como la extensión del dominio quinasas, la ubicación dentro del mismo del segmento de activación TGY y de la secuencia LTDD hipotéticamente regulada por GRK2. Se destaca también el motivo CD, inicialmente involucrado en la regulación de la asociación de sustratos y activadores.

La Figura 10 demuestra que la treonina 123 es un residuo altamente conservado, ubicado en la superficie exterior del surco de anclaje a activadores y sustratos de p38. Los alineamientos múltiples que se presentan fueron confeccionados por el programa ClustalX (<http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/ClustalX/>) por el Dr. Perdiguero. Los guiones introducen discontinuidades (*gaps*) para ajustar el alineamiento. Con letra roja sobre fondo amarillo se resaltan los residuos idénticos entre todas las isoformas, con fondo azul y fondo verde se indican las sustituciones conservativas, según su mayor o menor distribución, respectivamente, entre las proteínas alineadas. Sobre fondo blanco se dejan los aminoácidos no conservados. Al pie de cada alineamiento múltiple se indica el consenso (*consensus*) y mediante elipses rojas se destaca la zona de la treonina 123, señalada, además en la comparación de secuencias de la parte inferior con una flecha.

La Figura 11 revela que el mutante p38T123D no es activable por MKK6_{CAM} y carece de actividad quinasas sobre ATF2 *in vitro*. Figura 11A: Se realizaron ensayos de fosforilación (Hepes 25 mM pH 7,5; acetato magnésico 10 mM,

ES 2 357 681 T3

NaF 15 mM, 50 μ M ATP y [γ - 32 P]ATP 1000-2000 cpm/pmol) *in vitro* con las proteínas de fusión GST-p38WT, GST-p38T123A y GST-p38T123D (150 nM) como sustratos de fosforilación de MKK6_{CAM} (40 ng) recombinante (Upstate Biotechnology). Las reacciones se dejaron transcurrir a 30°C durante 30 minutos y se separaron las proteínas en geles SDS-PAGE al 8%. Se visualizó por tinción con Azul de Coomassie la cantidad de p38 en cada punto. A
5 continuación se determinó la radiactividad incorporada en cada isoforma de p38. La autorradiografía (32 P) muestra un experimento representativo de tres ensayos independientes, llevados a cabo por duplicado. Figura 11B: En estos mismos ensayos, se evaluó también la capacidad de GST-p38WT, GST-p38T123A y GST-p38T123D activadas por MKK6_{CAM} de fosforilar 2 μ g de GST-ATF2. Se acompaña la autorradiografía representativa (32 P) del control de GST-ATF2 total (Azul de Coomassie).

10 La Figura 12 presenta que la treonina 123 de p38 es necesaria para su correcta actividad catalítica sobre el sustrato MEF2A. Figura 12A: Se confeccionaron fosforilaciones *in vitro* con las proteínas de fusión indicadas en la Figura, en presencia (+) o ausencia (-) de MKK6_{CAM} (40 ng) recombinante y 2 μ g de GST-MEF2A. Se dejó transcurrir el ensayo durante 30 minutos. Se separaron las proteínas en SDS-PAGE al 8%, se tiñeron con CBB y se reveló la radiactividad
15 incorporada (32 P). Se aportan paneles de un experimento representativo de los tres realizados independientemente. Figura 12B. Se evaluó la actividad basal de las tres proteínas de fusión de p38 en ausencia del activador MKK6_{CAM}, en las ya descritas condiciones. Se presenta una autorradiografía representativa, tras larga exposición.

20 La Figura 13 muestra que el mutante de p38 T123D se activa menos que la p38 silvestre por MKK6_{CAM} *in situ*. En experimentos de sobreexpresión análogos a los descritos anteriormente, se transfectaron células HEK293, sembradas en M6 y siempre por duplicado, con: 150 ng de pCDNA3-Flag-p38 α WT, o pCDNA3-Flag-p38 α T123D y 50 ng de pCDNA3-MKK6_{CAM}, (o pCDNA3 vacío). Se evaluó la activación de las p38 con el anticuerpo anti-fosfo-p38. Para cada una de las dos isoformas se refirió la activación por MKK6_{CAM} a la situación basal, obteniéndose un determinado nivel de activación. Se estableció 100% de activación como la activación de p38 α WT en cada experimento. Se
25 muestran datos (\pm SEM) de tres experimentos independientes. Se realizó la prueba t de Student bilateral y se obtuvo: * p <0,0001. Los paneles de la derecha (Western blot) son ilustrativos de uno de los experimentos.

30 La Figura 14 muestra que el mutante T123D de p38 no se une a los sustratos y no se asocia a, o no es fosforilado por, MKK6. GST-p38 purificada y sus mutantes T123 (300 nM) fueron incubados en presencia de MKK6 purificada (3 nM) o con una cola de histidinas MAPKAPK2 (MK2, 20 nM) en un ensayo de precipitación (pull down) con GST como control negativo. Las proteínas sedimentadas fueron reveladas mediante un Western blot utilizando anticuerpos anti-MKK6, anti-histidina (para His-MK2) o anti-GST (para cantidades totales de GST-p38s). En todos los paneles, los resultados son representativos de 3 experimentos independientes realizados por duplicado.

35 La Figura 15 muestra cómo GRK2 reduce la diferenciación de fibroblastos a adipocitos dependiente de p38. Se confeccionaron líneas 3T3L1 establemente transfectadas con pCDNA3-GRK2 y pCDNA3-GRK2K220R. Se incluyen controles de expresión de GRK2 (anti-GRK2) obtenidos en las líneas celulares, en comparación los niveles en 3T3L1. Se sometió a las células al tratamiento estándar de diferenciación y en el día 15 de ésta, se fijaron las células con formalina y se tiñeron con Oil Red, colorante lipofílico que se une a las grasas acumuladas por los adipocitos. Se
40 contabilizaron al microscopio las células con fenotipo adipocítico (en rojo), en un total de 25 campos. Se muestran fotografías representativas de dos experimentos independientes por duplicado. Se incluye asimismo una foto de las células 3T3L1, exentas de la estimulación con insulina durante el proceso de diferenciación (control). En la gráfica se refleja el recuento de adipocitos (\pm SEM) en estos experimentos. Se realizó la prueba t de Student bilateral para cada línea estable con respecto a las 3T3L1 y se obtuvo: * p <0,0001. Se efectuaron en paralelo controles de la dependencia
45 de p38 mediante tratamiento farmacológico con SB203580 10 μ M.

50 La Figura 16 representa el reconocimiento por el anticuerpo anti-fosfo-Thr123 de la p38 inmunoprecipitada a partir de células humanas en cultivo y la fosforilación de p38 por GRK2 *in vitro*. Figura 16A: Las células HEK293 fueron transfectadas con vectores de expresión para Flag-p38alfa de ratón y GRK2 o su mutante inactivo (GRK2-K220R). Las células se cultivaron durante 16 horas sin suero antes de la lisis. Se inmunoprecipitó (IPP) flag-p38 mediante un anticuerpo anti flag (M2) y, tras electroforesis y transferencia, se detectó la proteína fosforilada en la Thr123 mediante Western Blot (WB) con un anticuerpo específico purificado en columnas de afinidad (P-p38-T123, dilución 1:200). Se reveló la misma membrana con anti-p38 total (p38) y otra membrana correspondiente a las proteínas contenidas en los extractos celulares antes de inmunoprecipitación (Lisados) con un anti-GRK2 436-689(GRK2). Figura 16B: Se
55 incubó GST-p38 (50 nM) sola, con GRK2 purificada (150 nM) o con 40 ng de MKK6_{CAM} constitutivamente activa en tampón de fosforilación en presencia de ATP no marcado radiactivamente durante 30 minutos a 30°C. El panel superior se reveló con un anticuerpo policlonal frente a la Thr123 de p38 en forma fosforilada. El panel intermedio se incubó con el anticuerpo fosfoespecífico de los restos Thr180/Tyr182 de p38 (Anti-Pp38) y en el revelado inferior se utilizó un anticuerpo contra p38 total.

60 La Figura 17 muestra que un anticuerpo anti-fosfo reconoce la p38 fosforilada por GRK2 en la treonina 123 ya que el mutante T123A de p38 no es reconocido en esas condiciones. GST-p38wt y GST-p38T123A (70 nM) fueron incubados solos, con GRK2 purificada (25 nM) o con MKK6_{CAM} recombinante (2 ng). Se añadió heparina (100 ng/ μ l), un inhibidor específico de GRK2, en donde se indica. La fosforilación de las proteínas GSTp38 fue analizada
65 por medio de un Western blot con un anticuerpo anti-fosfo-T123 y el GST-p38 total con anticuerpo anti-GST. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes.

ES 2 357 681 T3

La Figura 18 muestra los niveles de activación de p38 y de secreción de TNF en respuesta a lipopolisacárido de macrófagos extraídos de ratones parcialmente deficientes en GRK2. Se aislaron macrófagos peritoneales procedentes de ratones C57BL/6 silvestres (+/+) o hemicigotos para GRK2 (+/-). Tras someterlos a ausencia de estimulación durante 2 horas, se añadió al medio de cultivo lipopolisacárido bacteriano (LPS: 0,5 µg/ml) durante 16 horas. Se cuantificó la producción de citoquinas inflamatorias (TNFα) mediante un kit comercial de ELISA (Biotrak, de Amersham). Para confirmar la dependencia de este proceso de la actividad p38, se utilizó SB203580 (30 µM) 30 minutos antes de añadir LPS. Se muestran las medias±SD de 10 ratones procesados en 4 experimentos independientes. Los datos corresponden a la secreción de TNFα derivada de 106 células por pocillo de M24. *, p<0,005 (según la prueba T de Student).

10 Descripción detallada de la invención

En un aspecto, la invención se relaciona con una proteína MAPK, en la que dicha proteína MAPK es una proteína p38, en ocasiones identificada en esta descripción como “proteína MAPK de la invención”, seleccionada entre:

15 a) una proteína MAPK que comprende un resto fosforilado en un sitio de fosforilación diferente al sitio o sitios de fosforilación presentes en el segmento de activación de dicha proteína MAPK, o un fragmento de dicha proteína que comprende dicho resto fosforilado, en donde

20 - dicho sitio de fosforilación diferente es el resto de treonina en posición 123 (Thr123) de la p38, isoforma α, de ratón, o un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente en otra proteína MAPK tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos, y

25 - la fosforilación en dicho sitio de fosforilación diferente impide la activación de dicha proteína MAPK y también su actividad hacia sus sustratos; y

b) una proteína MAPK que comprende una carga negativa o un resto voluminoso en un sitio de fosforilación, o en el área que rodea a dicho sitio de fosforilación, que es diferente al sitio o sitios de fosforilación presentes en el segmento de activación de dicha proteína MAPK, o un fragmento de dicha proteína que comprende dicho resto fosforilado, en donde

30 - dicho sitio de fosforilación diferente es el resto de treonina en posición 123 (Thr123) de la p38, isoforma α, de ratón, o un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente en otra proteína MAPK tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos, y

35 - la introducción de dicha carga negativa o de dicho resto voluminoso en dicho sitio de fosforilación, o en el área que rodea a dicho sitio de fosforilación, impide la activación de dicha proteína MAPK y también su actividad hacia sus sustratos.

40 Tal como aquí se utiliza, el término “posicionalmente equivalente” se refiere a la posición de un aminoácido de una proteína MAPK que, por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de proteínas MAPK, corresponde a la Thr123 de p38, isoforma α, de ratón.

45 El término “proteína MAPK” incluye a las proteínas quinasas ERK, JNK y p38, así como a sus respectivas isoformas, de cualquier especie. Información sobre dichas quinasas y sus funciones así como sobre sus efectos celulares puede encontrarse en la revisión efectuada por Pearson y col. [Pearson G., *et al.*, 2001, “Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: Regulation and Physiological Functions”, *Endocrine Reviews* 22(2):153-183]. Información sobre las secuencias de aminoácidos de dichas proteínas MAPK puede encontrarse en bases de datos apropiadas conocidas por los expertos en la materia (e.g., Swissprot, NCBI, etc.). Las quinasas MAPK se encuentran ampliamente distribuidas entre las distintas especies y su estructura primaria está ampliamente conservada entre los distintos miembros de las distintas familias (ERK, JNK y p38).

Las proteínas MAPK se caracterizan, entre otras cosas, por la existencia de un segmento de activación que comprende, al menos un resto susceptible de ser fosforilado por la quinasa apropiada.

55 En una realización particular, dicho segmento de activación comprende la tríada de aminoácidos de fórmula (I)



60 donde

Thr es treonina,

Tyr es tirosina, y

65 Xaa es el resto de un aminoácido.

ES 2 357 681 T3

En una realización particular, Xaa es el resto de un aminoácido seleccionado entre ácido aspártico, ácido glutámico, glutamina, glicina y prolina.

En el caso particular de la p38 de mamífero, isoforma α , el segmento de activación comprende tríada de aminoácidos de fórmula (I) en las posiciones 180-182 de su secuencia de aminoácidos.

En otra realización particular, dicho segmento de activación comprende la tríada de aminoácidos de fórmula (II)



donde

Ser es serina,

Glu es ácido glutámico, y

Gly es glicina.

La proteína MAPK de la invención es una quinasa p38. La quinasa p38 se encuentra ampliamente distribuida entre las distintas especies y su estructura primaria está ampliamente conservada (Figura 10). En una realización particular, dicha p38 es una p38, en cualquiera de sus isoformas (α , β , γ , o δ), de mamífero, por ejemplo, de humano, roedor, etc. En una realización concreta, dicha p38 es la isoforma α de la p38 de ratón (*Mus musculus*) cuya secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID NO: 1 (GenBank, número de Acceso P47811).

Los inventores han encontrado, sorprendentemente, que la fosforilación de una proteína MAPK, en la que dicha proteína MAPK es una proteína p38, en un sitio susceptible de fosforilación diferente al sitio o sitios de fosforilación presentes en el segmento de activación de dicha proteína MAPK, es capaz de inhibir la activación de dicha proteína MAPK, activación que, como es conocido, transcurre vía fosforilación de los restos susceptibles de fosforilación (e.g., treonina o tirosina) presentes en dicho segmento de activación, por ejemplo, en concreto, en dicha tríada de aminoácidos a la que se ha hecho referencia previamente.

De hecho, estudios realizados por los inventores han puesto de manifiesto que la fosforilación de un resto de treonina en la posición 123 (Thr123) de la p38 de ratón, isoforma α , impide la fosforilación de los restos de treonina y tirosina presentes en las posiciones 180 y 182, respectivamente, de la tríada de aminoácidos de la fórmula (I) presente en el segmento de activación de dicha p38. Como consecuencia de ello, la p38 no se puede activar y, por tanto, no puede desempeñar su función en la cascada de transducción de señales, lo que puede resultar de especial utilidad en el tratamiento de aquellas enfermedades donde está implicada la activación de dicha MAPK en la cascada de señalización celular.

El experto en la materia entenderá que, no solo la fosforilación en dicho nuevo sitio de fosforilación, sino también la introducción de una carga negativa o de un resto voluminoso en dicho nuevo sitio de fosforilación, o en el área que rodea a dicho sitio, puede también causar el efecto de impedir la activación de una proteína MAPK, en la que dicha proteína MAPK es una proteína p38, y su actividad hacia sus sustratos.

Por tanto, la invención enseña la existencia de un nuevo sitio de fosforilación presente en una proteína MAPK, en la que dicha proteína MAPK es una proteína p38, en donde dicho sitio de fosforilación es diferente al sitio o sitios de fosforilación presentes en el segmento de activación de dicha proteína MAPK, tal como la Thr123 de la p38, isoforma α , de ratón, o bien un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente en otra proteína MAPK tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos, y, además, tiene la particularidad de que, una vez fosforilado, es capaz de inhibir la activación de dicha proteína MAPK.

La localización concreta de dicho sitio de fosforilación diferente puede variar dependiendo de la proteína MAPK en cuestión (ERK, JNK o p38), la isoforma y la especie del animal aunque no su función de impedir la activación de la proteína MAPK en cuestión tras su fosforilación (o tras la introducción de una carga negativa o de un resto voluminoso en dicho sitio de fosforilación o en el área que rodea a dicho sitio) ni su correspondencia o equivalencia posicional. Cualquier proteína MAPK, en la que dicha proteína MAPK es una proteína p38, que contienen dicho sitio de fosforilación con las características de posición y funcionalidad mencionadas previamente queda incluida dentro del ámbito de la presente invención. Por tanto, la proteína MAPK de la invención no solo incluye la proteína p38, isoforma α , de ratón, fosforilada en Thr123 sino sus proteínas ortólogas, es decir, proteínas, que procediendo de un gen ancestral común, desempeñan la misma función en las distintas especies, así como sus isoformas, independientemente de que el sitio de fosforilación se encuentre en dicha localización (Thr123) o en otra posición distinta y el aminoácido fosforilado sea un aminoácido diferente a treonina.

Adicionalmente, la proteína MAPK de la invención también incluye una proteína MAPK modificada, en la que dicha proteína MAPK es una proteína p38, que tiene una carga negativa o un resto voluminoso en el nuevo sitio de fosforilación o en el área que rodea a dicho sitio, por ejemplo, una proteína p38 de ratón, isoforma α , que contiene

una carga negativa o un resto voluminoso en la Thr123, o en el área que rodea a dicho sitio, y también sus proteínas ortólogas, así como sus isoformas, independientemente de si la carga negativa o el resto voluminoso está en dicha localización (Thr123) o en otra posición diferente y de si el aminoácido modificado es un aminoácido diferente a la treonina. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de cargas negativas que pueden ser introducidas en el nuevo sitio de fosforilación, o en el área que rodea a dicho sitio, según la invención, serán evidentes para un experto en la materia, por ejemplo, cualquier molécula o compuesto capaz de proporcionar una carga negativa, e.g., un péptido que lleva un grupo fosfato, siendo capaz dicho péptido de unirse a dicho sitio de fosforilación, o al área que lo rodea, y mimetizar el efecto de la fosforilación en dicho sitio. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de restos voluminosos que pueden ser introducidos en el nuevo sitio de fosforilación, o en el área que rodea a dicho sitio, según la invención, serán evidentes para un experto en la materia, por ejemplo, cualquier molécula, e.g., un péptido o un compuesto de bajo peso molecular, capaz de unirse a dicho sitio de fosforilación, o al área que lo rodea, y mimetizar el efecto de la fosforilación en ese sitio; aunque los inventores no desean estar vinculados por ninguna teoría, se cree que dicho residuo voluminoso puede ocasionar un cambio conformacional en la proteína MAPK que impide la activación de dicha proteína MAPK y también su actividad hacia sus sustratos. Tal como aquí se utiliza, la expresión “en el área que rodea al (nuevo) sitio de fosforilación” significa una región alrededor del sitio de fosforilación en la que una modificación introducida en ella por medio de una carga negativa o de un resto voluminoso impide la activación de dicha proteína MAPK y también su actividad hacia sus sustratos. Ensayos adecuados para determinar el efecto de impedir o inhibir la activación de una proteína MAPK y su actividad hacia sus sustratos pueden encontrarse en el Ejemplo que acompaña a esta descripción; en consecuencia, dicha información puede ser utilizada por el experto en la materia para identificar dicha “área que rodea el sitio de fosforilación”.

En una realización particular, la proteína MAPK de la invención es un fragmento de una proteína MAPK, en la que dicha proteína MAPK es una proteína p38, que comprende un resto fosforilado en un sitio de fosforilación diferente al sitio o sitios de fosforilación presentes en el segmento de activación de dicha proteína MAPK, en donde, como se ha mencionado previamente, dicho sitio de fosforilación diferente es la Thr123 de la p38, isoforma α , de ratón, o un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente en otra proteína MAPK tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos, y la fosforilación en dicho sitio de fosforilación diferente impide la activación de dicha proteína MAPK.

La longitud de dicho fragmento puede variar dentro de un amplio intervalo, por ejemplo, entre 3 y 30 restos de aminoácidos, típicamente, entre 5 y 25 restos de aminoácidos, preferentemente, entre 10 y 20 restos de aminoácidos. No obstante, si se desea, dicho fragmento, puede contener un mayor número de restos de aminoácidos. Ventajosamente, dicho fragmento comprende un epítipo de una proteína MAPK de la invención. En una realización particular, dicho fragmento comprende la SEQ ID NO: 2 correspondiente al epítipo QKLpTDDHVQFLIY, donde “pT” representa el resto de Thr123 fosforilado y el resto de las letras indica la notación de los aminoácidos en base al código de una sola letra, de la quinasa p38, isoforma α , de ratón. Dicho epítipo se encuentra altamente conservado a lo largo de la evolución, por lo que dicha SEQ ID NO: 2 puede considerarse como una secuencia consenso de dicho epítipo entre las proteínas ortólogas de p38 de las distintas especies.

En otra realización particular, la proteína MAPK de la invención es un fragmento de una proteína MAPK, en la que dicha proteína MAPK es una proteína p38, que comprende una carga negativa o un resto voluminoso en un sitio de fosforilación (o en el área que rodea a dicho sitio) que es diferente al sitio o sitios de fosforilación presentes en el segmento de activación de dicha proteína MAPK, en donde, como se ha mencionado previamente, dicho sitio de fosforilación diferente es la Thr123 de la p38, isoforma α , de ratón, o un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente en otra proteína MAPK tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos, y dicha modificación (carga negativa o resto voluminoso) en dicho sitio de fosforilación diferente impide la activación de dicha proteína MAPK. La longitud de dicho fragmento puede variar dentro de un amplio intervalo, por ejemplo, entre 3 y 30 restos de aminoácidos, típicamente, entre 5 y 25 restos de aminoácidos, preferentemente, entre 10 y 20 restos de aminoácidos. No obstante, si se desea, dicho fragmento, puede contener un mayor número de restos de aminoácidos. Ventajosamente, dicho fragmento comprende un epítipo de una proteína MAPK de la invención.

Se conocen numerosas patologías en las que están implicadas la activación de MAPK. A modo ilustrativo, no limitativo, se conoce la relación existente entre distintas enfermedades y p38 en forma activa, es decir, fosforilada en los restos de fosforilación presentes en el segmento de activación, por ejemplo, en los restos de Thr180 y Tyr182 de la p38, isoforma α , de mamífero (ratón). Por tanto, el hecho de que se pueda impedir la activación de la MAPK, en la que dicha proteína MAPK es una proteína p38, (impidiendo la fosforilación en los sitios de fosforilación presentes en el segmento de activación de la MAPK) por fosforilación del, o por introducción de una carga negativa o de un resto voluminoso en el, nuevo sitio de fosforilación, o en el área que rodea a dicho nuevo sitio de fosforilación, de dichas MAPK identificado en la presente invención (e.g., la fosforilación en Thr123 impide la fosforilación en los restos de Thr180 y Tyr182 de p38, isoforma α , de mamífero (ratón)), y también el hecho de que la fosforilación o la introducción de una carga negativa o de un resto voluminoso en la Thr123 o en el área que rodea a la Thr123 pueden impedir el anclaje y actividad de p38 hacia sus sustratos tienen importantes implicaciones biológicas que resultan de utilidad, entre otras posibles aplicaciones, en el diagnóstico de una patología mediada por una MAPK en forma activa, o para determinar el riesgo o predisposición de un sujeto a desarrollar dicha patología, o para evaluar o monitorizar el efecto de una terapia administrada a un sujeto que presente dicha patología, o para analizar el estadio o severidad y/o la evolución de dicha patología, así como en la identificación de compuestos potencialmente útiles para el tratamiento de dicha patología. En este sentido, la proteína MAPK de la invención puede jugar un papel destacado.

ES 2 357 681 T3

El término “sujeto” incluye a cualquier miembro de una especie animal, incluido el ser humano; a modo ilustrativo, dicho sujeto puede ser un mamífero, tal como un ser humano, un animal doméstico, un roedor, etc., preferentemente un hombre o mujer de cualquier edad y raza.

5 La expresión “patología mediada por una MAPK en forma activa”, tal como aquí se utiliza incluye a cualquier patología en la que interviene o desempeña algún papel una MAPK en forma activa, es decir, fosforilada en los restos de fosforilación presentes en el segmento de activación. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dicha patología mediada por una MAPK en forma activa incluyen cáncer así como enfermedades cardíacas, infecciosas, neuronales, pulmonares e inflamatorias. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichas enfermedades incluyen infarto de miocardio, hipertrofia, hipertensión, miocarditis, lesiones causadas por angioplastia, disfunciones miocárdicas, infecciones causadas por virus o bacterias, muerte neuronal y de otros tipos celulares, enfermedad de Alzheimer, psoriasis, artritis reumatoides, neuritis autoinmune, enfermedad de Crohn, cáncer (carcinomas, leucemias, linfomas, sarcomas, etc.), formación de trombos, respuesta a agentes quimioterapéuticos y radioterapéuticos, respuesta a isquemia/reperfusión, etc.

15 Por tanto, aquí se describe que la proteína MAPK de la invención es una proteína útil como marcador de diagnóstico o de predisposición de un sujeto a desarrollar una patología mediada por una MAPK en forma activa, por ejemplo, cáncer o una enfermedad cardíaca, infecciosa, nerviosa, neuronal, pulmonar o inflamatoria. Puesto que la presencia de MAPK en forma activa está asociada con las patologías mediadas por MAPKs en forma activa arriba mencionadas, la identificación de la proteína MAPK de la invención sería indicativa de un menor riesgo o predisposición a desarrollar dicha patología ya que la fosforilación en el sitio de fosforilación identificado en la presente invención, o la introducción de una carga negativa o de un resto voluminoso en dicho sitio de fosforilación o en el área que rodea a dicho sitio, impediría la activación de dicha MAPK. En una realización particular, dicha proteína MAPK de la invención es una proteína p38 de mamífero fosforilada en un sitio de fosforilación diferente al sitio o sitios de fosforilación presentes en el segmento de activación de dicha p38 de mamífero, por ejemplo, una p38 de mamífero fosforilada en Thr123, o un fragmento de dicha proteína que comprende dicho resto fosforilado.

También se describe un método *in vitro* para analizar el riesgo o predisposición de un sujeto a desarrollar una patología mediada por una MAPK en forma activa, que comprende:

- 30 a) detectar y/o cuantificar el nivel de una proteína MAPK de la invención en una muestra biológica procedente de dicho sujeto; y
- 35 b) comparar dicho nivel con el de una muestra control,
- en donde una reducción en dicho nivel respecto al de la muestra control es indicativo de riesgo del sujeto a desarrollar dicha patología mediada por una MAPK en forma activa.

40 Prácticamente cualquier muestra biológica procedente del sujeto a estudiar puede ser utilizada, por ejemplo, sangre, suero, plasma, tejido, etc. Dicha muestra puede ser obtenida por métodos convencionales. La muestra control es una muestra procedente de sujetos que no padecen dicha patología mediada por una MAPK en forma activa e incluye valores de referencia o basales.

45 La detección y/o cuantificación del nivel (concentración) de dicha proteína MAPK de la invención puede ser determinada por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, mediante métodos inmunométricos (véase más adelante).

50 Asimismo, se describe que la proteína MAPK de la invención puede ser utilizada para evaluar o monitorizar el efecto de una terapia administrada a un sujeto que presente dicha patología mediada por una MAPK en forma activa, por ejemplo, cáncer o una enfermedad cardíaca, infecciosa, nerviosa, neuronal, pulmonar o inflamatoria. En este sentido, un tratamiento que impida la activación de la MAPK, por ejemplo, fosforilando en el sitio de fosforilación identificado en la presente invención, permitiría analizar el efecto de una terapia administrada a un sujeto que presente dicha patología y, en caso de que no resulte eficaz, modificar el tratamiento o diseñar una terapia personalizada. En una realización particular, dicha proteína MAPK de la invención es una proteína p38 de mamífero fosforilada en un sitio de fosforilación diferente al sitio o sitios de fosforilación presentes en el segmento de activación de dicha p38 de mamífero, por ejemplo, una p38 de mamífero fosforilada en Thr123, o un fragmento de dicha proteína que comprende dicho resto fosforilado.

60 También se describe que la proteína MAPK de la invención también puede ser utilizada para analizar el estado o severidad y/o la evolución de dicha patología mediada por una MAPK en forma activa, por ejemplo, cáncer o una enfermedad cardíaca, infecciosa, nerviosa, neuronal, pulmonar o inflamatoria. En este sentido, la identificación de una proteína MAPK de la invención sería indicativa de una mejor evolución de ese tipo de patologías. En una realización particular, dicha proteína MAPK de la invención es una proteína p38 de mamífero fosforilada en un sitio de fosforilación diferente al sitio o sitios de fosforilación presentes en el segmento de activación de dicha p38 de mamífero, por ejemplo, una p38 de mamífero fosforilada en Thr123, o un fragmento de dicha proteína que comprende dicho resto fosforilado.

ES 2 357 681 T3

También se describe un método *in vitro* para evaluar o monitorizar el efecto de una terapia administrada a un sujeto que presente dicha patología mediada por una MAPK en forma activa, o para analizar el estadio o severidad y/o la evolución de dicha patología mediada por una MAPK en forma activa, que comprende

- 5 a) detectar y/o cuantificar el nivel de una proteína MAPK de la invención en una muestra biológica procedente de dicho sujeto; y
- b) comparar dicho nivel con el de una muestra control procedente del mismo sujeto.

10 La comparación entre ambos niveles será indicativa de la eficacia del tratamiento y/o de la evolución de la patología. Por ello, en este caso, la muestra control es una muestra del propio sujeto antes de administrarle el tratamiento o en periodos posteriores a la administración del tratamiento para analizar la eficacia del mismo y la evolución de la patología.

15 La detección y/o cuantificación del nivel (concentración) de dicha proteína MAPK de la invención puede ser determinada por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, mediante métodos inmunoquímicos (véase más adelante).

20 La proteína MAPK de la invención también puede ser utilizada para identificar compuestos potencialmente útiles para el tratamiento de dicha patología mediada por una MAPK en forma activa, en la que dicha proteína MAPK es una proteína p38, por ejemplo, cáncer o una enfermedad cardíaca, infecciosa, nerviosa, neuronal, pulmonar o inflamatoria. En este sentido, pueden utilizarse en el tratamiento de dichas enfermedades cardíacas, infecciosas, nerviosas, neuronales, pulmonares o inflamatorias compuestos que impidan la activación de dicha MAPK; asimismo, para el tratamiento
25 del cáncer, pueden utilizarse compuestos que defosforilen la MAPK de la invención ya que la activación de dichas MAPKs tras someter a un sujeto a quimioterapia o radioterapia produce la señal que induce la muerte de células tumorales. En una realización particular, dicha proteína MAPK de la invención es una proteína p38 de mamífero fosforilada en un sitio de fosforilación diferente al sitio o sitios de fosforilación presentes en el segmento de activación de dicha p38 de mamífero, por ejemplo, una p38 de mamífero fosforilada en Thr123, o un fragmento de dicha proteína que
30 comprende dicho resto fosforilado, o una proteína p38 que tiene un compuesto unido a Thr123 o al área que rodea a la Thr123 e imita la presencia de la carga negativa de un fosfato o un resto voluminoso en la Thr123 o en el área que rodea a la Thr123.

35 En una realización particular, la invención proporciona un método *in vitro* para identificar un compuesto potencialmente útil para el tratamiento de patologías mediadas por proteínas MAPK, en la que dicha proteína MAPK es una proteína p38, que comprende:

- a) poner en contacto el compuesto candidato con una proteína MAPK,
- 40 b) detectar la fosforilación de dicha proteína MAPK en un sitio de fosforilación diferente al sitio o sitios de fosforilación presentes en el segmento de activación de dicha proteína MAPK, y
- c) analizar si dicho sitio de fosforilación (i) es la Thr123 de la p38, isoforma α , de ratón (en caso de que la proteína MAPK utilizada haya sido dicha proteína), o un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente en otra proteína MAPK tal y como se define por alineamiento múltiple de
45 secuencias de aminoácidos, y si (ii) la fosforilación en dicho sitio de fosforilación diferente impide la activación de dicha proteína MAPK;

o, alternativamente,

- 50 i) poner en contacto el compuesto candidato (e.g., un compuesto capaz de fosforilar dicha proteína MAPK o un compuesto que mimetiza el efecto de dicha fosforilación) con una proteína MAPK;
- 55 ii) detectar la fosforilación de dicha proteína MAPK en un sitio de fosforilación del segmento de activación de dicha proteína MAPK para medir el efecto del compuesto candidato sobre la activación de la proteína MAPK, o detectar el efecto de mimetizar dicha fosforilación sobre dicha proteína MAPK para medir el efecto del compuesto candidato sobre la activación de la MAPK;
- 60 iii) analizar la actividad de dicha proteína MAPK en presencia del compuesto candidato hacia sus sustratos para evaluar la posible inhibición del anclaje y/o actividad de la proteína MAPK sobre sus sustratos en presencia de un compuesto competidor; y
- 65 iv) analizar (i) si dicho sitio de fosforilación en la Thr123 de la proteína p38, isoforma α , de ratón (en caso de que la proteína MAPK utilizada haya sido dicha proteína) es afectado por el compuesto candidato, y (ii) si la fosforilación en dicho sitio de fosforilación impide la activación de dicha proteína MAPK.

El compuesto candidato puede ser, en una realización particular, un compuesto capaz de fosforilar una proteína MAPK (e.g., una quinasa, etc.) o un compuesto que mimetiza el efecto de dicha fosforilación, en contacto con una proteína MAPK. El compuesto competidor puede ser, en una realización particular, un compuesto capaz de fosforilar una proteína MAPK (e.g., una quinasa, etc.).

La fosforilación de una proteína puede determinarse por cualquier método convencional conocido por los expertos en la materia. Se conocen diversos ensayos para determinar el estado de fosforilación de una proteína, o el resto de aminoácido que se encuentra fosforilado en una determinada proteína, como por ejemplo los ensayos de actividad quinasa *in vitro* utilizando ATP marcado radioactivamente; la electroforesis bidimensional de las proteínas así fosforiladas y marcadas (que permite analizar cuántos restos de aminoácidos están fosforilados en una proteína); espectrometría de masas de la proteína previamente purificada cuyo estado de fosforilación se quiere medir; mutagénesis dirigida seguida de ensayo de actividad quinasa *in vitro* con las proteínas purificadas; análisis de fosfo-péptidos que implica la separación en dos dimensiones de una proteína fosforilada tras digestión por tripsina o, el menos complicado técnicamente, Western blot, que contempla el empleo de anticuerpos contra dicha proteína que reconocen de manera específica el resto de aminoácido o el epítipo de la proteína que se encuentra fosforilado. Las técnicas para detectar restos fosforilados en proteínas son ampliamente conocidas por el experto en la materia y están recogidas en el estado de la técnica.

En una realización particular, dicha proteína MAPK es una quinasa p38, tal como una p38 de mamífero, y la fosforilación se lleva a cabo en el resto de Thr123 presente en dicha p38 de mamífero, isoforma α .

En otro aspecto, la invención se relaciona con un anticuerpo capaz de unirse a una proteína MAPK de la invención, en la que dicha proteína MAPK es una proteína p38, y/o capaz de detectar dicha proteína MAPK de la invención, en donde dicho anticuerpo es capaz de reconocer específicamente el resto de aminoácido Thr123 fosforilado o un epítipo de dicha proteína MAPK que comprende el Thr fosforilado.

Tal como se utiliza en esta descripción, el término “anticuerpo” pretende incluir tanto anticuerpos quiméricos o recombinantes como anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales o fragmentos proteolíticos de los mismos, tales como fragmentos, Fab o F(ab')₂, etc. Además, el ADN que codifica para la región variable del anticuerpo puede insertarse en otros anticuerpos para producir de este modo anticuerpos quiméricos. Los anticuerpos de cadena sencilla (scFv) pueden ser polipéptidos compuestos por cadenas sencillas que poseen la capacidad propia de un anticuerpo de unión a un antígeno y que comprenden un par de secuencias de aminoácidos homólogas o análogas a las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas de una inmunoglobulina (unión VH-VL o scFv). Los polipéptidos análogos a las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo pueden unirse, si se desea, a través de un polipéptido de unión. Métodos para la producción de anticuerpos son ampliamente conocidos por el experto en la materia y están recogidos en el estado de la técnica.

A modo ilustrativo, el anticuerpo proporcionado por esta invención es un anticuerpo capaz de unirse y/o detectar un epítipo presente en dicha proteína MAPK de la invención, en donde dicha proteína MAPK es una proteína p38, y en donde dicho anticuerpo es capaz de reconocer específicamente el resto de aminoácido THR123 fosforilado o un epítipo de dicha proteína MAPK que comprende el Thr123 fosforilado. En una realización particular, dicha proteína MAPK de la invención es una proteína p38 de mamífero fosforilada en un sitio de fosforilación diferente al sitio o sitios de fosforilación presentes en el segmento de activación de dicha p38 de mamífero, por ejemplo, una p38 de mamífero fosforilada en Thr123, o un fragmento de dicha proteína que comprende dicho resto fosforilado. En una realización concreta, dicho anticuerpo es capaz de unirse a un epítipo comprendido en un fragmento de la quinasa p38 de mamífero, comprendiendo dicho fragmento un resto de Thr123 fosforilado, o un resto posicionalmente equivalente (correspondiente) en otras proteínas p38 MAPK. En otra realización concreta, dicho anticuerpo es un anticuerpo capaz de unirse al epítipo que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2, epítipo altamente conservado a lo largo de la evolución, por lo que dicha SEQ ID NO: 2 puede ser considerada como una secuencia consenso de dicho epítipo entre las proteínas homólogas de p38 de las distintas especies.

También se describe un compuesto capaz de unirse a una proteína MAPK de la invención que se une a dicha proteína MAPK en el nuevo sitio de fosforilación identificado en esta invención [es decir, la Thr123 de la p38, isoforma α , de ratón, o un resto de un aminoácido posicionalmente equivalente en otra proteína MAPK tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos], o en el área que rodea a dicho sitio, provocando dicho compuesto una fosforilación reducida de la proteína MAPK en el segmento de activación y, por medio de eso, impide su activación y/o actividad hacia sus sustratos, por ejemplo, un compuesto que introduce una carga negativa o un resto voluminoso bien en dicho sitio de fosforilación o bien en el área que rodea a dicho sitio. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dicho compuesto incluyen:

- (i) un compuesto capaz de unirse a la región de anclaje (“docking”) de p38 y capaz de mimetizar la introducción de una carga negativa (e.g., un grupo fosfato) en dicha región, e.g., la introducción de una carga negativa o de un resto voluminoso en la Thr123 (o en el área que la rodea) de la p38, isoforma α , de ratón, o un resto de un aminoácido posicionalmente equivalente en otra proteína MAPK tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos, y la asociación de dicho compuesto en dicho sitio de fosforilación Thr123, o en el área que rodea a dicha Thr 123, impide la activación de dicha proteína MAPK;

ES 2 357 681 T3

- (ii) un compuesto capaz de unirse a la región de anclaje de p38 y capaz de mimetizar la introducción de una carga negativa (e.g., un grupo fosfato) en dicha región, e.g., la introducción de una carga negativa o de un resto voluminoso en la Thr123 (o en el área que la rodea) de la p38, isoforma α , de ratón, o un resto de un aminoácido posicionalmente equivalente en otra proteína MAPK tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos, y la asociación de dicho compuesto en dicho sitio de fosforilación Thr123, o en el área que rodea a dicha Thr 123, impide la actividad de dicha proteína MAPK hacia sus sustratos.

Adicionalmente, se describe el empleo de dicho compuesto capaz de unirse a una proteína MAPK de la invención y/o capaz de detectar dicha proteína MAPK de la invención para analizar el riesgo o predisposición de un sujeto a desarrollar una patología mediada por una MAPK en forma activa, o para evaluar o monitorizar el efecto de una terapia administrada a un sujeto que presente dicha patología, o para analizar el estadio o severidad y/o la evolución de dicha patología, así como en la identificación de compuestos potencialmente útiles para el tratamiento de dicha patología.

También se describe un vector, que comprende:

- (i) una secuencia de ácido nucleico que codifica un compuesto que fosforila un sitio de fosforilación diferente al sitio o sitios de fosforilación presentes en el segmento de activación de una proteína MAPK, en donde dicho sitio de fosforilación diferente es la Thr123 de la p38, isoforma α , de ratón, o un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente en otra proteína MAPK tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos, y la fosforilación en dicho sitio de fosforilación diferente impide la activación de dicha proteína MAPK; o
- (ii) una secuencia de ácido nucleico que codifica un compuesto que impide la fosforilación de un sitio de fosforilación diferente al sitio o sitios de fosforilación presentes en el segmento de activación de una proteína MAPK; o
- (iii) un compuesto que fosforila un sitio de fosforilación diferente al sitio o sitios de fosforilación presentes en el segmento de activación de una proteína MAPK, en donde dicho sitio de fosforilación diferente es la Thr123 de la p38, isoforma α , de ratón, o un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente en otra proteína MAPK tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos, y la fosforilación en dicho sitio de fosforilación diferente impide la activación de dicha proteína MAPK; o
- (iv) un compuesto que impide la fosforilación en un sitio de fosforilación diferente al sitio o sitios de fosforilación presentes en el segmento de activación de una proteína MAPK.

En una realización particular, dicha proteína MAPK es una quinasa p38 de mamífero y la fosforilación tiene lugar en un sitio de fosforilación diferente al sitio o sitios de fosforilación presentes en el segmento de activación de dicha p38 de mamífero, por ejemplo, en la Thr123 de una p38 de mamífero.

El vector puede ser un vector viral o un vector no viral, los cuales son conocidos por los expertos en la materia, y pueden ser utilizados en terapia, por ejemplo, en terapia génica.

En una realización particular, el vector comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un compuesto que fosforila un sitio de fosforilación diferente al sitio o sitios de fosforilación presentes en el segmento de activación de una proteína MAPK, en donde dicho sitio de fosforilación diferente es la Thr123 de la p38, isoforma α , de ratón, o un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente en otra proteína MAPK tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos, y la fosforilación en dicho sitio de fosforilación diferente impide la activación de dicha proteína MAPK, o bien, un compuesto que fosforila dicho sitio de fosforilación diferente al sitio o sitios de fosforilación presentes en el segmento de activación de una proteína MAPK, en donde dicho sitio de fosforilación diferente es la Thr123 de la p38, isoforma α , de ratón, o un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente en otra proteína MAPK tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos, y la fosforilación en dicho sitio de fosforilación diferente impide la activación de dicha proteína MAPK. La fosforilación en dicho sitio de fosforilación diferente produce la inhibición de la actividad de dicha proteína MAPK, por lo que dicho vector de la invención puede ser útil para el tratamiento de patologías mediadas por MAPKs en forma activa.

En otra realización particular, el vector comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un compuesto que impide la fosforilación de un sitio de fosforilación diferente al sitio o sitios de fosforilación presentes en el segmento de activación de una proteína MAPK o un compuesto que impide la fosforilación de dicho sitio de fosforilación diferente al sitio o sitios de fosforilación presentes en el segmento de activación de una proteína MAPK, tal como, por ejemplo, un inhibidor de una quinasa, tal como un inhibidor de la quinasa GRK2 o bien una fosfatasa que de-fosforilase dicho sitio de fosforilación. Al impedir la fosforilación de dicho sitio de fosforilación, se puede promover la activación de la proteína MAPK, lo cual puede ser particularmente interesante para el tratamiento del cáncer en donde la existencia de proteínas MAPKs en forma activa tras someter a un sujeto a radioterapia o quimioterapia conduce a la muerte

ES 2 357 681 T3

de células tumorales. Por tanto, en este caso, el vector puede ser útil para el tratamiento de patologías mediadas por MAPKs en forma activa, en particular, del cáncer.

5 En una realización concreta del vector, el compuesto que fosforila un sitio de fosforilación diferente al sitio o sitios de fosforilación presentes en el segmento de activación de una proteína MAPK es una quinasa, o un fragmento de la misma funcionalmente activo capaz de desempeñar la función propia de dicha quinasa, por ejemplo, la quinasa GRK2 o un fragmento funcionalmente activo de la misma, que, como se pone de manifiesto en esta invención fosforila el resto de Thr123 presente en una p38 de mamífero, tal como la p38 de ratón, isoforma α .

10 En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo capaz de unirse a una proteína MAPK y/o capaz de detectar dicha proteína MAPK, en donde dicha proteína MAPK es una proteína p38 seleccionada de

15 a) una proteína MAPK que comprende un resto fosforilado en un sitio de fosforilación que es diferente del sitio o sitios de fosforilación presentes en el segmento de activación de dicha proteína MAPK, o un fragmento de dicha proteína que comprende dicho resto fosforilado, en donde

20 - dicho sitio de fosforilación diferente es el resto de treonina en posición 123 (Thr123) de la p38, isoforma α , de ratón, o un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente en otra proteína MAPK tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos, y

- la fosforilación en dicho sitio de fosforilación diferente impide la activación de dicha proteína MAPK y también su actividad hacia sus sustratos; y

25 b) una proteína MAPK que comprende una carga negativa o un resto voluminoso en un sitio de fosforilación, o en el área que rodea dicho sitio de fosforilación, que es diferente del sitio o sitios de fosforilación presentes en el segmento de activación de dicha proteína MAPK, o un fragmento de dicha proteína que comprende dicho resto fosforilado, en donde

30 - en donde dicho sitio de fosforilación diferente es el resto de treonina en la posición 123 (Thr123) de la p38, isoforma α , de ratón, o un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente en otra proteína MAPK tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos, y

35 - la introducción de una carga negativa o un resto voluminoso en dicho sitio de fosforilación, o en el área que rodea dicho sitio de fosforilación, impide la activación de dicha proteína MAPK y también su actividad hacia sus sustratos, y

40 en donde dicho anticuerpo es capaz de reconocer específicamente el resto de aminoácido Thr123 fosforilado o un epítipo de dicha proteína MAPK que comprende el Thr123 fosforilado junto con, opcionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 En una realización particular, dicho anticuerpo es capaz de unirse a un epítipo que comprende un fragmento de la quinasa p28 de mamífero, comprendiendo dicho fragmento un resto de Thr123 fosforilado, o un resto posicionalmente equivalente en otras proteínas MAPK p38. En otra realización, dicho anticuerpo es capaz de unirse a un epítipo que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2.

50 Para su administración en la prevención y/o tratamiento de una patología mediada por una MAPK en forma activa, los compuestos activos (incluyendo los vectores) se formularán en una composición farmacéutica apropiada, en la cantidad terapéuticamente efectiva, junto con uno o más vehículos, adyuvantes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

55 Ejemplos de composiciones farmacéuticas incluyen cualquier composición sólida (e.g., comprimidos, cápsulas, gránulos, etc.) o líquida (e.g., soluciones, suspensiones, emulsiones, etc.) para su administración por cualquier vía de administración apropiada, por ejemplo, oral, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, etc., típicamente, por vía oral debido al carácter generalmente crónico de la enfermedad a tratar.

60 En una realización particular, dichas composiciones farmacéuticas pueden estar en una forma farmacéutica de administración por vía oral, bien en forma sólida o líquida. Ejemplos ilustrativos de formas farmacéuticas de administración por vía oral incluyen comprimidos, cápsulas, granulados, soluciones, suspensiones, etc., y pueden contener los excipientes convencionales, tales como aglutinantes, diluyentes, desintegrantes, lubricantes, humectantes, etc., y pueden ser preparadas por métodos convencionales. Las composiciones farmacéuticas también pueden ser adaptadas para su administración parenteral, en forma de, por ejemplo, soluciones, suspensiones o productos liofilizados, estériles, en la forma de dosificación apropiada; en este caso, dichas composiciones farmacéuticas incluirán los excipientes adecuados, tales como tampones, tensioactivos, etc. En cualquier caso, los excipientes se elegirán en función de la forma farmacéutica de administración seleccionada. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de fármacos y de su preparación puede encontrarse en el libro "Tratado de Farmacia Galénica", de C. Faulí i Trillo, 10 Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

ES 2 357 681 T3

En general, la cantidad terapéuticamente efectiva de compuesto (o vector) a administrar dependerá, entre otros factores, del sujeto que vaya a ser tratado, de la severidad de la patología que padezca dicho sujeto, de la forma de administración elegida, etc. Por este motivo, las dosis mencionadas en esta invención deben ser consideradas tan solo como guías para el experto en la materia, y éste debe ajustar las dosis en función de las variables citadas anteriormente.

5 No obstante, la composición farmacéutica de la invención se puede administrar una o más veces al día, por ejemplo, 1, 2, 3 ó 4 veces al día, en una cantidad típica total diaria comprendida entre 25 y 75 mg/kg/día.

La composición farmacéutica de la invención puede ser utilizada junto con otros fármacos adicionales útiles en la prevención y/o tratamiento de dichas patologías mediadas por MAPKs en forma activa para proporcionar una

10 terapia de combinación. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, pueden ser proporcionados en forma de una composición separada para su administración simultánea o no a la de la composición farmacéutica proporcionada por esta invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de

15

(i) un anticuerpo capaz de unirse a una proteína MAPK y/o capaz de detectar dicha proteína MAPK, en donde dicha proteína MAPK es una proteína p38 seleccionada de

a) una proteína MAPK que comprende un resto fosforilado en un sitio de fosforilación que es diferente del sitio o sitios de fosforilación presentes en el segmento de activación de dicha proteína MAPK, o un fragmento de dicha proteína que comprende dicho resto fosforilado, en donde

20

- dicho sitio de fosforilación diferente es el resto de treonina en posición 123 (Thr123) de la p38, isoforma α , de ratón, o un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente en otra proteína MAPK tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos, y

25

- la fosforilación en dicho sitio de fosforilación diferente impide la activación de dicha proteína MAPK y también su actividad hacia sus sustratos; y

b) una proteína MAPK que comprende una carga negativa o un resto voluminoso en un sitio de fosforilación, o en el área que rodea dicho sitio de fosforilación, que es diferente del sitio o sitios de fosforilación presentes en el segmento de activación de dicha proteína MAPK, o un fragmento de dicha proteína que comprende dicho resto fosforilado, en donde

30

- en donde dicho sitio de fosforilación diferente es el resto de treonina en la posición 123 (Thr123) de la p38, isoforma α , de ratón, o un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente en otra proteína MAPK tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos, y

35

- la introducción de una carga negativa o un resto voluminoso en dicho sitio de fosforilación, o en el área que rodea dicho sitio de fosforilación, impide la activación de dicha proteína MAPK y también su actividad hacia sus sustratos, y

40

en donde dicho anticuerpo es capaz de reconocer específicamente el resto de aminoácido Thr123 fosforilado o un epítipo de dicha proteína MAPK que comprende el Thr123 fosforilado; o

45

(ii) una proteína GRK2; o

(iii) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica GRK2;

50

en la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una patología mediada por MAPKs en forma activa, donde dicha proteína MAPK es una proteína p38 de mamífero y la patología es constricción aórtica, fallo cardíaco seguido de enfermedad coronaria avanzada, fallo cardíaco congestivo o artritis reumatoide.

55

En una realización particular, dicha proteína MAPK es una quinasa p38 de mamífero y la fosforilación tiene lugar en un sitio de fosforilación diferente al sitio o sitios de fosforilación presentes en el segmento de activación de dicha p38 de mamífero, por ejemplo, en la Thr123 de una p38 de mamífero.

60

En una realización particular, dicho anticuerpo es capaz de unirse a un epítipo comprendido en un fragmento de la quinasa p38 de mamífero, comprendiendo dicho fragmento un resto Thr123 fosforilado, o un resto posicionalmente equivalente en otras proteína MAPK p38. En otra realización, dicho anticuerpo es capaz de unirse a un epítipo que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2.

65

En una realización particular, dicho compuesto es la quinasa GRK2 que fosforila la Thr123 de la p38, isoforma α , de mamífero (ratón).

ES 2 357 681 T3

En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit que comprende una proteína MAPK de la invención, o un anticuerpo capaz de unirse a una proteína MAPK y/o capaz de detectar dicha proteína MAPK, en donde dicha proteína MAPK es una proteína p38 seleccionada de

- 5 c) una proteína MAPK que comprende un resto fosforilado en un sitio de fosforilación que es diferente del sitio o sitios de fosforilación presentes en el segmento de activación de dicha proteína MAPK, o un fragmento de dicha proteína que comprende dicho resto fosforilado, en donde
- 10 - dicho sitio de fosforilación diferente es el resto de treonina en posición 123 (Thr123) de la p38, isoforma α , de ratón, o un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente en otra proteína MAPK tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos, y
- 15 - la fosforilación en dicho sitio de fosforilación diferente impide la activación de dicha proteína MAPK y también su actividad hacia sus sustratos; y
- d) una proteína MAPK que comprende una carga negativa o un resto voluminoso en un sitio de fosforilación, o en el área que rodea dicho sitio de fosforilación, que es diferente del sitio o sitios de fosforilación presenten en el segmento de activación de dicha proteína MAPK, o un fragmento de dicha proteína que comprende dicho resto fosforilado, en donde
- 20 - en donde dicho sitio de fosforilación diferente es el resto de treonina en la posición 123 (Thr123) de la p38, isoforma α , de ratón, o un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente en otra proteína MAPK tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos, y
- 25 - la introducción de una carga negativa o un resto voluminoso en dicho sitio de fosforilación, o en el área que rodea dicho sitio de fosforilación, impide la activación de dicha proteína MAPK y también su actividad hacia sus sustratos, y

30 en donde dicho anticuerpo es capaz de reconocer específicamente el resto de aminoácido Thr123 fosforilado o un epítipo de dicha proteína MAPK que comprende el Thr123 fosforilado.

35 En una realización particular, dicho anticuerpo es capaz de unirse a un epítipo comprendido en un fragmento de la quinasa p38 de mamífero, comprendiendo dicho fragmento un resto Thr123 fosforilado, o un resto posicionalmente equivalente en otra proteína MAPK p38. En otra realización, dicho anticuerpo es capaz de unirse a un epítipo que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2.

40 El kit aquí descrito puede ser utilizado en el diagnóstico de una patología mediada por una MAPK en forma activa, o para determinar el riesgo o predisposición de un sujeto a desarrollar dicha patología, o para evaluar o monitorizar el efecto de una terapia administrada a un sujeto que presente dicha patología, o para analizar el estadio o severidad y/o la evolución de dicha patología, así como en la identificación de compuestos potencialmente útiles para el tratamiento de dicha patología. En una realización concreta, dicha proteína MAPK es una quinasa p38 de mamífero fosforilada en la Thr123 de una p38 de mamífero, isoforma α .

45 También se describe un método de tratamiento de una patología mediada por una MAPK en forma activa, en donde dicha proteína MAPK es una proteína p38, que comprende administrar a un sujeto en necesidad de tratamiento una composición farmacéutica proporcionada por esta invención.

50 El siguiente ejemplo ilustra la invención y no trata de limitar el alcance de la misma.

Ejemplo

Fosforilación de la Thr123 de la proteína p38 por la enzima GRK2

55 I. Materiales y Métodos

Productos

60 Todos los reactivos y productos utilizados son de grado analítico. Cloruros sódico, cálcico, amónico, manganésico y magnésico, fosfatos sódicos y potásicos, carbonatos sódicos, hidróxido sódico, acetato sódico, sacarosa, urea, Tris, formaldehído, paraformaldehído, glicina, ácido acético glacial, ácido clorhídrico, metanol, etanol, butanol y glicerol fueron suministrados por Merck. ATP (adenosín trifosfato), fluoruro sódico, ácido desoxicólico, EDTA (ácido etilendiaminetetraacético), EGTA (ácido etilenglicol Bis (2-aminoetilenéter)-N-N-N'-N'-tetraacético), β -mercaptotanol, DTT (ditiotreitól), heparina, ortovanadato sódico, DMSO (dimetilsulfóxido), rojo Ponceau, HEPES (ácido N-(2-hidroxietil)piperazin-N'-2-etanosulfónico), Nonidet P-40, Tritón x-100, Tween-20, aprotinina, inhibidor de tripsina, azida sódica, Proteína A-Sepharose, fueron suministrados por Sigma. PMSF (fluoruro de fenil-metil-sulfonilo), benzamida, glutatión reducido, BSA (albúmina de suero bovino) y los antibióticos ampicilina y kanamicina así como el IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido) se obtuvieron de Roche. TEMED (N,N,N,N-tetrametil-etilendiamina),

ES 2 357 681 T3

SDS (dodecil sulfato sódico), persulfato amónico, azul de bromofenol, azul de Coomassie, patrones proteicos preteñidos de peso molecular conocido, papel de nitrocelulosa y reactivo de Bradford fueron proporcionados por Bio-Rad. El reactivo de Folin-Ciocalteu se obtuvo de Panreac, el TCA (ácido tricloroacético) de Carlo-Erba. El isótopo radiactivo [γ - 32 P] ATP fue proporcionado por Amersham Biosciences y la mezcla de marcaje metabólico [35 S] metionina-cisteína fue suministrada por New England Nuclear.

Construcciones y plásmidos empleados

Se han utilizado en esta memoria los plásmidos siguientes:

GRKs

- La construcción de pCMV-GRK3 de rata fue cedida por la Dra. S. Cotecchia, de la Universidad de Lausanne, Suiza.

- Las construcciones pCDNA3-GRK2 bovina, pCDNA3-GRK2-K220R bovina pCDNA3-GRK5 fueron cedidas por el laboratorio del Dr. J. L. Benovic de la Universidad Thomas Jefferson en Filadelfia, E.E.U.U.

- La construcción pCEFL-ADNc antisentido de GRK2 fue enviada por la Dra. C. Shayo.

Módulo de p38 MAPK

- El mutante constitutivamente activo pCDNA3-MKK6 β (E) (pCDNA3-MKK6 β (Glu): MKK6S207E/T211E ha sido proporcionado por el Dr. J. M. Redondo, del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (Madrid), quien asimismo, facilitó la construcción pCDNA3-Flag-p38 α de ratón y del vector de expresión procariota pGEX2T-p38 α .

- Los vectores pGEX4T-Mxi2 y pGEX4T-Mxi2 Δ 17, destinados a la producción de proteínas de fusión con GST, fueron donados por los Drs. P. Crespo y V. Sanz, de la Universidad de Cantabria.

Otros

- El vector vacío pCDNA3 es de Invitrogen.

- El plásmido pCEFL-EGFP lo proporcionó la Dra C. Murga (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa).

- La construcción pBC12BI- β_2 -AR fue cedida por la Dra. A. Ruiz-Gómez (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa).

- El mutante Raf-1YY340/341DD fue proporcionado por el doctor A. S. Dhillon, Beatson Institute for Cancer Research, Glasgow, U.K.

- pTrcHisB se obtuvo de Invitrogen.

Cultivos celulares

Líneas celulares establecidas

Se han utilizado diversas líneas celulares establecidas: las células HEK293 (riñón embrionario humano) se obtuvieron de Invitrogen, las células COS-7 (células de riñón de mono verde) y las células Sf9 (*Spodoptera frugiperda*), obtenidas de la ATCC (American Type Culture Collection). Las células HEK293 y COS-7 se crecieron en monocapa sobre placas individuales P-100, P-60 (Falcon) o placas multipocillo M6, M12 o M24 (Falcon, Costar) en medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con glutamina 2 mM, suero fetal de ternera al 10%, y una mezcla de antibióticos (50 μ g/ml gentamicina, 0,01% estreptomycinina y 0,063% penicilina G).

Asimismo se emplearon dos cultivos masivos de expresión estable de GRK2, generados a partir de células EBNA (derivada de HEK y transfectada con un plásmido que codifica el antígeno EBNA) y del vector pCDNA3-GRK2 con resistencia a neomicina, por lo que se cultivan en presencia de geneticina 200 μ g/ml (neomicina G418, Calbiochem).

La línea celular preadipocítica 3T3-L1, obtenida de la ATCC, así como las líneas estables generadas a partir de ella, se mantuvieron en medio DMEM, suplementado con glutamina y antibióticos y con 10% de suero de ternera neonatal (new born calf serum, NCS). Se añadió geneticina 750 μ g/ml a las poblaciones establemente transfectadas con pCDNA3-GRK2 y con pCDNA3-K220R. Las condiciones de la diferenciación a adipocitos se detallan más adelante.

Todos estos tipos celulares se incuban a 37°C en una atmósfera humidificada con 5-7% de CO₂.

Las células Sf9 se crecieron en suspensión a una densidad de 3x10⁵ células/ml con agitación a 150 rpm, o en monocapa en placas P-100 o P-150 en medio de Grace (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal de ternera y gentamicina (50 μ g/ml) a 27°C sin atmósfera de CO₂.

ES 2 357 681 T3

Se obtuvieron cultivos primarios de macrófagos murinos y se mantuvieron utilizando protocolos convencionales. Esencialmente, ratones C57BL/6 GRK2 +/+ y +/-, de 3 meses de edad, amablemente donados por el Dr. Marc Caron (Duke University, North Carolina) fueron inyectados intraperitonealmente con tioglicolato sódico (1 ml). Cuatro días después, se aislaron macrófagos peritoneales mediante un lavado intraperitoneal con 15 ml de PBS. Se sembraron un millón de células por pocillo sobre una placa M12, se dejaron adherir en medio RPMI suplementado con 0,5% de suero de ternera fetal (FCS) y se lavaron de forma extensiva. Los macrófagos resultantes fueron estimulados durante 16 horas a 37°C en una cámara humidificada con las concentraciones determinadas de LPS de *E. coli* (Sigma) in RPMI con 0,5% de FCS.

10 *Transfecciones*

Las transfecciones transitorias de las células HEK293 y COS-7 se llevaron a cabo en placas P-100 P-60 a una confluencia de entre el 70 y el 80%, por el método de Lipofectamine/PLUS, (Invitrogen). Aunque se emplearon protocolos alternativos de trasfección con reactivos como Fugene (Roche), JetPei (Poly Transfection) o Escort-II (Sigma), el procedimiento más utilizado fue el de lipofectamina. Resumidamente, un día antes de la transfección se plaquean $1,5 \times 10^6$ células (HEK293) por P-60 o correlativamente un número de células proporcional a la superficie de la placa empleada. A partir de este punto los protocolos se refieren a una placa P-60. Al día siguiente se prepara una mezcla (1) de ADN plasmídico de alta pureza (aislado en columnas de afinidad suministradas por Quiagen y resuspendido en agua MilliQ estéril) (3-5 μg en el caso de P-60), reactivo PLUS (8 μl para P-60) y OPTIMEM (Gibco, BRL), (250 μl para P-60) que se incuba 15 minutos a temperatura ambiente. En cada experimento se añade la cantidad de vector vacío necesaria (en general, pCDNA3) para mantener la cantidad total de ADN por placa constante. Paralelamente y en otro tubo se mezcla (2) la lipofectamina (12 μl para P-60) con OPTIMEM (250 μl para P-60) que se incuba igualmente. Transcurridos los 15 minutos, se mezclan en proporciones iguales (1) y (2), se incuba el preparado otros 15 minutos y finalmente se vierte sobre las placas (mezcla de reacción final: 0,5 ml para P-60), que previamente se han cubierto con OPTIMEM (2 ml por P-60). Se incuban las células a 37°C en el medio de transfección durante 3 horas, tiempo al cabo del cual se retira el medio de la transfección, reemplazándose por medio DMEM suplementado con suero al 10%. Al día siguiente, se cambia el medio por medio fresco y se deja que las células se recuperen, al menos durante 24 horas antes de procesar el cultivo para el experimento. En general, los tratamientos y la recolección y lisis de las células se produjeron a las 48 horas de la transfección.

30 *GRK2 y p38MAPK*

En los experimentos de asociación de GRK2 y Flag-p38 α se empleó una relación de 1:1:1 de GRK2 (o GRK2-K220R), Flag-p38 α , y receptor β_2 -adrenérgico (generalmente 1 μg de cada por p60).

En los ensayos de sobreexpresión de dosis crecientes de GRK2, se transfectaron células HEK293, sembradas normalmente en placas multipocillo de 6 o de 12 (M6 o M12) con pCDNA3-Flag-p38 α , pCDNA3-MKK6_{CAM}, y con cantidades crecientes del vector pCDNA3-GRK2 (indicadas en las Figuras). Generalmente, para una M6 se empleaban 100 ng de Flag-p38 α , 100 ng de MKK6_{CAM}, y de 0 a 1 μg de GRK2. En todos los puntos se completaba la cantidad total de ADN con pCEFL-EGFP y con pCDNA3 vacío, en sustitución de pCDNA3-MKK6_{CAM}, en el caso de los puntos control.

En las transfecciones de ADN antisentido de GRK2, en placas multipocillo M6, las cantidades de ADN empleadas fueron algo diferentes: 150 ng de pCDNA3-Flag-p38 α , 50 ng de pCDNA3-MKK6_{CAM}, y, de 0,5 μg a 2 μg del vector pCEFL-GRK2 antisentido (AS) o las mismas cantidades de pCEFL-EGFP. En todos los puntos se completó la cantidad total de ADN con el vector pCEFL vacío.

En ensayos de sobreexpresión análogos se transfectaron transitoriamente las células en M6 y siempre por duplicado, con: 150 ng de pCDNA3-Flag-p38 α WT, o pCDNA3-Flag-p38 α T123D y 50 ng de pCDNA3-MKK6_{CAM}, (o pCDNA3 vacío).

La expresión transitoria de las distintas proteínas se confirmó por análisis de los lisados celulares (aproximadamente un 10% del volumen total del lisado celular) por inmunodetección tras electroforesis (Western blot), con anticuerpos específicos como se especifica en cada caso.

55 *Tratamientos celulares*

Los tratamientos de estimulación de las células transfectadas transitoriamente se llevaron a cabo en todos los casos a las 48 horas de la transfección. Tras la estimulación con los distintos agentes, se lavaron las células en tampón fosfato salino (PBS) frío y se cosecharon con ayuda de un rascador. El tampón de lisis en el que se recogen depende de la inmunoprecipitación específica que se vaya a realizar (ver apartado de inmunoprecipitación).

La estimulación de células HEK293 con isoproterenol (Sigma), 10 μM se llevó a cabo a 37°C en medio de cultivo sin suero. En estos experimentos se mantuvieron las células sin suero (ayuno) durante unas 2 horas antes de la estimulación, con el fin de minimizar los estímulos procedentes de compuestos presentes en el suero.

La estimulación con NaCl 0,5 M (Merck) se realizó durante 15 minutos en el incubador de células.

ES 2 357 681 T3

Diferenciación de adipocitos

El cultivo de las células se realiza con medio DMEM al 10% de suero NCS. Sin embargo, todo el proceso de diferenciación que a continuación se explica ha de hacerse en medio con suero empobrecido AXC (resina de intercambio iónico) mediante sucesivas adsorciones del suero fetal de ternera a una resina de intercambio aniónico y a carbón activo. El suero AXC fue proporcionado por el servicio de cocinas del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Se crecen las células hasta su confluencia y se plaquean (5×10^5 en P-100) en medio DMEM-10% AXC, suplementado con $4 \mu\text{M}$ de biotina (Sigma). Al día siguiente, se reemplaza el medio por medio fresco. Se dejan crecer las células durante tres días más, hasta que alcancen de nuevo la confluencia, día que se denomina "0". El día 0 de la diferenciación, las células se cultivan en un medio que contiene: dexametasona $0,5 \mu\text{M}$ (Sigma), 3-isobutil-1-metilxantina $0,5 \text{ mM}$ (IMBX, de Sigma) y insulina $1 \mu\text{M}$ (Sigma) y en el cual permanecen por tres días más. El día 3 se reemplaza el medio con este tratamiento iniciador de la adipogénesis, por el medio DMEM-10% AXC, suplementado con $4 \mu\text{M}$ de biotina y insulina $1 \mu\text{M}$, en el cual va a transcurrir el resto de la diferenciación, reemplazado el medio cada tres días. A partir del día 6 y hasta el 15, se analizó la adipogénesis por medio de la tinción con Oil Red, colorante rojo de composición lipofílica que se une a las gotas de grasa que los adipocitos han acumulado en su citoplasma. Para ello, se fijan las células con formalina (formaldehído al 3,7%) durante 5 minutos y se lavan con PBS frío. Se incuba con una solución previamente filtrada 60:40 (v/v) de Oil Red (disuelto en isopropanol 0,2% p/v) y agua. Se lava abundantemente con PBS y se visualizan las células al microscopio óptico. Se procede al recuento de las células en un total de 25 campos por cada placa experimental.

Generación de mutantes

Mutantes puntuales

La mayoría de los mutantes fueron generados mediante el protocolo de mutagénesis dirigida de QuickChange de Stratagene. Resumidamente, se confeccionaron los oligos mutagénicos antiparalelos -que a continuación se reseñan para cada mutante en particular-, con los que se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un termociclador (Gene Amp[®] 9700, de Applied Biosystems), empleando como polimerasa termoestable Pfu. Los vectores íntegramente amplificados se digirieron con DpnI para eliminar el ADN parental o molde y el producto de la digestión se transformó en bacterias competentes, a partir de las cuales se pudo comprobar la incorporación de la mutación, por secuenciación en el SIDI (Servicio Interdepartamental de Investigación) con oligonucleótidos cebadores específicos de cada tipo de plásmido (Sp6, T7, T3, o los específicos para la secuenciación de proteínas clonadas en vectores pGEX).

p38T123A

- oligo FWD: 5' GTG AAG TGC CAG AAG CTG **GCC** GAC GAC CAC GTT

CAG 3' (SEQ ID NO: 3)

- oligo REV: 5' CTG AAC GTG GTC GTC **GGC** CAG CTT CTG GCA CTT

CAC 3' (SEQ ID NO: 4)

Los productos de la PCR mutagénica se secuenciaron con los oligonucleótidos cebadores SP6 y T7, que flanquean la ORF (marco abierto de lectura) de p38 en pCDNA3 o con los oligonucleótidos específicos para la secuenciación de la serie de plásmidos pGEX de Amersham.

p38T123D

- oligo FWD: 5' GTG AAG TGC CAG AAG CTG **GAC** GAC GAC CAC GTT

CAG 3' (SEQ ID NO: 5)

- oligo REV: 5' CTG AAC GTG GTC GTC **GTC** CAG CTT CTG GCA CTT CAC

3' (SEQ ID NO: 6)

Mutantes truncados

Se generó la proteína truncada GST-280-360p38, correspondiente a los 80 últimos aminoácidos de p38 α , utilizando el sistema de Gateway de Invitrogen. Este polivalente método de clonaje mediante recombinasas permite la expresión de la proteína o el fragmento proteico de interés en un gran número de plásmidos para huéspedes tanto eucariotas como

ES 2 357 681 T3

procariotas y con variados epítomos. Se adjuntan esquemas explicativos de los pasos que se siguieron: generación del vector de entrada (entry clone) y obtención del plásmido de expresión con GST.

En primer lugar, fue necesario el diseño de los oligonucleótidos que permitiesen incorporar las secuencias attB, blanco de las recombinasas, flanqueando la región de la ORF de p38 α que se quiere traducir. Se denominan GTW, de Gateway. En negrita se destaca la secuencia que después será reconocida por la recombinasa BP. El oligo GTW-FWD se confeccionó de manera que el primer aminoácido de p38 a traducir (Ala 281, subrayado en la secuencia nucleotídica) estuviera en fase con la secuencia attB1. El oligo GTW-REV incorpora el codón de terminación de la traducción (también subrayado). En la PCR se utilizó el plásmido pGEX2T-p38 α como molde.

- oligo GTW-FWD: 5' GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT

CGC TGT CGA CCT ACT GGA GAA GAT G 3' (SEQ ID NO: 7)

- oligo GTW-REV: 5' GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC

TCA GGA CTC CAT TTC TTC TTG GTC 3' (SEQ ID NO: 8)

El clonaje del producto de la PCR, de 240 pb en el vector pDONORTM201 se realizó mediante la reacción BP-clonasa (durante al menos 1 hora a 25°C) consistente en la recombinación, mediada por las secuencias attB, del producto de la PCR con el vector pDONOR. La reacción se detiene añadiendo Proteinasa-K 10 minutos a 37°C. El ADN, producto de la recombinación, se utiliza para transformar bacterias DH5 α , que son seleccionadas con kanamicina.

Seguidamente se eligió el plásmido de destino: pDEST15 que asegura la expresión procariota de la proteína en él clonada, como fusión, en fase desde las secuencias de recombinación, a GST. (También se introdujo el fragmento C-terminal de p38 en el plásmido de expresión eucariota pDEST27, pero dichos resultados se han omitido). La reacción LR-clonasa se realiza utilizando el clon de entrada (pDONOR-280-360p38) y el vector: pDEST15 linearizado, incubando con la mezcla enzimática LR-clonasa durante 1 hora a 25°C. La reacción se detiene incubando la muestra con Proteinasa-K 20 minutos a 37°C y el ADN obtenido, tras pertinente comprobación por secuenciación con los oligos attB, se utilizó para transformar bacterias BL21, a partir de las cuales se purificó la construcción GST-280-360 p38.

Subclonajes de ADN

Para la expresión y purificación de MAPKAPK2 (MK2) con una cola de histidina C-terminal, se obtuvo el plásmido pFtx5-MK2 Δ N1, deleciónado en una región rica en prolina del extremo N-terminal para una expresión más estable, a partir del Dr. Phil Cohen (University of Dundee, Escocia, UK) y se utilizó como molde en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los iniciadores:

5' GGG GCC ATG GTC AAG TCC GGC C 3' (SEQ ID NO: 9), y

5' CCCC CTC GAG GTG GGC CAG AGC CGC AGC 3' (SEQ ID NO: 10).

El producto se subclonó en NcoI-XhoI (en negrilla) en el vector pTrcHis2B (Invitrogen).

Proteínas y péptidos recombinantes purificados

MEKK6/MEKK3 activada fue proporcionada por Upstate.

La purificación de GRK2 la llevó a cabo la Dra. A. Ruiz-Gómez a partir de células Sf9 infectadas con construcciones de GRK2 en baculovirus.

La rodopsina se purifica a partir de retinas bovinas según métodos convencionales. Se obtiene así una preparación en la que la rodopsina supone más del 90% de la proteína (evidenciado por tinción con azul de Coomassie).

Las proteínas de fusión GST-p38, GST-ATF2, GST-MEF2A, GST-Mxi2, GST-Mxi Δ 17 y GST-280-360p38, GST-p38T123A y p38T123D se purificaron según métodos estándar que describimos brevemente: se transforman dichas construcciones en bacterias *E. coli* y se induce su expresión con IPTG. Las bacterias se sedimentan y lisan en Tris-HCl 10 mM pH 8, TritonX-100 1%, lisozima 2 mg/ml e inhibidores de proteasas, tras lo cual el lisado bacteriano se sonica y clarifica. Se carga en la columna glutatión-Sepharose4B[®] (AmershamBiosciences) y se pasa durante un mínimo de 3 horas, se lava la columna con PBS y después se eluyen las proteínas con Tris-HCl 50 mM pH 8, glutatión reducido 5 mM (Sigma). Se comprueba la pureza y la concentración de las proteínas obtenidas en geles desnaturizantes poliacrilamida-SDS. El origen de los plásmidos que codifican estas proteínas se especifica en el apartado anterior, o si, son de generación propia, se consigna donde procede.

ES 2 357 681 T3

Los sustratos específicos de p38 como MBP (proteína básica de mielina) o PHAS-I (proteína fosforilada calor y ácido estable regulada por insulina) se obtuvieron de SIGMA y de Stratagene, respectivamente. El péptido APRTPG-GRC, descrito como sustrato específico de MAPKs utilizado en reacciones de fosforilación con la quinasa p38, fue sintetizado por el Servicio Proteómica del CBMSO. Se disolvió a una concentración final de 0,5 mM en Tris 20 mM a pH 7,6.

La determinación de proteínas se realizó por el método de Bradford o por el método de Lowry y cols. utilizando albúmina de suero bovino como estándar para construir la recta patrón.

10 *Electroforesis*

Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS

Geles unidimensionales

Se utilizaron geles de poliacrilamida-SDS según el método descrito por Laemmli cuyos porcentajes de acrilamida-bisacrilamida oscilaban entre 7 y 12% en función de la resolución requerida por el experimento. Como patrones de peso molecular se emplearon las proteínas: miosina (200 kDa), β -galactosidasa (116,25 kDa), fosforilasa B (97,4 kDa), albúmina de suero bovino (66,2 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa), inhibidor de tripsina de soja (21 kDa) y lisozima (14 kDa) (Rainbow Markers, de Bio-Rad). En algunos casos, los geles se tiñeron con azul de Coomassie. Tras resolver las proteínas, el gel puede someterse a autorradiografía si las proteínas están marcadas con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, o a fluorografía si las proteínas están marcadas con $[\text{S}^{35}]\text{-metionina}$. En ambos casos, se requiere un paso de fijación en metanol:acético (50:10) durante 20 minutos. En los marcajes metabólicos se recurrió frecuentemente a la amplificación de la señal, incubando durante 20 minutos con Amplify (Amersham), para después secar el gel y exponerlo con una película de rayos X Agfa Curix RP2 de 100 NIF.

Geles bidimensionales

Con el fin de analizar el número de residuos sustrato de la fosforilación por GRK2 en p38 se incubaron ambas proteínas en las condiciones de reacción que se especifican más adelante. Las fosfo-proteínas resultantes se resolvieron en geles bidimensionales. El isoelectroenfoco o primera dimensión electroforética se confeccionó empleando una mezcla resolutive de anfólitos (BioRad), de rango final de pH de 3-10, en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 4%, con urea, 8 M. En ocasiones, la primera dimensión se realizó de manera alternativa empleando las tiras preensambladas de Biorad (IPG Strips, de rango de pH 3-10). La segunda dimensión se llevó a cabo en un gel del 8% (SDS-PAGE) y las fosfoproteínas se detectaron por autorradiografía.

Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa-TAE

La separación de fragmentos de ADN se realizó en geles de agarosa de desarrollo horizontal del 0,8-1%. El tampón de electroforesis utilizado fue TAE (Tris-acético 40 mM, EDTA 2 mM) y el tampón de carga de las muestras fue glicerol al 50%, EDTA 1 mM, azul de bromofenol al 0,4% y azul de xileno al 0,4%. Los patrones de peso molecular fueron los fragmentos de digestión enzimática con HindIII de los fagos y $\Phi 29$ (suministrados por el servicio de fermentación del Centro de Biología Molecular).

45 *Secuenciación Proteómica*

La determinación de la ubicación de la modificación post-traduccional de interés fue realizada por el Servicio de Proteómica del Nodo UAM (Universidad Autónoma de Madrid) de la Red Cardiovascular, englobado dentro del Servicio de Proteómica del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (http://www.cbm.uam.es/mkfactory.esdomain/webs/CBMSO/plt_Servicio_Pagina.aspx?IdServicio=29&IdObjeto=118).

Se separan electroforéticamente (SDS-PAGE 8%) las muestras y se tiñe el gel, prestando especial atención a los pasos de manipulación para minimizar las contaminaciones con queratinas, proteínas muy abundantes en el entorno. Las bandas a analizar se recortan del gel de poliacrilamida y se someten a digestión triptica (tripsina de Promega).

La mezcla de péptidos tripticos se analiza por MALDI-TOF: (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization- Time Of Flight, modelo Autoflex de Bruker). En resumen, las especies peptídicas se adsorben, por cristalización, a una matriz, tras lo cual, y por la incidencia de pulsos cortos de un láser, se desunen en forma protonada. Este método de ionización de la muestra está acoplado a un analizador del tiempo de vuelo. En efecto, los péptidos monocargados adquieren una energía cinética proporcional a su masa, y “vuelan” por un tubo de vacío hasta impactar con el detector. Una pequeña alícuota (0,5 μl) del sobrenadante de la digestión se analizó directamente en un espectrómetro de masas de tipo MALDI-TOF, modelo autoflex de Bruker, equipado con reflector, empleando DHB (ácido 2,5-dihidroxibenzoico) como matriz y una superficie Anchor-Chip (Bruker) como portamuestras. El espectro obtenido corresponde finalmente a los péptidos separados en función de la relación masa-carga (m/z). Se cotejaron los espectros de fragmentación de GST-p38 y de GST-p38 fosforilada por GRK2 y se halló un péptido candidato.

Para corroborar este indicio, se sometieron las muestras a otro tipo de análisis espectrométrico que permite la obtención de espectros de fragmentación (MS/MS) de péptido individuales: ionización por electrospray acoplada a

ES 2 357 681 T3

trampa iónica (ElectroSpray/Mass Spectrometry- Ionic Tramp ES/MS-IT, modelo Deca-XP de Thermo-Finnigan, San José, California, USA). Antes de la ionización y gracias a que ésta se puede llevar a cabo en un capilar, es decir con muestras líquidas, se separó el péptido candidato (previamente “sospechado” por MALDI-TOF) mediante RP-HPLC (cromatografía líquida de alta presión en fase reversa). Se empleó una columna de 180 μ m de diámetro interno (0,18 mm x 150 mm BioBasic 18 RP column de Thermo-Keystone) a un flujo de 1,5 μ l/m en modo micro-spray con una interface “metal needle-kit” (Thermo-Finnigan), con un gradiente de 5% al 60% de solvente B para la elución (90 minutos) de los péptidos. La cromatografía está acoplada al espectrómetro de masas de trampa iónica. En este proceso de fragmentación, las muestras se someten a un intenso campo eléctrico, como resultado de lo cual se generan gotas cargadas, que, tras evaporación del solvente, acaban emitiendo iones correspondientes a los péptidos de la mezcla muestral. Éstos pueden estar multiprotonados, preferentemente en el extremo N-terminal y en los residuos de histidina, arginina y lisina. El analizador de trampa iónica genera un campo eléctrico tridimensional que permite separar los iones procedentes de la ionización por electrospray. Se obtiene así finalmente un espectro de fragmentación o espectro MS/MS que, al trabajar “en modo SIM” (monitorización de iones aislados), se limita al espectro de fragmentación del péptido candidato. Las muestras se analizaron en modo de alta sensibilidad o modo “SIM”, monitorizándose las siguientes m/z: 937,51 y 977,51. Tras realizar una predicción teórica de las series de fragmentación del péptido “supuestamente” fosforilado, se asignan varios fragmentos de las series b e y” al espectro obtenido.

Inmuno-protocolos

En la Tabla I se recopilan los anticuerpos primarios utilizados.

Inmunodetección tras electroforesis (“Immunoblot o Western blot”)

Las muestras para el análisis (proteínas purificadas, lisados o fracciones subcelulares, etc) se resuelven en geles de poliacrilamida-SDS junto con patrones de peso molecular comerciales (Bio-Rad). Las proteínas así separadas se transfieren a un filtro de nitrocelulosa (Transblot de Bio-Rad) mediante transferencia líquida en tampón carbonato (Na_2CO_3 3 mM, NaHCO_3 10 mM, 20% metanol pH ϕ 10) durante 75 minutos (a 50 V en el caso de geles de 12 x 14 cm utilizando un Trans-Blot Cell de Bio-Rad, o bien a 30 V durante 120 minutos). Tras teñir la membrana de nitrocelulosa con rojo Ponceau, se incuba toda la noche a 4°C en medio TBS (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 150 mM) suplementado con leche en polvo desnatada (Molico) al 5% o BSA al 5%, con objeto de bloquear los posibles sitios de unión inespecífica. Tras descartar el medio de bloqueo, la membrana se pone en contacto con el anticuerpo correspondiente, diluido (Tabla I) en TBS-BSA 1%. Antes de incubar con el segundo anticuerpo (anti-inmunoglobulina de conejo unido a peroxidasa, cuando el primer anticuerpo es policlonal, y anti-inmunoglobulina de ratón para los monoclonales; ambos de Nordic Immunology) diluido 1:50.000, se lava la membrana tres veces (3 x 10 minutos) con TBS-Tween 20 al 0,15%. Finalmente, para el revelado se emplea un método quimioluminiscente en el que la peroxidasa cataliza la oxidación del sustrato luminol en presencia de H_2O_2 (ECL, Amersham). La cuantificación se realiza por densitometría láser de las películas expuestas (Molecular Dynamics 300A Computing Densitometer).

Se generó suero anti-fosfo-Thr123p38 policlonal en conejos, a través de Pacific Immunology, utilizando el péptido QKLpTDDHVQFLIYC, de la proteína p38 α de ratón, como inmunógeno, y, posteriormente, se purificó mediante dos pases seriados a través de columnas de afinidad de péptido y anti-fosfo péptido. El anticuerpo anti-His fue adquirido a Sigma.

Determinación de la actividad de p38 y de ERK

La determinación del grado de actividad de p38 y de ERK transfectadas promovida por los distintos estímulos activadores se realizó por un método de inmunodetección. Se utilizaron anticuerpos específicos que reaccionan sólo con la forma fosforilada y activada de estas quinasas (anti-fosfop38 y anti-fosfoERKs respectivamente (ver descripción en la tabla de anticuerpos).

Las células HEK293, generalmente sometidas a ayuno (medio sin suero) de duración variable: de 2 horas en el caso de p38 a toda la noche en el caso de ERK, se estimularon y, tras el procesamiento de los lisados celulares, se llevó a cabo la inmunodetección de las fosfoproteínas con los anticuerpos fosfo-específicos de los segmentos de activación de ambas proteínas. Tras el revelado de esta primera inmunodetección, se desprendieron los complejos inmunes con el tampón: SDS al 2%, β -mercaptoetanol 100 mM, TrisHCl 62,5 mM, pH 6,7 y se procedió a la reincubación de las membranas con los anticuerpos anti-p38 o anti-ERK totales. La cuantificación de las bandas se realizó en un densitómetro láser. En todos los casos, los valores obtenidos para las bandas detectadas con el anticuerpo anti-fosfo-proteína se normalizaron en relación a la cantidad total de p38 o ERK expresadas en las células. De esta forma se representa el aumento de estimulación de las diferentes quinasas con respecto a las condiciones basales. En algunos casos, sin embargo, dado el riesgo de interferencia del primer revelado en el segundo, se evaluó la activación mediante la densitometría de dos membranas distintas, reveladas separadamente, una con el anticuerpo fosfo-específico y la otra con el anticuerpo contra la proteína total.

Inmunoprecipitación

Las muestras o lisados celulares totales que van a ser sometidos a inmunoprecipitación se diluyen en diferentes tampones suplementados con inhibidores de proteasas (STI Soybean Tripsin Inhibitor) y benzamidina 100 μ g/ml, PMSF 200 μ g/ml y aprotinina 10 μ g/ml). Los tampones variaron según el anticuerpo utilizado en cada caso, como

ES 2 357 681 T3

se especifica a continuación. En todos los casos, tras dejar la lisis transcurrir durante un mínimo de 1 hora a 4°C, en agitación, se centrifugaron las muestras (24000 xg) y se tomaron alícuotas (10% aproximadamente) para confirmar la expresión de proteínas específicas. A la muestra restante se le añadió BSA (500 µg por p60) y la cantidad de anticuerpo que correspondiera en cada caso. Todas las inmunoprecipitaciones se desarrollaron a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se añadieron 30 µl al 50% de proteína A-Sepharose (Sigma) o la proteína G-Sepharose (Zymed), según el anticuerpo fuera policlonal o monoclonal respectivamente y se incubó a 4°C durante 90 minutos más. Este paso se omitió cuando los anticuerpos estaban covalentemente unidos a las resinas, en cuyo caso se añadían 5-10 µl de la “inmuno-resina”. Se recogieron los complejos inmunes por centrifugación y, tras descartar el sobrenadante, se lavaron 3-5 veces (800 xg, 5 minutos) con 10-15 ml de tampón de lavado.

Cuando el destino de los inmunoprecipitados eran reacciones de fosforilación, éstos se lavaban dos veces más (2 x 10-15 ml) con el tampón de incubación de la misma, sin ATP.

Las proteínas inmunoprecipitadas se resuspendieron en tampón de ruptura de electroforesis y generalmente se hirvieron durante 5 minutos para después cargar la muestra completa en un gel de poliacrilamida-SDS del porcentaje adecuado.

Tampón RIPA (radioimmunoprecipitation assay)

Este tampón de solubilización fue ampliamente utilizado, especialmente en las inmunoprecipitaciones de las GRKs: NaCl 300 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7,5, Nonidet P-40 2%, ácido desoxicólico 1%, y SDS 0,2%.

Tampón de inmunoprecipitación “M2 anti-flag”

Para las inmunoprecipitaciones con el anticuerpo M2 anti-flag, las células se cosecharon en: tampón fosfato sódico 10 mM pH 7,4 (preparado a partir de soluciones madre de NaHPO₄ y NaH₂PO₄ 0,1 M), NaCl 150 mM y 1% n-dodecil-β-D-maldósido. Tras la lisis, se completa hasta 300 µl (por placa p60) con el tampón salino compuesto por Tris-HCl 20 mM; NaCl 150 mM e inhibidores de proteasas. Finalmente los lavados de los inmunoprecipitados se hacen en el tampón compuesto por: Tris-HCl 50 mM pH 7.5, MgCl₂ 20 mM, 1% Tritón X-100, EDTA 1 mM, MgCl₂ 1 mM, NaF 15 mM, Pirofosfato 20 mM.

Experimentos de precipitación (“pull-down”)

Las proteínas GST, GST-p38wt, GST-p38T123A y GST-p38T123D fueron expresadas en bacterias y aisladas utilizando Gluthatione-Sepharose 4B (GE-Amersham) siguiendo procedimientos convencionales (Murga, C. *et al.* High affinity binding of beta-adrenergic receptor kinase to microsomal membranes. Modulation of the activity of bound kinase by heterotrimeric G protein activation. *J Biol Chem* 271, 985-994 (1996)). His-MAPKAPK2 fue purificado utilizando una resina Probond (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. MKK_{6CAM} fue comprado a Uptate Biotech. La cantidad de proteínas detallada en la leyenda de cada figura se incubó en tampón de unión (Tris 25 mM pH 7,5, NaCl 0,25 M, MgCl₂ 10 mM, NaF 5 mM y 0,5% de BSA) durante 30 minutos a 30°C con agitación constante. Se añadió ATP (50 µM) para que precipitara MAPKAPK2. Los precipitados se lavaron 3 veces (10 ml) con el mismo tampón conteniendo 0,5% de Triton X100. Los complejos precipitados se resolvieron mediante SDS-PAGE y se revelaron mediante Western Blot.

Ensayos de fosforilación

Fosforilación in vitro de proteínas recombinantes

Fosforilación de p38 por GRK2

Se incubaron GST-p38 y GRK2 recombinantes (ambas equimolares a 25-150 nM, salvo en los experimentos de cálculo de los parámetros cinéticos y en los que se especifica) en el tampón de fosforilación de p38 (Hepes 25 mM pH 7,5, acetato de magnesio 10 mM, ATP 50 µM, [γ -³²P] ATP 2000-3000 cpm/pmol) en un volumen final de 40 µl. Normalmente las reacciones de fosforilación se dejaron transcurrir durante 30 minutos a 30°C. En el caso de las electroforesis bidimensionales o de las muestras destinadas a la secuenciación proteómica, la reacción se alarga hasta 1 o 2 horas.

Los compuestos heparina y SB203580 (Calbiochem), inhibidores de GRK2 y de p38 respectivamente, se utilizaron a concentraciones de diez veces la IC₅₀ para asegurar la completa inhibición de sendas quinasas, esto es a 1,5 µM para la heparina y a 0,5 µM para el SB. Los sustratos empleados fueron MBP (14 µg por punto) o PHAS-I a una concentración final de 25 ng/µl para p38 y caseína (7,5 µg por punto) para GRK2.

El procesamiento de las muestras tras detenerla fosforilación es idéntico a los casos anteriores, salvo que la resolución de las proteínas se hace en un gel (SDS-PAGE) del 8%.

Las proteínas de fusión a GST: p38α, Mxi2, Mxi2Δ17 y 280-360 p38 (0,5 µg de cada una de ellas) se incubaron con GRK2 recombinante (200 nM), en tampón de fosforilación (Hepes 25 mM pH 7,5, acetato de magnesio 10 mM, ATP 50 µM, [γ -³²P] ATP 2000-3000 cpm/pmol) durante 30 minutos a 30°C. Se incluyó la heparina (150 nM) como

inhibidor específico de GRK2. Se pararon las reacciones por adición de tampón de ruptura con SDS. Se resolvieron las muestras en SDS-PAGE 8%. Con el fin de asegurar la inclusión de cantidades idénticas de proteína, primero se visualizaron en el gel por tinción con Azul de Coomassie. A continuación se secó el gel y se detectó la radiactividad incorporada a las proteínas (^{32}P).

Los mutantes puntuales de p38 en el hipotético sitio de fosforilación por GRK2 (T123) fueron generados y purificados como se ha descrito anteriormente y se sometieron a fosforilación por GRK2 en el tampón de fosforilación de p38 (Hepes 25 mM pH 7,5, acetato de magnesio 10 mM, ATP 50 μM , [γ - ^{32}P] ATP 2000-3000 cpm/pmol) en un volumen final de 40 μl . Se varió la concentración relativa (10-80 nM) de GRK2 y de las isoformas de p38, tal y como se reseña en las Figuras.

Fosforilación de p38 por MKK6_{CAM}

Se realizaron ensayos de fosforilación (Hepes 25 mM pH 7,5, acetato de magnesio 10 mM, NaF 15 mM, ATP 50 μM y [γ - ^{32}P]ATP 1000-2000 cpm/pmol) *in vitro* con las proteínas de fusión GST-p38 WT, GST-p38 T123A y GST-p38 T123D (150 nM) como sustratos de fosforilación de MKK6_{CAM} (40 ng) recombinante (Upstate Biotechnology). Como en los casos anteriores, las reacciones se dejaron transcurrir a 30°C durante 30 minutos y se separaron las proteínas en geles SDS-PAGE al 8%. Con el fin de asegurar la inclusión en los ensayos de cantidades idénticas de proteínas p38, se visualizaron los geles por tinción con Azul de Coomassie. A continuación se determinó la radiactividad incorporada en cada isoforma de p38.

Fosforilación del péptido APRTPGGRR por p38

Se inmunoprecipita de células HEK293, Flag-p38alpha con M2Anti-Flag-agarosa. Los inmunoprecipitados se lavan tres veces con 10-15 ml de tampón M2 y dos veces con otros tantos volúmenes de tampón de equilibrado de la fosforilación (NaF 15 mM, Hepes 25 mM pH 7,5 y acetato magnésico 10 mM). En el último lavado, se resuspenden los complejos inmunes-agarosa en 1 ml de tampón y separa un 10% de cada punto (100 μl) para controlar la inmunoprecipitación de Flag-p38. Con Flag-p38 inmunoprecipitada restante se llevan a cabo ensayos-quinasa, utilizando como sustrato el péptido APRTPGGRR. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 μl , en un tampón de fosforilación compuesto por Hepes 25 mM pH 7,5; acetato de magnesio 10 mM, NaF 15 mM, ATP 50 μM y [γ - ^{32}P] ATP 500-1000 cpm/pmol y 1-2 mM del péptido sustrato. Cuando se especifica, se añade SB203580 a la reacción *in vitro* a una concentración final de 0,5 μM . Se deja transcurrir la fosforilación durante 30 minutos a 30°C, tras lo cual se detiene por adición de 15 μl de TCA al 30%. Se precipitan las proteínas por centrifugación (25.000 xg, 15 minutos, 4°C) y se recupera, de cada reacción, el sobrenadante que contiene el péptido fosforilado. Recortes cuadrados (1 cm x 1 cm) de papel Whatman P81 se impregnan con el péptido en solución. Se dejaron secar, se lavan abundantemente con ácido fosfórico 75 mM y finalmente se cuantifica la radiactividad incorporada por el péptido adsorbido por cuantificación de la radiación de Cerenkov. La actividad de p38 sobre este péptido se refiere, en cada caso, a la radiactividad basal (o fondo) que se detecta en los puntos correspondientes únicamente al péptido.

Fosforilación de sustratos de ATF2 y MEF2A por p38

Se utilizaron las formas de ATF2 y MEF2A unidas a GST para poner a prueba la actividad catalítica de GST-p38. En la mayoría de los casos, se emplearon 2 μg de GST-ATF2 o GST-MEF2A, de producción propia. Las condiciones de fosforilación son las mismas que las expuestas en los anteriores casos. No obstante, en otras ocasiones, reseñadas pertinentemente en las Figuras, se emplearon 0,2 μg de sustrato y se dejó transcurrir la reacción de fosforilación únicamente durante 15 minutos.

Comparaciones de secuencias

Alineamientos de los ortólogos e isoformas de p38

Los alineamientos múltiples que se presentan fueron confeccionados con el programa ClustalX (<http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/ClustalX/>) y ajustados manualmente mediante la introducción de discontinuidades (*gaps*) por el Dr. Perdiguero, del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid.

Tratamiento matemático y estadístico de los datos

Los experimentos se realizaron, como mínimo, dos veces y en general los puntos se llevaron por duplicado o triplicado. Los datos se expresan como la media con la desviación estándar de la media ($\pm\text{SEM}$).

Para los cálculos de las constantes cinéticas de las reacciones enzimáticas, se asumió el comportamiento de Michaelis-Menten de las quinasa. Se confeccionaron los gráficos con el programa "Kaleidagraph", dotado de un algoritmo capaz de deducir los parámetros cinéticos: constante de Michaelis-Menten (K_m) y velocidad máxima ($V_{\text{max}}=V_0$ (nmol de PO_4^{3-} incorporado.mg de enzima $^{-1}$ minuto $^{-1}$)).

El análisis estadístico se realizó mediante el test de prueba "t de Student bilateral" (de dos colas) y n-1 grados de libertad donde la hipótesis nula es que no existe diferencia significativa entre la situación o condición cuya significatividad estadística queremos determinar y la situación control o basal. El valor correspondiente a la probabilidad

del cumplimiento de la hipótesis nula (p) obtenido en cada caso varió de $p < 0,001$ o $p < 0,0001$, como se detalla en las Figuras.

II. Resultados

5

Interrelaciones funcionales entre GRK2 y p38MAPK

p38 se fosforila por GRK2

10 Los investigadores de la invención han estudiado los mecanismos que rigen la modulación de la actividad de GRK2 y su expresión por MAPK, dada la implicación preponderante de GRK2 y sus receptores sustrato tanto en la fisiología cardiaca como en la etiología de las enfermedades cardiovasculares, como hipertensión, fallo cardiaco congestivo, o angina de pecho; y dada la conocida importancia del módulo de p38 MAPK en el desarrollo del miocardio y en su posterior funcionalidad. Existe una correlación inversa entre los niveles aumentados de GRK2 y la inactivación de p38 en fallo cardiaco congestivo. Además, los niveles de GRK2 están disminuidos en enfermedades de índole inflamatoria como por ejemplo la artritis reumatoide.

15 Por todas estas evidencias, se decidió acometer el estudio de las posibles interacciones entre GRK2 y p38. La primera aproximación experimental fueron ensayos de fosforilación de ambas proteínas. En la Figura 1, panel A, se muestra que GRK2 fosforila a p38. Para descartar la posibilidad de que se tratara de una autofosforilación de p38 promovida de alguna manera por la presencia de GRK2, se incluyó en los ensayos de fosforilación heparina (16 ng/ μ l), ampliamente empleado como inhibidor de GRK2, habiéndose cerciorado antes de que ésta no afectara a la actividad catalítica de p38. En este mismo panel se demuestra que la inhibición de la actividad catalítica de GRK2 conlleva una menor fosforilación de p38, por lo que directamente la actividad Ser/Thr quinasa de GRK2 es la responsable de la marca radiactiva incorporada en GST-p38. Estos experimentos fueron completados con controles negativos de fosforilación de GST por GRK2 y con el escrutinio de la zona de unión entre la porción GST y la ORF de p38.

20 Una reciente publicación describe la autofosforilación de p38 estimulada por su interacción con TAB1, para demostrar que este no era el caso de la invención se incluyó el piridinilimidazol SB203580, inhibidor competitivo por el ATP específico de p38, en ensayos de fosforilación. En el panel B de la Figura 1 se muestra el efecto del inhibidor SB203580 en la actividad catalítica de p38 sobre un sustrato genérico de ésta como MBP (proteína básica de mielina). Dado que la actividad basal de p38 α es nimia, no se aprecia gran fosforilación de MBP y aún así, se detecta la inhibición por SB203580. Los dos siguientes carriles informan de que el piridinilimidazol no afecta a la actividad quinasa de GRK2. Finalmente, las dos últimas calles de la autorradiografía muestran que no es la capacidad autofosforilativa de p38 lo que se potencia en presencia de GRK2. La conclusión final de estos experimentos descritos es que p38 se fosforila *in vitro* por GRK2.

25 Para comprobar que la fosforilación no estaba teniendo lugar en los residuos fosforilables por las quinasas (MAPKK) activadoras de p38 como MKK3 y MKK6, las reacciones de fosforilación se realizaron en frío (es decir, sin [γ - 32 P]-ATP) y la inmunodetección empleando el anticuerpo fosfoespecífico de Anti-P-p38 (Figura 1, sección C). Este anticuerpo reconoce epítomos fosforilados en la secuencia en la treonina 180 o en la tirosina 182 de p38. Como se aprecia en el panel inferior, sólo la presencia de la proteína recombinante MKK6 da lugar al reconocimiento de fosfo-p38 por el mencionado anticuerpo. En el panel superior se revelaron las proteínas totales con un anticuerpo anti-GRK2 que reconoce la GST (para ver GST-p38). Estos experimentos demuestran que GRK2 fosforila a p38 en un residuo distinto de la T180.

GRK2 fosforila a p38 de forma rápida y con alta afinidad

30 El estudio de los parámetros cinéticos de la reacción muestra que éstos son indicativos de la posibilidad de que la reacción tenga lugar *in vivo*. La Figura 1 versa sobre la caracterización cinética de la fosforilación. Inicialmente, se llevaron a cabo experimentos de curso temporal (panel D) en los que se comprueba que la fosforilación es rápidamente detectada (a los 5 minutos), estimándose un tiempo medio de 15 minutos para alcanzar el 50% de la fosforilación máxima. GRK2 es una quinasa ecléctica, capaz de fosforilar numerosos sustratos no particulados como tubulinas, sinucleínas, y fosducinas. La afinidad que GRK2 exhibe por sus sustratos es variable. Así, la K_m para las sinucleínas y para las β -tubulinas, dependiendo de los subtipos de ambas, está entorno a 1-2 μ M. En el caso de p38, el valor de la $K_m = 80$ nM (ver tabla de la Figura 1, panel E) está más cercano a lo descrito para otros sustratos fisiológicos de GRK2 como la fosducina y la proteína similar a fosducina (PhD y PhLP, K_m entre 40-100 nM o los receptores m_2 -muscarínicos. Los valores de estequiometría hallados, en, al menos tres cuantificaciones por Cerenkov, oscilaron entre 0,4-0,8 mol P_i/mol p38, lo que muestra la existencia de un sitio de fosforilación por GRK2.

60

GRK2 y p38 interactúan, dependientemente de agonista

65 GRK2 interactúa con diversas proteínas implicadas tanto en señalización como en tráfico celular. Así, GRK2 interactúa con $G\alpha_q$, $G\beta\gamma$, PI3K α y γ , clatrina, GIT (GRK Interacting protein) y caveolina, además de otras moléculas, de cuya interacción resulta la modulación de su actividad (como fosfolípidos, Ca²⁺-calmodulina, quinasas, etc.). GRK2 es una quinasa modular y su actividad catalítica está refrenada por interacciones intramoleculares entre sus distintos dominios. Por ello, para ver su capacidad de asociarse con p38, se promovió la adquisición de su conformación activa mediante la estimulación de receptores β_2 AR, siendo la activación de p38 por éstos escasa. Se emplearon

células HEK293, transfectadas transitoriamente con los plásmidos codificantes del receptor β_2 AR, Flag-p38 y GRK2. Tras someter a las células a un ayuno nocturno, se estimularon con el agonista isoproterenol, a una concentración de 10 μ M. En estas condiciones, la inmunoprecipitación de p38 trae consigo la detección de la quinasa GRK2 en los inmunoprecipitados, y este efecto se ve potenciado por estimulación del receptor β_2 AR (Figura 2, panel A). Tal y como se muestra en los diferentes apartados que componen la Figura 2, la máxima asociación se obtiene a los cinco minutos de exposición al isoproterenol. Por otro lado, se observa que la asociación entre ambas quinasas no es preceptiva de la estimulación del β_2 AR, puesto que se coimmunoprecipitan también en condiciones basales (0 minutos). En el panel A, se incluyen los controles de arrastre inespecífico (Cneg) de la inmunoprecipitación anti-Flag, y la constatación de que otro estímulo notorio de p38 (NaCl) no desencadena esta asociación. Finalmente, se presentan los niveles de activación de p38 bajo estas condiciones. Éstos revelan primero que, la activación de p38 por isoproterenol no es muy fuerte y segundo, que la activación es tanto menor cuanto más se une a GRK2.

Se realizaron experimentos de inmunoprecipitación “recíproca”, es decir, en el mismo sistema celular, pero empleando anticuerpos anti-GRK2 para detectar p38 en los inmunoprecipitados. En el apartado B se observó que p38 y GRK2 interaccionan de manera dependiente de agonista (5 minutos de isoproterenol). Se comprobó, sección C, que disminuyendo la concentración de GRK2, se la seguía rescatando unida a Flag-p38. De nuevo se encontró una unión potenciada a los 5 minutos de estimulación por el agonista del β_2 AR.

En la sección D, se examinó la capacidad de p38 de coimmunoprecipitarse con el mutante catalíticamente inactivo de GRK2, K220R. Se puede apreciar cómo, a niveles de expresión similares de GRK2-K220R y de GRK2-WT (ver tercer panel), el mutante no sólo es capaz de asociarse en mayor medida a p38 sino que su interacción parece independiente del estímulo β_2 AR.

La sobreexpresión de GRK2 reduce la capacidad de p38 de ser activada por la quinasa MKK6

Se puso a prueba la interfase entre p38 y uno de sus más comunes activadores, MKK6. Con el fin de acotar y cercenar posibles activaciones cruzadas, se empleó el mutante constitutivamente activo de esta MAPKK, MKK6CAM. En la Figura 3, apartado A se incluyen unos paneles representativos de experimentos de transfección transitoria en células HEK293, en los que se sobreexpresaron dosis crecientes de plásmido pCDNA3-GRK2 (completando siempre la cantidad de ADN total con pCDNA3-GFP), junto con Flag-p38 y MKK6CAM. Se observa que la activación de p38 dependiente de MKK6CAM disminuía tanto más, cuanto más cantidad de GRK2 se expresaba en las células. La sobreexpresión permitía cerciorar la evaluación del resultado de las mismas células. Ciertamente, al tomar sólo la inmunodetección de Flag-p38, se seleccionan las células transfectadas (y por tanto sometidas a los efectos de GRK2 y MKK6CAM) y se dejan de lado los efectos del resto. Por otro lado, en estas células resultaba difícil detectar en todas las ocasiones la p38 endógena. Se utilizaron unas células que expresan cantidades fijas de GRK2, dos poblaciones de HEK293 que expresan establemente diferentes cantidades de GRK2, se les introduce transitoriamente los ADNs que codifican Flag-p38 y MKK6CAM (o su control). Los resultados se recopilan en la sección B, y muestran que, en este sistema, de nuevo se observa una disminución de la capacidad de p38 de ser activada por MKK6CAM.

La sobreexpresión de GRK2 reduce la actividad quinasa de p38 sobre un péptido-sustrato

A continuación se puso a prueba la actividad catalítica de una p38 sometida tanto al estímulo de su activador MKK6CAM, como al de dosis crecientes de GRK2 sobre un sustrato exógeno. Para ello, las células HEK293 se dejaron en medio con suero durante los días de espera requeridos para que tenga lugar la sobreexpresión óptima; a consecuencia de lo cual GRK2 podía estar siendo estimulada por factores presentes en el suero, como LPA, etc. cuyas señales dimanarían de los GPCRs. Se recolectaron las células y se inmunoprecipitó de ellas la quinasa Flag-p38 reconocida por el anticuerpo monoclonal anti-flag unido a una resina de agarosa. En cada punto (llevado siempre por duplicado), se reservó una alícuota del inmunoprecipitado para comprobar la cantidad del mismo por inmunodetección, (ver el panel insertado en el apartado B de la Figura 4). Los inmunoprecipitados, lavados repetidas veces, se ensayan entonces en una reacción de fosforilación sobre el sustrato peptídico APR. Este péptido, denominado así por los tres primeros aminoácidos de su secuencia, corresponde a los residuos 94 a 102 de MBP y se ha utilizado anteriormente para ensayar la actividad de MAPK por poseer el consenso de fosforilación de estas enzimas. En la sección A se incluyen los controles de lisados que nos indican tanto la cuantía de la expresión de GRK2 como el estado de activación que p38 alcanza en esas condiciones. El análisis del apartado B permite emitir diferentes conclusiones. La primera es que la actividad catalítica de la p38 inmunoprecipitada se correlaciona, en cada punto, con su respectivo estado de activación, revelado con el anticuerpo anti-fosfo p38 en A y se caracteriza por ser atenuada por la sobreexpresión de GRK2. La segunda es que, Flag-p38 sometida a estímulos presentes en el suero del medio de cultivo exhibe también una actividad catalítica despreciable frente al péptido-sustrato APR. Se tomaron pues estos niveles como referencia para la cuantificación gráfica. Cabe destacar finalmente que la fosforilación del péptido APR era estrictamente dependiente de p38, dada su ostensible inhibición por SB 203580.

La reducción de los niveles de GRK2 repercute en una mayor activación de p38 por MKK6CAM

A fin de avalar los resultados anteriores, se acometen los experimentos recíprocos. Es decir, si GRK2 está influyendo negativamente en la actuación de p38. Independientemente de su actividad quinasa sobre GPCRs, la bajada de los niveles de GRK2 debería permitir una mayor señal anti-fosfo-p38 en el mismo contexto, a saber, por MKK6CAM. Se emplearon células HEK293 para llevar a cabo transfecciones transitorias de cantidades crecientes de ADN antisentido (AS) contra GRK2 (Figura 5 A, izquierda) cuyo control en paralelo son las mismas cantidades del plásmido

que codifica la GFP (C). En la Figura se presentan los paneles de un experimento representativo. En los niveles de GRK2 como media se obtiene de un 20-50% de disminución, en función de la dosis de ADN empleada. Estos datos corroboran lo inferido de los experimentos anteriores de sobreexpresión de GRK2, a saber, que a menor cantidad de GRK2 en las células, p38 es capaz de sufrir una mayor activación por MKK6_{CAM}. Se adjunta una estimación gráfica representativa de este efecto (Figura 5A, derecha). Se refieren los niveles de activación de p38 (anti-fosfo-p38/anti-p38) a su activación basal, en cada situación: ya de mayor reducción de GRK2 (AS) ya de GFP (C,control).

En estos mismos experimentos se valora la activación de Flag-p38 en condiciones basales. La activación en reposo, es decir, sin MKK6_{CAM}, de p38 α suele ser escasa. Se puede llegar a determinar por inmunodetección, dejando largas exposiciones durante el revelado quimioluminiscente (referido como “sobreexposición” en Figura 5, apartado B). Así, tal y como se puede apreciar, el perfil de activación de p38 en condiciones de no co-transfección de MKK6_{CAM} emula el de la p38 sometida a la activación de este mutante constitutivamente activo. Acorde con la eliminación de una de las variables, a saber, la sobreexpresión de MKK6_{CAM} que redundaba en una inconstante activación de p38, los datos de activación basal de p38 influida por la presencia de mayores o menores niveles de GRK2 total son más cuantitativos. Así, se hallan representados en la parte inferior de la Figura los datos provenientes de la cuantificación de la activación de Flag-p38 α sin MKK6_{CAM}. Relativizando en cada punto de ADN antisentido la activación de p38 al control paralelo de GFP, se obtiene una marcada tendencia de p38 a ser mejor sustrato de sus activadores celulares cuanto menor es la presencia de GRK2 (Figura 5, gráfico del apartado B). La significatividad, denotada mediante un asterisco se refiere por tanto a que en la prueba estadística t de Student se obtuvo un valor de $p < 0,05$ en cada punto de ADN antisentido comparado con su respectivo control de GFP.

La localización del sitio de fosforilación por GRK2 en p38 mediante construcciones truncadas revela la implicación de determinantes estructurales terciarios en la interacción p38-GRK2

Mxi2 es una variante de procesamiento alternativo de p38 cuyo C-terminal difiere del de p38 α . Mxi2 es una proteína inicialmente aislada en experimentos de doble híbrido por interaccionar con la proteína Max. De los aminoácidos 1 a 280 es idéntica a p38 α pero ostenta un C-terminal de 17 restos completamente diferentes (ver esquemas en la Figura 6). Se ha empleado, además de Mxi2, el mutante truncado Mxi Δ 17, (que corresponde exactamente a p38 α Δ 80) para determinar si algunas de las serinas o treoninas del C-terminal de p38 eran las dianas de fosforilación de GRK2. Se obtuvieron las proteínas de fusión, por métodos estándar de purificación de proteínas y se ensayó, comparando con p38 α su capacidad de ser sustrato de GRK2 (Figura 6, apartado A). Con cantidades comparables de p38 α , Mxi2 y Mxi Δ 17, estas dos últimas no son fosforiladas por GRK2. Es más, las trazas de fosforilación que se distinguen en Mxi2 y Mxi Δ 17 son más tenues que la correspondiente a la fosforilación de p38 α en presencia de heparina. En la Figura se incluyen también controles de autofosforilación de cada una de estas quinasas.

A tenor de estos resultados se acometió la generación y purificación de los 80 últimos aminoácidos de la secuencia de p38 α , fusionados, nuevamente a GST. Esta construcción se elaboró mediante el protocolo de mutagénesis de QuickChange, y posterior inclusión del fragmento de ADN que codificaba el GST-280-360 p38 α en el sistema polivalente de Gateway. Sorprendentemente, tras purificar la proteína de fusión y ensayarla frente a GRK2, no se obtuvo rastro alguno de fosforilación. Estos resultados se recopilan en el apartado B de la Figura 6. En ellos se ve cómo, a una cantidad mucho mayor de GST-280-360 p38 α que de GST-Mxi Δ 17 y de GST-p38 α (WB anti-GST, panel inferior), no se obtiene fosforilación de ninguna de las dos primeras y sí de la última.

De estos datos se infiere que se necesitan determinantes estructurales presentes en la proteína p38 α WT, y ausentes en sus partes truncadas N- y C-terminales para el reconocimiento y ulterior fosforilación por GRK2.

GRK2 fosforila a p38 en un único residuo

Tras constatar la inadecuación de las aproximaciones anteriores para determinar el residuo fosforilado por GRK2, se buscó el residuo por técnicas proteómicas. Para cerciorarse de que la estequiometría calculada correspondía a un único sitio de fosforilación se resolvieron los ensayos de fosforilación de GRK2 y p38 mediante electroforesis bidimensionales, cuyo resultado se muestra en el apartado A de la Figura 7. En la primera electroforesis se aprovecha el cambio del punto isoelectrónico de las proteínas a consecuencia de la incorporación del fosforilo, mientras que en la segunda éstas se separan en función de su masa, según una SDS-PAGE de rutina. Únicamente en el panel correspondiente a la fosforilación en presencia de GRK2, se puede apreciar una intensa banda radiactiva correspondiente a GST-p38. Asimismo, se distinguen en este panel trazas difusas de ³²P indicativas de la autofosforilación múltiple de GRK2.

En el Servicio de Proteómica del Nodo UAM de la Red Cardiovascular, englobado dentro del Servicio de Proteómica del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (http://www.cbm.uam.es/mkfactory.esdomain/webs/CBMSO/plt_Servicio_Pagina.aspx?IdServicio=29&IdObjeto=118) se identificó la modificación post-traducciona. Cotejando los espectros de fragmentación de GST-p38 y de GST-p38 fosforilada por GRK2, tras digestión triptica y espectrometría de masas MALDI-TOF, se observó la existencia, en la muestra fosforilada, de un péptido cuya masa podía corresponder a la de otro péptido, detectado en sendas muestras, más 80 Da. En efecto, se percibe la presencia minoritaria pero exclusiva de la muestra sometida a fosforilación por GRK2, de este péptido, modificado post-traduccionalmente con un grupo fosfato (1954,330=1874,326+80). Se incluye en esta Figura (sección B de la Figura 7) la ampliación de la zona del espectro en la que se detectaron rastros de este putativo portador de la fosforilación, proporcionándose la Figura íntegra en el apartado de Materiales y Métodos. El análisis detallado del espectro de masas permitió llegar a identificar un péptido candidato, fruto de la digestión con tripsina: LTDDHVQFLIYQILR.

Para corroborar este indicio, se separó el péptido candidato por HPLC y se llevó a cabo un análisis espectrométrico más fino: ionización por electrospray acoplada a trampa iónica (ES/MS-IT), monitorizando aisladamente el ión del correspondiente al péptido antes hallado. Los resultados muestran primeramente la información procedente de la cromatografía líquida de alta presión en lo concerniente al tiempo de elución del péptido monitorizado en ambas muestras. Se observa un adelanto en la salida en el caso del péptido procedente de la fosforilación por GRK2, originado por el fundamento de la cromatografía, que separa los péptidos por hidrofobicidad, quedando tanto más retenidos cuanto menos polares.

Segundo, se presentan los espectros de fragmentación de ambos péptidos y la asignación de las series a los picos obtenidos. Este análisis permitió identificar a la treonina del péptido candidato LTDDHVQFLIYQILR como la portadora de la fosforilación. En la Figura 8 se resaltan en amarillo los picos correspondientes a la masa total del péptido en sus distintas especies, en sendas muestras y en naranja, el pico de 938,3 Da correspondiente a la especie diferencial entre el espectro de la muestra fosforilada y la no fosforilada.

La conclusión final de las aproximaciones espectrométricas y proteómicas fue que la fosforilación de GRK2 sobre p38 se produce en la treonina 123 de la secuencia de p38 α .

La mutación de la treonina 123 de p38 α impide la fosforilación GRK2

Con el fin de verificar la localización del residuo diana de la fosforilación por GRK2, se generaron dos mutantes de p38 α en la T123. El mutante p38 α T123A representa la forma de p38 no fosforilable por GRK2, mientras que el mutante p38 α T123D, por la carga negativa del aspártico así como por la longitud de su cadena lateral, mimetiza la forma constitutivamente fosforilada de la treonina 123. Se purificaron las proteínas de fusión GST-p38 α T123A y GST-p38 α T123D y se sometieron a la fosforilación por GRK2, llevando siempre como control la proteína p38 α WT (Figura 9, apartado A). A concentraciones de sustrato tanto bajas como equimolares con respecto a la quinasa, se confirma que ninguno de los dos mutantes es sustrato de GRK2, ratificando la identidad de la treonina 123 como sustrato de dicha fosforilación. En la sección A de la Figura se incluyen también los controles de cantidad de p38 total cuantificados por inmunodetección con un anticuerpo anti-p38. En B, se incluye un esquema escalado representativo de p38 α (número de acceso de la base de datos Swiss-Prot Q16539, www.expasy.org), en el que cabe destacar su gran dominio quinasa, que abarca casi la proteína entera. Al final de la proteína se ubica una pequeña región, denominada CD, (Common Docking) que constituye el dominio de anclaje común, tanto de sustratos como activadores de p38 y que se ha visto media los reconocimientos proteína-proteína en la familia de las MAPK. El análisis del cristal de p38 junto con péptidos procedentes de MKK3 y de MEF2A, ha permitido corregir y afinar la descripción de este surco de anclaje.

La treonina 123 es un residuo sumamente conservado entre isoformas y entre especies

En la Figura 10, se muestran dos alineamientos de las secuencias de diferentes proteínas p38, confeccionadas por los inventores. En el panel superior se han comparado las isoformas α de las p38 (MK14 en las bases de datos Swiss-Prot) de diferentes especies: *Cyprinus carpio* (carpa común, MK14A_CYPKA: Q90336), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta, MK14A_DROME: O62618), *Xenopus laevis* (Rana de uñas africana, MK14_XENLA: P47812), *Pan troglodytes* (chimpancé, MK14_PANTR: Q95NE7), *Canis familiaris* (perro, MK14_CANFA: O02812), *Homo sapiens* (humano, MK14_HUMAN: Q16539), *Mus musculus* (ratón, MK14_MOUSE: P47811) y *Rattus norvegicus* (rata, MK14_RAT: P70618). Se utiliza un simple código de colores que diferencia aminoácidos idénticos entre los ortólogos de p38 (amarillo), de aminoácidos muy conservados e idénticos al consensuado (azul), de aminoácidos muy conservados equivalentes al consensuado (verde). El resto de residuos no conservados permanece en blanco. Las regiones en las que mayor variabilidad se ha permitido son precisamente las exteriores al dominio quinasa de p38, entre las que cabe destacar la zona C-terminal donde se ubica el dominio CD cuyos aminoácidos ácidos permiten, merced al establecimiento de interacciones electrostáticas con aminoácidos básicos de sustratos, activadores y desactivadores, el reconocimiento de éstos. Mediante una elipse roja se destaca la ubicación de la T123 en la secuencia de todas las p38 α alineadas. No sólo la treonina 123 está presente en casi todas las isoformas sino que cuando no aparece, se encuentra una serina, igualmente fosforilable en su lugar. Además, la región flanqueante de aminoácidos ácidos que se supone constituye el consenso de fosforilación por GRK2 está conservada en todos los ortólogos.

A continuación se estudió si la regulación descrita por los inventores podía ser común a todas las cuatro isoformas preeminentes de p38, a saber α , β , γ , y δ . Para ello, se alinearon las zonas que comprenden los residuos 120 a 140 de las isoformas de p38 de levaduras: HOG1 de *Candida albicans* (Q92207), HOG1 de *Saccharomyces cerevisiae* (P32485), Sty1 de *Schizosaccharomyces pombe* (Q09892); las isoformas γ de p38 de humano, de ratón, de rata y de rana africana (isoformas MK12 en el alineamiento, P53778, O08911, Q63538, P47812); isoformas δ de p38 de humano, de chimpancé, de ratón y de rata (isoformas MK13: O15264, Q9N272, Q9Z1B7 y Q9WTY9 respectivamente en el alineamiento); las dos isoformas de p38 de drosófila (MK14_DROME, O62618 y O61443), las isoformas β de humano (β_2 difiere de la inicialmente aislada β en que carece de la inserción, por procesamiento alternativo, de ocho aminoácidos presente en ésta. La isoforma β es minoritaria y difícil de aislar por ello se suele identificar la forma β con la variante β_2) y de ratón (MK11: Q15759, Q9WUI1); y finalmente las isoformas α (MK14) de *Xenopus*, de *Cyprinus* (isoforma MK14A antes incluida en la comparativa e isoforma MK14B, Q9I958) de chimpancé, de perro, de hombre, de ratón y de rata, anteriormente alineadas. Resulta llamativa la alta conservación de las secuencias entre todas ellas, incluso las procedentes de levaduras. Respecto a la treonina en cuestión (T123 de p38 α humana), se puede decir que se halla conservada en vertebrados -e incluso en metazoos-, así como los aminoácidos circundantes, entre los que se

ES 2 357 681 T3

encuentran los residuos ácidos D y E. Así, incluso si el alineamiento sufre una interrupción a la altura justo de este residuo, sigue estando conservado en las isoformas δ de p38. La única isoforma de las incluidas en este alineamiento que carece de una serina o treonina en un contexto homólogo es la p38 γ humana.

5 *La fosforilación de p38 por GRK2 merma tanto la actividad catalítica de p38 sobre sus sustratos como la capacidad de ser sustrato de MKK6*

En las Figuras 11 y 12 se reúnen los experimentos que se idearon para determinar qué consecuencias funcionales podía tener la fosforilación de GRK2 sobre la T123 de p38. Lo primero que se estudió fue si la fosforilación de GRK2 sobre p38 mermaría la activación de ésta por MKK6_{CAM} *in vitro*. En los paneles que conforman A en la Figura 11, se presentan los resultados, en duplicados, obtenidos en experimentos de fosforilación de MKK6_{CAM} sobre GST-p38 y los mutantes GST-p38T123A y GST-p38T123D. A cantidades similares de proteínas recombinantes (Azul de Coomassie), GST-p38T123D es mucho peor sustrato de MKK6_{CAM} que las otras dos p38 (³²P).

15 A continuación se estudió si esta capacidad disminuida por parte de GST-p38T123D de ser fosforilada por MKK6_{CAM} se correlacionaba con un menoscabo de su actividad catalítica *in vitro*. Para ello se confeccionaron unos ensayos de fosforilación que, debido a la indetectable actividad basal de GST-p38, requerían la inclusión de la quinasa activadora MKK6_{CAM}. En la parte B de la Figura 11 se probó la capacidad de GST-p38WT y de los dos mutantes GST-p38T123A y GST-p38T123D de fosforilar un sustrato conocido se p38 como es ATF2, previamente purificado como proteína de fusión a GST. Así, en cada reacción de fosforilación, se incluyen sustrato, MAPK y MAPKK. Se muestra un experimento representativo (³²P) en donde los puntos están por duplicado, así como su respectivo control de cantidades de proteína (Azul de Coomassie). Así, estos ensayos revelan que p38T α 123D carece de la más mínima actividad catalítica sobre GST-ATF2 mientras que p38 α y p38T α 123A lo fosforilan de manera análoga.

25 Se decidió corroborar los datos con un sustrato más específico de p38, pues ATF2 es también fosforilado por JNK. Se purificó GST-MEF2A, por haber sido recientemente cristalizado junto a p38 así como por ser un sustrato preferente de p38. En la Figura 12 se reúnen los ensayos llevados a cabo con este sustrato. El apartado A afianza las deducciones previas, a saber, la actividad de p38T α 123D sobre MEF2A está completamente abolida, mientras que el mutante p38T α 123A conserva la capacidad de fosforilar este sustrato. Se observa, además, que la fosforilación se acompaña de un cambio correlativo de movilidad del sustrato GST-MEF2A, detectado por tinción con Azul de Coomassie. Es frecuente que la hiperfosforilación de una proteína redunde en un cambio de su movilidad electroforética, apreciable incluso en geles desnaturalizantes de poliacrilamida y SDS. Tras analizar los ensayos de fosforilación en su conjunto, se pudo observar además que el mutante p38T α 123A, si bien es correctamente fosforilado por MKK6_{CAM}, exhibe una actividad quinasa reducida frente a los dos sustratos que se probaron. Se decidió diseccionar un poco más este efecto diferencial entre p38T α 123A y p38 α WT, para lo cual los investigadores se fijaron en su respectiva actividad basal, es decir en ausencia de la quinasa activadora MKK6 y frente a MEF2A (Figura 12, apartado B). La actividad basal de p38 se pudo evaluar en condiciones de suficiente sustrato y larga exposición y se pudo comprobar que sendos mutantes en la T123 poseen menor actividad catalítica basal que la quinasa silvestre. p38T α 123A se comporta como el término medio entre p38 α WT y p38T α 123D. Así pues, el mutante p38T α 123A, en condiciones enzimáticas más restrictivas (10 veces menos sustrato y 15 minutos de fosforilación; panel C de la Figura 12), presenta mayor diferencia catalítica respecto a p38 α WT que lo que los experimentos iniciales indicaban.

El mutante p38T123D tiene menor capacidad de activarse por MKK6_{CAM} in situ

45 Los resultados, que paralelamente aportan una explicación coherente a los datos iniciales en células HEK293, se corroboraron en este mismo sistema. Antes, se generó por PCR el mutante pCDNA3-Flag-p38T123D de expresión en eucariotas. Así pues, siguiendo aproximaciones experimentales análogas a las de las de sobreexpresión o reducción de GRK2 en HEK293, se transfectó Flag-p38WT y Flag-p38T123D junto con el activador MKK6_{CAM}. El gráfico de la Figura 13 ilustra, comparando en cada experimento la activación de Flag-p38T123D (frente a su activación basal) con la activación de Flag-p38WT, una notable reducción de la misma. La activación de p38T123D en células es menos probable que la de la quinasa silvestre. Se incluyen asimismo en esta Figura paneles ilustrativos de las inmunodetecciones que proporcionaban estos experimentos.

55 En la Figura 14, la unión de los sustratos (MK2) y activadores (MKK6) a p38 o sus mutantes en T123 es analizada mediante un ensayo de unión *in vitro* utilizando proteínas purificadas. Tal como se muestra, la capacidad del mutante T123D para asociarse a MK2 o a MKK6 está severamente reducida con respecto a la del mutante T123A o a la de la proteína tipo silvestre.

60 *GRK2 regula negativamente la diferenciación inducida por insulina de la línea preadipocítica 3T3-L1*

La línea pre-adipocítica 3T3-L1 se utilizó como modelo celular que permitiera estudiar la regulación de p38 por GRK2. Estos fibroblastos presentan la interesante particularidad de que, sometidos a determinados estímulos entre los que destaca la insulina, adquieren, al final de un tratamiento de, aproximadamente dos semanas, un fenotipo adipocítico. Esta diferenciación es fácilmente distinguible por la acumulación de gotas de grasa que se tiñen con un colorante rojo lipofílico y que llegan a ocupar la práctica totalidad del citoplasma de las 3T3-L1.

Una de las funciones fisiológicas de p38, distinta de la más ortodoxa respuesta al estrés celular, es su papel en proceso de diferenciación. En el caso concreto de los fibroblastos 3T3L1, se ha demostrado la implicación de p38 en

tanto en cuanto la diferenciación a adipocitos se bloquea por SB203580 y la presencia de MKK6_{CAM} es suficiente para. Los factores de transcripción C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein) y PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ), cuya expresión varía en el transcurso de la diferenciación, parecen sometidos a la regulación por p38. Más concretamente, C/EBP β se supone es fosforilado por p38, que a su vez está activa únicamente en las etapas
5 iniciales de la diferenciación; lo que promovería la ulterior expresión de PPAR γ y de los marcadores adipocíticos que se encuentran bajo su control.

Para investigar el efecto que GRK2 pudiera tener en la diferenciación adipocítica de 3T3L1, se generaron líneas establemente transfectadas con los plásmidos pCDNA3-GRK2 y pCDNA3-GRK2K220R que otorgan resistencia a la
10 neomicina. Después de la pertinente comprobación de que los niveles de GRK2 estaban en efecto sobreexpresados en ambos casos, en comparación con la línea 3T3L1 (ventana insertada en el gráfico de la Figura 15), se procedió a desencadenar la diferenciación según el protocolo estándar. Las células 3T3L1, en ausencia de estímulos lipogénicos, tienen un saludable aspecto de fibroblastos (foto correspondiente al control en 3T3L1) que se convierte claramente en un fenotipo adipocítico, como atestiguan las gotas lipídicas rojas y la morfología redondeada que estas células
15 adquieren (foto +insulina en las 3T3L1). En el caso de las estables de GRK2, el número de adipocitos por campo es visiblemente menor que en caso de los fibroblastos con niveles endógenos de esta quinasa. Y en lo que atañe a las células 3T3L1-K220R, el efecto adipogénico es sustancialmente mayor al de las células control. GRK2 inhibe pues la adquisición de la morfología adipocítica mediada por insulina mientras que K220R la estimula. Además, este efecto es dependiente de p38 pues la adición del inhibidor farmacológico SB203580 revierte toda adipogénesis. Es más,
20 cuando se reservaban como controles internos del experimento placas sin someter a los tratamientos diferenciadores, las estables de K220R sufrían mucha más conversión espontánea a adipocitos que las otras células. En el gráfico de la derecha se representa el recuento del número de adipocitos por campo en cada una de las tres líneas celulares. Se entiende por campo una zona visualizada con el microscopio óptico en cada p100 o p60. En cada placa, se contabilizaban normalmente hasta un total de unos 25 campos aleatorios. La significatividad de los datos se calculó mediante
25 la prueba t-Student ($p < 0,001$) para datos pareados (cada línea celular estable comparada con la 3T3L1).

Los datos de las Figuras 16 y 17 conducen a la conclusión de que un antisuero policlonal frente a un péptido de p38 fosforilado en Thr123 es capaz de reconocer la proteína p38 fosforilada *in vitro* por GRK2 pero no por MKK6 en otros
30 restos, y que este reconocimiento es específico para el resto Thr123 ya que el mutante T123A no es inmunodetectado por ese antisuero. También, esta sobreexpresión de GRK2 puede promover un incremento en la inmunodetección de este epítipo por este anticuerpo, señal que está reducida cuando un mutante GRK2 inactivo (K220R) está sobreexpresado.

35

(Tabla pasa a página siguiente)

40

45

50

55

60

65

TABLA I

Anticuerpo (Ac)	Epítipo/ Proteína Pm(KDa)	Tipo	Dilución (WB)	Dilución (IP o IF)	Péptido Inmunogénico	Casa Comercial/ Fuente
Anti-HA (12CA5)	HA 1,1	MR	-	2µg/ml	Residuos 76-111 de la hemaglutinina : nonapéptido YPYDVPDYA	Boehringer Mannheim
Anti-HA (Y-11)	HA	PC	1:500	-	Residuos internos de la hemaglutinina	Santa Cruz
Anti-Flag M2-agarosa	FLAG 0,96	MR unido a resina de agarosa	-	0,01-0,02µl de Ac-resina/µl de tampón de lisis	Octa-péptido FLAG (DYKDDDDK)	Sigma
Anti-Myc-agarosa	c-Myc 2,1	MR unido a resina de agarosa	-	0,01-0,02µl de Ac-resina/µl de tampón de lisis	Péptido correspondiente a aminoácidos 408-439 de c-Myc de origen humano MEQKLISEEDLLRKRGS	Santa Cruz
Anti-Myc	c-Myc 2,1	MR	-	1:1000 (IF)	Hibridoma 9E10 contra la secuencia EQKLISEEDL humana	Servicio de Microscopía del CBMSO
Anti-PF1(GRK2)	GRK2 79,6	PC	1:1000	1:300	Proteína de fusión GST-PF1 (aminoácidos 50-145 de GRK2 bovina)	Elaboración Propia (Dra. C. Murga)
910 (GRK2)	GRK2	PC	1:1000	-	Proteína de fusión GST-PF1 (aminoácidos 50-145 de GRK2 bovina).	Elaboración Propia (Dra. E. Morato y B. Palacios)
Anti-PF2 (GRK2)	GRK2	PC	1:1000	1:200	Proteína de fusión GST-PF2 (aminoácidos 436-689 de GRK2 bovina)	Elaboración Propia (Dra. C. Murga)
Anti-GRK2/3	GRK2/3	MR	1:1000	1µg/ml	Proteína de fusión GST-GRK3 (467-688).	Upstate Biotechnology
Anti-GRK3 (sc-563)	GRK3 79,7	PC	1:1000	-	Péptido C-terminal de GRK3 bovina	Santa Cruz Biotechnology
Anti-GRK5 (sc-565)	GRK5 67,8	PC	1:1000	0.2µg/ml	Péptido C-terminal de GRK5 humana	Santa Cruz Biotechnology

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Anticuerpo (Ac)	Epítipo/ Proteína Pm(KDa)	Tipo	Dilución (WB)	Dilución (IP o IF)	Péptido Inmunogénico	Casa Comercial/ Fuente
Anti-GRK6 (sc-566)	GRK6 66	PC	1:500	0.2µg/ml	Péptido C-terminal de GRK6 humana	Santa Cruz Biotechnology
Anti-ERK1 (sc-93)	ERK1 P44	PC	0,75µg/ml	-	Péptido emplazado en C-terminal de ERK1 de rata	Santa Cruz Biotechnology
Anti-ERK2 (sc-154)	ERK2 42	PC	0,75µg/ml	-	Péptido emplazado en C-terminal de ERK2 de rata	Santa Cruz Biotechnology
Anti-P-ERK 1/2	ERK1 y ERK2	MR	1:500	-	Fosfo T202/Y204. (forma activa.). Péptido sintético correspondiente a la región entorno a dichos residuos de la p44MAPK humana	Cell Signaling
Anti-p38	p38 42	PC	1:1000	-	Péptido sintético derivado de la p38 humana	Cell Signaling
Anti-p38N	p38	PC	1:1500	-	14 últimos aminoácidos (C-terminales) de p38α de Xenopus	Donado por el Dr. A. Nebreda (EMBL, Heidelberg, Alemania. CNIO, Madrid, España)
Anti-P-p38	p38	PC	1:1000	-	Fosfo T180/Y182. Péptido sintético correspondiente a la región en torno a dichos residuos de la p38 humana	Cell Signaling
Anti-MKK6/ SKK3	MKK6 40	PC	1:500	-	Proteína de fusión MBP-MKK6 humana	Upstate Biotechnology
Anti-MKK6/ SKK3	MKK6	PC	1:1000	-	Proteína de fusión MalE-MKK6 humana	Donado por el Dr. A. Nebreda (EMBL, Heidelberg, Alemania. CNIO, Madrid, España)
Anti-Gαs (K-20)	Gαs 45	PC	1:1000	-	Epítipo N-terminal de Gαs humana	Santa Cruz
Anti-Gαq/11 (C-19)	Gαq/11 42	PC	1:1000	-	Péptido dentro de dominio común a Gαq y Gα11 de ratón.	Santa Cruz
Anti-Gαi común	Gαi-1 (I-20), Gαi-2(T-19) y Gαi-3(C-10) 41-45	PC	1:1000	-	Mezcla propia de los anticuerpos contra las distintas Gαi, de origen humano y de rata.	Santa Cruz
Anti-Gα12 (S-20)	Gα12 44	PC	1:1000	-	Péptido del N-terminal de Gα12 de ratón	Santa Cruz

REIVINDICACIONES

1. Una proteína MAPK, donde dicha proteína MAPK es una proteína p38, seleccionada entre:

a) una proteína MAPK que comprende un resto fosforilado en un sitio de fosforilación diferente al sitio o sitios de fosforilación presentes en el segmento de activación de dicha proteína MAPK, o un fragmento de dicha proteína que comprende dicho resto fosforilado, en donde

- dicho sitio de fosforilación diferente es el resto de treonina en posición 123 (Thr123) de la p38, isoforma α , de ratón, o un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente en otra proteína MAPK tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos, y

- la fosforilación en dicho sitio de fosforilación diferente impide la activación de dicha proteína MAPK y también su actividad hacia sus sustratos; y

b) una proteína MAPK que comprende una carga negativa o un resto voluminoso en un sitio de fosforilación, o en el área que rodea a dicho sitio de fosforilación, que es diferente al sitio o sitios de fosforilación presentes en el segmento de activación de dicha proteína MAPK, o un fragmento de dicha proteína que comprende dicho resto fosforilado, en donde

- dicho sitio de fosforilación diferente es el resto de treonina en posición 123 (Thr123) de la p38, isoforma α , de ratón, o un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente en otra proteína MAPK tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos, y

- la introducción de una carga negativa o un resto voluminoso en dicho sitio de fosforilación, o en el área que rodea a dicho sitio de fosforilación, impide la activación de dicha proteína MAPK y también su actividad hacia sus sustratos.

2. Proteína según la reivindicación 1, en la que dicha proteína MAPK es la p38 de mamífero.

3. Proteína según la reivindicación 1, en la que dicha proteína MAPK es la p38, isoforma α , de ratón y tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.

4. Proteína según la reivindicación 1, en la que dicha proteína MAPK comprende un segmento de activación seleccionado entre:

- un segmento de activación que comprende la tríada de aminoácidos de fórmula (I)



donde

Thr es treonina,

Tyr es tirosina, y

Xaa es el resto de un aminoácido, preferentemente, de un aminoácido seleccionado entre ácido aspártico, ácido glutámico, glutamina, glicina y prolina; y

- un segmento de activación que comprende la tríada de aminoácidos de fórmula (II)



donde

Ser es serina,

Glu es ácido glutámico, y

Gly es glicina.

5. Proteína según la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2.

ES 2 357 681 T3

6. Un método *in vitro* para identificar un compuesto potencialmente útil para el tratamiento de patologías mediadas por proteínas MAPK activas, donde dicha proteína MAPK es una proteína p38, que comprende:

a) poner en contacto el compuesto candidato con una proteína MAPK,

b) detectar la fosforilación de dicha proteína MAPK en un sitio de fosforilación diferente al sitio o sitios de fosforilación presentes en el segmento de activación de dicha proteína MAPK, y

c) analizar si dicho sitio de fosforilación (i) es la Thr123 de la p38, isoforma α , de ratón, en caso de que la proteína MAPK utilizada sea dicha proteína, o un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente en otra proteína MAPK tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos, y si (ii) la fosforilación en dicho sitio de fosforilación diferente impide la activación de dicha proteína MAPK;

o, alternativamente,

i) poner en contacto un compuesto candidato capaz de fosforilar dicha proteína MAPK con una proteína MAPK;

ii) detectar la fosforilación de dicha proteína MAPK en un sitio de fosforilación del segmento de activación de dicha proteína MAPK para medir el efecto del compuesto candidato sobre la activación de la proteína MAPK;

iii) analizar la actividad de dicha proteína MAPK en presencia del compuesto candidato hacia sus sustratos para evaluar la posible inhibición del anclaje y/o actividad de la proteína MAPK a sus sustratos en presencia de un compuesto competidor; y

iv) analizar si dicho sitio de fosforilación (i) en la Thr123 de la proteína p38, isoforma α , de ratón, en caso de que la proteína MAPK utilizada sea dicha proteína, o un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente en otra proteína MAPK tal como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos, y si (ii) la fosforilación en dicho sitio de fosforilación impide la activación de dicha proteína MAPK.

7. un anticuerpo capaz de unirse a una proteína MAPK según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, y/o capaz de detectar dicha proteína MAPK según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dicho anticuerpo es capaz de reconocer específicamente el resto de aminoácido Thr123 fosforilado o un epítipo de dicha proteína MAPK que comprende la Thr123 fosforilada.

8. Anticuerpo según la reivindicación 7, en donde dicho anticuerpo es capaz de unirse a un epítipo comprendido en un fragmento de la quinasa p38 de mamífero, comprendiendo dicho fragmento un resto de Thr123 fosforilado, o un resto posicionalmente equivalente en otras proteínas MAPK p38.

9. Anticuerpo según la reivindicación 7 u 8, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo capaz de unirse un epítipo que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2.

10. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, junto con, opcionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable.

11. Empleo de

(i) un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9; o

(ii) una proteína GRK2; o

(iii) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica GRK2;

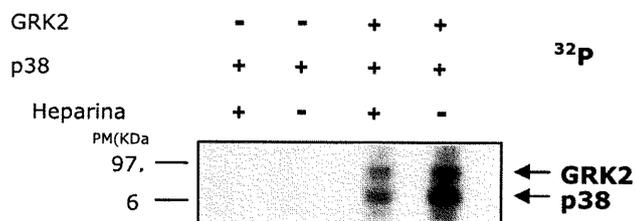
en la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de una patología mediada por MAPKs activas, en la que dicha proteína MAPK es una proteína p38 de mamífero y la patología es constricción aórtica, fallo cardíaco seguido de enfermedad coronaria avanzada, fallo cardíaco congestivo o artritis reumatoide.

12. Un kit que comprende una proteína MAPK según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9.

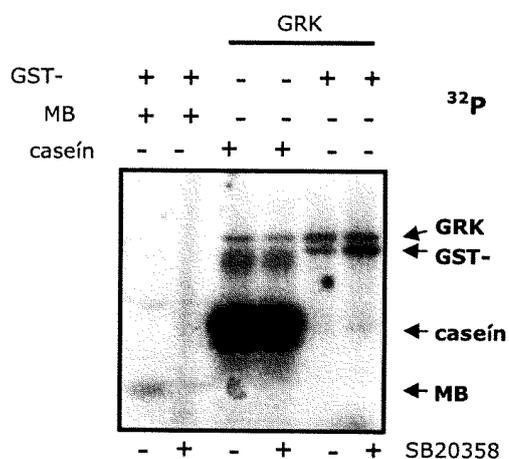
13. Kit según la reivindicación 12, en el que dicha proteína MAPK es una quinasa p38 de mamífero fosforilada en Thr123 de una p38 de mamífero, isoforma α .

FIGURA 1

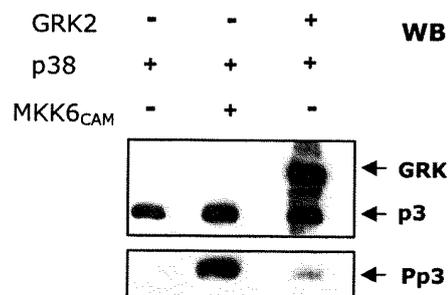
A



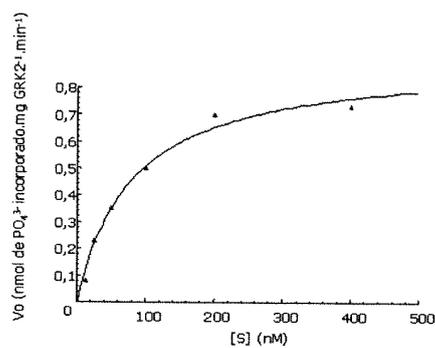
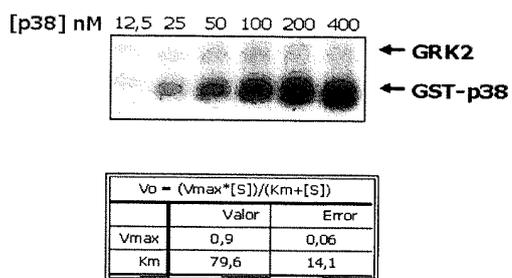
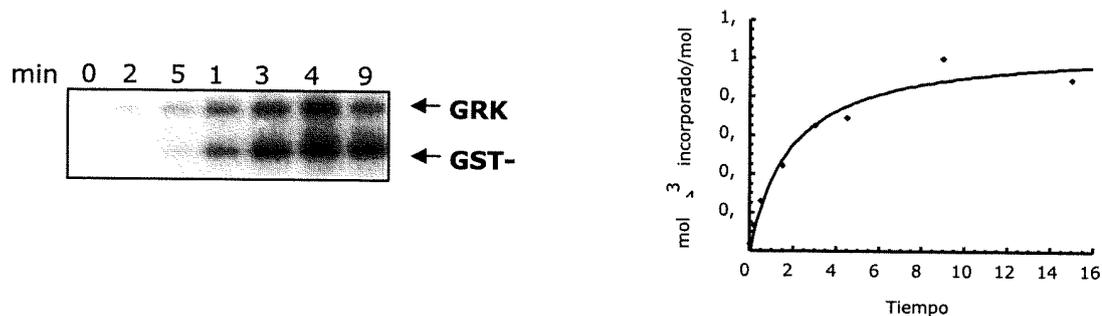
B



C



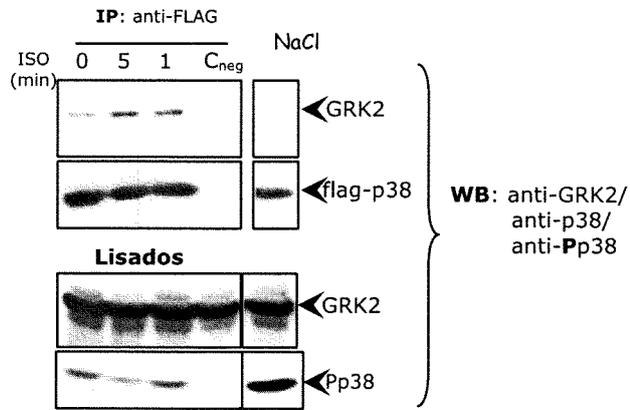
D



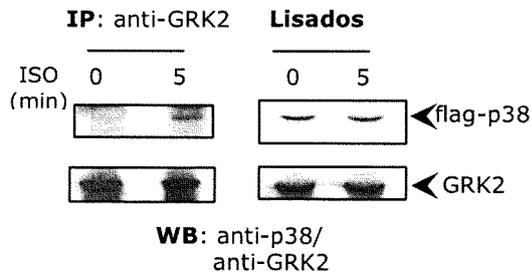
E

FIGURA 2

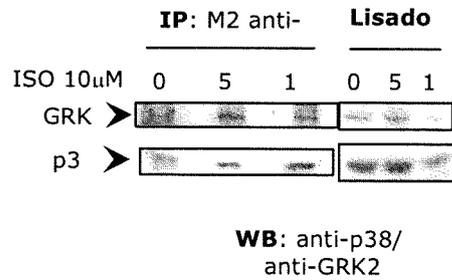
A



B



C



D

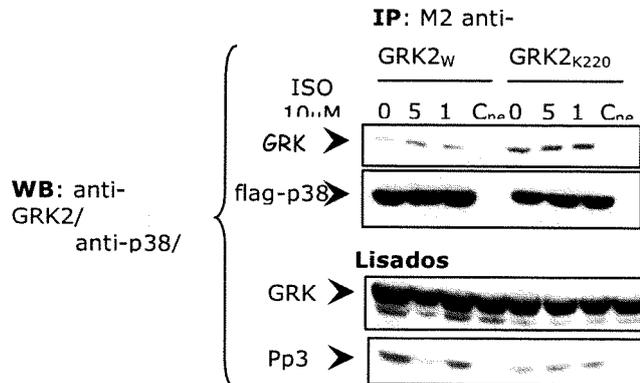
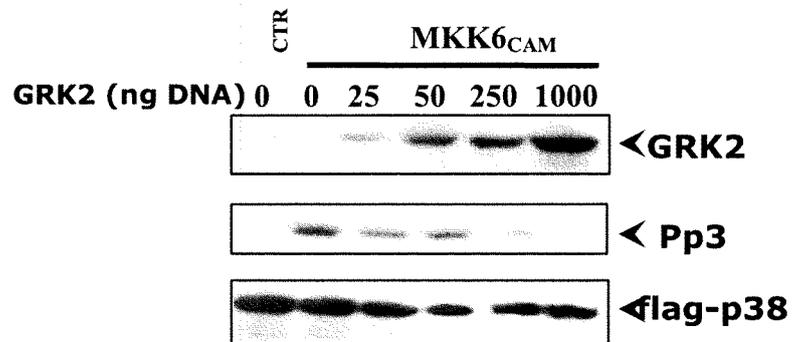


FIGURA 3

A



B

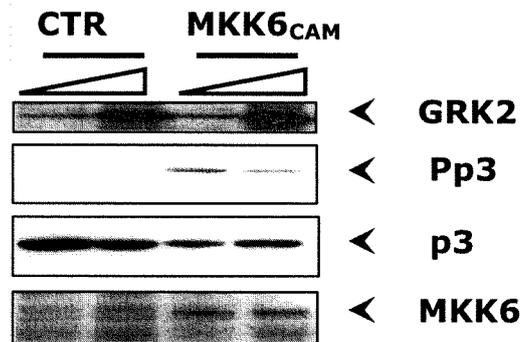
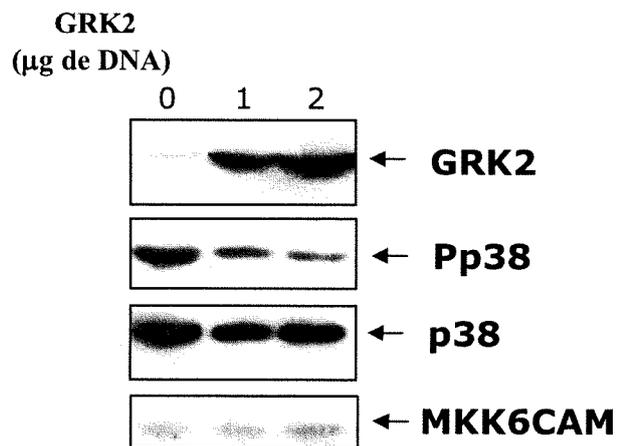


FIGURA 4

A



B

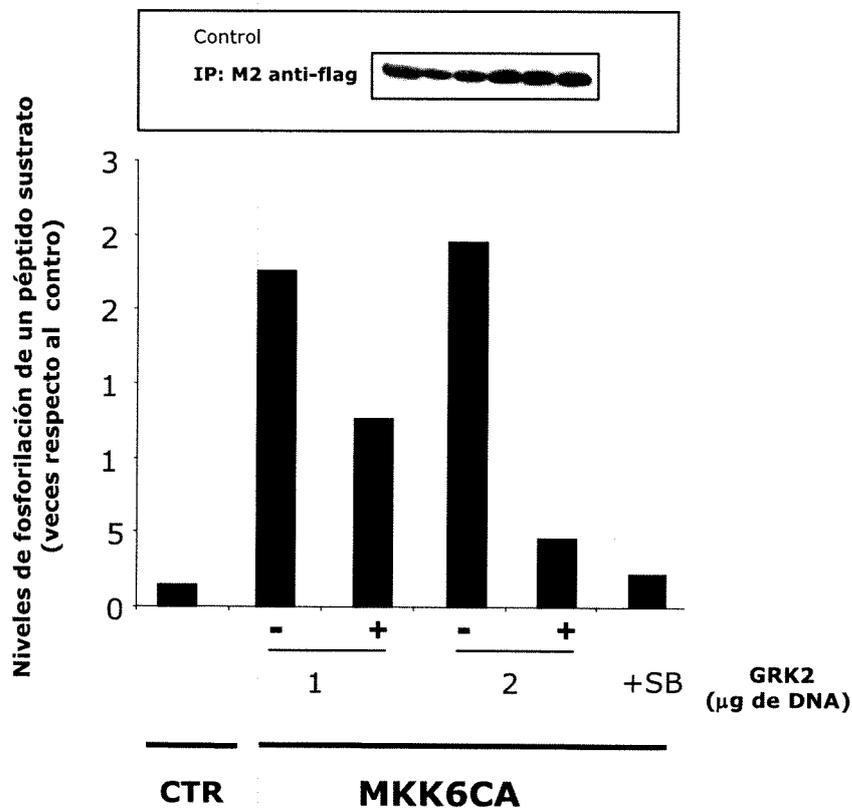
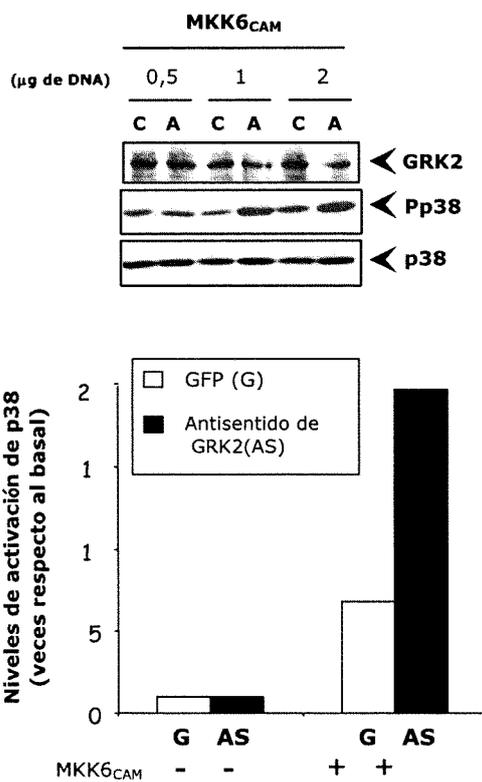


FIGURA 5

A



B

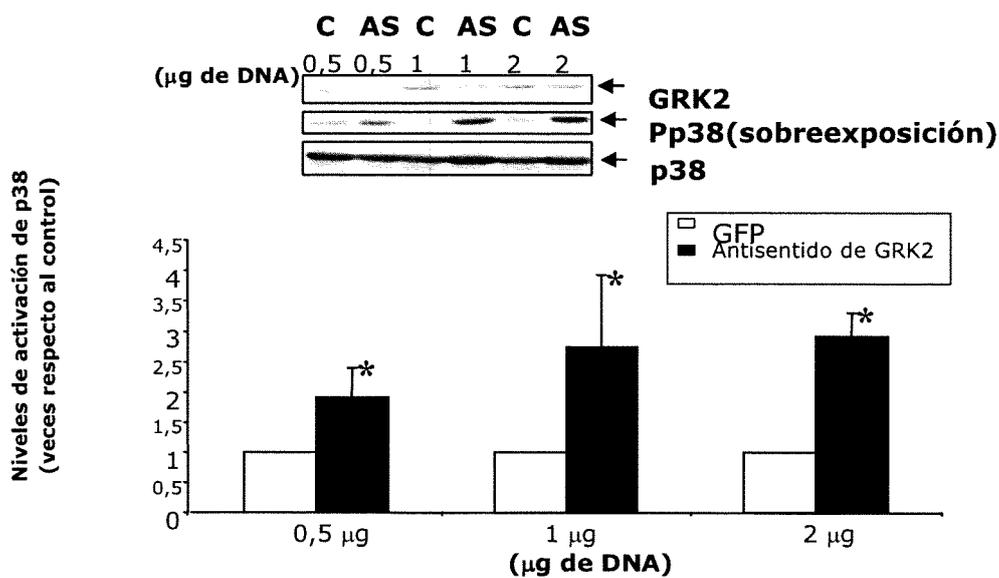


FIGURA 6

A

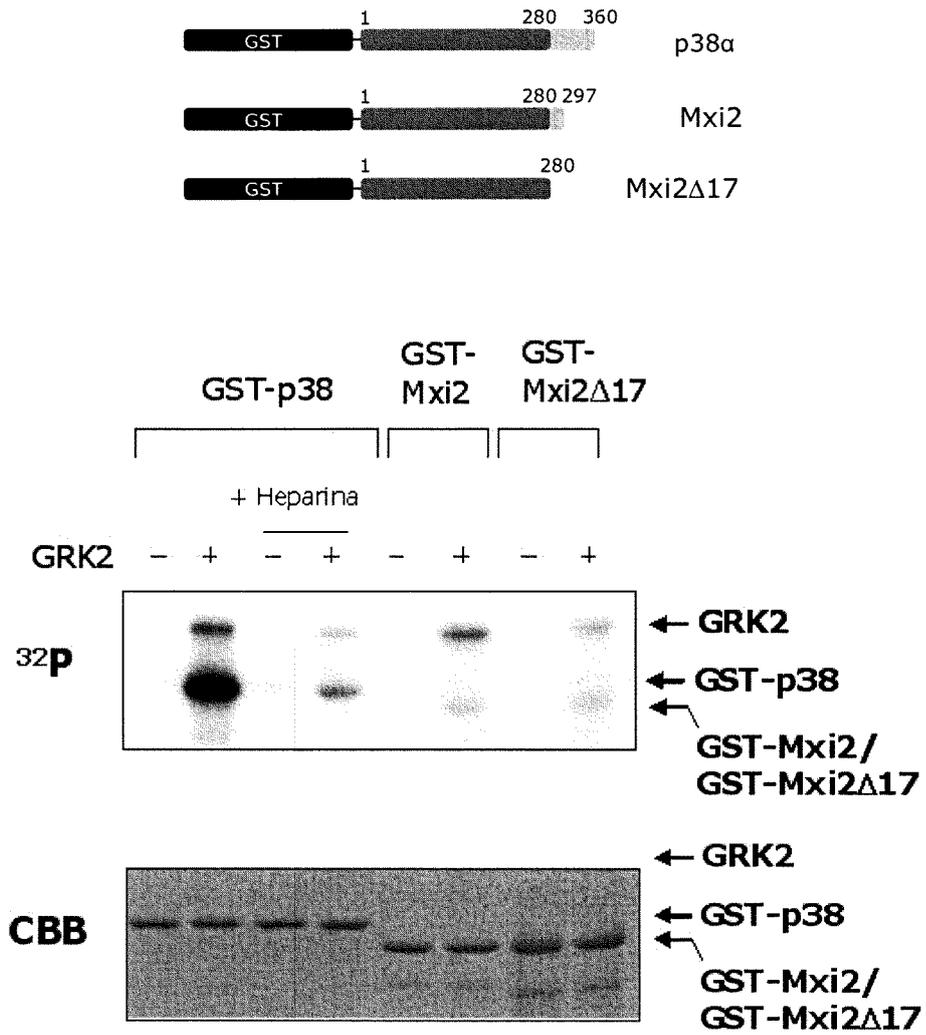


FIGURA 6

B

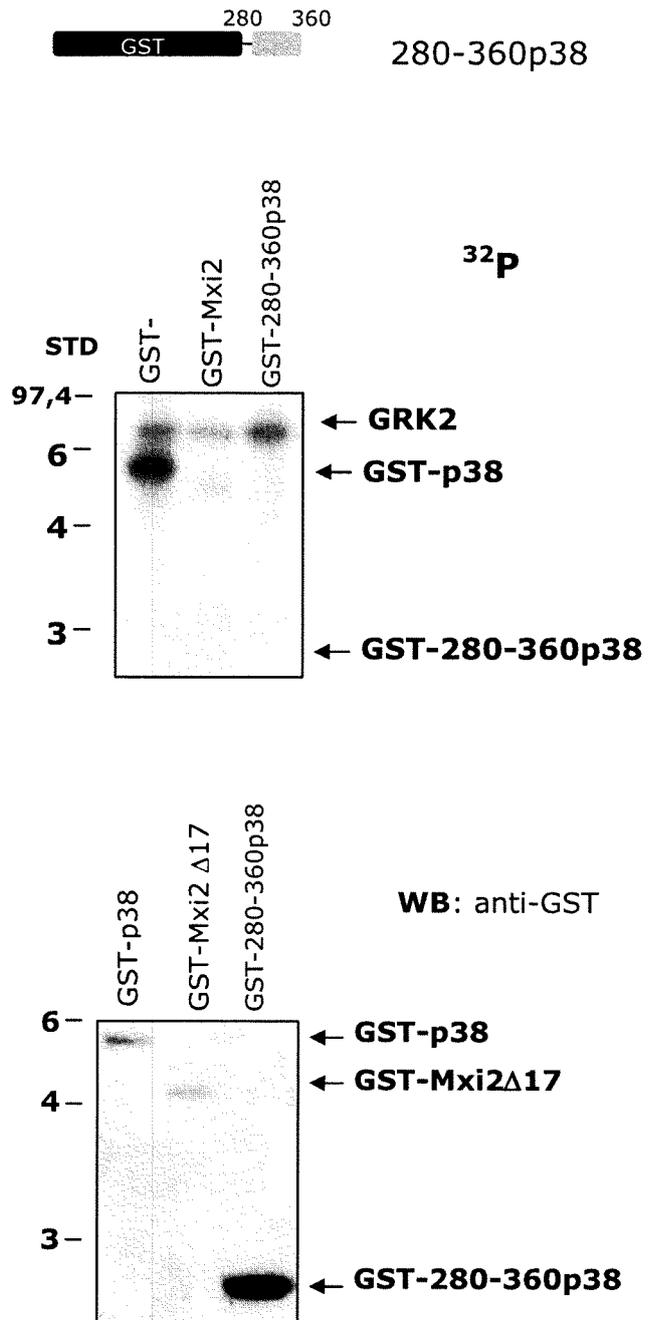
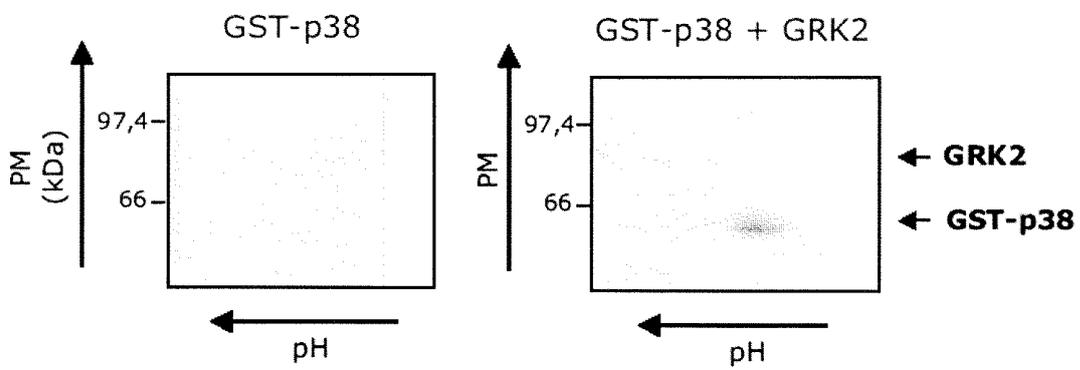


FIGURA 7

A



B

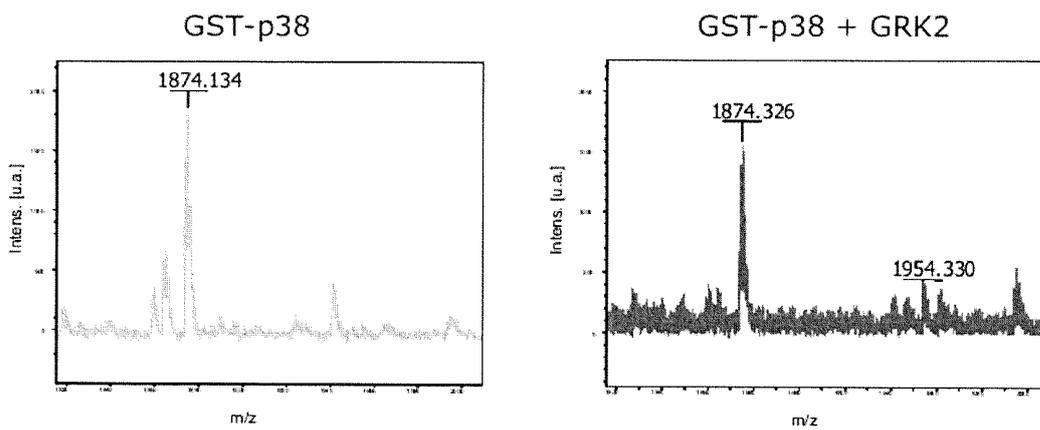


FIGURA 8

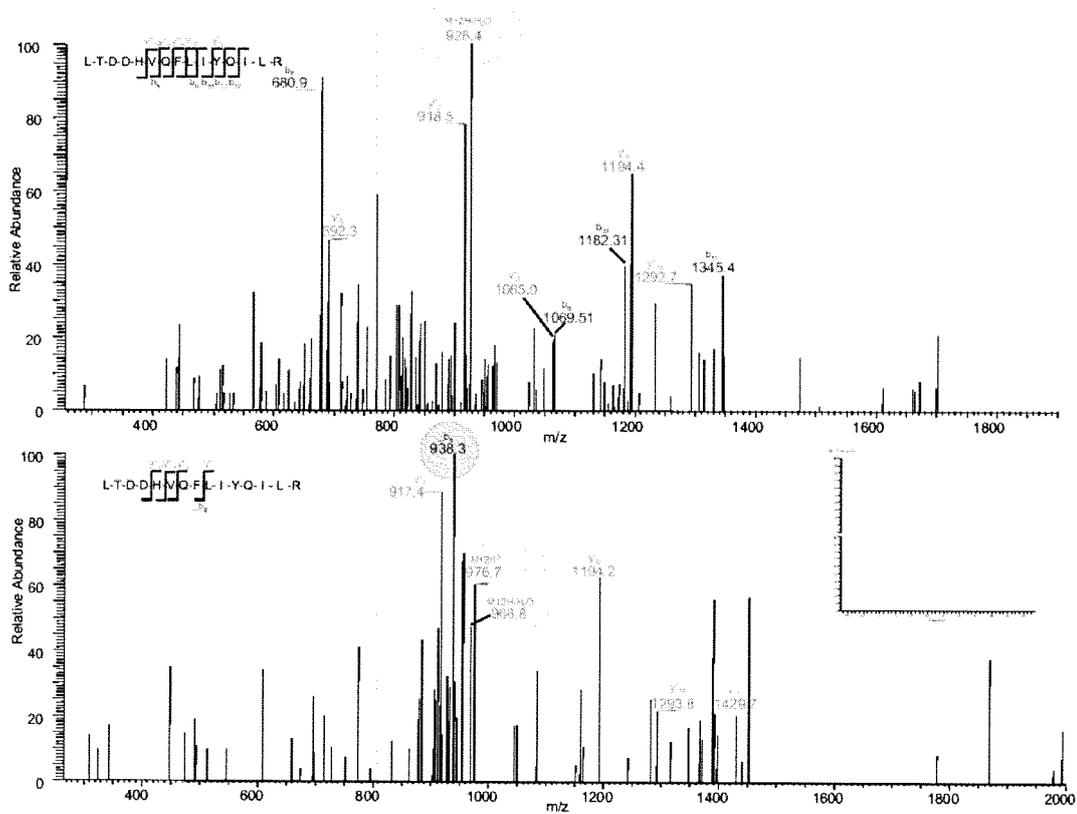


FIGURA 9

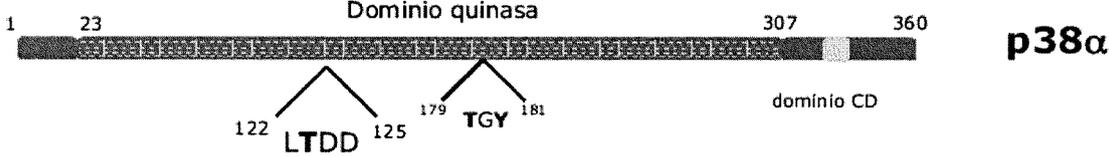
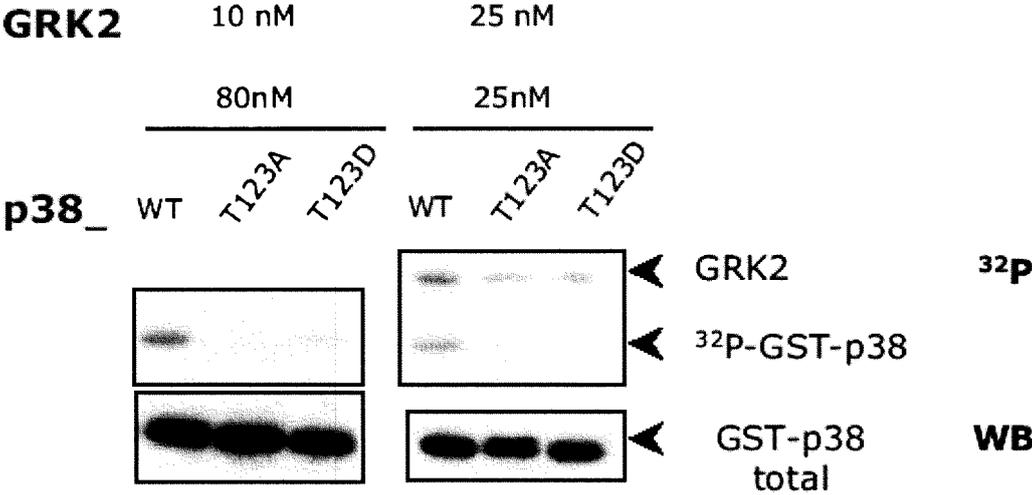


FIGURA 10

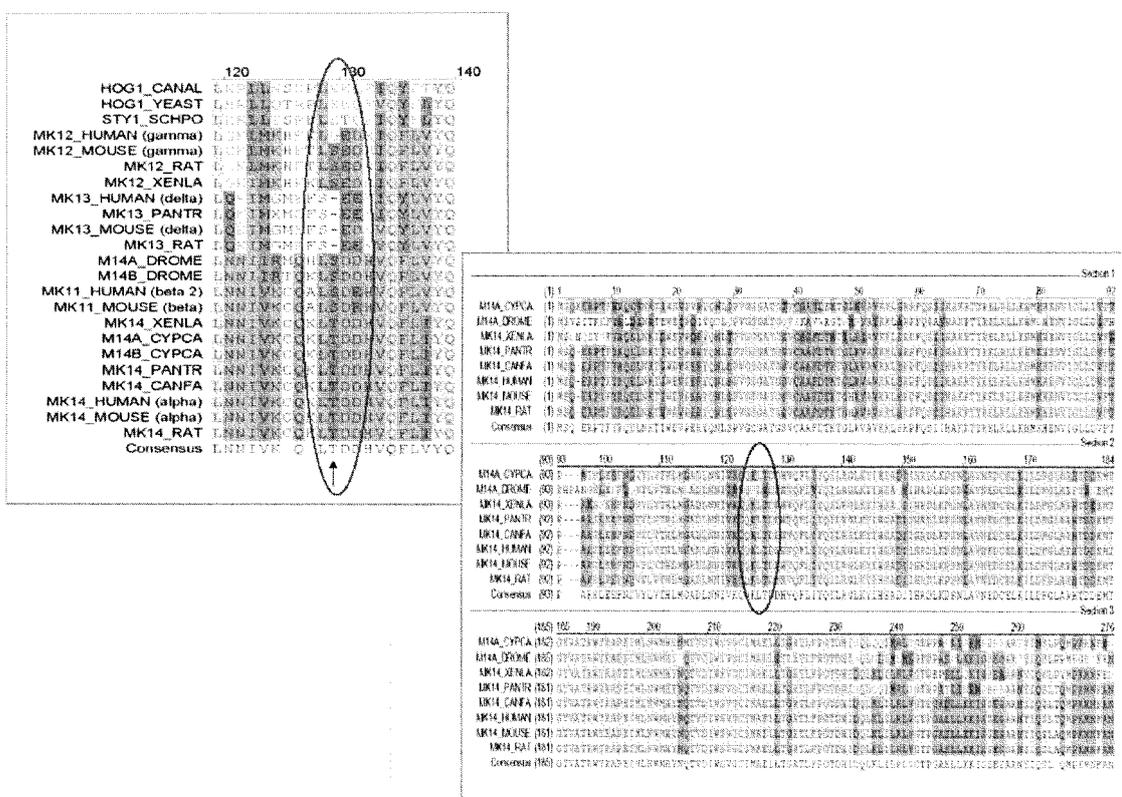
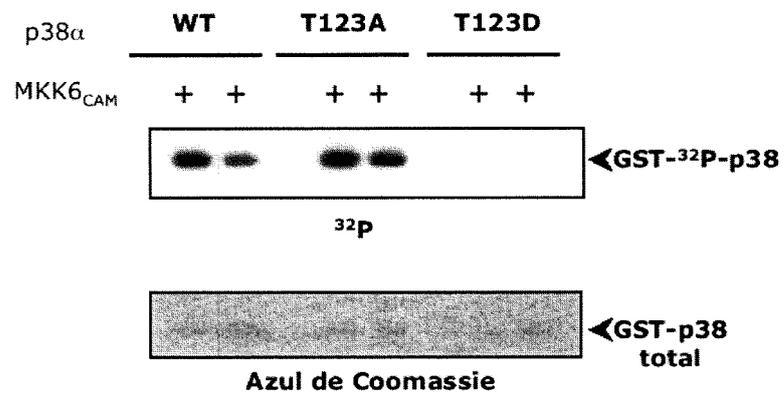


FIGURA 11

A



B

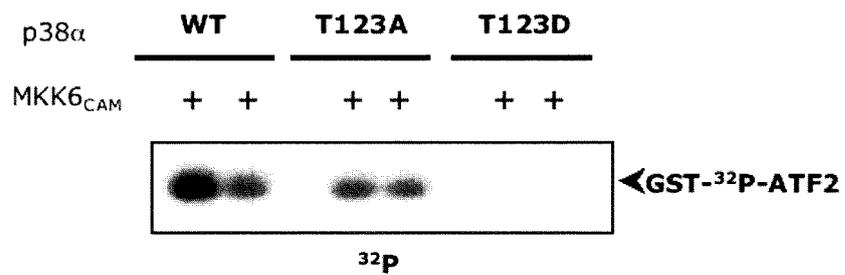
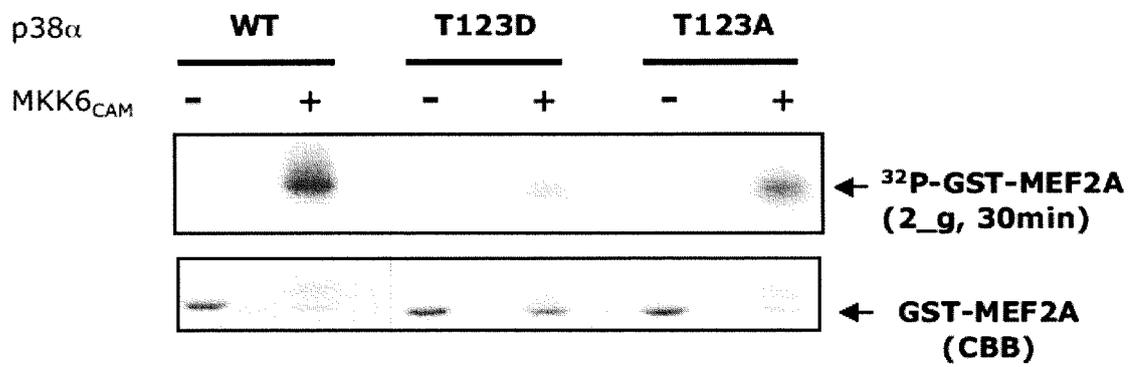


FIGURA 12

A



B

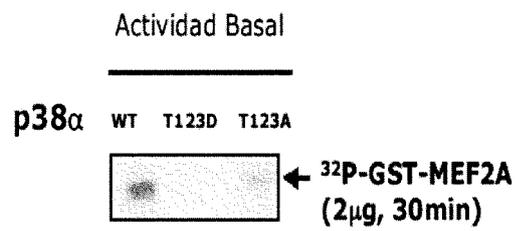


FIGURA 13

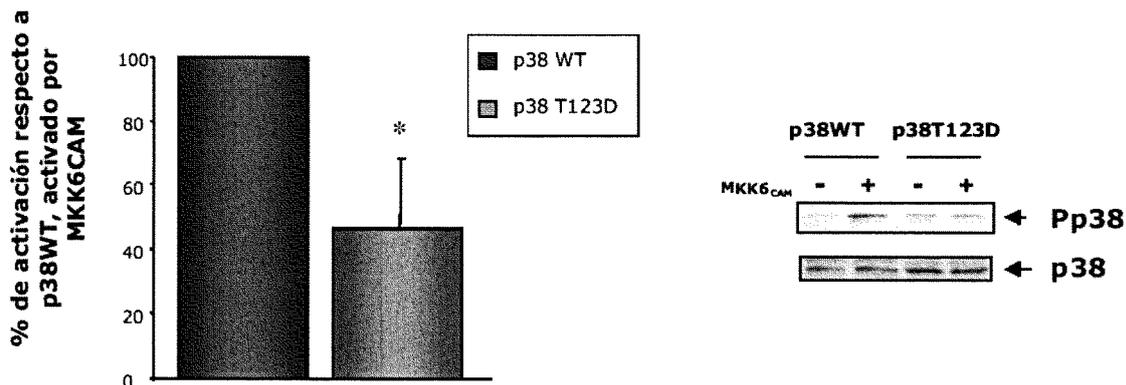


FIGURA 14

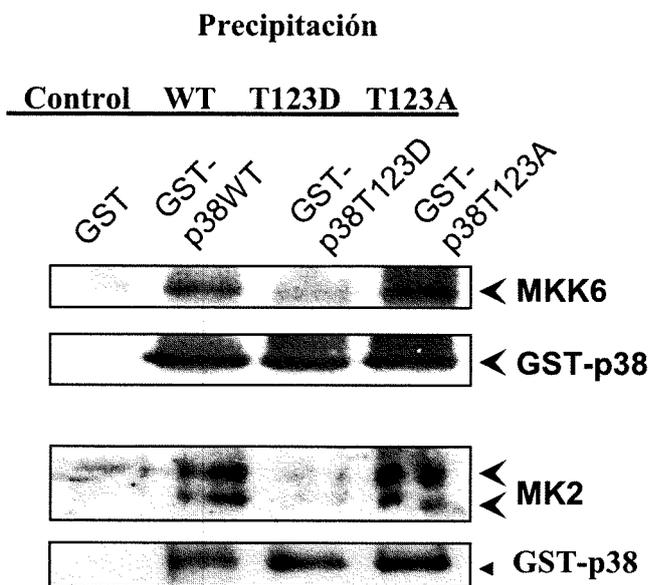


FIGURA 15

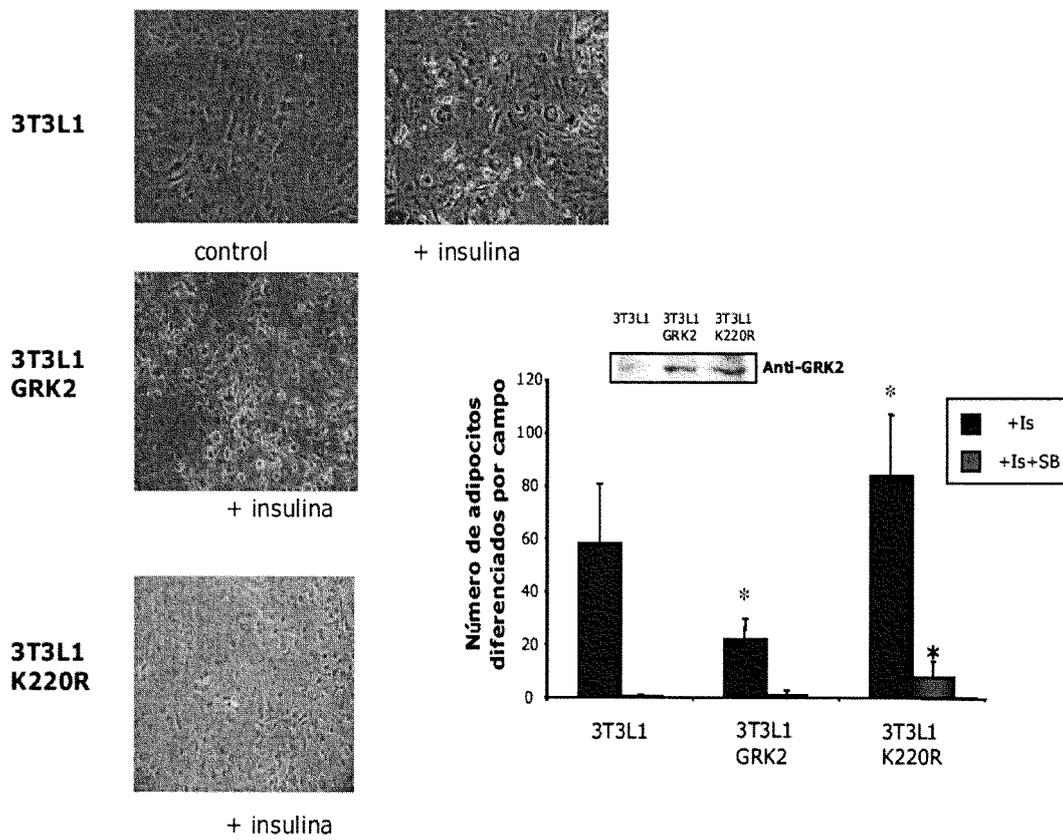
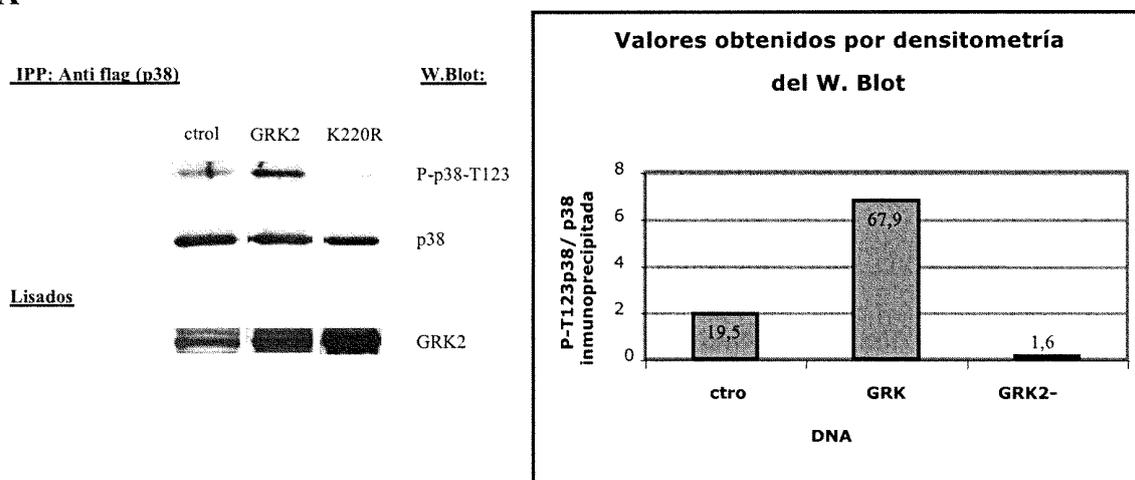


FIGURA 16

A



B

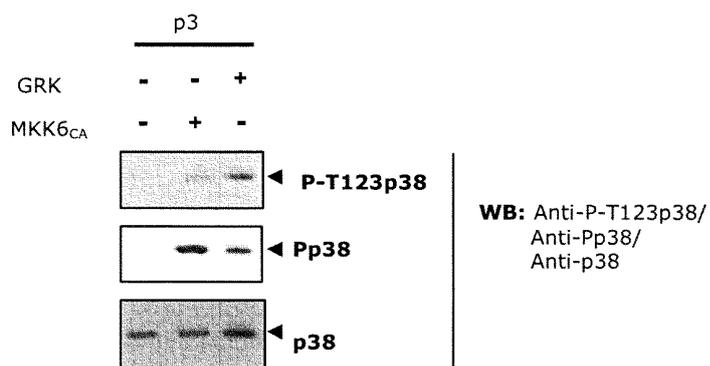


FIGURA 17

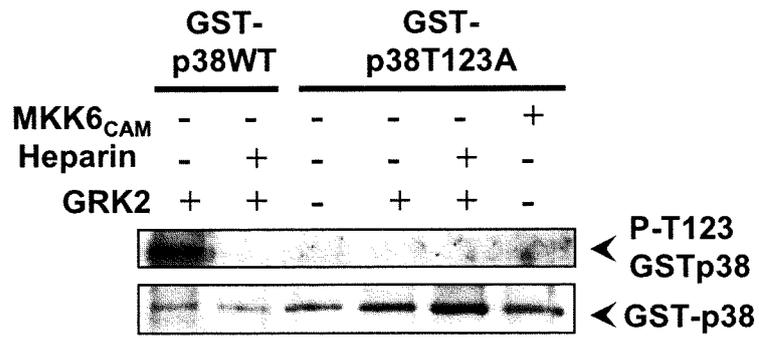
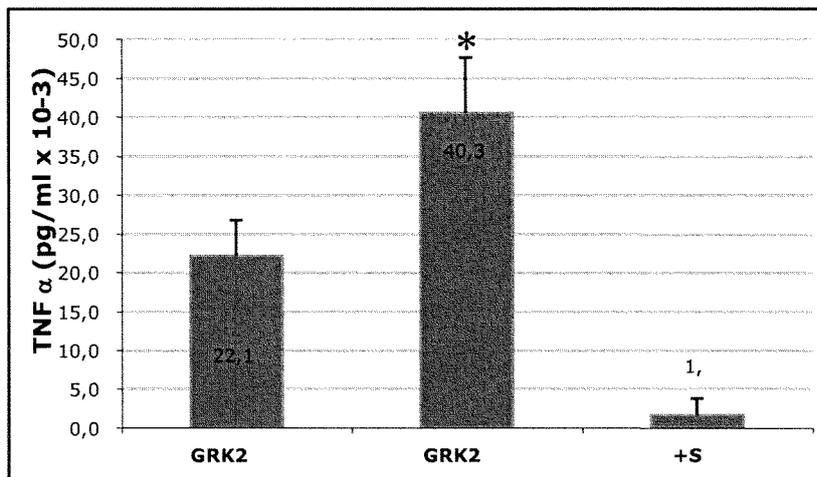


FIGURA 18



ES 2 357 681 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

5 <120> NEW PHOSPHORYLATION SITE OF MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASES, MODIFIED PROTEINS AND APPLICATIONS

<130> P1467PC00

10 <150> P200501404
<151> 2005-06-10

15 <160> 10

<210> 1
<211> 360

20 <212> PRT
<213> *Mus musculus*

<223> p38 alpha protein

25 <400> 1

30 Met Ser Gln Glu Arg Pro Thr Phe Tyr Arg Gln Glu Leu Asn Lys Thr
1 5 10 15

Ile Trp Glu Val Pro Glu Arg Tyr Gln Asn Leu Ser Pro Val Gly Ser
20 25 30

35 Gly Ala Tyr Gly Ser Val Cys Ala Ala Phe Asp Thr Lys Thr Gly His
35 40 45

Arg Val Ala Val Lys Lys leu Ser Arg Pro Phe Gln Ser Ile Ile His
50 55 60

40 Ala Lys Arg Thr Tyr Arg Glu Leu Arg Leu Leu Lys His Met Lys His
65 70 75 80

45 Glu Asn Val Ile Gly Leu Leu Asp Val Phe Thr Pro Ala Arg Ser Leu
85 90 95

Glu Glu Phe Asn Asp Val Tyr Leu Val Thr His Leu Met Gly Ala Asp
100 105 110

50 Leu Asn Asn Ile Val Lys Cys Gln Lys Leu Thr Asp Asp His Val Glu
115 120 125

55 Phe Leu Ile Tyr Gln Ile Leu Arg Gln Leu Lys Tyr Ile His Ser Ala
130 135 140

ASp Ile Ile His Arg Asp Leu Lys Pro Ser Asn Leu Ala Val Asn Glu
145 150 155 160

60 Asp Cys Glu Leu Lys Ile Leu Asp Phe Gly Leu Ala Arg His Thr Asp
165 170 175

Asp Glu Met Thr Gly Tyr Val Ala Thr Arg Trp Tyr Arg Ala Pro Glu
180 185 190

65 Ile Met Leu Asn Trp Met His Tyr Asn Gln Thr Val Asp Ile Trp Ser

ES 2 357 681 T3

<210> 4
<211> 36
<212> DNA
5 <213> Artificial sequence

<220>
<223> Reverse mutagenic oligonucleotide used for the p38T123A mutant
10
<400> 4
ctgaacgtgg tcgtcggcca gcttctggca cttcac 36

<210> 5
<211> 36
<212> DNA
20 <213> Artificial sequence

<220>
<223> Forward mutagenic oligonucleotide used for the p38T123D mutant
25
<400> 5
gtgaagtgcc agaagctgga cgacgaccac gttcag 36

<210> 6
<211> 36
<212> DNA
35 <213> Artificial sequence

<220>
<223> Reverse mutagenic oligonucleotide used for the p38T123D mutant
40
<400> 6
gtgaagtgcc agaagctgga cgacgaccac gttcag 36

<210> 7
<211> 55
<212> DNA
50 <213> Artificial sequence

<220>
<223> GTW-FWD oligonucleotide used to make the truncated protein GST-280-360p38
55
<400> 7
ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt cgctgtcgac ctactggaga agatg 55

<210> 8
<211> 54
<212> DNA
65 <213> Artificial sequence

ES 2 357 681 T3

<220>

<223> GTW-REV oligonucleotide used to make the truncated protein GST-280-360p38

5 <400> 8

ggggaccact ttgtacaaga aagctgggctc tcaggactcc atttcttctt ggctc

54

10 <210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

15

<220>

<223> Oligonucleotide used for the expression and purification of MAPKAPK2 (MK2)

20 <400> 9

ggggccatgg tcaagtccgg cc

22

25 <210> 10

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial sequence

30

<220>

<223> Oligonucleotide used for the expression and purification of MAPKAPK2 (MK2)

35 <400> 10

ccccctcgag gtgggccaga gccgcagc

28

40

45

50

55

60

65