

UCH - FC
MAG - EBE
D 278
C.A

ESTABLECIMIENTO DEL NEUROBLASTOMA N1E 115 COMO UN MODELO DE LA DIFERENCIACION NEURONAL



UNIVERSIDAD DE CHILE

Entregada a La Universidad de Chile
En cumplimiento parcial de los requisitos
Para optar al Grado de

**MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS CON
MENCION EN
ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA EVOLUTIVA**



Por

CRISTIAN ALEJANDRO DE GREGORIO CONCHA

Agosto de 2010

Director de Tesis : Dr. Christian González B.

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGISTER**

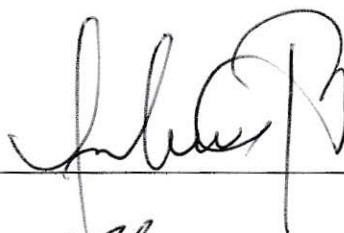
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster, presentada por el candidato

CRISTIAN ALEJANDRO DE GREGORIO CONCHA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas con Mención en Ecología y Biología Evolutiva, en el examen de Defensa Rendida el día 06 de Mayo de 2010.


Director de Tesis:

Dr. Christian González B.

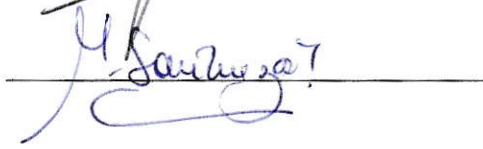


Comisión de Evaluación de Tesis:

Dra. Verónica Palma



Dra. Magdalena Sanhueza





Agradecimientos

Primero que nada, me gustaría agradecer a mis padres, que desde pequeño me motivaron para sacar adelante una carrera profesional, y se esforzaron durante años para poder darme la mejor educación posible. De la misma forma, agradecer a mis hermanos Fernando, Juan Pablo e Isabel, a mi Weli Inés, y a toda mi numerosa familia curicana, porque siempre están ahí cuando los necesito.

De la misma forma, agradecer el apoyo incondicional de mi familia adoptiva; obviamente, a mi polola Javiera, la luz de mi vida que alumbra cada uno de los pasos que doy, así como a su madre, Carolina, y el resto de su parlanchina familia, que siempre se preocupan por mí como si fuera uno más de la familia.

También en mi recuerdo permanecen en forma incesante mis compañeros y mis amigos del laboratorio. Agradezco a toda la gente del LDCN, al Christian, la Cristi, el Erick, la Carola Blackhill, la invitada (Carola Head), los Danieles, el Scofield, y a mis queridos vecinos del edificio, que siempre se portaron un 7. Todos ellos fueron fundamentales para la realización de mi trabajo.

Y para concluir, agradecer a mis amigos, por su gran apoyo y amistad en las buenas, las más o menos, y las malas. Gracias por estar ahí para conversar, pasar con bromas los ratos amargos, con pichangas, perreos y paseos a la playa. Ustedes saben cuánto los quiero.

Simplemente, me considero un agradecido de la vida, porque tengo todo lo que un ser humano podría desear: amor, trabajo, salud, amistad, y por supuesto, el vil dinero.

A todos ustedes, Gracias!!!!





I.-ÍNDICE

I.- ÍNDICE.....	ii
II.- ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
III.- ABREVIATURAS.....	iv
1.- RESUMEN.....	1
2.- ABSTRACT.....	2
3.- INTRODUCCIÓN.....	3
3.1 Desarrollo de la polaridad neuronal.....	3
3.2 Neuritogénesis en líneas celulares: emulando la diferenciación neuronal.....	6
3.3 Proteínas asociadas al control de los microtúbulos.....	8
3.4 Regulación de los microfilamentos de actina.....	12
3.5 La degradación de las proteínas y la inhibición del crecimiento neurítico.....	17
4.- HIPÓTESIS.....	19
5.- OBJETIVO GENERAL.....	20
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
6.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
6.1 MATERIALES.....	24
6.1.1 Material Biológico.....	24
6.1.2 Reactivos químicos y de cultivo celular.....	25
6.1.3 Anticuerpos.....	25
6.1.4 Plasmidios.....	27
6.2 MÉTODOS.....	28
6.2.1 Cultivo celular.....	28
6.2.2 Inducción de diferenciación neuronal.....	28
6.2.3 Análisis bioquímico.....	29
6.2.4 Inmunofluorescencia.....	30
6.2.5 Análisis morfométrico.....	31
6.2.6 Establecimiento de cultivos primarios.....	31



6.2.7 Inmunoprecipitación.....	32
6.2.8 Determinación de la actividad de rac1 y cdc42.....	33
6.2.9 Ensayo de separación de la fracción soluble y fibrilar de actina.....	34
6.2.10 Medición por ELISA de la actividad de las GTPasas de la familia de Rho	35
6.2.11. Transfección de DNA en las células N1E 115.....	36
6.2.12 Análisis Estadístico.....	36
7.-RESULTADOS.....	37
7.1 Establecimiento de un método eficiente para la diferenciación de la línea celular N1E 115.....	37
7.2 Cambios en la masa de las proteínas reguladoras del citoesqueleto durante diferenciación de las células N1E 115.....	43
7.2.1 Cambios en la regulación de los microtúbulos durante la diferenciación....	43
7.2.1.1 Proteínas asociadas a microtúbulos.....	43
7.2.1.2 Otras proteínas que se asocian a microtúbulos.....	49
7.2.2 Proteínas quinasas involucradas en diferenciación neuronal.....	52
7.2.3 Cambios en la regulación de la dinámica de actina durante la diferenciación en las células N1E 115.....	55
7.2.3.1 Análisis de los cambios de masa y actividad de rac1 y cdc42 en la diferenciación.....	55
7.2.3.2 Análisis del cambio de masa y actividad de RhoA.....	58
7.2.3.3 Control de la actividad de las GTPasas por los factores intercambiadores de nucleótido guanina (GEFs).....	62
7.2.3.4 Cambio en la fosforilación de cofilina mediado por la activación de PAK durante la diferenciación.....	62
7.3 Cambios en la polimerización de actina durante el proceso de diferenciación neuronal.....	66
7.4 Analizar el efecto de una familia de proteasas y su inhibición sobre la diferenciación neuronal.....	70

7.5 Establecer al neuroblastoma N1E 115 como un buen modelo para realizar transfecciones.....	77
7.6 Establecimiento de un paralelo entre el proceso de extensión de neuritas de las células N1E 115 y el desarrollo de polaridad en neuronas de rata.....	84
7.6.1 Establecimiento de los cultivos primarios de hipocampo de rata (E18).....	84
7.7 Comparación de las células de neuroblastoma N1E 115 diferenciadas y las neuronas primarias en cultivo.....	86
8. DISCUSIÓN.....	90
8.1 Establecimiento de un método eficiente para la diferenciación de la línea celular murina N1E 115.....	90
8.2 La diferenciación del neuroblastoma N1E 115 indujo cambios en los patrones del citoesqueleto.....	92
8.2.1 Proteínas que regulan la polimerización de los microtúbulos.....	93
8.2.2 La diferenciación indujo cambios en los niveles y actividad de proteínas de señalización.....	97
8.2.3 Proteínas que regulan la polimerización de los microfilamentos de actina.....	99
8.3 La diferenciación del neuroblastoma N1E 115 puede ser inducida por la modulación de la actividad de las calpaínas.....	101
8.4 El neuroblastoma N1E 115 es un buen modelo para realizar estudios de pérdida o ganancia de función.....	105
8.5 Comparación de las células de neuroblastoma N1E 115 diferenciadas y las neuronas primarias en cultivo.....	107
9.- CONCLUSIONES.....	111
10.- REFERENCIAS.....	114



II.-ÍNDICE DE FIGURAS



Figura 1: Etapas del desarrollo de polaridad neuronal	4
Figura 2: Comportamiento dinámico de los microtúbulos.....	11
Figura 3: Estructuras de actina filamentososa en un cono de crecimiento neuronal.....	13
Figura 4: Rol de las GTPasas pequeñas de la familia de Rho A en la regulación del citoesqueleto de actina.....	16
Figura 5: Ensayos de diferenciación celular para el neuroblastoma N1E 115 con 3 métodos diferentes.....	39
Figura 6: Cuantificación de los patrones de diferenciación obtenidos con los tratamientos aplicados.....	41
Figura 7: Variaciones en la morfología celular producto de la diferenciación.....	42
Figura 8: Cambios en la abundancia de las proteínas MAPs al inducir la diferenciación neuronal.....	46
Figura 9: Distribución subcelular de las principales MAPs y las proteínas CRMP-2 y SCG10 en células N1E 115 diferenciadas e indiferenciadas.....	48
Figura 10: Cambios en la abundancia de proteínas capaces de modular los microtúbulos durante la diferenciación.....	51

Figura 11: Cambios en la masa y la actividad de CDK5 y su activador p35, y la JNK durante la diferenciación en células N1E 115.....	54
Figura 12: Análisis de los cambios en la masa y en la actividad de la GTPasa rac1 durante la diferenciación en células N1E 115.....	57
Figura 13: Análisis de los cambios en la masa y en la actividad de la GTPasa cdc42 durante la diferenciación neuronal en células N1E 115.....	59
Figura 14: Análisis de los cambios de masa y de actividad de RhoA durante la diferenciación en las células N1E 115	60
Figura 15: Cambios en la masa de las GEF Tiam1 y trio durante la diferenciación de las células N1E 115.....	63
Figura 16: Cambios en la masa y la actividad de PAK durante la diferenciación.....	65
Figura 17: Cambios en la masa y fosforilación para las proteínas LIMK1 y cofilina durante el proceso de diferenciación.....	67
Figura 18: Cambios en la polimerización de actina durante la diferenciación neuronal.....	68
Figura 19: Regulación de la masa de las calpaínas y su actividad, mediada por la quinasa PKA.....	72
Figura 20: Variaciones morfológicas de las células N1E 115 tratadas con el inhibidor farmacológico de las calpaínas, el ALLM.....	75
Figura 21: Regulación de los niveles de la calpastatina durante la diferenciación.....	78



Figura 22: Eficiencia de transfección de la línea celular N1E 115, y efecto de la sobreexpresión de la proteína CRMP-2.....81

Figura 23: Cambios morfológicos mediados por la transfección de la proteína SCG10 y 4 variantes con mutaciones en residuos fosforilables.....83

Figura 24: Establecimiento de cultivos primarios de hipocampo de rata.....85

Figura 25: Paralelo entre la diferenciación en neuronas y en el neuroblastoma N1E 115.....89



III.-ABREVIACIONES

ABP	Proteína de unión a actina
ADF	Factor despolimerizante de actina
ALLM	N-acetil Leucina- Leucina- Metioninal
AMP	Adenosín monofosfato
AR	Ácido retinoico
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Suero albúmina de bovino
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
DBcAMP	Dibutiril Adenosín monofosfato cíclico
DIV	Días <i>in vitro</i>
DMEM	Medio modificado Eagle de Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
ECL	Reactivo quimiolumincente para <i>western blot</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
F-actina	Actina fibrilar
FBS	Suero fetal de bovino
GSK3 β	Glicógeno sintasa quinasa 3 beta
GTP	Guanosina trifosfato.
HBSS	Solución salina balanceada de Hank.
HRP	Peroxidasa de rábano

Ig	Inmunoglobulina
KDa	Kilodalton
KO	<i>Knock out</i>
MAP	Proteína asociada a microtúbulos
NGF	Factor de crecimiento neural
PBD	Dominio de interacción, P-21 binding domain
PBS	Solución tampón fosfato salino
PBST	PBS-Tween 0,05%
PMSF	Fluoruro de fenilmetanosulfonil
SDS-PAGE	Electroforesis denaturante en gel de poliacrilamida
siRNA	Ácido ribonucleico interferente pequeño
RNA	Ácido ribonucleico
TBS	Solución tampón Tris-NaCl

1.-RESUMEN

El proceso de diferenciación neuronal incluye el remodelamiento de la morfología celular, un evento que es fundamental para el correcto funcionamiento del sistema nervioso. El estudio de la neuritogénesis y el desarrollo de la polaridad han sido ampliamente estudiados *in vitro* en modelos murinos y de rata durante más de 20 años, sin embargo, otros trabajos se han enfocado en emular el proceso de diferenciación neuronal en líneas celulares, donde ha adquirido una notable importancia el feocromocitoma de rata PC12. Éste ha sido el modelo celular más empleado, desde que se descubrió que era capaz de adoptar una morfología de tipo neuronal al ser inducida por factores neurotróficos. Sin embargo, una de sus desventajas es que no posee un origen de sistema nervioso central, lo que impide estudiar en ella la totalidad de proteínas expresadas normalmente por las neuronas.

La línea celular N1E 115 (neuroblastoma de cerebro de ratón) resulta ventajosa para el estudio de la neuritogénesis, ya que se diferencia con la mera privación de nutrientes, en conjunto con la adición al medio de crecimiento de compuestos que promueven la diferenciación neuronal. En este trabajo se estudió algunos de los procesos moleculares responsables de los cambios morfológicos durante la diferenciación, asociados principalmente a la estabilización del citoesqueleto de microtúbulos y los filamentos de actina. Además, se determinó que la inhibición de una familia de proteasas también juega un rol clave en la diferenciación del neuroblastoma. Finalmente, se planteó su utilidad como un nuevo modelo para el estudio de proteínas involucradas en la neuritogénesis, y para la búsqueda de nuevos marcadores moleculares de diferenciación neuronal.

2.-ABSTRACT

Neuronal differentiation is determined by remodeling of cell morphology, an event that is essential for the proper functioning of the nervous system. While the study of neuritogenesis and development of polarity has been extensively studied *in vitro* in mice and rats for over 20 years, other studies have focused on emulating the process of neuronal differentiation in cell lines, where the rat pheochromocytoma PC12 cell line has acquired a remarkable importance. This has been the most widely used cellular model, since the discovery that under the addition of neurotrophic factors PC12 cells adopt a neuron-like morphology. However, since PC12 cells are not bona fide nervous system cell, they would lack some of the properties found in neurons.

The N1E 115 cell line (derived from mouse brain) can extend neurites after nutrients withdrawal in addition to the presence of compounds in the growth medium that promote neuronal differentiation. However, this cell line has not been phenotypically characterized and the detailed description of cytoskeleton expressed proteins in the differentiated and undifferentiated states is unknown. Therefore, in this work, we studied the morphological and molecular changes that N1E 115 cells undergo during differentiation, mainly associated with changes in the expression and activity of proteins related to the control of cytoskeleton stability and the activity inhibition of a protease family. This model may be useful for studying proteins involved in neuritogenesis and to screen for new molecular markers of neuronal differentiation.

3.-INTRODUCCIÓN

Las neuronas son células altamente diferenciadas y especializadas para realizar sus funciones fisiológicas. Gracias a su morfología, las neuronas son capaces de establecer circuitos que almacenan y transmiten información esencial para las funciones de los organismos vivos (Horton y Ehlers, 2003; Tojima e Ito, 2004). A pesar de que los distintos tipos de neuronas exhiben diversas formas y tamaños, éstas suelen estar divididas en 2 dominios funcionales discretos, muy diferentes a nivel estructural, funcional y bioquímico: el compartimiento somadendrítico y el axonal (Craig y Banker, 1994). El estudio del proceso de neuritogénesis y de los eventos moleculares que definen la diferenciación de una neurita en un axón o una dendrita, han sido ampliamente estudiados en una disciplina denominada polaridad neuronal.

3.1 Desarrollo de la polaridad neuronal

El grupo de Gary Banker ha sido el pionero en describir los acontecimientos morfológicos tempranos ocurridos en neuronas hipocampales de rata cultivadas *in vitro* (Dotti *et al*, 1988). Desde ahí en adelante, el proceso de desarrollo de la polaridad neuronal se dividió en 5 etapas arbitrarias, que abarcan desde la adhesión de la neurona a la placa de cultivo y la formación de pequeños filopodios (la etapa 1), hasta alcanzar su desarrollo completo, con un largo axón y muchas dendritas ramificadas y provistas de espinas dendríticas (etapa 5), hacia las dos semanas de cultivo *in vitro* (Figura 1). Sin

embargo, muchos de los estudios de la polaridad neuronal se han enfocado principalmente en la transición de la etapa 2 a la 3 (que las neuronas alcanzan alrededor de 1 a 2 días *in vitro*), porque corresponde al momento en que una de las neuritas comienza a elongarse más velozmente que el resto, para posteriormente convertirse en un axón, mientras que las demás neuritas serán destinadas a diferenciarse en dendritas a partir de la etapa 4.

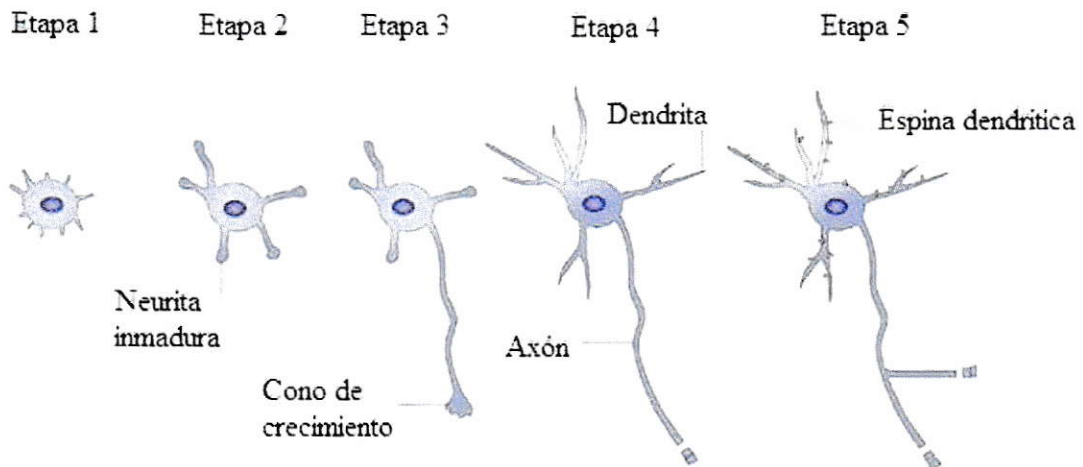


Figura 1: Etapas del desarrollo neuronal. Este esquema muestra las 5 etapas definidas arbitrariamente para el desarrollo de una neurona *in vitro*. Durante la etapa 1, la célula se adhiere a la placa de cultivo y comienza la formación de pequeños filopodios. En la etapa 2, comienza a extender prolongaciones de mayor calibre y longitud equivalente, las neuritas, una de las cuales se diferenciará para convertirse en axón durante la etapa 3, mientras las demás neuritas posteriormente se transformarán en dendritas. Durante la etapa 4, se produce una elongación rápida del axón, que madurará completamente hacia la etapa 5, período en el cual las dendritas se verán provistas de abundantes ramificaciones y espinas dendríticas (Adaptado de Arimura y Kaibuchi, 2007).

El desarrollo de la polaridad neuronal involucra muchas moléculas que participan en las cascadas de señalización que contribuyen a la correcta formación de la morfología de la célula (Nakata e Hirokawa, 2007). Este nivel de especificación, que se comienza a determinar desde el desarrollo embrionario de los organismos, debe mantenerse constante durante toda su vida, a fin de poder mantener la funcionalidad del sistema nervioso. De esta forma, resulta clave una fina modulación del citoesqueleto y de la maquinaria encargada del tráfico de membranas (Foletti *et al*, 1999).

El dilucidar cómo las neuronas llevan a cabo la pérdida de la simetría, regulan su tamaño y su forma durante el desarrollo, y cómo se establecen los cambios morfológicos que alteran la conectividad funcional entre neuronas pre y post-sinápticas, se ha convertido en un gran y difícil desafío durante las últimas décadas. Muchos de los procesos que controlan la diferenciación de los precursores neurales a neuronas se han estudiado *in vitro* en cultivos primarios provenientes modelos animales, e incluyen los cambios en la activación e inhibición de las rutas metabólicas relacionadas con la síntesis y destinación de proteínas y lípidos, y los cambios de actividad de proteínas quinasas y fosfatasas, que finalmente llevan a modificar los patrones establecidos para el citoesqueleto de microtúbulos y los filamentos de actina (Satoh *et al*, 1988).

3.2 Neuritogénesis en líneas celulares: emulando la diferenciación neuronal

Existe un abordaje complementario para comprender el fenómeno de la neuritogénesis, basado en la utilización de modelos de células inmortalizadas. Uno de los ejemplos más clásicos es aquél que describieron Greene y Tischler (1976), trabajo en el cual se estableció a la línea celular de rata PC12 (proveniente de un feocromocitoma, un tumor de la médula suprarrenal) como un valioso modelo para la diferenciación neuronal. En presencia del factor de crecimiento neuronal (NGF), las células PC12 modifican drásticamente su morfología, desde células esféricas a células que extienden neuritas y adquieren propiedades de neuronas simpáticas (Kobayashi *et al*, 1997). Este cambio de morfología involucra la activación de vías de señalización que se encuentran río abajo de la proteína tirosina quinasa de membrana TrkA (Huang y Reichardt, 2003). En este contexto, el cultivo de líneas celulares que son capaces de diferenciarse a una morfología de tipo neurona se puede utilizar como un interesante acercamiento para el estudio de los procesos asociados a la extensión y retracción de las prolongaciones celulares, un proceso que recapitula ciertos aspectos del desarrollo de polaridad en neuronas.

Una de las principales ventajas que permite el trabajo con líneas celulares, es que éstas se mantienen en constante división. Esto permite obtener una amplia cantidad de células en lapsos cortos de tiempo, lo que puede resultar muy beneficioso al momento de realizar experimentos que requieren un número elevado de células, como las inmunoprecipitaciones, los ensayos de pull down o las electroforesis en geles de 2

dimensiones. Por otro lado, las líneas celulares corresponden a cultivos homogéneos, mientras que las células obtenidas desde los cultivos primarios nunca corresponden a un solo tipo celular, lo que puede desencadenar las interferencias de otros tipos celulares no deseados. Y finalmente, una ventaja muy importante de las líneas celulares respecto a las neuronas es su alta eficiencia de transfección de DNA o RNAs de interferencia, lo que facilita la realización de estudios asociados al uso de herramientas genéticas.

La línea celular N1E 115, un neuroblastoma que se aisló de un tumor del cerebro de un ratón (Amano *et al.*, 1972), podría constituir un modelo de diferenciación interesante. Esta línea celular ha sido anteriormente utilizada en la investigación del rol de neurotransmisores y sus respectivos receptores, y ha sido una herramienta para algunos estudios de neuritogénesis (Jenkins *et al.*, 1996; Sarnier *et al.*, 2000; Yakubchik *et al.*, 2005). Una de las ventajas que tiene el uso de esta línea celular para los estudios de diferenciación, es que existe evidencia que da cuenta de cambios morfológicos y fisiológicos importantes que se producen durante el proceso de transformación hacia una célula de tipo neurona (Kruman *et al.*, 1993; Oh *et al.*, 2006). Estos cambios se obtienen con la simple privación de nutrientes (bajas concentraciones de suero fetal), en conjunto con la adición de pequeños porcentajes de compuestos diferenciadores al medio de crecimiento (Clejan *et al.*, 1996). Además, la línea celular N1E 115 posee la ventaja de expresar proteínas que son tejido-específicas para el sistema nervioso central, en tanto que estas moléculas se podrían estudiar en otras líneas celulares no neuronales (o que no derivan del sistema nervioso central) sólo por medio de aproximaciones, como las transfecciones. Sin embargo, como la línea celular N1E 115 aún no ha sido

caracterizada fenotípicamente, no se conoce a cabalidad la totalidad de proteínas asociadas a la diferenciación que se expresan en su estado diferenciado e indiferenciado. Este trabajo constituye un punto de inicio para lograr este objetivo.

Entre las principales proteínas que se relacionan con la diferenciación y la extensión de neuritas, se encuentran las asociadas al control del citoesqueleto y al transporte polarizado de proteínas y lípidos, por medio del aparato de Golgi. En el presente trabajo, nos enfocaremos en caracterizar las proteínas que regulan la dinámica del citoesqueleto, y en cómo varían sus niveles de abundancia y sus modificaciones post-traduccionales en correlación con la diferenciación de la línea celular N1E 115.

3.3 Proteínas asociadas al control de los microtúbulos

Dentro del conjunto de proteínas reguladoras del citoesqueleto en neuronas, existe un pequeño grupo que ha sido extensamente estudiado durante más de 3 décadas: las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs), las responsables de los procesos de ensamblaje y estabilización de los microtúbulos (Mitchison y Kirschner, 1988). La función de las MAPs no sólo se encuentra asociada a su abundancia y localización en las neuronas, sino también a la regulación de su actividad por medio de fosforilaciones (donde se pueden considerar relevantes quinasas como CDK5, GSK3 β y JNK), que pueden permitir su activación, la disminución de su actividad o su inactividad (Arimura y Kaibuchi, 2007). Las dos clases de proteínas asociadas a microtúbulos más

importantes son las de la familia MAP1, constituida por la MAP1A y B (Halpain y Dehmelt, 2006), y por otro lado, las proteínas de la familia de MAP2/tau (Dehmelt y Halpain, 2005).

Otros integrantes del grupo de las MAPs, que no se encuentran entre las más convencionales, son las fosfoproteínas doblecortina (DCX) y LIS1. Si bien ambas poseen dominios de interacción con microtúbulos y poseen capacidad para inducir su estabilización (Shmueli *et al*, 2001; Sapir *et al*, 1999), también se les han asociado otras funciones celulares, ya que son parte de las vías de señalización que controlan la migración neuronal (Gdalyahu *et al*, 2004). Esto queda de manifiesto en el hecho de que los genes codificantes para ambas proteínas fueron inicialmente descritos como los responsables de enfermedades humanas asociadas a problemas de migración neuronal. En el caso de LIS1, su deficiencia produce una enfermedad denominada lisencefalia o síndrome de Miller-Dieker (Caspi *et al*, 2000), mientras que la ausencia de DCX produce la enfermedad de lisencefalia asociada al cromosoma X o síndrome de doble corteza (Glesson *et al*, 1998).

Otra proteína que es altamente expresada durante el desarrollo del sistema nervioso y tiene un importante papel en la nucleación de los microtúbulos y la neuritogénesis, es la CRMP-2 (Fukata *et al*, 2002). Su función se basa en la unión a heterodímeros de tubulina, transportándolos hacia el extremo distal de la neurita y promoviendo la polimerización de los microtúbulos *in vivo* (Fukata *et al*, 2002). Esta proteína se encuentra enriquecida en las puntas de los axones de las neuronas

diferenciadas, y se ha determinado que posee un rol fundamental para el desarrollo de la polaridad (Inagaki *et al*, 2001). La sobreexpresión de esta proteína conduce al crecimiento de neuronas con múltiples axones o con axones más elongados, mientras que el uso de un siRNA específico para esta proteína genera neuronas sin desarrollo de polaridad o con axones más cortos (Arimura y Kaibuchi, 2007).

En contraposición con las proteínas anteriormente descritas, otras familias de proteínas, como las *stathminas*, poseen un rol relacionado con la desestabilización de microtúbulos, por lo que también tienen una función muy relevante en el control del citoesqueleto. El miembro de la familia de las *stathminas* cuya expresión resulta más abundante en el sistema nervioso central durante el desarrollo, es la proteína SCG10 (Morii *et al*, 2006). Su expresión es altamente regulada durante el desarrollo del sistema nervioso, donde se encuentra en altas cantidades en estadios embrionarios, regulando el citoesqueleto de microtúbulos y la neuritogénesis. Esta molécula desempeña un rol antagónico al de las proteínas MAPs. Su función es finamente modulada por las serina/treonina quinasas JNK, PKA y CDK5, las cuales regulan su actividad por medio de fosforilaciones en 4 residuos específicos (Antonsson *et al*, 1998). La actividad de esta proteína se ve disminuida por las fosforilaciones en sus 4 residuos de serina en una forma dosis dependiente (Grenningloh *et al*, 2004). Por lo tanto, es un buen candidato para entender cómo se regula el balance entre los factores que promueven el ensamblaje y el desensamblaje de los microtúbulos, comportamiento conocido como inestabilidad dinámica (Tataruk *et al*, 2006; Figura 2).

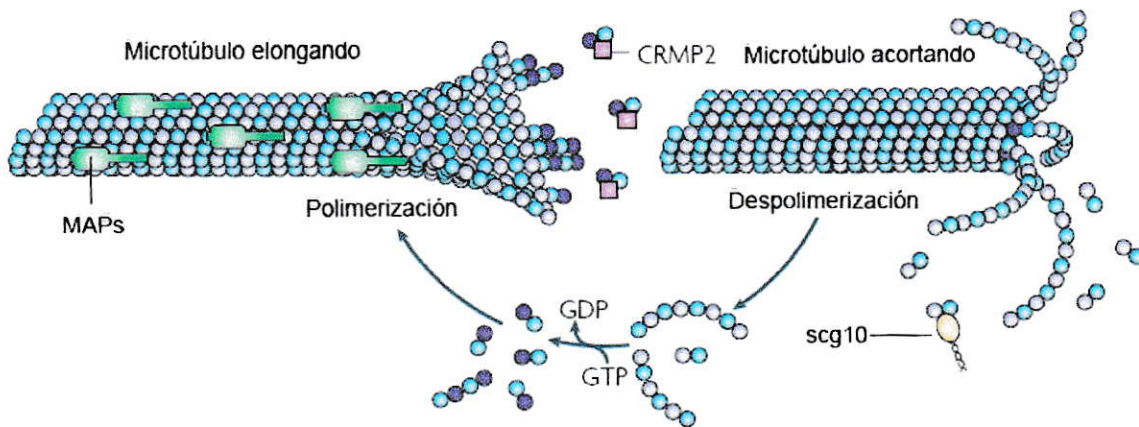


Figura 2: Comportamiento dinámico de los microtúbulos. Si bien los microtúbulos se encuentran en un estado metaestable, pueden pasar por ciclos de nucleación (polimerización), donde se potencia la función estabilizadora de las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) y la proteína transportadora CRMP-2, o por ciclos de catástrofe, donde los microtúbulos rápidamente se desorganizan, debido a la acción de proteínas desestabilizadoras como la SCG10. Una vez que se establece una señal de rescate, los microtúbulos se vuelven a rearmar. Debido a este comportamiento, se dice que los microtúbulos poseen una estabilidad dinámica (adaptado de Conde y Cáceres, 2009).

3.4 Regulación de los microfilamentos de actina

Los microtúbulos y sus proteínas asociadas no son los únicos responsables del control de la morfología celular. El citoesqueleto de actina es fundamental para el desarrollo de neuritas, ya que se estima que éste es el motor que posee la fuerza inicial para poder extender un proceso adelantado, que luego se consolida con la adición de microtúbulos y de membranas. En el eje principal del crecimiento de una neurona durante el proceso de diferenciación, el cono de crecimiento axonal, se pueden distinguir varias estructuras filamentosas de actina soportando el proceso adelantado, como lo son los geles (filamentos entrecruzados) y manojos transversales y longitudinales de actina (Pak *et al*, 2008; Lowery *et al*, 2009; Figura 3). Por lo tanto, el control de la polimerización, despolimerización y *severing* de los filamentos de actina resulta muy relevante para la protrusión y retracción de las prolongaciones tempranas, sobre todo en el axón, donde se manifiesta la más elevada dinámica de los filamentos de actina. Esto quedó evidenciado cuando se determinó que la sola adición de citocalasina-D a una neurita indiferenciada desencadena que ésta se convierta en axón, mientras que la adición transitoria de citocalasina-D al medio de cultivo de neuronas *in vitro* genera células multiaxónicas sin polaridad (Bradke y Dotti, 1999).

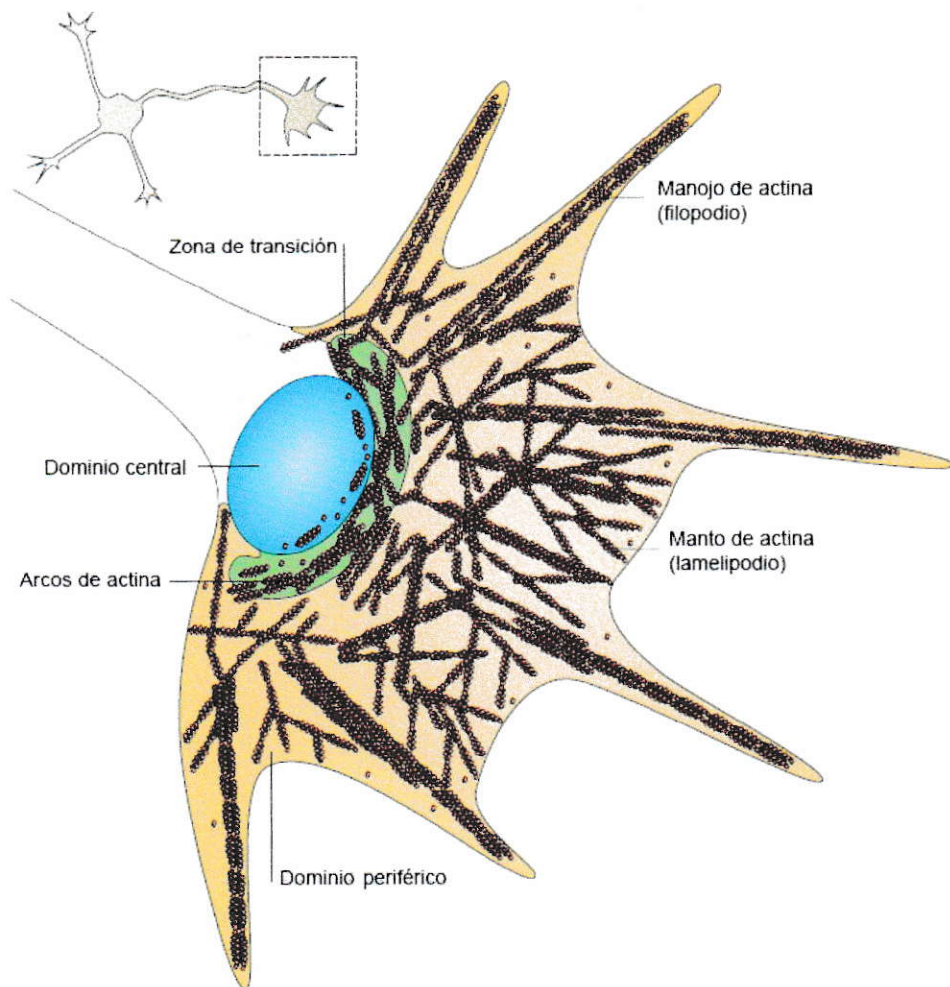


Figura 3: Estructuras de actina filamentosa en un cono de crecimiento neuronal. El cono de crecimiento, ubicado en la parte distal de una neurita, se puede dividir en tres zonas: el dominio periférico, compuesto de filopodios y lamelipodios, el dominio de transición, rico en arcos de actina (manojos de actina transversales), y el dominio central, sin presencia de actina, pero donde se encuentran en abundancia los microtúbulos. Adaptado de Pak *et al*, 2008.

En este contexto, el control de los filamentos de actina resulta clave para la extensión de los procesos adelantados. Las GTPasas de la familia de Rho son consideradas como las proteínas maestras que controlan la dinámica de los filamentos de actina en todos los sistemas vivos hasta ahora descritos, y se ha demostrado que son esenciales para los arreglos del citoesqueleto de actina en el citoplasma (Etienne-Manneville y Hall, 2002). Estas proteínas son muy abundantes y se han descrito más de 20 en mamíferos, siendo las más caracterizadas RhoA, rac1 y cdc42 (Nikolic, 2002). Las cascadas de señalización dependientes de las GTPasas pequeñas controlan la activación y/o inactivación de numerosas proteínas quinasas, que finalmente pueden modificar la actividad de las proteínas de unión a actina (ABPs). Se ha descrito que en cultivos neuronales, la activación de rac1 induce la formación de lamelipodios, la activación de cdc42 desencadena la formación de filopodios, y la de RhoA induce el colapso de las neuritas (Arber *et al*, 1998; Luo, 2000 y Yang *et al*, 1998; Figura 4).

Las Rho GTPasas poseen un mecanismo conservado de regulación, ya que éstas se encuentran en estado inactivo unidas a GDP, y en estado activo unidas a GTP. Los factores de intercambio de nucleótido guanosina (proteínas GEFs) permiten la activación de estas GTPasas al intercambiar el nucleótido por GTP, mientras que las proteínas GAP (proteínas activadoras de la actividad GTPasa) son capaces de devolverlas a un estado inactivo, unidas a GDP (Nikolic, 2002). De esta forma, se ha determinado que proteínas GEFs, como tiam1, trio y kalirin, resultan claves para la formación del axón, la correcta morfología de las espinas dendríticas y el proceso de *pathfinding* neuronal (Newsome *et al*, 2000; Nikolic, 2002; Kunda *et al*, 2001; Ma *et al*, 2001).

En este trabajo, se estudió las principales GTPasas en el sistema nervioso: rac1, cdc42 y RhoA, para las cuales se analizó los cambios en su abundancia y su actividad durante la diferenciación de las células N1E 115, así como también se estudió los cambios de expresión de las GEFs trio y tiam1, todas las cuales son capaces de modular la actividad de las proteínas de unión a actina.

Las ABPs son las proteínas efectoras que controlan la estabilización, entrecruzamiento y empaquetado de los filamentos de actina (Van Troys *et al*, 2008). Una de las principales integrantes de este tipo de moléculas es la cofilina. Esta proteína, que depende de la vía de señalización de rac1, tiene actividad dinamizante de los microfilamentos de actina. La cofilina se encuentra en estado activo cuando está desfosforilada, y se ha determinado que su función es vital para la formación de estructuras de actina fibrilar características de los conos de crecimiento, en la parte distal de las prolongaciones neuronales (Nikolic, 2002). La cofilina es inhibida por la acción de LIMK1, a través de la fosforilación de un residuo de serina en la posición 3, lo que desencadena la disminución de su afinidad por los microfilamentos de actina, permitiendo la reorganización del citoesqueleto de actina y la formación de lamelipodios (Yang *et al*, 1998). A su vez, la LIMK1 se encuentra río abajo de las proteínas rac1/pak1, siendo ésta última capaz de fosforilar a LIMK1 cuando interactúa con rac1 unida a GTP (Nikolic *et al*, 1998). En las células PC12, se ha determinado que la cofilina pierde afinidad por la actina en la presencia de un agente inductor de la formación de neuritas, como el NGF (Mitsuharu *et al*, 2007). De esta forma, resulta

interesante estudiar el efecto de la actividad de las proteínas cofilina y LIMK1 sobre la diferenciación de las células N1E 115.

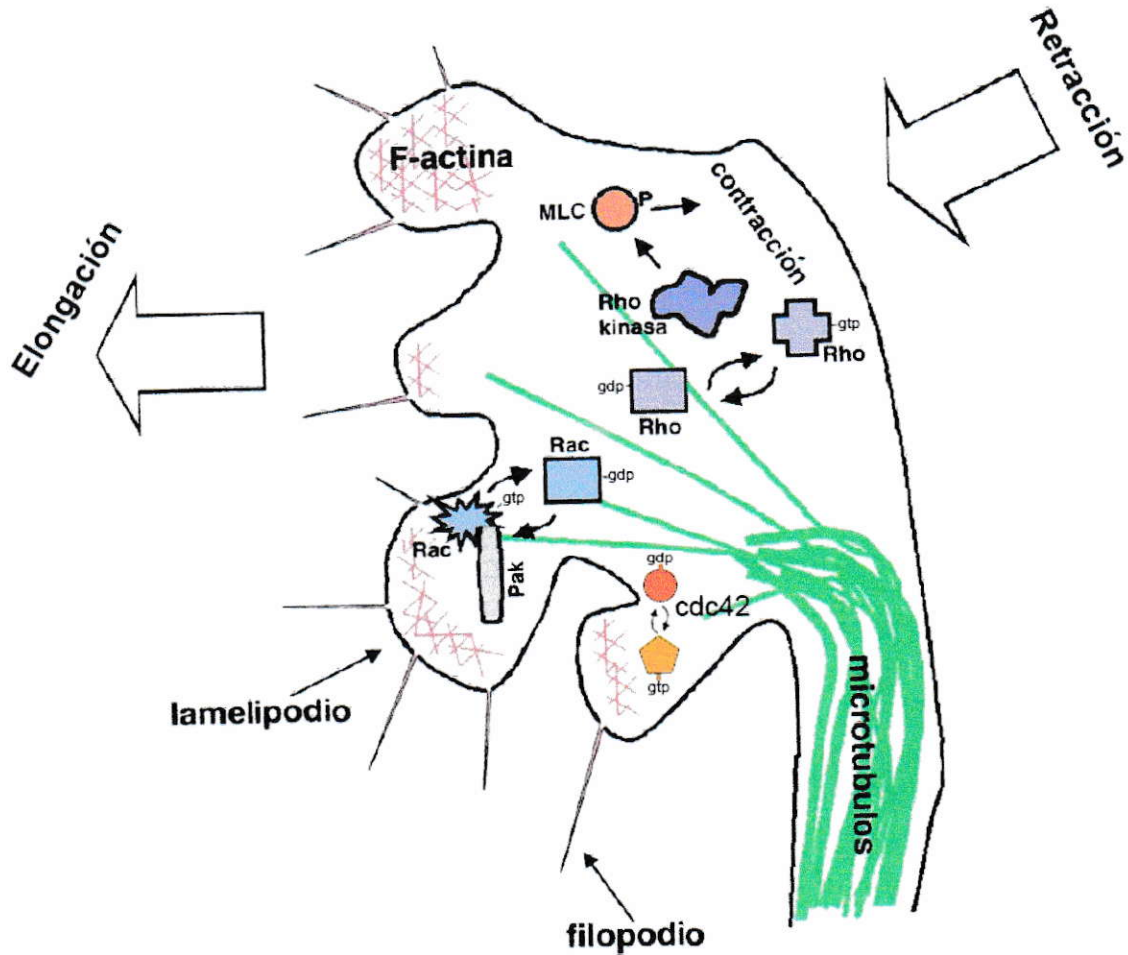


Figura 4: Rol de las GTPasas pequeñas de la familia de RhoA en la regulación del citoesqueleto de actina. El esquema muestra las vías que involucran a las GTPasas pequeñas de la familia de Rho A sobre los mecanismos de elongación y retracción celular dependientes de actina. Se ha determinado que cdc42 tiene un rol asociado a la extensión de filopodios, rac1 regula la formación de lamelipodios, y Rho A participa en el colapso de neuritas y en la retracción celular. Adaptado de Nikolic, 2002.

3.5 La degradación de las proteínas y la inhibición del crecimiento neurítico.

Si bien son muchos los avances que se han logrado en la última década en el conocimiento de la fisiología neuronal, aún se sabe poco de los mecanismos moleculares que desencadenan el rompimiento de su simetría, así como los procesos que desencadenan la definición del axón. Es evidente que durante la diferenciación neuronal existe una intensa actividad transcripcional y traduccional de proteínas, sin embargo, otros estudios han determinado que la degradación y proteólisis de moléculas también es fundamental para el desarrollo de la polaridad (Wang *et al*, 2003; Yan *et al*, 2006; Schwamborn *et al*, 2007)

Existe evidencia de que la inhibición del crecimiento de las neuritas, una vez especificado el axón, es un mecanismo necesario para la correcta morfología de las neuronas, pues evita la generación de neuronas multiaxónicas (resultados no publicados del Laboratorio de Dinámica Celular y Neuronal; Mingorance-Le Meur *et al*, 2008). En esta inhibición del crecimiento neurítico ha sido involucrada la familia de cisteína proteasas llamadas calpaínas, las cuales son capaces de activar o inactivar proteínas por medio de su clivaje específico, aunque los mecanismos moleculares asociados se encuentran poco estudiados. Por ello, uno de los objetivos de esta tesis fue estudiar el rol de las calpaínas en la regulación del crecimiento de las neuritas.

En vista de los antecedentes presentados en relación a la importancia del citoesqueleto en los cambios de morfología observados durante la diferenciación neuronal, y la relevancia que tienen durante este proceso las proteínas que modulan la estabilidad, la elongación y la dinámica de los microtúbulos y los filamentos de actina, nos planteamos la siguiente hipótesis para este trabajo.

4.-HIPÓTESIS

Los cambios morfológicos ocurridos durante la diferenciación del neuroblastoma N1E 115 involucran modificaciones en la estabilidad de los microtúbulos y los filamentos de actina, que decursan por cambios tanto en la masa como la actividad de proteínas clave que modulan el citoesqueleto.

5.-OBJETIVO GENERAL

Inicialmente, nos propusimos analizar los cambios en la abundancia relativa y las modificaciones post- traduccionales de un conjunto de proteínas que son necesarias para la generación de la polarización de una neurona en cultivo. Para ello, nos enfocaremos en las principales proteínas descritas que controlan la polimerización y la despolimerización de los microtúbulos, el ensamblaje de los filamentos de actina, y las proteínas de señalización que regulan estos sistemas.

Finalmente, una vez cumplidos los objetivos propuestos, se realizó un paralelo entre el proceso de diferenciación del neuroblastoma N1E 115 con aquel descrito para la polarización de neuronas embrionarias de rata, uno de los modelos más utilizados para estudiar la diferenciación morfológica y bioquímica de una neurona.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

5.1.1 Establecer un método efectivo para la diferenciación de la línea celular N1E 115.

En este objetivo evaluaremos el mejor método para permitir una eficiente diferenciación de las células N1E 115 utilizando como inductores químicos al DMSO, el ácido retinoico y el dibutilil AMP cíclico (Clejan *et al*, 1996; Cosgaya *et al*, 1996; Abemayor y Sidell, 1989). La eficiencia de la diferenciación se evaluará cuantificando los parámetros morfométricos y morfológicos de las células diferenciadas, y se compararán los resultados obtenidos para cada método.

5.1.2 Analizar los cambios en la regulación de los microtúbulos durante la diferenciación neuronal.

En este objetivo nos enfocaremos en analizar los cambios en la masa de las principales proteínas reguladoras de microtúbulos, como lo son las proteínas de la familia de las MAPs: MAP1A y B, MAP2, tau, LIS1 y doblecortina. Otras proteínas que modulan la polimerización de los microtúbulos a estudiar serán la CRMP-2, la SCG10, y las quinasas que controlan la dinámica de microtúbulos río arriba, como lo son JNK y CDK5.

5.1.3 Analizar los cambios en la dinámica de los filamentos de actina durante la diferenciación neuronal.

En este objetivo analizaremos los cambios en la dinámica de los microfilamentos de actina y las variaciones en la masa y la actividad de las proteínas moduladoras de la polimerización de actina durante la diferenciación del neuroblastoma N1E 115. Entre estas proteínas, se encuentran las GTPasas rac1, RhoA y cdc42, y las proteínas asociadas a la actividad de estas GTPasas, como CDK5, pak1, LIMK1, cofilina, y las proteínas GEF tiam1 y trio. Adicionalmente, se cuantificará bioquímicamente cómo los procesos de diferenciación inducen un aumento global en el contenido de actina fibrilar, en detrimento de la actina globular.

5.1.4 Estudiar el papel de una familia de proteasas y su inhibición sobre la diferenciación neuronal.

En este punto evaluaremos la importancia de un sistema de proteasas en el control de la neuritogénesis, y se analizará si la inhibición del sistema puede establecerse como un mecanismo para la diferenciación neuronal.

5.1.5 Establecer nuestro modelo de diferenciación neuronal como un buen sistema para realizar transfecciones.

En este objetivo evaluaremos como la morfología de nuestro modelo puede ser modificada por una transfección transitoria. Para ello, escogimos dos representantes que modulan la estabilidad del citoesqueleto de microtúbulos. Por una parte evaluaremos el efecto de la sobreexpresión de un factor que estimula la polimerización de los microtúbulos, la proteína CRMP2. Análogamente, evaluaremos como las formas silvestres y mutantes de la proteína desestabilizadora de microtúbulos SCG10 pueden afectar la correcta diferenciación de las células N1E 115.

5.1.6 Establecer correlatos entre los resultados obtenidos para la diferenciación en la línea celular N1E 115, y aquellos observados en cultivos primarios de neuronas.

En este punto compararemos los cambios bioquímicos obtenidos durante la diferenciación de las células N1E 115 con aquellos descritos para neuronas primarias de hipocampo en cultivos de corta duración. Nos enfocaremos particularmente en el estadio donde se define la pérdida de simetría y se desarrolla el axón.

6.- MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 MATERIALES

6.1.1 Material biológico

6.1.1.1 Animales

Se utilizaron hembras preñadas de 18 días de la cepa de rata (*Rattus norvegicus*) Sprague Dawley para realizar cultivos primarios de hipocampo.

Los animales fueron tratados según el protocolo de manipulación de éstos, aprobado por la comisión de ética del Departamento de Biología de la Universidad de Chile.

6.1.1.2 Líneas celulares

Se utilizó la línea celular N1E 115, derivada de un tumor de cerebro de ratón (*Mus musculus*) (American Type Culture Collection: CRL-2263; Amano *et al*, 1972).

6.1.2 Reactivos químicos y de cultivo celular

Para el cultivo de líneas celulares se utilizó el medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco), suplementado con suero fetal bovino (FBS) (HyClone), penicilina, estreptomicina y fungizona (Gibco), y tripsina/EDTA 10X (Gibco). Para experimentos de diferenciación celular, se utilizó DMSO (Merck), ácido retinoico (Calbiochem) y dibutilil cAMP (Sigma). Se utilizó el inhibidor de calpaínas ALLM (Calbiochem). Las placas de cultivo y los tubos de centrifugación utilizados se adquirieron de Orange Inc.

Otros reactivos y productos químicos de uso general utilizados durante el desarrollo de este trabajo se adquirieron en TCL, Sigma, Calbiochem, Winkler y Sudelab. Además, se utilizó las películas autorradiográficas FujiFilm (HR-U30) y el reactivo de ECL de Perkin Elmer.

6.1.3 Anticuerpos

Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anti MAP2 clon HM-2, anti α -tubulina clon DM1A, anti tubulina tirosinada clon tub-1A2 y anti cofilina policlonal (Sigma); G712A anti β III tubulina y G560A anti GFAP (Promega), anti SCG10-BR (provisto por la Dra. Gabriela Grenningloh) (Antonsson *et al.*, 1998); anti CRMP2

(provisto por Ph.D. Kozo Kaibuchi; Arimura *et al.*, 2004); tau-1 clon PC1C6 (provisto por Ph.D. Lester Binder; Binder *et al.*, 1985), N-19 anti MAP1B, N-18 Anti MAP1A, H-300 anti LIS1, C-17 anti tau, C-4 anti β -actina, C-8 anti CDK5, C-19 anti p35, H-103 anti DAB1 y C-18 anti LIMK1, C-19 anti pak, 9E10 anti c-Myc, C-16 anti Tiam1 y D-20 anti trio (Santa Cruz Biotechnology), anti calpastatina clon 1F7E3D10 (Calbiochem), AB4202 anti cdc42, AB4201 anti rac1, AB3884 anti RhoA, MAB3104 anti calpaína 1, anti glu-glu (epítipo EYMPME), anti calpaína 2, anti arp2 (Chemicon), anti JNK1/JNK2 clon G151-666 y anti P-JNK (thr 183/ tyr 185) (BD Biosciences), anti Doblecortina (donado por la Dra. Orly Rayner; Shmueli *et al.*, 2001), anti cofilina Ser3 fosforilado, anti LIMK1 Thr508 fosforilado y anti sustratos fosforilados de PKA (RRXS/T) (Cell Signaling).

Los anticuerpos secundarios empleados fueron los siguientes: Anti-IgG de conejo y ratón acoplados a peroxidasa de rábano (HRP), de Jackson ImmunoResearch Labs, y Anti-IgG de cabra, acoplado a peroxidasa de rábano (HRP), de Santa Cruz Biotechnology. Adicionalmente, para inmunocitoquímica se utilizó Anti-IgG de conejo y ratón Alexa Fluor 546 y 488, más la tinción específica contra filamentos de actina, Faloidina 546 y 488 (Molecular Probes), y como tinción para núcleo celular se utilizó ToPro, cuando se requirió (Molecular Probes).

6.1.4 Plasmidios

Para la transfección de CRMP-2, se utilizó el constructo pEF-BOS-myc h-CRMP-2, el cual incluye la forma silvestre de la proteína CRMP-2 humana.

Para la transfección de las 5 variantes de SCG10, se utilizaron los siguientes constructos: SCG10 silvestre, pCDNA3-SCG10 WT-EE, donde E-E corresponde al epítipo EYMPME; más las dos mutantes constitutivamente activas no fosforilables: pCDNA3-SCG10 S73A-EE, y la cuádruple mutante pCDNA3-SCG10 S4A-EE (posee un reemplazo de los residuos de serina 50, 62, 73 y 97 por alanina); y las dos mutantes dominantes negativas pCDNA3-SCG10 S73D-EE y la cuádruple mutante pCDNA3-SCG10 4D-EE (posee un reemplazo de los residuos de serina 50, 62, 73 y 97 por ácido aspártico, que emula una fosforilación).

Los plasmidios utilizados se replicaron en la cepa DH5 α de *E. coli*, mediante quimiotransformación, y el DNA obtenido de los clones positivos se purificó por MIDI PREP (Quiagen Plasmid Midi Kit) y se cuantificó por espectrofotometría (NanoDrop).

6.2 MÉTODOS

6.2.1. Cultivo Celular

La línea celular murina N1E 115 se creció en medio DMEM suplementado con 10% FBS, 100 µg/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina, y se cultivó en placas de cultivo de 100 mm a 37°C, en un incubador con 5% de CO₂ y humedad controlada al 95%.

6.2.2. Inducción de diferenciación neuronal

Las células N1E 115 indiferenciadas se crecieron a una densidad de 10000 células / cm² en medio DMEM suplementado con 10% FBS durante 24 horas, y para inducir la diferenciación a una morfología de tipo neurona, se cambiaron a un medio de diferenciación, constituido por DMEM suplementado con 0,5% (v/v) de FBS y 10 µM de ácido retinoico, 3 mM de dibutilil AMP cíclico (DBcAMP) o 1,5% DMSO (v/v), según como se indicó en cada caso. Las células se dejaron crecer durante 5 días, cambiando cada 2 días a medio fresco de diferenciación. Para los experimentos con ALLM, también se utilizó medio DMEM 0,5 % de FBS con concentraciones de ALLM de 10, 20, 30 o 40 µM, el cual se cambió por un medio fresco equivalente cada dos días. Las células se dejaron crecer durante 5 días.

6.2.3. Análisis Bioquímico

Para el análisis de proteínas totales de las células N1E 115 en sus estados diferenciados e indiferenciados, se realizaron extractos de proteínas desde placas de cultivo de 100 mm. Para ello, las células fueron lisadas durante 15 minutos en solución tampón de extracción de proteínas (Tris 20 mM pH 7,4; NaCl 100 mM; EDTA 1 mM; tritón X-100 1%) para proteínas citosólicas, o solución de extracción RIPA para proteínas de membrana, más inhibidores de proteasas (PMSF 0,2 mM; Aprotinina 1 mM; Leupeptina 1 mM, Pepstatina 0,2 mM), un inhibidor de serina/treonina fosfatasas (Caliculina A 10 nM), y un inhibidor de tirosina fosfatasas (NaVO_3 200 μM). Luego de centrifugar los extractos obtenidos a 15000G durante 15 minutos, se recolectaron los sobrenadantes y se almacenaron con solución de carga 1X a -80°C , dejando una alícuota para la medición de la concentración de proteínas por el método descrito por Bradford (1976). Si bien en este ensayo se recomienda no utilizar detergentes como el tritón X-100, no se observó problemas con la cuantificación de proteínas a la dilución utilizada, contando con los controles necesarios.

Los extractos proteicos se resolvieron en un SDS-PAGE a concentraciones de poliacrilamida adecuadas para los pesos moleculares de las proteínas a estudiar (desde 6% hasta 15%). Una vez lograda la separación de proteínas, éstas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa. A continuación, las membranas fueron bloqueadas en solución de 5% de leche y PBS-tween 20 al 0,05%, y posteriormente se incubaron por

1 hora o toda la noche con anticuerpo primario (específico para la proteína a detectar), se lavaron 3 veces con PBS-tween 20 al 0,05% por 10 minutos, y luego se incubaron 1 hora con anticuerpo secundario (conjugado con la peroxidada de rábano, HRP). Las membranas fueron nuevamente lavadas 3 veces con PBS-tween 20 al 0,05% y fueron incubadas con un sustrato para la peroxidasa que genera una reacción de quimioluminiscencia (reactivo ECL). Las placas se revelaron utilizando filmes de autoradiografía. Para los análisis densitométricos, se normalizaron las señales obtenidas contra la proteína de expresión constitutiva α -tubulina o β -actina, como control de carga.

6.2.4 Inmunofluorescencia

Los ensayos de inmunofluorescencia se realizaron según los protocolos descritos por González-Billault *et al*, 2004. Los cubreobjetos que contienen las células fueron fijados con una solución de sacarosa 4% y paraformaldehído 4% durante 20 minutos, y luego las células fueron permeabilizadas con solución de tritón X-100 0,1% en PBS durante 5 minutos. Posteriormente, se incubaron con PBS-BSA 5% (solución de bloqueo) durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4° C. Luego se procedió a incubar los cubreobjetos con los anticuerpos primarios en solución de PBS-BSA 1% durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4° C, y luego de 3 lavados con PBS se incubaron de la misma forma con los anticuerpos secundarios y tinción de Faloidina y/o ToPro₃, cuando fuese requerido. Después de 3 lavados con PBS

se montaron en portaobjetos utilizando el reactivo FluorSave (Calbiochem). Finalmente, las células se visualizaron en el microscopio de epifluorescencia Zeiss Axiovert 200M o el microscopio confocal invertido LSM 510 Zeiss.

6.2.5 Análisis morfométrico

Para el procesamiento de las imágenes obtenidas por microscopía y la realización del análisis morfométrico, que incluyen la medición del cuerpo celular y la longitud de las prolongaciones neuríticas, se utilizaron los programas Axiovision Viewer 3.0 y el Zeiss LSM Image Browser. Las células seleccionadas para realizar las mediciones fueron escogidas al azar desde campos visuales en objetivo 40x, entre aquellas poblaciones que se encontraran en menores densidades, para que se pudiera ver en forma clara los límites celulares (sobre todo en lo referido a la sobreposición de las prolongaciones neuríticas).

6.2.6 Establecimiento de cultivos primarios

Los cultivos de neuronas hipocampales se realizaron a partir de ratas con 18 días de preñez (embriones en estadio E18), según el protocolo previamente descrito (*Banker y Cowan, 1977*). Este método consiste en la obtención de los embriones de la rata sacrificada, los cuales se mantuvieron en la solución salina de Hank (HBSS, Gibco) hasta que se les disectó los hipocampos. Posteriormente, el tejido se fragmentó y se

incubó con Tripsina (Gibco) 0,5% en HBSS por 15 minutos a 37°C. Posteriormente, se realizó 3 lavados con HBBS y se disgregó suavemente el tejido con una pipeta Pasteur. Finalmente, se determinó el número de neuronas por contaje en un hemocitómetro, y se sembró en placas de cultivo de 60 mm o cubreobjetos de vidrio de 12 mm de diámetro en placas de 24 pocillos (los cuales se preincubaron con poli-D-lisina, un sustrato adhesivo para que se adhieran las neuronas) a una densidad aproximada de 1 millón de células para las placas de 60 mm y de 30.000 células para los cubreobjetos. Las neuronas se mantuvieron en medio neurobasal (Gibco) suplementado con 10% de suero de caballo, glutamina 2mM, piruvato 1mM, 100 µg/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina durante 2 horas. Luego de este intervalo de tiempo, las células se cambiaron a medio neurobasal suplementado con B27 (Gibco), glutamina 2mM, piruvato 1mM, 100 µg/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina. Las placas se mantuvieron en un incubador a 37°C, 95% de humedad y 5% de CO₂ durante 1, 2 ó 3 días, para realizar extractos proteicos o inmunocitoquímica.

6.2.7 Inmunoprecipitación

Utilizando el protocolo de extracción de proteínas mencionado anteriormente, se incubaron 250 µg de proteínas con 2,5 µg de anticuerpo primario específico en un volumen final de 1 mL de solución tampón de inmunoprecipitación (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Tritón X-100 1%, NaVO₃ 0,2 mM, DTT 1 mM).

La mezcla se agitó durante 1 hora o toda la noche a 4°C. Luego, se agregó 25 µL de una solución Proteína A - Agarosa o proteína G- Agarosa (para anticuerpos policlonales y monoclonales, respectivamente) al 50% en PBS, y se dejó agitando durante 1 hora o toda la noche a 4°C. A continuación, los extractos de proteínas se centrifugaron durante 5 minutos a 3000 g a 4 °C, desde donde se guardó el sobrenadante a -20 °C en solución de carga 1X, y el precipitado se lavó tres veces por medio de centrifugaciones durante 5 minutos a 3000 g con tampón de inmunoprecipitación, y finalmente fue resuspendido en 20 µl de solución tampón Laemmli 1X. Las proteínas fueron separadas por medio de SDS-PAGE y analizadas mediante el protocolo anteriormente descrito para western blot.

6.2.8 Determinación de la actividad de Rac1 y cdc42 (Pull down)

Para determinar la actividad de Rac1 en las células N1E 115 indiferenciadas y diferenciadas, se utilizó un kit de activación de rac1 provisto por Cytoskeleton Inc. Este ensayo se basa en la capacidad de interacción de un dominio conservado llamado PBD (p-21 binding domain), capaz de interactuar con la forma activa de rac1 o cdc42, es decir, la forma unida a nucleótido GTP (Stanyon y Bernard, 1999). Para esta técnica de Pull-down se utilizaron placas de cultivo de 100 mm confluentes con células diferenciadas e indiferenciadas, las cuales se lisaron en una solución de extracción de proteínas (Tris 50 mM pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, NaCl 0,3 M, 2% Igepal), la suspensión se centrifugó a 8000 g por 5 minutos y se recuperó el sobrenadante. Para este ensayo se

utilizó 2 mg de proteínas, y el volumen utilizado se lleva a 1 mL con la solución de extracción de proteínas. A continuación, se añadieron 20 µg de perlas de PBD-GST, y una mezcla de inhibidores de proteasas. Luego de una hora de incubación a 4°C en agitación, la mezcla se centrifugó a 5000 g por 3 minutos a 4°C y se lavó 2 veces en una solución de Tris 25 mM pH 7,5, MgCl₂ 30 mM y NaCl 40 mM. Luego, el pellet se resuspendió en solución tampón de Laemmli 1X y se guardó a -20°C hasta ser utilizado para un ensayo general de western blot.

6.2.9 Ensayo de separación de la fracción soluble y fibrilar de actina

Para ello, se utilizó el kit comercial F : G Actin (Cytoskeleton Inc.), que permite precipitar los filamentos de actina por una centrifugación a alta velocidad. Para ello, se obtuvo extractos de proteínas desde placas de 100 mm confluentes con células indiferenciadas y diferenciadas, para lo cual se utilizó un buffer de lisis (incluye ATP 1mM y un cóctel de inhibidores de proteasas) precalentado a 37° C, temperatura clave para que no se despolimericen los filamentos de actina. El homogenizado se centrifugó a 3000 g a 37° C durante 5 minutos para precipitar las células intactas, y luego los extractos se centrifugaron nuevamente a 100000 g durante 1 hora a 37° C, para precipitar los filamentos de actina, mientras que el sobrenadante se encuentra enriquecido en actina globular. Adicionalmente, se utilizó dos placas de 100 mm como control positivo y negativo, a las cuales se les adicionó citocalasina-D 1 µM (inhibe la polimerización de filamentos de actina) o faloidina 10 µM (inhibe la despolimerización de filamentos de

actina), antes de realizar la centrifugación a 100000 g. Una vez separadas las fracciones, el sobrenadante se guarda a -20° C en solución de carga 1X, mientras que la fracción precipitada se resuspende en agua nanopura, y se mantiene en hielo durante 1 hora para despolimerizar los filamentos de actina. Posterior a este paso, los extractos se guardaron en solución de carga 1X a -20° C, y se realizó posteriormente el protocolo de western blot tradicional, utilizando un anticuerpo primario policlonal que reconoce a la actina globular, provisto por el kit.

6.2.10 Medición por ELISA de la actividad de las GTPasas pequeñas de la familia de Rho (cdc42, rac1 y RhoA).

Para este ensayo se utilizó tres kits comerciales (Cytoskeleton Inc.), que permiten la unión de las proteínas a una matriz de afinidad específica para cada GTPasa (cdc42, rac1 y RhoA) en una placa de 96 pocillos. Inicialmente, se realizaron extractos de proteínas a partir de células N1E 115 diferenciadas e indiferenciadas, manteniendo en todo momento los extractos a temperaturas entre 0 y 4° C, para evitar la acción de proteínas GAP, que rápidamente hidrolizan el GTP a GDP. Posteriormente, se agregó 15 µg de proteína a cada pocillo y se incubaron con anticuerpo primario por 45 minutos a temperatura ambiente en alta agitación (entre 250 y 300 rpm en un agitador orbital). Posteriormente, se lavó los pocillos 3 veces con solución de lavado, y se incubaron con anticuerpo secundario por 45 minutos, con alta agitación a temperatura ambiente. Luego se lavan los pocillos 3 veces con solución de lavado, y se realizó la lectura de la

quimioluminiscencia en un fluorímetro a una longitud de onda de 420 nm, con una ganancia de 100 y un tiempo de integración de 50 ms.

6.2.11. Transfección de DNA en las células N1E 115

Para este objetivo, se utilizó como sistema de transfección la Lipofectamina 2000 (Invitrogen), el cual se ha descrito como una eficiente forma de transfectar DNA plasmidial o iRNA en líneas celulares (Pichet y Ciccarone, 2000). En resumen, se utilizó placas de 60 mm con células a una confluencia cercana al 50%, las cuales fueron incubadas con medio Optimem (Invitrogen) con 2 µg de DNA y 3,5 µL de Lipofectamina 2000, los cuales se preincubaron en conjunto anteriormente durante 20 minutos. Luego de 6 horas, el Optimem se removió de la placa, y se cambió por DMEM fresco con 5% de FBS. Las células se crecieron desde 24 a 48 horas, para que expresaran el DNA exógeno y puedan responder al aumento de la expresión de la proteína a estudiar.

6.2.12 Análisis Estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el método Test de Student, utilizando una cola, y se consideró una diferencia significativa las probabilidades menores a 0,05 (indicado por un asterisco), menores a 0,005 (indicado por dos asteriscos) y menores a 0,001 (indicado por tres asteriscos).

7.- RESULTADOS

7.1 Establecimiento de un método eficiente para la diferenciación de la línea celular murina N1E 115.

Si bien la línea celular N1E 115 ya ha sido utilizada para algunos estudios de diferenciación neuronal (Jenkins *et al*, 1996; Sarnier *et al*, 2000, Yakubchik *et al*, 2005), existe un solo protocolo descrito que permite inducir su diferenciación hacia un fenotipo celular de tipo neurona, por medio de la adición de pequeños porcentajes de DMSO (Clejan *et al*, 1996). En el presente trabajo, se probaron otros 2 métodos de diferenciación descritos para otras líneas celulares (Mao *et al*, 2000; Muñoz *et al*, 2000), a fin de encontrar un mecanismo de diferenciación efectiva, pero que tenga también una mínima incidencia en la sobrevivencia de la célula, ya que algunos compuestos utilizados para diferenciar resultan demasiado dañinos y pueden originar la activación de rutas apoptóticas (Kruman *et al*, 1993). Debido a ello, se eligieron 3 compuestos que al agregarse al medio de crecimiento podrían inducir la diferenciación de las células N1E 115: el DMSO (Clejan *et al*, 1993), el ácido retinoico (Mao *et al*, 2000) y el dibutilil AMP cíclico (DBcAMP), un análogo del AMP cíclico (Muñoz *et al*, 2000), y se evaluó el mejor compuesto. Para ello, se realizaron mediciones morfométricas de la morfología celular obtenida para cada tratamiento, y adicionalmente, se comprobó que el compuesto no sea dañino para las células por medio del análisis visual al microscopio óptico.

La Figura 5 muestra los cambios morfológicos obtenidos con los tratamientos de diferenciación ensayados, por medio de imágenes de inmunofluorescencia. En el cultivo control, al cual no se le añade ningún compuesto adicional al medio de crecimiento, las células crecen en forma rápida, alcanzando la confluencia de la placa de cultivo. Entre los compuestos utilizados para la diferenciación, se puede observar en la Figura 5B que el ácido retinoico no desencadena la extensión de neuritas en las células, algo muy similar a lo ocurrido en las células sin tratamiento. El DMSO y el DBcAMP fueron capaces de generar la extensión de prolongaciones neuríticas en las células, a lo que se sumó una tardanza o una incapacidad para llegar a la confluencia en las placas de cultivo, posiblemente por una disminución en la división celular, lo que es característico de las células diferenciadas.

Los cambios morfológicos obtenidos con los diferentes tratamientos se evaluaron por inmunofluorescencia. En la Figura 6A se muestra que el DMSO y el DBcAMP son capaces de inducir la diferenciación en las células N1E 115. Sin embargo, el DMSO no es capaz de diferenciar tan eficientemente como el DBcAMP, ya que las células tratadas con DMSO presentan menos neuritas por célula, y éstas son de menor longitud que aquéllas tratadas con DBcAMP. Por último, el DBcAMP permite la sobrevida de las células durante más de 6 días en cultivo, a diferencia del DMSO, que resultó ser más dañino para la sobrevida celular y luego de 4 días las células en cultivo comenzaban a perder su viabilidad. Si bien no se realizó un ensayo de apoptosis celular para confirmar esta afirmación, esto era evidente al microscopio óptico, y no nos enfocamos en profundidad en el tratamiento con DMSO por ser menos eficiente el DBcAMP.

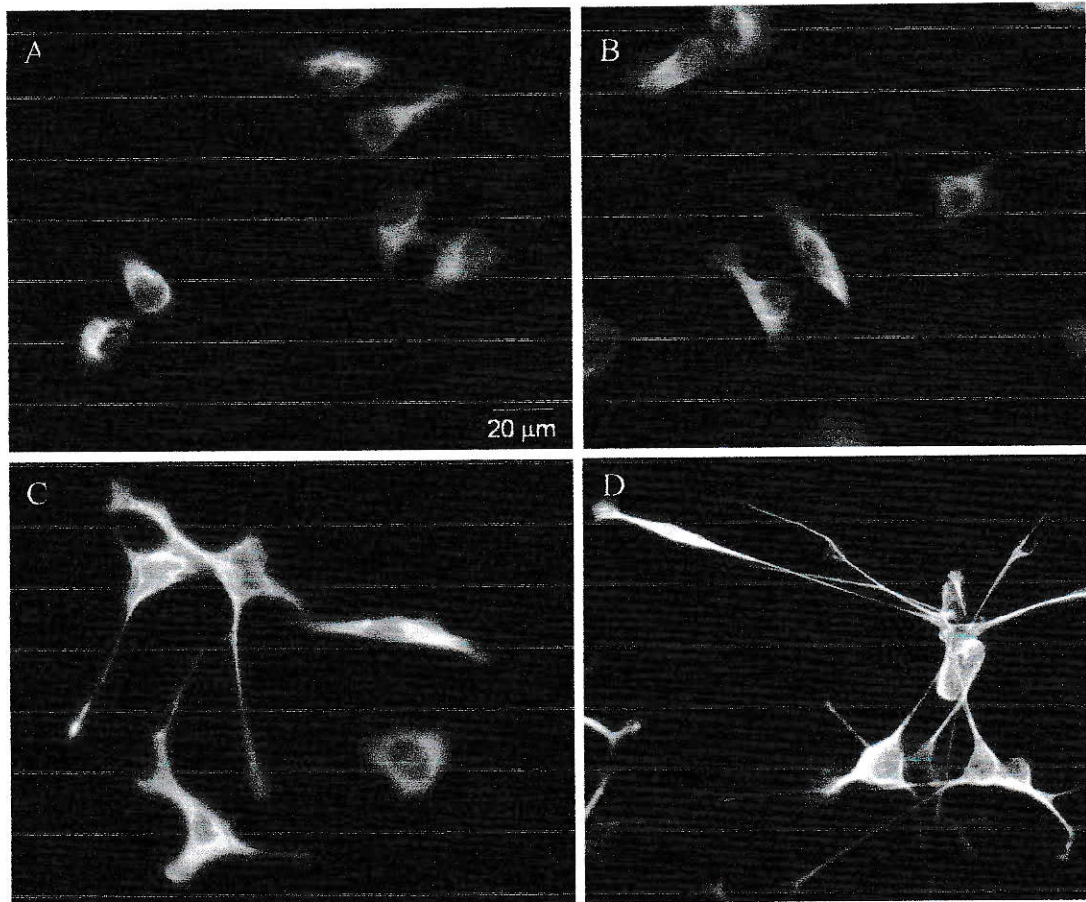


Figura 5: Ensayos de diferenciación celular para el neuroblastoma N1E 115 con 3 métodos diferentes. Para visualizar la morfología celular, se tomaron imágenes de microscopía de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo contra α -tubulina. A, cultivo de células en condiciones de crecimiento control (medio de cultivo DMEM con 0,5 % FBS). B, células crecidas en medio DMEM 0,5% FBS con 10 μ M de ácido retinoico durante 5 días. C, células crecidas en DMEM 0,5% FBS con 1,5% de DMSO durante 5 días. D, células crecidas en DMEM 0,5% FBS con 3 mM de DBcAMP durante 5 días. La barra blanca equivale a 20 μ m, y las imágenes fueron tomadas al azar utilizando el objetivo 40x.

Para definir un parámetro concreto de diferenciación de las células, se adoptó como criterio la elongación de neuritas con una longitud mayor a dos diámetros del cuerpo de la célula (Oh *et al*, 2006), equivalente aproximadamente a 20 μm . En base a esto, se realizaron mediciones para establecer qué porcentaje de las poblaciones de neuroblastoma efectivamente se diferenció (Figura 6C). Los cultivos tratados con DMSO y DBcAMP fueron capaces de inducir a las células a diferenciarse en forma efectiva respecto al control, sin embargo, el DBcAMP resultó ser el agente capaz de generar el mayor número de neuritas por célula (figura 6A) y de mayor longitud que las observadas con los demás tratamientos (Figura 6B), y un porcentaje de la población diferenciada muy superior al observado en las otras condiciones, todo esto sin alterar la sobrevivencia celular durante al menos 6 días de cultivo en presencia de este compuesto. En base a esto, para diferenciar los cultivos celulares se optó por utilizar el DBcAMP.

Al analizar los cambios morfológicos en las células diferenciadas durante 5 días en DBcAMP, se observó el desarrollo de varias neuritas por célula (un promedio de casi 4 por célula), las que presentaron ramificaciones secundarias en algunos casos. Además, se observó un aumento de las estructuras filamentosas de actina (filopodios y lamelipodios, indicados por flechas y cabezas de flecha blancas, Figura 7) en células diferenciadas, así como un aumento de la intensidad de fluorescencia para la α -tubulina tiosinada en la punta de las neuritas, lo cual se ha determinado que representa microtúbulos más dinámicos, y es característico de lo que ocurre en la parte distal de los axones de neuronas en desarrollo (Figura 7, Witte *et al*, 2008).

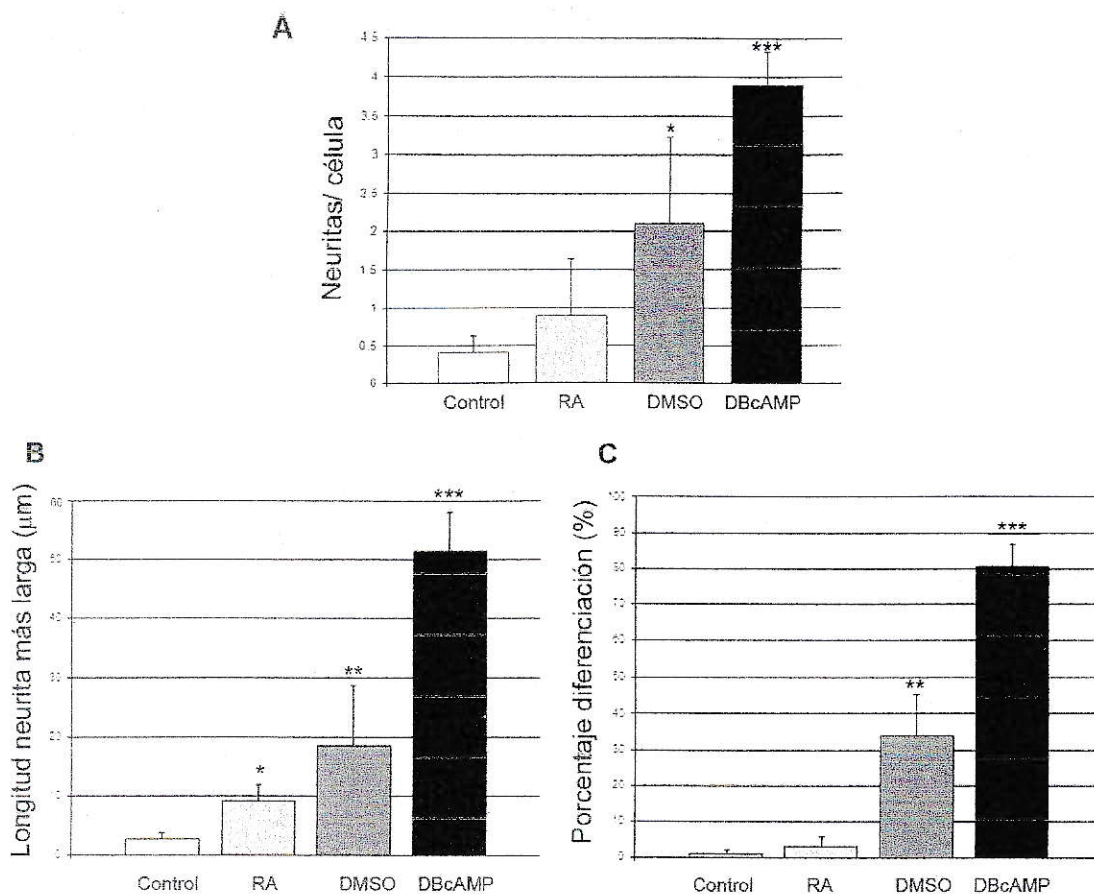


Figura 6: Cuantificación de los patrones de diferenciación obtenidos con los tratamientos aplicados. Para ver cuál de los 3 compuestos utilizados actúa como el mejor agente diferenciador, se procedió a medir la cantidad de neuritas extendidas por cada célula para cada tratamiento (A), la longitud de la neurita más larga en las células para cada tratamiento (B) y el porcentaje de células diferenciadas, definidas como aquellas que extendían neuritas de longitud igual o mayor a 2 diámetros celulares (aproximadamente 20 µm). El compuesto capaz de diferenciar de manera más eficiente a las células es el DBcAMP. Para las mediciones, se tomó un número de 100 células para cada caso. El asterisco indica un resultado estadísticamente significativo para una prueba t de student, con $p < 0,05$; dos asteriscos indican $p < 0,005$ y tres asteriscos un $p < 0,001$.

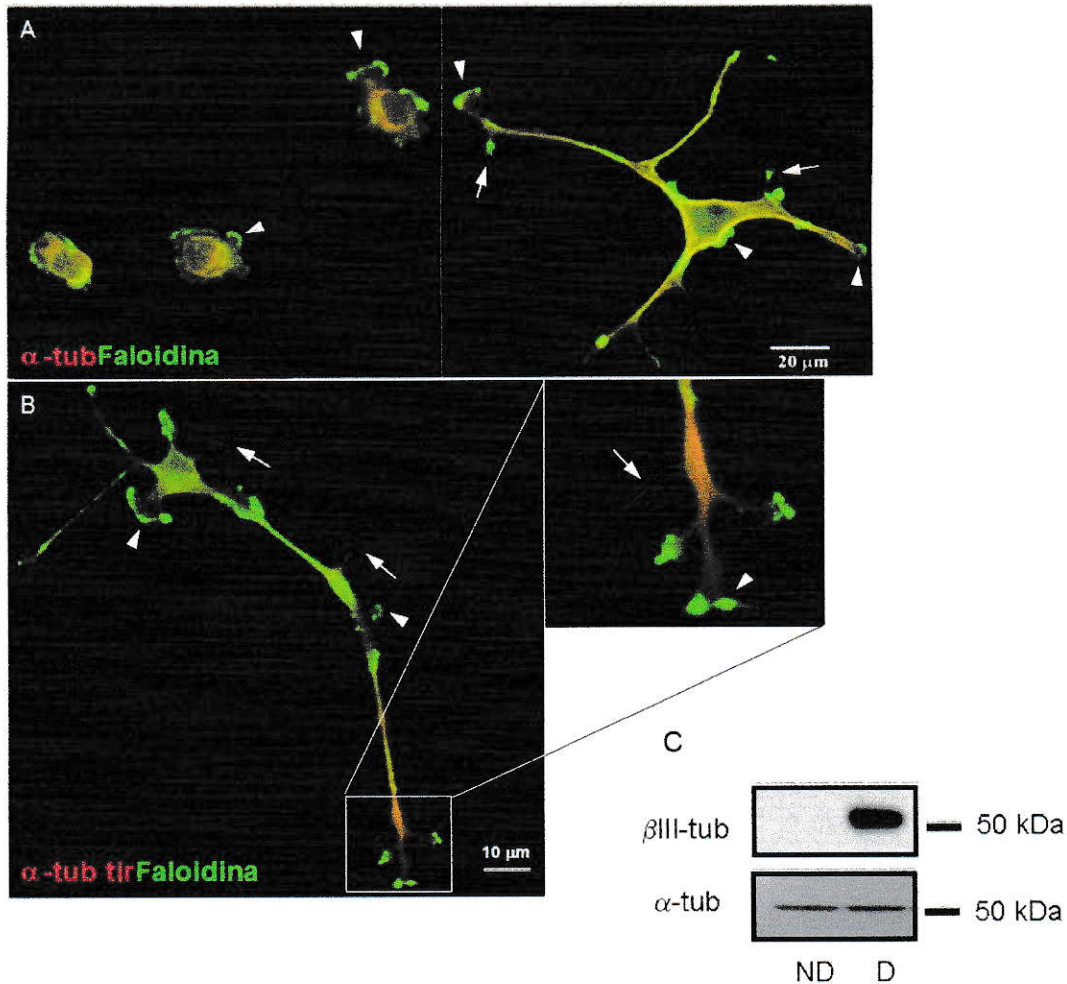


Figura 7: Variaciones en la morfología celular y expresión de β III tubulina producto de la diferenciación. A) Inmunocitoquímica contra α -tubulina y tinción de F-actina para células indiferenciadas (izquierda) y células diferenciadas (derecha). Durante la diferenciación, las células desarrollan ramificaciones primarias y secundarias, y experimentan un aumento en la formación de filopodios y lamelipodios (flechas y cabezas de flecha blancas, respectivamente). B) Aumento de la tirosinación de la α -tubulina hacia el extremo distal de la ramificación neurítica, evento relacionado con una mayor dinámica de los microtúbulos, lo cual se ha descrito que es requerido para el crecimiento de los axones neuronales (Witte *et al*, 2008). La imagen fue tomada en el microscopio de epifluorescencia Zeiss Axiovert 200M, con el objetivo 63X, y la barra indica la longitud equivalente. C) Expresión del marcador neuronal β III tubulina exclusivamente en células diferenciadas, mientras que la α -tubulina se expresa en forma equivalente en células diferenciadas e indiferenciadas.

7.2 Cambios en la masa de las proteínas reguladoras del citoesqueleto durante la diferenciación de las células N1E 115.

Debido a la evidente modificación de la morfología celular durante la diferenciación hacia un fenotipo neuronal (Figura 7), es necesario pensar que el citoesqueleto tiene un rol clave durante este proceso, ya que es la estructura que sostiene a la célula y es el responsable de sus movimientos. Es por ello que se ha tomado como uno de los objetivos de este trabajo explorar cuáles son las modificaciones de las principales proteínas que se han descrito como reguladoras de los microtúbulos y los filamentos de actina, así como las proteínas de señalización que controlan estas vías, para analizar si éstas sufren cambios en su abundancia y en su actividad durante la diferenciación en las células N1E 115.

7.2.1 Cambios en la regulación de los microtúbulos durante la diferenciación.

7.2.1.1 Proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs).

Esta familia de proteínas es la principal reguladora del citoesqueleto de microtúbulos, para las cuales existe extensa evidencia que las involucra con los procesos de migración y desarrollo de polaridad (Vallee, 1990; González-Billault *et al*, 2002). Éstas son capaces de modular la estabilidad dinámica de los microtúbulos, permitiendo los movimientos de expansión y retracción que naturalmente se llevan a cabo en

neuronas, como parte de su proceso de maduración (Tanaka y Sabry, 1995). Es por ello que se estudió si los cambios morfológicos y bioquímicos producidos durante de la diferenciación neuronal de las células N1E 115 son capaces de alterar la masa total de las MAPs más convencionales: MAP1A, MAP1B, MAP2 y tau. Estos análisis se hicieron por medio de western blot, desde extractos de células diferenciadas e indiferenciadas, y posteriormente, fueron sometidas a un análisis de significancia estadística (test de student, para muestras en triplicado, a partir de la densitometría de las bandas detectadas por western blot y normalizadas contra una proteína de expresión constitutiva).

La Figura 8A muestra un aumento significativo para la proteína MAP1B, proteína que ha sido identificada como la primera en expresarse durante el desarrollo del cerebro, a la cual se le atribuye un rol fundamental en el proceso de establecimiento de la polaridad neuronal (González-Billault *et al.*, 2004). En su densitometría respectiva (figura 8B), se puede apreciar un aumento cercano al doble de la cantidad total respecto a la condición indiferenciada, lo que evidencia que podría ser producto de un aumento de la expresión asociada directamente al proceso de diferenciación.

La proteína MAP2 posee un comportamiento similar al observado para MAP1B (figura 8C), cuya expresión aumenta producto de la diferenciación neuronal. Sin embargo, la densitometría da cuenta de que este cambio no es tan drástico como el observado para MAP1B (figura 8D).

Otra proteína MAP que está muy relacionada estructural y funcionalmente a MAP1B, es la proteína MAP1A. Ésta también posee la capacidad de estabilizar los microtúbulos, pero se expresa en forma más activa en neuronas maduras, y se localiza preferentemente en dendritas (Halpain y Dehmelt, 2006). En la figura 8E se muestra un aumento de la expresión de esta proteína durante la diferenciación, mientras que en la densitometría de la figura 8F, se observa un aumento de cerca del 50% respecto a la cantidad encontrada en células indiferenciadas.

La proteína tau también pertenece a la familia de las MAPs, pero posee un tamaño notablemente inferior al de las proteínas revisadas anteriormente (entre 45 y 65 kDa), y se han descrito 6 isoformas originadas por *splicing* alternativo (Smith, *et al*, 1995). Sin embargo, el anticuerpo utilizado (ver Materiales y Métodos) reconoce sólo 1 isoforma de la proteína total en extractos de ratón. En la Figura 8G, se observa como la proteína tau también aumenta su masa total durante la diferenciación neuronal, al igual que todas las MAPs convencionales objeto de este estudio, en un porcentaje cercano al 50% (Figura 8H).

Adicionalmente a los experimentos de western blot, se analizó por medio de inmunofluorescencia la presencia y localización de 3 proteínas MAPs de relevancia: la MAP2 (su forma total), que es utilizada como marcador específico del compartimento somatodendrítico en neuronas, y los epítomos tau1 (tau hipofosforilado; Binder *et al*, 1985) y MAP1B fosforilada en modo I (Ulloa *et al*, 1994), los cuales se han utilizado

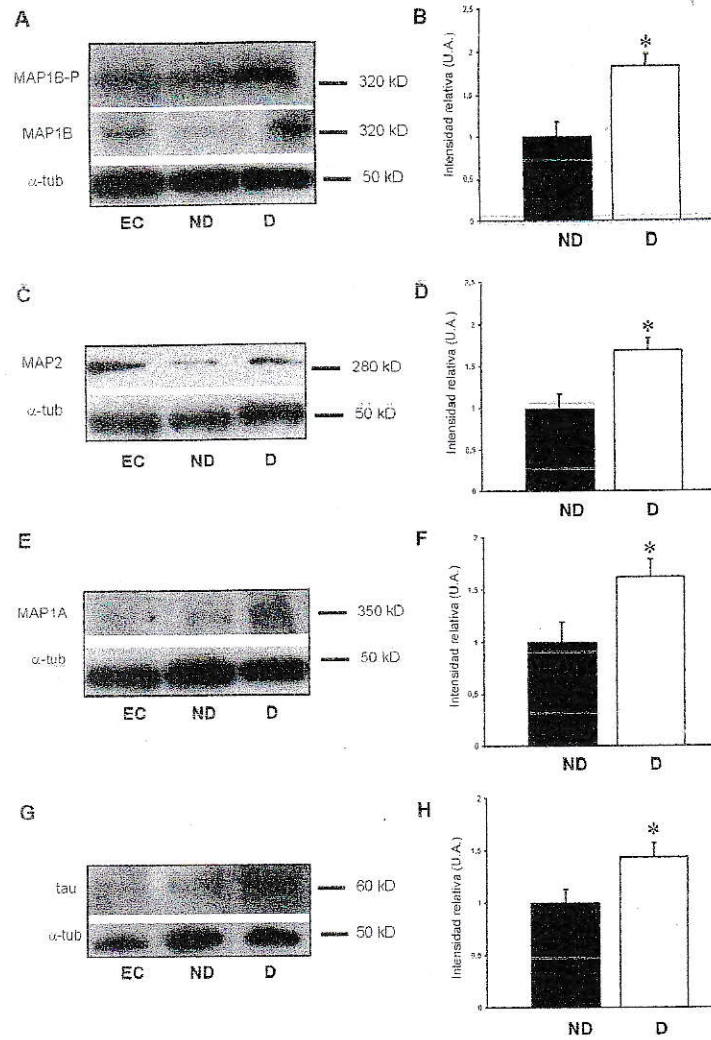


Figura 8: Cambios en la abundancia de las proteínas MAPs al inducir la diferenciación neuronal. En la figura se muestran los western blots para las proteínas MAP1B y MAP1B-P en modo 1 (A), MAP2 (C), MAP1A (E) y tau (G), con sus respectivas densitometrías de la masa total normalizado contra la cantidad de α -tubulina (B, D, F y H). El carril EC corresponde a un extracto de cerebro de ratón (control positivo), y los carriles ND y D son extractos de células indiferenciadas y diferenciadas, respectivamente. El (*) indica cambios significativos ($p < 0,05$ para experimentos en triplicado).

ampliamente como marcadores de axón en neuronas. En la Figura 9A se muestra la presencia de MAP2 a través de toda la célula (control y DBcAMP), sin embargo, en las células diferenciadas (DBcAMP) esta proteína se encuentra relativamente aumentada (mayor intensidad de señal) respecto a las células indiferenciadas (control), y marcadamente distribuida en todas las prolongaciones neuríticas.

Por otro lado, al analizar la distribución de los marcadores axonales tau1 y MAP1B-P, éstos también presentan un aumento en las células diferenciadas, donde se encuentran en forma marcada tanto en el cuerpo celular como en las prolongaciones neuríticas.

De esta manera, se obtuvo una correlación entre el aumento en la abundancia para las proteínas MAPs obtenido por medio de western blots y un aumento en la intensidad de la señal en las inmunofluorescencias de las células N1E 115 diferenciadas respecto a las células control. Este conjunto de datos da cuenta de que se podría requerir de una remodelación tanto de los microtúbulos, como se observa con la expresión de la isoforma β III de la tubulina, como de la abundancia y la actividad mediada por fosforilación de sus proteínas accesorias (como las MAPs) durante la diferenciación neuronal. Estos cambios podrían ser fundamentales para modificar tanto la dinámica como la estabilidad de los microtúbulos en los segmentos distales y proximales de la neurita, que permitirían el crecimiento y la consolidación de una extensión celular, respectivamente.

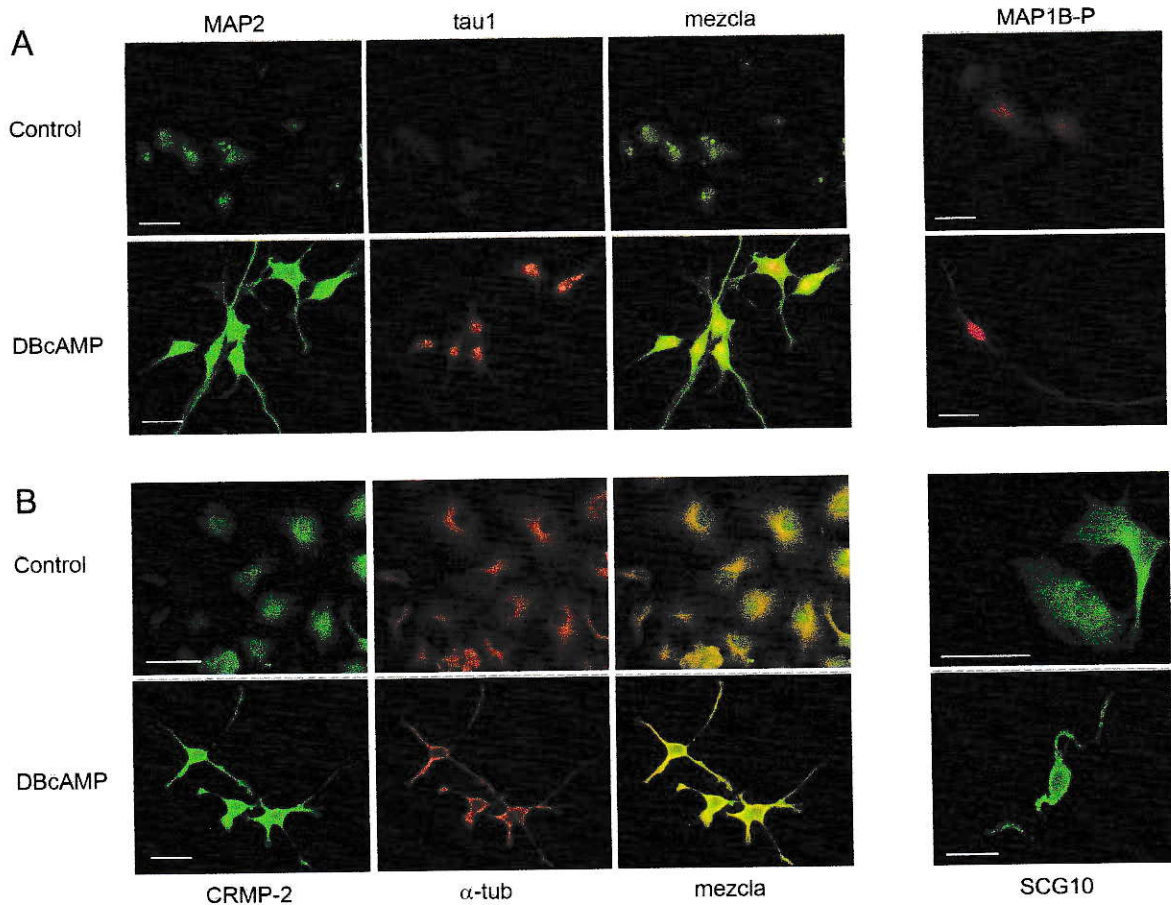


Figura 9: Distribución subcelular de las principales MAPs y las proteínas CRMP-2 y SCG10 en células N1E 115 diferenciadas e indiferenciadas. A) Inmunocitoquímicas para las proteínas MAP2, tau (forma hipofosforilada; Binder *et al*, 1985) y MAP1B (forma fosforilada en modo I; Ulloa *et al*, 1994) en células N1E 115 diferenciadas e indiferenciadas. B) Distribución subcelular de las proteínas CRMP-2 y SCG10, en células N1E 115 diferenciadas e indiferenciadas. Las imágenes fueron tomadas con los objetivos 40X y 63X, y fueron sometidas a zoom digital. La barra blanca representa 20 μ m.

7.2.1.2 Otras proteínas que se asocian a microtúbulos:

Si bien las proteínas MAPs son claves para el desarrollo del cerebro, no son las únicas proteínas que son capaces de unirse y modular al citoesqueleto. Últimamente, se ha obtenido evidencia suficiente para confirmar la presencia de varias otras proteínas capaces de unirse a microtúbulos o a heterodímeros de α y β tubulina. Entre las proteínas MAPs no convencionales, encontramos a LIS1 y doblecortina, que tiene importantes funciones asociadas con el correcto desarrollo del cerebro y la migración neuronal, pero que también tienen actividad estabilizadora de microtúbulos (Shmueli *et al*, 2001).

Durante la diferenciación neuronal de la línea N1E 115, se observó una leve disminución del nivel de la proteína LIS1 total en la célula (Figura 10A), que si bien no resultó ser significativa, fue de cerca del 20% (Figura 10B). Resulta interesante que mientras todas las proteínas MAP aumentan su expresión durante la diferenciación, la de LIS1 se mantuvo constante. Por el contrario, una proteína que tiene una alta correlación con LIS1, la doblecortina, sufre un fuerte aumento durante la diferenciación (Figura 10C). Este resultado puede ser novedoso, debido que ambas proteínas interactúan para regular procesos como el transporte de vesículas, y compiten por la estabilización de microtúbulos durante el desarrollo del cerebro (Caspi *et al*, 2000).

Otra proteína estudiada en este trabajo, la CRMP2, no se ha definido como parte de la familia de las MAPs, pero posee un motivo de unión a heterodímeros de tubulina. La CRMP-2 participa en el transporte de α y β tubulina hacia la parte distal de las neuritas, potenciando el crecimiento de los microtúbulos (Fukata *et al*, 2002). En la Figura 10E se observa como esta proteína experimenta un alza significativa en su masa en células diferenciadas, lo que podría indicar que existe un aumento de la síntesis de esta proteína dependiente del desarrollo de neuritas. Este resultado se confirmó por medio de inmunofluorescencia (Figura 9B), donde se observa que las células diferenciadas presentan un enriquecimiento en la abundancia en esta proteína respecto a las células indiferenciadas.

Finalmente, se estudió una proteína que se asocia a microtúbulos, pero que posee una actividad opuesta a la de las proteínas MAPs. Las *stathminas* son una pequeña familia de proteínas, donde SCG10 es la de mayor expresión en las etapas iniciales del desarrollo del cerebro, y específica de neuronas (Grenningloh *et al*, 2004). En la Figura 10G se aprecia que esta proteína disminuye su expresión durante el proceso de diferenciación neuronal a casi la mitad de su cantidad relativa a las células indiferenciadas. Al realizar inmunofluorescencia en células N1E 115, no se reportaron cambios evidentes en la abundancia de esta proteína entre estados diferenciados e indiferenciados, sin embargo, en células diferenciadas se encontró particularmente enriquecida en la parte más distal de las neuritas, en la zona de mayor dinámica de los microtúbulos, donde podría encontrarse en forma más activa durante la diferenciación.

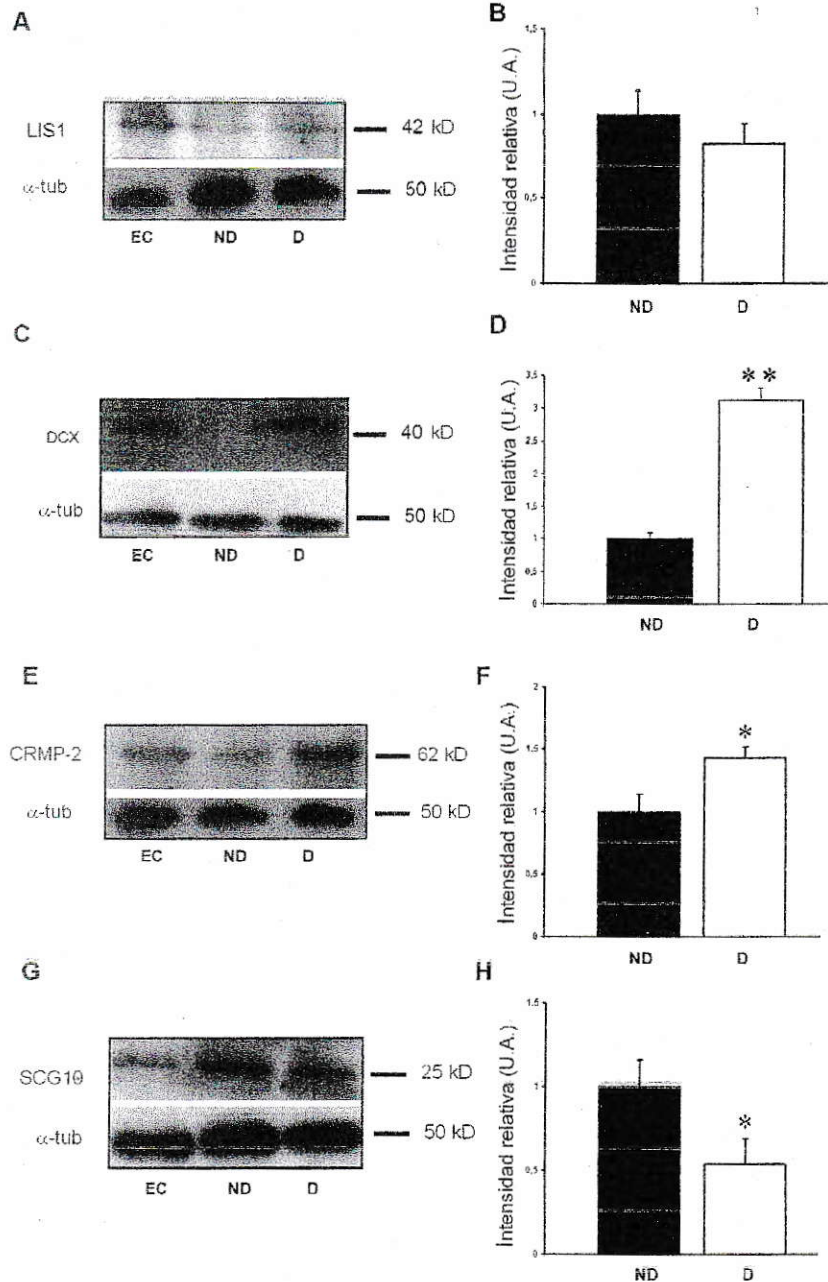


Figura 10: Cambios en la abundancia de proteínas capaces de modular los microtúbulos durante la diferenciación. Western blots contra las proteína LIS1 (A), doblecortina (C), CRMP-2 (E) y SCG10 (G), y sus análisis estadísticos en (B), (D), (F) y (H). EC, extracto de cerebro de ratón (control positivo); ND y D son extractos de células indiferenciadas y diferenciadas, respectivamente. El (*) indica una probabilidad menor a 0,05 y (**) indica una probabilidad menor a 0,005 (experimentos en triplicado).

7.2.2 Proteínas quinasas involucradas en diferenciación neuronal

Una vez realizado el estudio de las proteínas efectoras que modulan la estabilidad y la dinamicidad de los microtúbulos, para continuar con la realización de este objetivo nos centramos en el análisis de las quinasas que regulan la dinámica de microtúbulos río arriba, por medio de fosforilaciones.

Una de las enzimas más versátiles, que participa en un amplio espectro de vías de señalización, como la del dolor, en sinaptogénesis y en memoria (Smith *et al*, 2001), es la quinasa dirigida por prolina CDK5. Se ha descrito que tiene un rol importante en la fosforilación de proteínas asociadas al citoesqueleto de microtúbulos, principalmente (Ohshima *et al*, 1996). Es por ello que resulta interesante ver si existe un cambio en la abundancia o en la actividad de esta proteína durante la diferenciación.

La Figura 11A da cuenta de que la cantidad de CDK5 no varía durante la diferenciación neuronal, para un experimento en triplicado. Si bien en la densitometría se aprecia un leve aumento, éste no resulta estadísticamente significativo (Figura 11B). La actividad de la proteína CDK5 está muy asociada a la abundancia de sus proteínas activadoras, p35 y p39. Es por esto que también se quiso estudiar si la abundancia de la molécula activadora de CDK5 específica de cerebro, p35, se ve alterada durante la diferenciación neuronal. En la Figura 11C, se muestran los resultados de experimentos en que se estudió si existe una variación en la cantidad de p35 que pudiese explicar cambios en la actividad de la quinasa sin variaciones en la masa de CDK5. Sin embargo,

los resultados indican que tampoco ocurre un cambio significativo para la masa de p35 en un experimento en triplicado.

Finalmente, analizamos si la interacción entre CDK5 y p35 podría estar favorecida durante la diferenciación de las células N1E 115. Para ello, inmunoprecipitamos a la quinasa CDK5 a partir de extractos de proteínas de células no diferenciadas y diferenciadas, y posteriormente evaluamos la cantidad de p35 asociada a la quinasa. Interesantemente, al realizar este experimento se observó un aumento de la interacción entre ambas, lo que podría dar cuenta de una activación de CDK5, pese a no existir cambios significativos en la masa de la quinasa ni del activador p35.

Otra proteína quinasa que tiene alta relevancia sobre el control de la estabilidad del citoesqueleto es la JNK, ya que es capaz de fosforilar a proteínas MAPs como MAP1B, tau y doblecortina (Bogoyevitch y Kobe, 2006). En la Figura 11G se ve como esta serina / treonina quinasa experimenta un importante aumento en su masa y en la fosforilación de las isoformas 1 y 2 durante la diferenciación de las células N1E 115. Este aumento de su masa total y su actividad podría ser una respuesta a la activación de la vía de señalización de las MAPKs, la cual puede ser regulada por medio de los niveles de AMPc citosólicos (Deng *et al*, 2001).

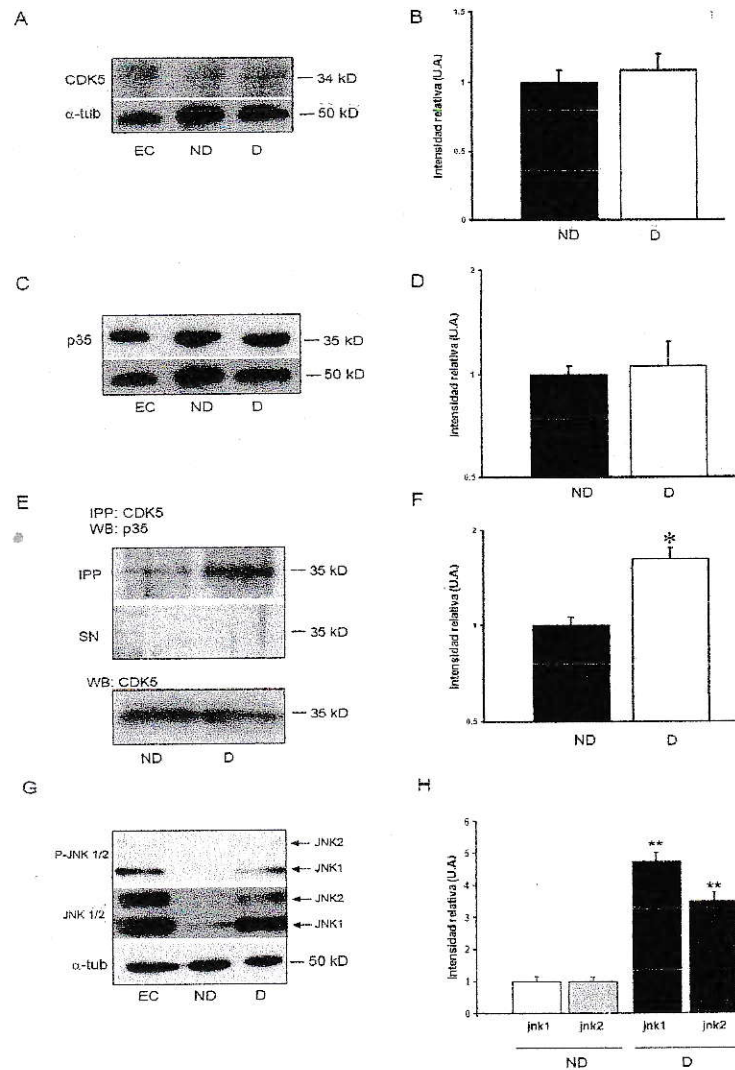


Figura 11: Cambios en la masa y la actividad de CDK5 y su activador p35, y la JNK durante la diferenciación en células N1E 115. A) Western blot contra CDK5, con su respectivo análisis estadístico en B. C) Western blot contra la proteína activadora de CDK5, p35, y su densitometría en D. E) IPP de CDK5 y western blot contra p35 (análisis estadístico en F). Se utilizó como control de carga la cantidad relativa de CDK5. G) Western blot contra las formas totales y fosforiladas de JNK1 y 2, de masa aproximada 50 y 70 kDa, respectivamente (análisis estadístico en H). EC, extracto de cerebro total de ratón; ND, extracto de células no diferenciadas; D, extracto de células diferenciadas. IPP: inmunoprecipitado; SN: fracción sobrenadante. El (*) indica una probabilidad menor a 0,05, mientras que (**) indica una probabilidad menor a 0,005 para experimentos en triplicado.

7.2.3 Cambios en la regulación de la dinámica de actina durante la diferenciación en las células N1E 115.

7.2.3.1 Análisis de los cambios de masa y actividad de rac1 y cdc42 en la diferenciación.

En esta segunda parte quisimos evaluar los cambios asociados a las proteínas que modulan al citoesqueleto de actina. Para ello, nos enfocamos en un grupo de proteínas que ejerce un rol muy importante sobre la dinámica de los filamentos de actina: las GTPasas pequeñas de la familia de Rho. Inicialmente se estudió cómo variaban la actividad y la masa de 2 de sus miembros más estudiados, rac1 y cdc42, responsables de los movimientos protrusivos en muchos tipos celulares. Adicionalmente, la actividad de estas 2 proteínas (dependiente de la unión al nucleótido GTP o GDP) fue analizada por pull down, debido a que en su estado activo ambas comparten afinidad con el dominio de interacción PBD de la proteína pak1 (provisto en forma de perlas de PBD-GST por el kit de activación de rac1, Cytoskeleton Inc.).

En el pull down de la Figura 12B se muestra una activación de la proteína rac1 en respuesta a la diferenciación neuronal, pese a que no existe un cambio en la cantidad de rac1 total (Figura 12A). La vía de rac1 se encuentra cercanamente relacionada con la de cdc42, y existe certeza de que pueden actuar en forma conjunta para llevar a cabo procesos de extensión celular (Luo, 2000). Para ver si existe una activación de ambas GTPasas simultáneamente, también se evaluó por pull down la actividad de cdc42

durante la diferenciación de las células N1E 115. En este último ensayo, se observó un aumento significativo de la activación de cdc42 durante la diferenciación, aunque menos evidente de aquel obtenido para rac1 (Figura 13D).

Ambos resultados fueron chequeados por medio de un ensayo de ELISA, utilizando un kit comercial provisto por Cytoskeleton Inc, para ambas GTPasas (Figuras 12E y 13 E). En el caso de ambas GTPasas, el resultado del ensayo de ELISA fue menos evidente comparado al arrojado por el ensayo de pull down, pero sin embargo, también resultó significativo. Al verificar los controles positivos (GTPasas constitutivamente activas) y negativos (ausencia de extracto de proteína en los pocillos), se observan valores que están dentro de los rangos descritos por el método (razón entre el control positivo y el negativo debe ser > 6). Por ello, la diferencia podría deberse sólo a distintas sensibilidades de los métodos empleados, ya que el método de pull down sólo se describe como un análisis semi-cuantitativo (manual del proveedor).

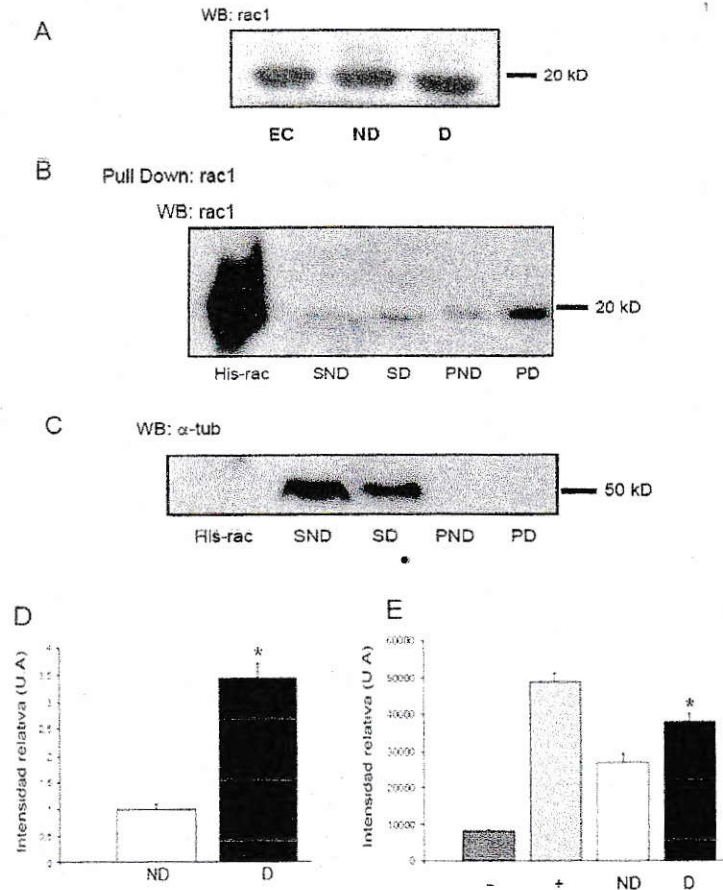


Figura 12: Cambios en la masa y en la actividad de la GTPasa rac1 durante la diferenciación en células N1E 115. A) Western blot para rac1 total. EC, extracto de cerebro de ratón; ND, extracto de células indiferenciadas; D, extracto de células diferenciadas. B) Ensayo de medición de la actividad de rac1. His-rac, 1 μ g de proteína rac1 recombinante purificada; SND, sobrenadante del extracto de células no diferenciadas; SD, sobrenadante del extracto de células diferenciadas; PND, pull down del extracto de células no diferenciadas; PD, pull down del extracto de células diferenciadas. C) Western blot contra α -tub para las muestras utilizadas en B, como referencia de la cantidad relativa de proteínas cargadas, y de que la interacción es específica. D) Cuantificación de la actividad de rac1, normalizado contra de α -tubulina (n=3, p<0,05). E) Análisis estadístico para el ensayo de activación de rac1 determinado por ELISA (n=4, p<0,05). (-) y (+) representan el control negativo sin proteína, y el control positivo con rac1 constitutivamente activa.

De esta forma, demostramos por medio de dos métodos diferentes que las GTPasas rac1 y cdc42 se encuentran más activas en las células N1E 115 diferenciadas en relación a las células indiferenciadas. Esta activación podría ser fundamental para el control de la polimerización de actina, requerida para la extensión de neuritas y la formación de estructuras como filopodios y lamelipodios, los que se encuentran presentes forma común en las células diferenciadas (Figura 7).

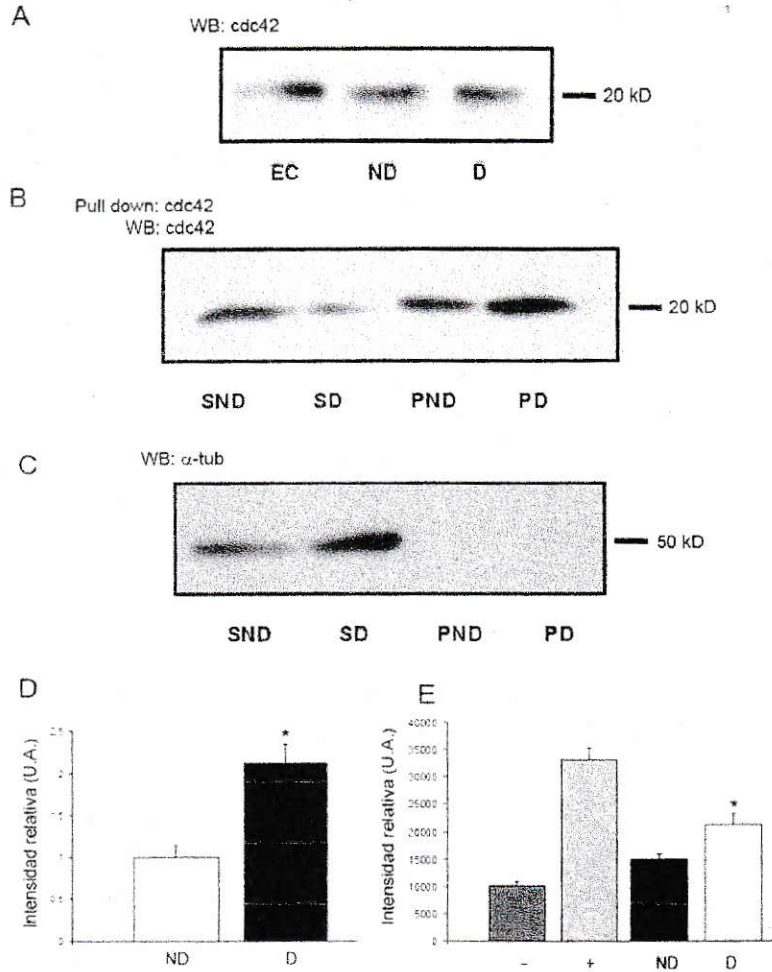


Figura 13: Análisis de los cambios en la masa y en la actividad de la GTPasa cdc42 durante la diferenciación neuronal en células N1E 115. A) Western blot para cdc42 total. EC, extracto de cerebro total de ratón; ND, extracto de células no diferenciadas; D, extracto de células diferenciadas. B) Ensayo de medición de la actividad de cdc42. SND, sobrenadante del extracto de células no diferenciadas; SD, sobrenadante del extracto de células diferenciadas; PND, pull down del extracto de células no diferenciadas; PD, pull down del extracto de células diferenciadas. C) Western blot contra α -tub para las mismas muestras utilizadas en B, como una referencia de la cantidad relativa de proteínas cargadas. D) Cuantificación de la actividad de cdc42, normalizando contra la intensidad de las bandas de α -tubulina (n=3, p< 0,05).

7.2.3.2 Análisis del cambio de masa y actividad de RhoA.

En este objetivo, se evaluó el cambio en la masa y la actividad experimentados por la GTPasa RhoA durante la diferenciación. Por medio de western blot, se detectó una fuerte disminución de la masa de RhoA en las células N1E 115 luego de la diferenciación (Figura 14A), que podría dar cuenta de que esta vía se encontraría apagada o muy disminuida una vez que el proceso de neuritogénesis se ha llevado a cabo. Para confirmar este resultado, se realizó un ensayo de interacción basado en la técnica de ELISA (kit de activación de RhoA por ELISA, Cytoskeleton Inc). La Figura 14C da cuenta de este resultado, que confirma la disminución de la actividad de RhoA posterior a la diferenciación.

En su conjunto, estos resultados sugieren que la diferenciación del neuroblastoma N1E 115 requiere de la activación de las proteínas rac1 y cdc42, y de la inactivación de la proteína RhoA.

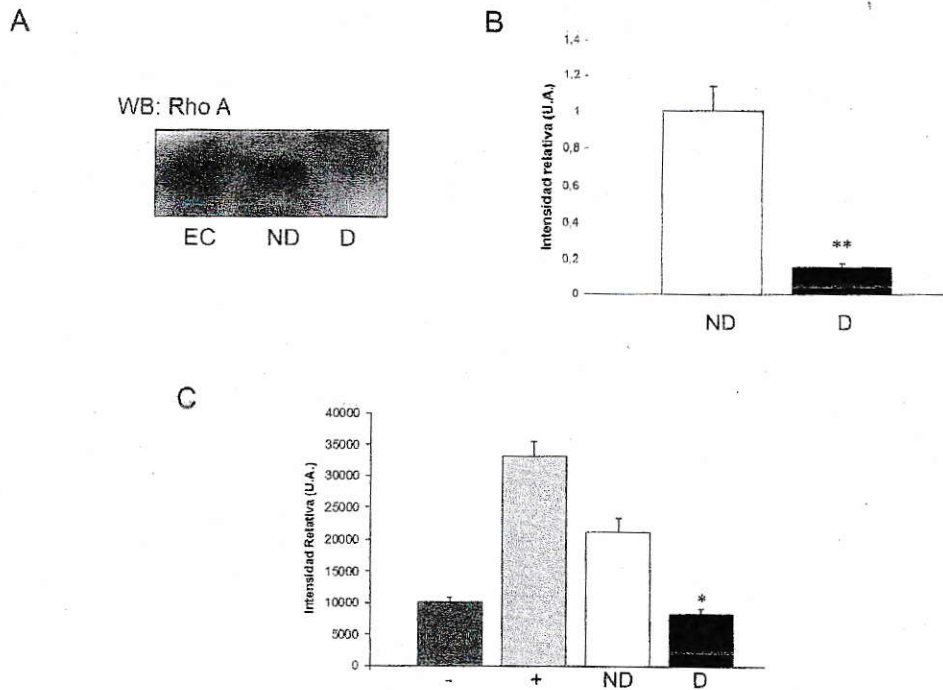


Figura 14: Análisis de los cambios de masa y de actividad de RhoA durante la diferenciación en las células N1E 115. A) Western blot contra RhoA, que da cuenta de su disminución casi total durante la diferenciación neuronal. En B se muestra su análisis estadístico. EC, extracto de cerebro de ratón; ND, extracto de células no diferenciadas; D, extracto de células diferenciadas (n=3). C) Disminución de la actividad de RhoA detectada por medio de un ensayo de ELISA. El (-) constituye el control negativo sin adicionar proteína al pocillo, el (+) equivale a la carga de proteína RhoA constitutivamente activa, y ND y D constituyen los extractos no diferenciados y diferenciados, respectivamente (n=4). El (*) indica una probabilidad menor a 0,05 y el (**) indica una probabilidad menor a 0,01.

7.2.3.3 Control de la actividad de las GTPasas por los factores intercambiadores de nucleótido guanina (GEFs)

La actividad de las GTPasas pequeñas de la familia de RhoA son controladas por mecanismos bien establecidos. Su actividad oscila entre estados inactivos (unidas a GDP) y estados activos (unidas a GTP). En esta regulación juegan un rol clave los factores intercambiadores de nucleótido guanina (GEFs), los cuales son capaces de promover el estado activo de las GTPasas. Esta activación permanece hasta que las GTPasas desencadenan su actividad GTPásica intrínseca, la cual es inducida por las proteínas GAPs (proteínas activadoras de la actividad GTPásica).

Se analizó si existían cambios en la masa de 2 proteínas GEFs capaces de promover la actividad de las GTPasas de la familia de RhoA, como lo son Tiam1 y trio (Nikolic, 2002; Briançon-Marjollet *et al*, 2008; Lane *et al*, 2008). En la Figura 15 se muestra un aumento significativo de la proteína GEF Tiam1, la cual se ha establecido que es fundamental para el desarrollo de neuritas, mientras que su ausencia genera neuronas sin desarrollo de polaridad (Kunda *et al*, 2001). Por otro lado, la proteína trio aumenta también su masa, sin embargo, el aumento no es significativo. Estos resultados dan cuenta de que podría ser necesaria una activación de las GTPasas, como rac1 y cdc42, para llevar a cabo la regulación del citoesqueleto y desencadenar la neuritogénesis.

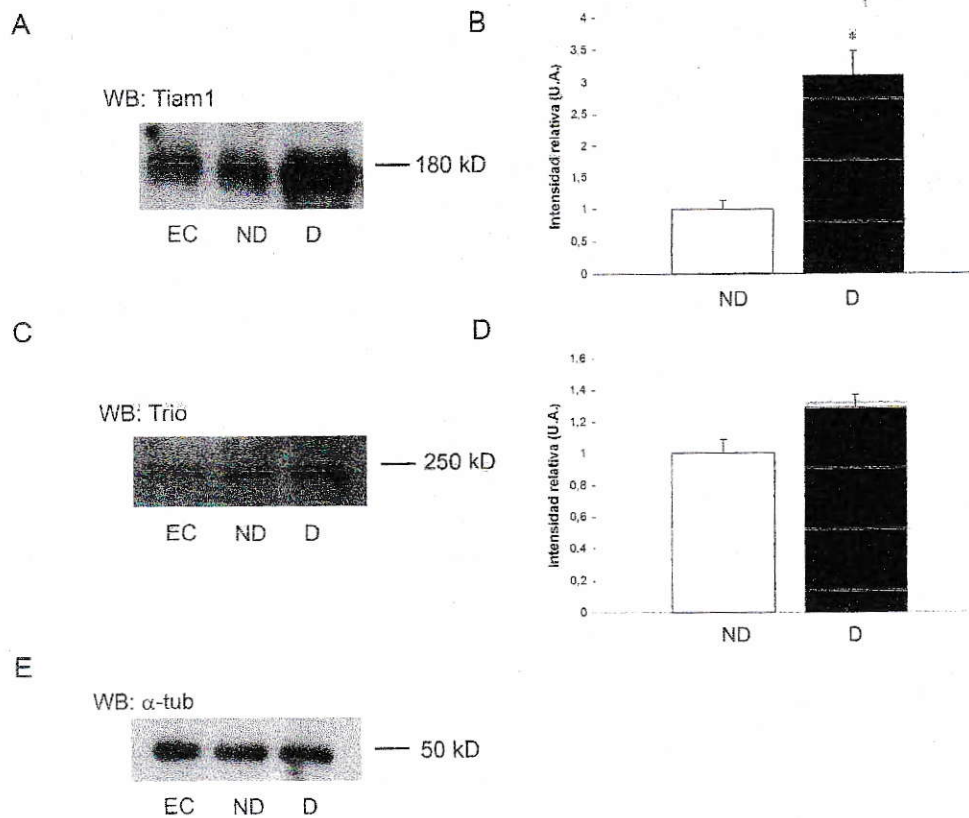


Figura 15: Cambios en la masa de las GEF Tiam1 y trio durante la diferenciación de las células N1E 115. A) Western blot contra la GEF Tiam1, con su análisis estadístico en B (n=3). C) Western blot contra trio junto a su análisis estadístico en D (n=3). E) Western blot contra α -tubulina, utilizado como control de carga. EC, extracto de cerebro de ratón; ND, extracto de células N1E 115 indiferenciadas; D, extracto de células N1E 115 diferenciadas. El (*) indica una probabilidad menor a 0,05.

7.2.3.4 Cambio en la fosforilación en cofilina mediado por la activación de pak1 durante la diferenciación.

Una vez que las GTPasas monoméricas son activadas, existen cascadas de señalización que responden a estos cambios dinámicos de actividad. Una de estas cascadas está íntimamente relacionada con la activación de rac1. Es así como la proteína pak1 es capaz de activarse cuando interactúa con rac1 activo, y de esta forma, es capaz de participar en la vía de señalización que permite la modulación del citoesqueleto modificando la fosforilación y la actividad de la proteína de unión actina cofilina. En la figura 15A se muestra un aumento en la masa de la quinasa pak, en sus isoformas 1 y 2, en respuesta a la diferenciación neuronal. Este aumento en la masa de pak se podría correlacionar con un aumento en su actividad quinasa durante la diferenciación.

Para verificar esto, se procedió a realizar una inmunoprecipitación con un anticuerpo que reconoce residuos de treonina fosforilados. La pak1 fosforilada en el residuo de treonina 423, es capaz de autofosforilarse e inducir la activación de otras proteínas río abajo, como LIMK1 (Hayashi *et al*, 2002). En la Figura 16B se muestra también un aumento de la fosforilación en treonina de pak1, lo que se correlaciona con la activación de rac1 durante la diferenciación, y que podría desencadenar una activación de la proteína LIMK1.

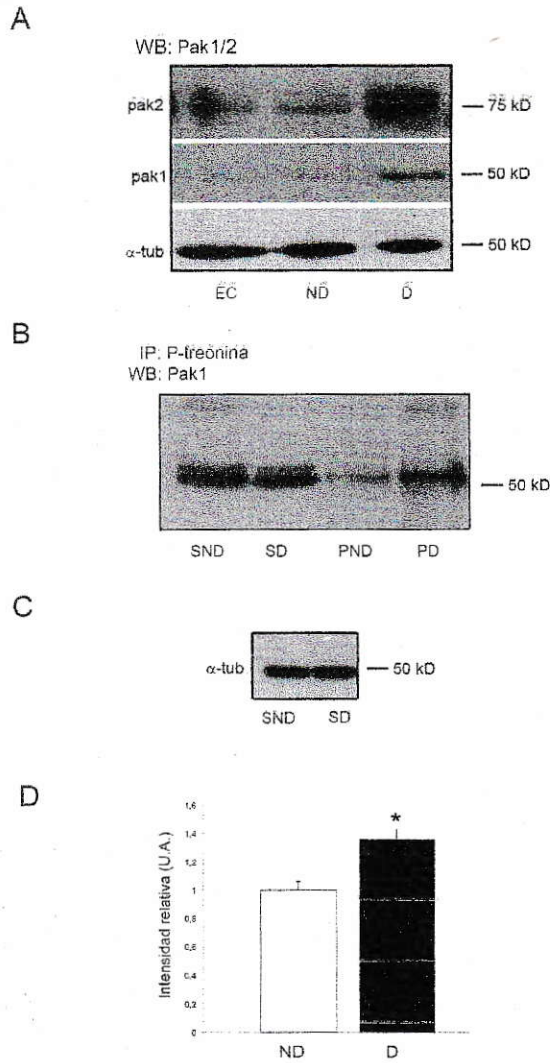


Figura 16: Cambios en la masa y la actividad de pak durante la diferenciación. A), Western blot contra pak1 y 2. EC, extracto de cerebro total de ratón; ND, extracto de células no diferenciadas; D, extracto de células diferenciadas (n=3). B) Inmunoprecipitación con un anticuerpo contra fosfo-treonina, para detectar pak1 activo. SND, sobrenadante del extracto de células no diferenciadas; SD, sobrenadante del extracto de células diferenciadas; PND y PD, precipitado del extracto de células no diferenciadas y diferenciadas, respectivamente. C) western blot contra α -tubulina, como control de carga de la inmunoprecipitación. D) Análisis de la razón entre pak1 activo (fosforilado) y pak1 total, para un n= 3. El (*) indica una probabilidad menor a 0,05.

Finalmente, el aumento de la masa y de la activación de la proteína pak1 podría estar modulando la actividad de la quinasa LIMK1, la cual a su vez, al ser fosforilada, es capaz de inactivar a cofilina, al fosforilarla en el residuo de serina en la posición 3 (Edwards *et al*, 1999). Esta vía de señalización finalmente desencadena en un cambio en la polimerización de actina. En la Figura 17 se muestra cómo se asocia el proceso de diferenciación con un aumento de la fosforilación de cofilina, y que podría dar cuenta de la formación de nuevos polímeros de actina para permitir la protrusión celular asociada a la extensión de neuritas.

7.3 Cambios en la polimerización de actina durante el proceso de diferenciación neuronal.

Anteriormente hemos descrito las proteínas clave que controlan la polimerización de actina, como rac1, cdc42 y RhoA, las cuales presentan cambios en su actividad durante la diferenciación neuronal. Así mismo, hemos demostrado que estos cambios se asocian a cambios en las vías de señalización que se encuentran río debajo de las GTPasas. Por lo tanto, en este set de experimentos se pretende ver las consecuencias fisiológicas globales de los cambios de actividad de las GTPasas ocurridos durante la diferenciación neuronal sobre la polimerización del citoesqueleto de actina. Para ello, se utilizó un kit comercial (Cytoskeleton Inc.) que permite separar la fracción soluble de actina (actina globular o G-actina) de aquella que se encuentra polimerizada (actina fibrilar o F-actina) a partir de 1 mg de extractos de proteínas totales.

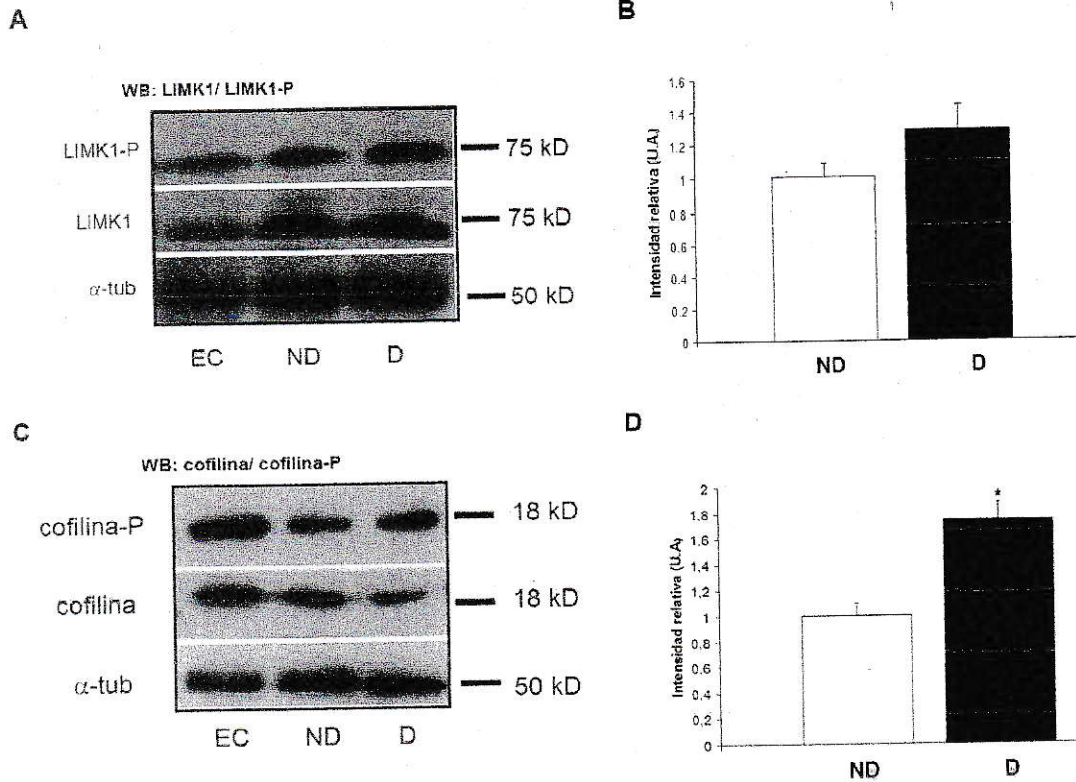


Figura 17: Cambios en la masa y la fosforilación para las proteínas LIMK1 y cofilina, durante el proceso de diferenciación. A, Western blot para la proteína LIMK1 fosforilada y LIMK1 total. En B se muestra la densitometría de la razón entre la proteína LIMK1 fosforilada y LIMK1 total, utilizando a α -tubulina como control de carga (n=5). C, Western blot contra la proteína cofilina fosforilada y cofilina total. D, densitometría de la razón entre la proteína cofilina fosforilada y la cofilina total y α -tubulina como control de carga (n = 5). EC, extracto de cerebro de ratón; ND, extracto de células no diferenciadas; D, extracto de células diferenciadas. El (*) indica una probabilidad menor a 0,05.

Para comprobar que el sistema funciona correctamente, se utilizó como controles extractos de células N1E 115 tratados con faloidina (toxina que inhibe la despolimerización de los filamentos de actina) y con citocalasina-D (droga que impide la polimerización de actina), y luego se comparó los cambios ocurridos en la polimerización de actina en células diferenciadas y no diferenciadas.

La Figura 18 muestra las fracciones de sobrenadante y precipitado obtenidas luego de la ultracentrifugación, que se encuentran enriquecidas en actina globular y fibrilar, respectivamente. Al analizar los controles, se observa que el extracto celular al que se le adicionó faloidina presenta un enriquecimiento de la actina en la fracción precipitada, mientras que al extracto que se le adicionó citocalasina D dio cuenta de una mayor cantidad de actina en el sobrenadante, tal como se esperaría. Por otro lado, se puede observar que en los extractos provenientes de células no diferenciadas se observa una banda de actina de alta intensidad en la fracción soluble, en relación a la banda que se encuentra en la fracción precipitada. Por el contrario, se puede observar que en el extracto de células diferenciadas hay una banda de actina de mayor calibre en el precipitado, mientras que la banda del sobrenadante se presenta en forma más débil. Para cuantificar éstos cambios, se procedió a normalizar la intensidad de la señal de actina en el precipitado con la intensidad de la banda obtenida del sobrenadante (razón F : G actina). Al graficar esta razón, se observa una diferencia muy evidente en la polimerización de los filamentos de actina, la cual se ve significativamente aumentada durante la diferenciación del neuroblastoma N1E 115 ($n = 4$, $p < 0,005$).

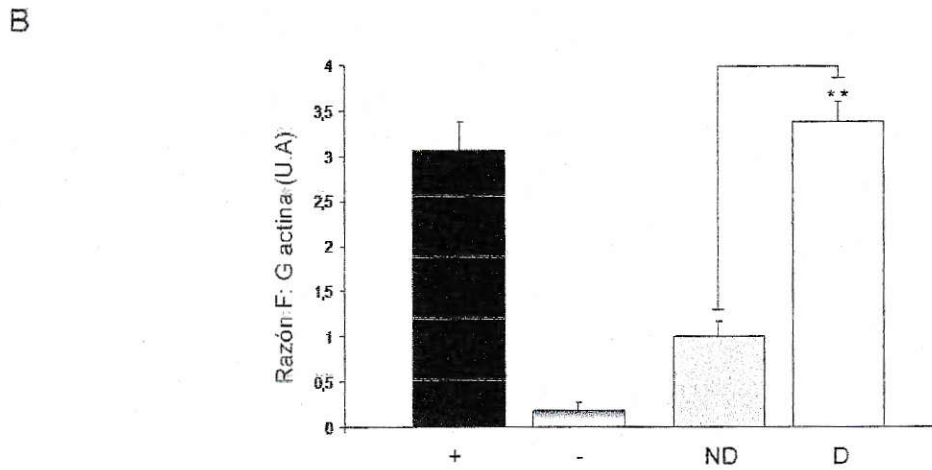
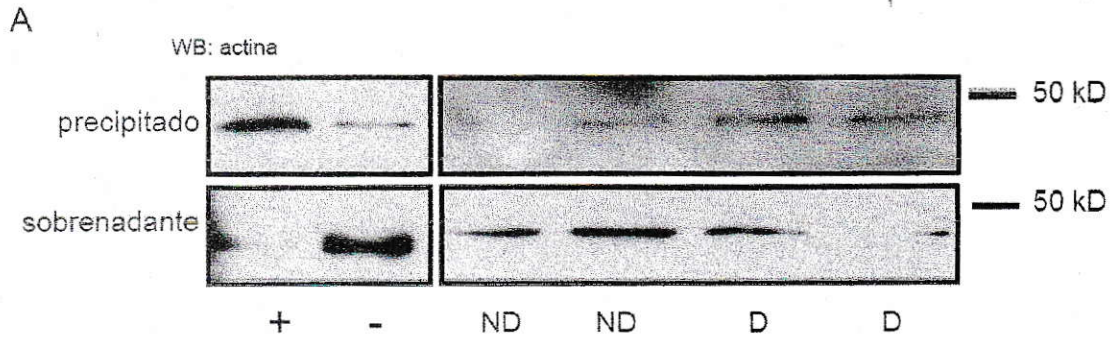


Figura 18: Cambios en la polimerización de actina durante la diferenciación neuronal. Para ello, se utilizó un kit comercial que permite separar la actina globular de la fibrilar. A) Western blot contra actina, para las fracciones precipitada y sobrenadante de los extractos de células N1E 115 tratados con faloidina (+), con citocalasina D (-), o extractos de células indiferenciadas (ND) o diferenciadas (D). B) Cuantificación de la razón de la señal obtenida para la actina del precipitado y del sobrenadante (razón F: G actina; n = 4, p < 0,005).

7.4 Analizar el efecto de una familia de proteasas y su inhibición sobre la diferenciación neuronal.

Los resultados obtenidos hasta este momento indican que la diferenciación del neuroblastoma N1E 115 involucra cambios sustanciales en proteínas claves que controlaran la dinámica del citoesqueleto. Sin embargo, datos derivados de otras líneas del laboratorio indicaban que un buen sistema para modular la diferenciación neuronal también podría relacionarse con la inhibición local de la degradación de proteínas, como un mecanismo que explique la acumulación de factores que promuevan el crecimiento exclusivamente en una neurita en células neuronales. Los datos obtenidos desde la literatura indican que el proteosoma y otras familias de proteasas serían necesarias para la degradación de proteínas que contribuyen a regular procesos como el desarrollo de la polaridad y el crecimiento y ramificación de las prolongaciones neuronales (Yan *et al*, 2006; Mignorance Le-Meur *et al*, 2008; Wang *et al*, 2003). En esta tesis decidimos evaluar el efecto que ejerce la familia de las calpaínas, las cuales son capaces de activar o desactivar proteínas por medio de su clivaje específico, a diferencia del proteosoma, que sólo es capaz de llevar a cabo la inactivación de proteínas por medio de su degradación. De esta forma, se analizó los cambios en la abundancia de las isoformas mejor descritas de calpaínas: las calpaínas 1 y 2, durante la diferenciación de las células N1E 115. Esto nos puede dar una pista sobre una posible regulación de su masa cuando las células están extendiendo neuritas.

En la Figura 19 se puede observar cómo durante la diferenciación no hay un cambio significativo en la masa de la calpaína 1, mientras que la calpaína 2 disminuye en forma evidente. Esta baja en la masa de la calpaína 2 podría ser un resultado interesante, debido a que se ha reportado que la calpaína 2 es responsable del 90% de la actividad calpaína total en neuronas (Oshima *et al*, 1989). Este resultado sugiere que la diferenciación neuronal podría requerir de la pérdida de la función (o actividad) de esta proteasa.

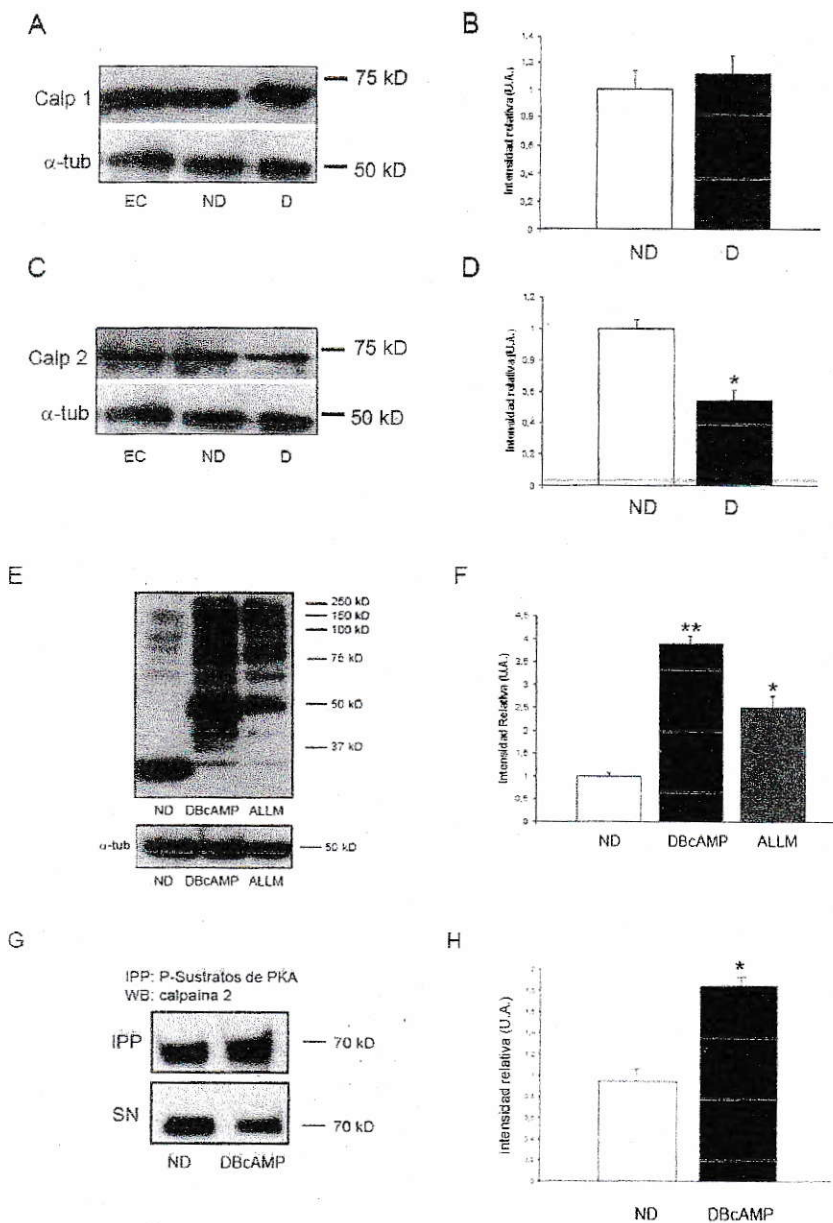


Figura 19. Regulación de la masa de las calpaínas y su actividad, mediada por la quinasa PKA. A) western blot para la isoforma 1 de calpaína, junto a su respectiva densitometría normalizada contra α -tubulina en B (n = 4). C) western blot contra calpaína 2, junto a su respectiva cuantificación normalizada en D (n = 4, p < 0,05). E) Western blot contra los sustratos fosforilados por la quinasa PKA para extractos de células indiferenciadas (ND) y diferenciadas con dibutilil AMP cíclico (DBcAMP) y ALLM. En F se muestra el análisis estadístico para un n=3. G, Western blot contra

calpaína 2 para extractos proteicos inmunoprecipitados con un anticuerpo que reconoce epítomos fosforilados por PKA (análisis estadístico en H, n=3). EC, extracto de cerebro de ratón utilizado como control positivo; ND, extracto de células indiferenciadas; D, extracto de células diferenciadas. El asterisco indica un $p < 0,05$.

Para analizar si durante la diferenciación existe una disminución de la actividad de las calpaínas, que se ha establecido como un evento clave para que se lleve a cabo la actividad protrusiva dependiente de actina (Mignorance Le-Meur, 2008), quisimos estudiar si la inhibición farmacológica de las calpaínas es capaz de alterar la morfología celular. Para ello, se utilizó concentraciones crecientes (10 a 40 μM) de ALLM en el medio de cultivo de las células N1E 115. Este inhibidor afecta a todas las isoformas, y no se ha descrito ningún compuesto capaz de inhibir a alguna isoforma específicamente. En la Figura 20, se puede observar que al mantener las células durante 5 días (ver Materiales y Métodos) sólo en presencia de 10 μM de ALLM, un importante porcentaje de éstas comienzan a extender prolongaciones neuríticas de longitudes superiores a 50 μm . Este efecto se ve potenciado cuando las células fueron expuestas a 20 μM de ALLM, ya que una mayor cantidad de células son inducidas a extender prolongaciones (ver cuantificación, Figura 20). El efecto de una concentración de 30 μM es similar a aquél observado a 20 μM , mientras que cuando se aumenta a 40 μM , no se mejora el porcentaje de diferenciación total de las células, y se comienza a observar un efecto tóxico de este compuesto (por medio de microscopía óptica se observó una importante cantidad de células muertas).

Estos resultados efectivamente sugieren fuertemente que la diferenciación neuronal requiere de una pérdida de la función de las calpaínas, y muy probablemente de la calpaína 2.

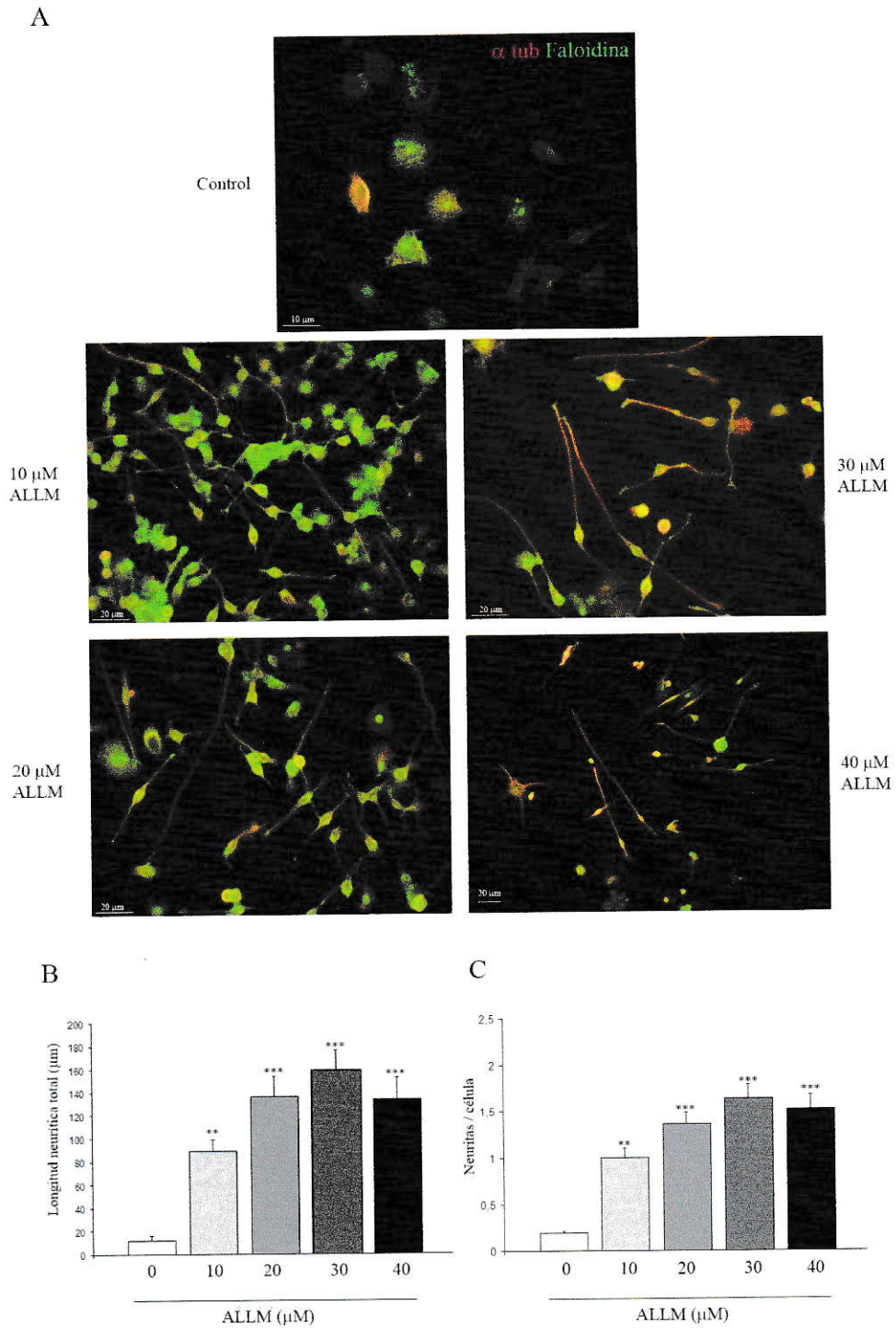


Figura 20: Variaciones morfológicas de las células N1E 115 tratadas con el inhibidor farmacológico de las calpaínas, el ALLM. A) Inmunocitoquímica para las células N1E 115 en ausencia o presencia de ALLM (10, 20, 30 y 40 μM). En rojo se

muestra el anticuerpo contra α -tubulina y en verde la tinción para actina polimerizada (Faloidina). B) Cuantificación de la longitud total de las neuritas desarrolladas por las células tratadas con distintas concentraciones de ALLM (n = 100 para cada caso). C) Cuantificación del número de neuritas por cada célula en presencia de las distintas concentraciones de ALLM (n = 100). El (**) indica una probabilidad de 0,005 y el (***) indica una probabilidad de 0,001.

Posteriormente, se analizó si durante la diferenciación existía un cambio en la expresión del inhibidor endógeno específico de las calpaínas, la calpastatina. El resultado fue una notable disminución de la masa de la calpastatina una vez que las células se diferencian, lo que es interesante, debido a que se podría esperar un aumento de la masa de calpastatina asociado a la diferenciación (Figura 21). Para ver si la calpastatina sufre algún cambio en su masa en forma temprana a la diferenciación con DBcAMP, se realizó una curva temporal con las células N1E 115 expuestas a DBcAMP desde las 0 horas (control) hasta las 96 horas (4 días de diferenciación). El resultado dio cuenta de que existe un importante cambio en la masa de la calpastatina, donde inicialmente se puede apreciar una alta expresión de esta proteína luego de 8 horas en presencia del agente diferenciador, mientras que después de las 24 horas se empieza a generar una disminución en su masa (Figura 21C). Este resultado refleja que la calpastatina podría ejercer una inhibición temprana de las calpaínas, y de esta forma, se podría desencadenar la diferenciación.

Finalmente, otro mecanismo de regulación de las calpaínas, es llevado a cabo por medio de su fosforilación, lo que permite reducir su actividad. Una de las quinasas que es capaz de fosforilar a las calpaínas es la PKA. Por ello, se analizó la actividad de esta proteína quinasa durante la diferenciación con DBcAMP y con el inhibidor farmacológico de las calpaínas, el ALLM. El resultado fue concluyente: durante la diferenciación se observó un aumento de la actividad quinasa de la PKA. Sin embargo, fue sorprendente el resultado de una proteína desconocida de cerca de 30 kDa que disminuyó su fosforilación drásticamente en las células diferenciadas, resultado que se trató de responder desde la literatura relacionada, sin tener a la fecha un candidato razonable que se ajuste a esta masa.

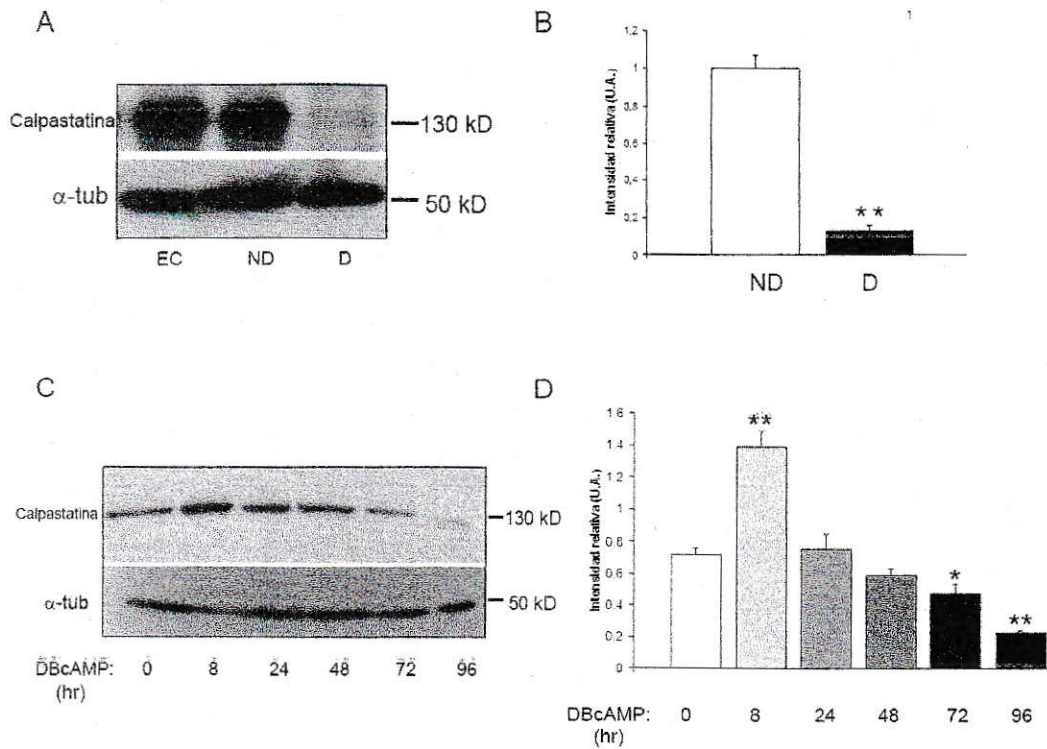


Figura 21: Regulación de los niveles de la calpastatina durante la diferenciación neuronal. A) Variación de la masa de la calpastatina en células indiferenciadas (ND) y células diferenciadas (D). EC, extracto de cerebro de ratón, utilizado como control positivo. C) Cambios en la masa de calpastatina en un curso temporal de inducción con DBcAMP, y en D se muestra la razón entre la calpastatina y la α -tubulina (n = 3). El (*) representa una probabilidad menor a 0,05 y el (**) representa una probabilidad menor a 0,01.

7. 5 Establecer al neuroblastoma N1E 115 como un buen modelo para realizar transfecciones.

Si bien los cultivos primarios de neuronas de corteza y de hipocampo se encuentran entre los modelos más utilizados para los estudios de neuritogénesis y diferenciación neuronal, uno de los grandes problemas que poseen es la baja eficiencia de transfección que tienen estos linajes celulares. Es por ello que muchos estudios de sobreexpresión de genes y de interferencia de RNA se llevan a cabo en líneas celulares. En base a esto, el origen neuronal de la línea celular N1E 115 permite llevar a cabo estudios en condiciones fisiológicas más similares a una neurona que el que se puede obtener con una línea celular no neuronal.

En este trabajo, específicamente se llevarán a cabo estudios con 2 proteínas que ya hemos mencionado en este trabajo. El primero consistente en la sobreexpresión de la proteína CRMP-2 silvestre unida a un epítipo *myc*, cuya función permite potenciar la elongación de los microtúbulos *in vivo* e *in vitro* (Fukata *et al*, 2002). Por otro lado, también se introducirán los plasmidios codificantes para la proteína desestabilizadora de microtúbulos SCG10, y 4 mutantes que emulan estados fosforilados (dominante negativa) o desfosforilados (constitutivamente activa), los que cuentan con un epítipo glu-glu (EYMPME).

Inicialmente, se estandarizó la transfección de las células N1E 115 con GFP utilizando Lipofectamina 2000, el cual se ha descrito que funciona con alta eficiencia

para líneas celulares como las PC12 y las COS-7 (Pichet y Ciccarone, 2000). En nuestro modelo, se estima que la eficiencia de transfección de GFP fue de aproximadamente 53% (n = 200, Figura 22A).

Para analizar el efecto de la transfección del plasmidio de CRMP-2, se realizó un análisis morfométrico para las células transfectadas (positivas para *myc*), y se comparó con aquellas que no se transfectaron a las 36 horas post- transfección. Se contabilizaron el número de neuritas por célula y la longitud neurítica total. Además, se confirmó por western blot la correcta expresión de la proteína recombinante, utilizando un anticuerpo primario anti-myc (Figura 22B).

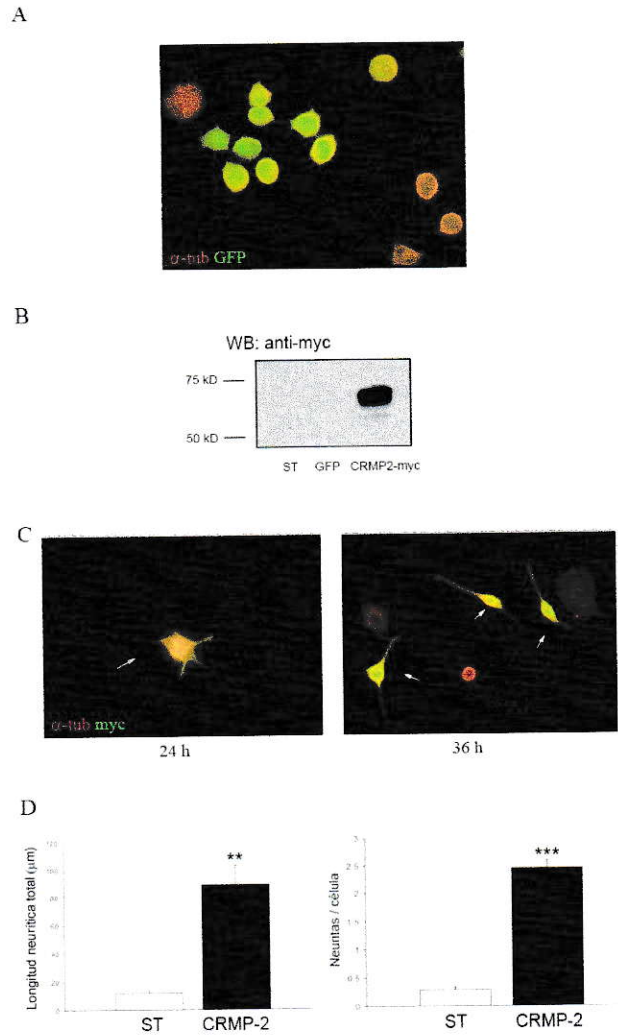


Figura 22: Efecto de la sobreexpresión de la proteína CRMP-2 en las células N1E 115. A) Eficiencia de la transfección de las células N1E 115 con GFP (el 53% de la población expresó GFP, $n = 200$). B) La sobreexpresión de la CRMP-2 fusionada a un epítipo *myc* se detectó por western blot con un anticuerpo primario anti *myc*. C) Cambio en la morfología de las células N1E 115 transfectadas con la CRMP-2 (indicadas por flechas blancas), las cuales presentan neuritas desde las 24 horas, y presentan una mayor longitud a las 36 horas post-transfección. D) Análisis morfológico de las células transfectadas (CRMP-2) y no transfectadas (ST) a las 36 horas de la transfección, que incluye la medición de la longitud neurítica total y el número de neuritas presentes en cada célula. Las imágenes fueron tomadas con el objetivo 40X.

Una vez establecido el efecto de la transfección de un factor que induce la polimerización de los microtúbulos sobre la morfología celular, decidimos analizar el efecto de una proteína antagonista.

Posteriormente, se llevó a cabo la transfección de los 5 plasmidios codificantes para SCG10 y las 4 mutaciones de los residuos de serina (ver Materiales y Métodos). Debido a que el anticuerpo contra el epítipo glu-glu reconoce muchas bandas inespecíficas por western blot, no se pudo utilizar este anticuerpo para ensayos de inmunocitoquímica (Figura 23A). En su reemplazo, se utilizó una cotransfección con GFP, para identificar las células transfectadas, la cual otorga una eficiencia cercana al 95% (Dandekara *et al*, 2005).

El fenotipo de las células transfectadas con las mutantes de SCG10 fue dispar: sólo la forma silvestre de SCG10 y la forma dominante negativa 4D fueron capaces de generar la extensión de neuritas en las células N1E 115, mientras que las formas constitutivamente activas (73A y 4A) y la dominante negativa parcial (73D) no presentaron morfologías diferenciales respecto a las células que expresaban sólo GFP (Figura 23C). La morfología de las células transfectadas con SCG10 WT y la mutante 4D resultaron similares, sin embargo, la primera indujo la formación de más neuritas de una longitud relativamente menor a las que generó la mutante 4D (Figura 23D).

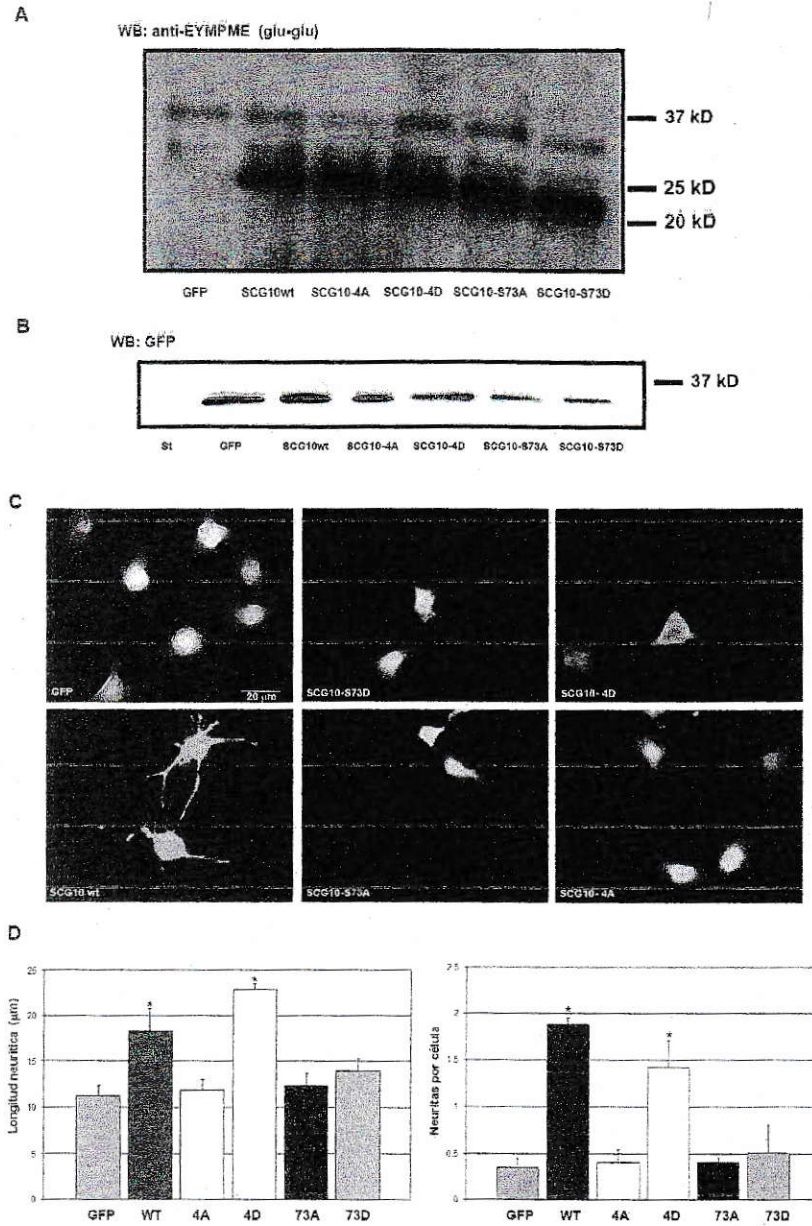


Figura 23: Cambios morfológicos mediados por la transfección de la proteína SCG10 y 4 variantes con mutaciones en residuos fosforilables. Para llevar a cabo la transfección, se utilizó el sistema de cotransfección. A) Expresión de las proteínas mutantes para SCG10, reconocidas por un anticuerpo contra el epítipo EYMPME fusionado a las proteínas. El anticuerpo reconoce una banda en los 23 kDa correspondiente a SCG10, y otras bandas no específicas de pesos moleculares entre los

30 y los 170 kDa. B) Western blot que da cuenta de la expresión de la proteína fluorescente GFP en los extractos de células N1E 115 transfectados sólo con GFP o cotransfectados con GFP y los 5 plasmidios a estudiar. Se utilizó como control negativo extracto de células sin transfectar (ST). C) Inmunocitoquímica para las células N1E 115 transfectadas con GFP (control) o cotransfectadas con GFP y las 5 variantes de SCG10. Las células fueron fijadas 36 horas después de la transfección. D) Análisis morfométrico del efecto generado por las transfecciones en C ($n = 100$ por cada caso, en 3 experimentos independientes y $p < 0,05$). Las imágenes fueron tomadas con el objetivo 40X, y la barra indica la longitud equivalente.

7.6 Establecimiento de un paralelo entre el proceso de extensión de neuritas de las células N1E 115 y el desarrollo de polaridad en neuronas de rata.

7.6.1 Establecimiento de los cultivos primarios de hipocampo de rata (E18).

Para este objetivo, se realizaron cultivos *in vitro* de neuronas provenientes de los hipocampos de embriones de rata de 18 días de preñez, que entre sus principales ventajas se encuentra la homogeneidad del cultivo, que se encuentra representado en cerca de un 90% por neuronas, por lo que ha sido ampliamente utilizado como modelo de estudio (figura 24). Para realizar un paralelo entre los procesos de extensión de neuritas de las células N1E 115 y el desarrollo de polaridad en neuronas, procedimos a estudiar las proteínas que consideramos más importantes para el control de la dinámica

de los microtúbulos y los filamentos de actina en neuronas y células N1E 115, y comparar con la literatura existente.

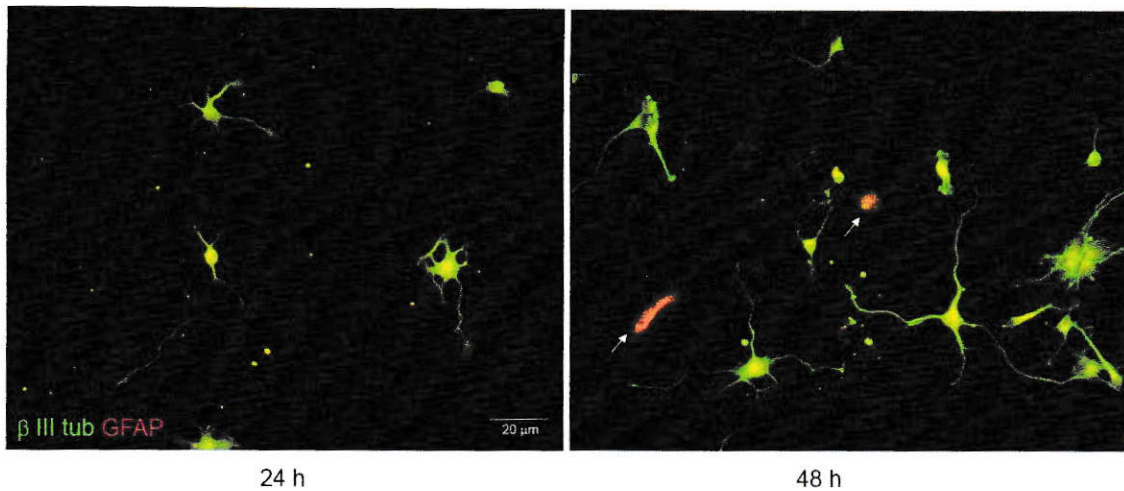


Figura 24: Establecimiento de cultivos primarios de hipocampo de rata. Si bien el cultivo de hipocampo se ha descrito como uno de los que permite obtener neuronas en forma más homogénea, esto fue chequeado esto por medio de tinciones específicas que nos permitan diferenciar células neuronales (β III tubulina) de células no neuronales (GFAP). En cultivos de 24 y 48 horas, el número obtenido de células no neuronales (indicadas con flechas blancas) fue muy inferior a aquél que se observó para neuronas, siendo estimado en alrededor de un 10%.

7.7 Comparación de las células de neuroblastoma N1E 115 diferenciadas y las neuronas primarias en cultivo.

Para llevar a cabo el paralelo entre una célula N1E 115 diferenciada y una neurona hipocampal, analizaremos ambos modelos desde el punto de vista morfológico y bioquímico.

A nivel morfológico, observamos que las células N1E 115 diferenciadas presentan varias similitudes respecto a las neuronas. Las primeras fueron capaces de desarrollar neuritas sobre los 50 μm , las cuales presentaban ramificaciones primarias, secundarias, y una importante cantidad de lamelipodios y filopodios (Figura 7), tal como lo hacen las neuronas hipocampales luego de 1 día de crecimiento *in vitro*. Además, observamos en las células N1E 115 otras características de las neuronas, como la presencia de “ondas” de actina a lo largo de las neuritas (resultados no mostrados), que fueron descritas en neuronas por el grupo de Banker (Ruthel y Banker, 1998), y un aumento en la dinámica de los microtúbulos en la parte distal de las neuritas evidenciado por la marca de la α -tubulina tirosinada (Figura 7), un hecho bien descrito en neuronas (Witte *et al*, 2008).

Sin embargo, la característica que hace que la línea celular N1E 115 no pueda emular completamente la morfología neuronal es su incapacidad para lograr la pérdida de la simetría. Esto quedó demostrado al utilizar marcadores de dendritas (MAP2) y de

axón (tau hipofosforilado y MAP1B fosforilados en modo I) en nuestro modelo celular, los cuales se distribuían en forma homogénea a través de toda la célula. Es por ello que la morfología de una célula N1E 115 diferenciada es más similar a una neurona no polarizada (estado 2), ya que no es capaz de alcanzar el alto grado de complejidad estructural y la segregación bioquímica lograda por una neurona madura (Figura 25).

Al realizar un paralelo entre los cambios bioquímicos propios de la polarización en neuronas y la diferenciación de las células N1E 115, podemos encontrar una serie de similitudes y algunas diferencias. En nuestro modelo celular encontramos un aumento en la expresión de las proteínas MAPs convencionales en forma aproximadamente equivalente (Figura 10), lo que se correlaciona con lo que ocurre en neuronas, excepto por el hecho de que la proteína MAP1A sufre un aumento de expresión en etapas posteriores del desarrollo (resultados no mostrados; Riederer y Matus, 1985). Además, existe una similitud en el grado de fosforilación de la proteína MAP1B, así como en la abundancia y la actividad de 2 de las quinasas responsables de esta modificación, CDK5 y JNK (Pigino *et al*, 1997, Oliva *et al*, 2006). Además, durante la diferenciación las células N1E 115 expresan en forma muy abundante la isoforma $\beta 3$ de la tubulina, un marcador clásico de neuronas, que da cuenta de una remodelación de la estructura interna de los microtúbulos. De esta forma, encontramos que los cambios globales relacionados al control de los microtúbulos son similares en neuronas y las células N1E 115.

Al analizar los cambios referentes al citoesqueleto de actina en ambos modelos, también encontramos varias diferencias. La activación de las GTPasas rac y cdc42 son claves para modular la estabilidad del citoesqueleto y para los movimientos protrusivos dependientes de actina de la neurona, sobre todo cuando la célula se encuentra explorando su alrededor, como ocurre durante su diferenciación. De esta forma, en nuestro modelo celular encontramos un aumento de la actividad, pero no en la masa, de las GTPasas rac1 y cdc42, que se correlaciona al aumento de las protrusiones celulares que observamos por microscopía (Figura 7), y a lo ocurrido en neuronas durante la transición de la etapa 2 a la 3, donde la activación en paralelo de cdc42 y rac1 desemboca en el rápido crecimiento de una neurita para convertirse en axón (Watabe-Uchida *et al*, 2006).

Evidentemente, la activación de rac1 y cdc42 es muy importante para la definición del axón. Ha sido demostrado que en neuronas en estadio 2 tardío existe un enriquecimiento de pak1 activo en la neurita más larga, mientras que en el estadio 3 pak1 fosforilado se encuentra exclusivamente en el extremo distal del axón (Jacobs *et al*, 2007). Esta activación de pak1 podría estar regulando río abajo a la cofilina, cuya fosforilación es clave para la extensión del axón (Garvalov *et al*, 2007). Todos estos cambios bioquímicos también resultan muy similares a los resultados obtenidos para la diferenciación de nuestro modelo celular.

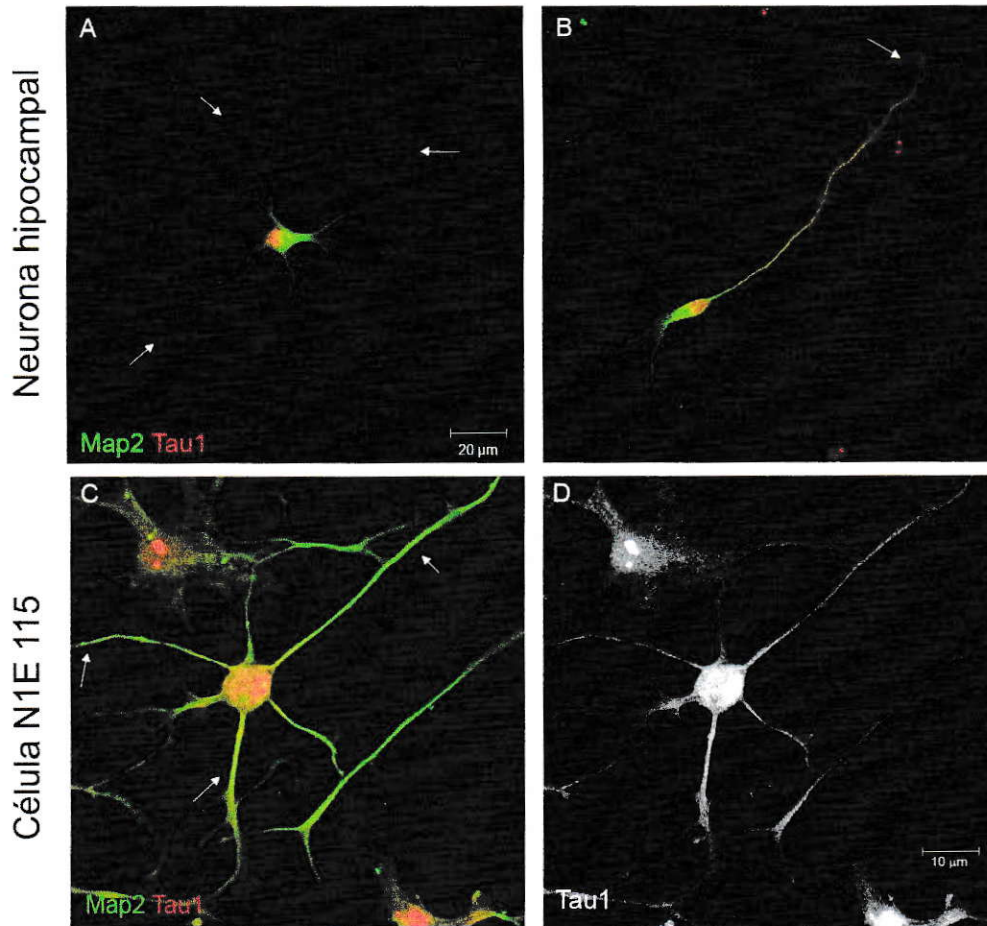


Figura 25: Paralelo entre la diferenciación de neuronas y del neuroblastoma N1E 115. Arriba se muestra la morfología de una neurona en estadio 2 (A) y en estadio 3 (B). La tinción en verde corresponde a la proteína somatodendrítica MAP2, mientras que la tinción roja equivale a tau desfosforilado (tau1), que se encuentra en el soma y particularmente en el axón (B, flecha blanca). Las células N1E 115 diferenciadas (abajo) no presentan una polaridad celular, es decir, todas sus prolongaciones neuríticas son equivalentes a nivel bioquímico. De esta forma, se puede observar que los marcadores de dendritas y axón, MAP2 y tau1, se distribuyen de la misma manera a través de todas las neuritas, a pesar de que existe una ramificación más desarrollada que las demás. Las imágenes A y B fueron tomadas en el objetivo 40X (zoom digital), y las C y D fueron tomadas en el objetivo 63X.

8.- DISCUSIÓN

8.1 Establecimiento de un método eficiente para la diferenciación de la línea celular murina N1E 115.

Para el estudio de la diferenciación neuronal a partir de células de origen neuronal immortalizadas existen numerosos modelos, entre los que se incluyen las células PC12, N2A y las SH-SY5Y (Cosgaya *et al*, 1996; Muñoz *et al*, 2000; Messi *et al*, 2008). En esta parte del trabajo nos propusimos caracterizar exhaustivamente el modelo de diferenciación basado en la utilización del neuroblastoma de ratón N1E 115. Para ello, requeríamos de un método que generara una morfología celular con los atributos de una neurona diferenciada, es decir, con ramificaciones primarias y secundarias de longitudes varias veces mayor al diámetro celular. Segundo, que fuera un método que no afectara la sobrevivencia de las células, y con el que éstas se pudieran mantener en cultivo durante el mayor tiempo posible y pudieran madurar y diferenciarse completamente. Adicionalmente, se necesitó que la diferenciación fuera uniforme para la mayoría de las células, ya que los estudios se realizaron en base a las poblaciones totales de células encontradas en las placas de cultivo, por lo tanto, fue necesario que la diferenciación fuese lo más sincronizada posible, para que todas las células sean comparables entre sí a nivel bioquímico y morfológico.

Entre los métodos estudiados, el que generó en el neuroblastoma N1E 115 los rasgos morfológicos más similares a los de una neurona fue el DBcAMP. Este análogo del AMP cíclico es capaz de ingresar a la célula a través de la membrana plasmática, y activar las vías dependientes de cAMP, entre las que se cuenta la vía de las MAPK (proteínas quinasas asociadas a mitógenos, Deng *et al*, 2001) y la de PKA (Liang *et al*, 2007), las cuales son capaces de controlar río abajo la transcripción genética y la regulación del citoesqueleto, procesos que son fundamentales para la diferenciación neuronal. Adicionalmente, el DBcAMP dio los mejores patrones de diferenciación, basados en la longitud de las neuritas de las células, así como el porcentaje total de células diferenciadas (aquellas que poseen al menos una neurita de longitud superior a 2 diámetros celulares, aproximadamente 20 μm ; Figura 6), donde el DBcAMP fue capaz de generar una diferenciación del 82% de la población total al cabo de 5 días, siendo muy superior a los otros compuestos diferenciadores.

Los otros tratamientos, basados en la adición de ácido retinoico y DMSO al medio de cultivo, no fueron capaces de dar patrones deseables de diferenciación. Si bien el DMSO fue capaz de generar neuritas en las células, la eficiencia total de diferenciación de las células no resultó ser tan alta como la obtenida con el DBcAMP (Figura 6), sumado a que tenía un efecto letal para muchas de las células después de los 4 días de cultivo (basado en la observación al microscopio óptico). El ácido retinoico, el cual ha sido utilizado para diferenciar otras líneas celulares (Mao *et al.*, 2000), prácticamente no indujo diferenciación en esta línea celular (Figura 6). Por ello, el

DBcAMP fue el compuesto diferenciador de las células N1E 115 elegido para realizar este trabajo.

8.2.1 La diferenciación del neuroblastoma N1E 115 indujo cambios en los patrones del citoesqueleto.

Al realizar observaciones por medio de inmunocitoquímica, observamos diferencias morfológicas drásticas en las células N1E 115 diferenciadas respecto a las indiferenciadas. Adicionalmente a la formación de ramificaciones neuríticas primarias y secundarias, la tinción de faloidina permitió observar los microfilamentos de actina, distribuidos a través de toda la célula, dejando ver en la parte distal de las neuritas una concentración local de F-actina, similar a lo ocurrido en los conos de crecimiento neuronales (Gungabissoon y Bamburg, 2003). Sin embargo, también es posible ver en células diferenciadas una activa formación de filopodios y lamelipodios (Figura 7), en los cuales también existe un enriquecimiento de F-actina. Por otro lado, también se evidenció un aumento en la tirosinación de la α -tubulina hacia el extremo distal de las neuritas, modificación que permite el aumento de la dinámica de microtúbulos, que resulta fundamental para que las neuritas se puedan elongar (Witte *et al*, 2008).

Estas alteraciones ocurridas en la neuritogénesis del neuroblastoma N1E 115, permiten comparar a estas células diferenciadas con neuronas jóvenes en etapa 2 (o 2 ardua), porque si bien poseen el potencial de desarrollar el proceso de diferenciación

neuronal y poseer neuritas de tamaños considerables, son incapaces de emular la complejidad de los axones y las dendritas, ni de desarrollar estructuras características de neuronas maduras, como las espinas dendríticas. Este punto se discutirá en profundidad posteriormente.

8.2.2 Proteínas que regulan la polimerización de microtúbulos

Las MAPs se encuentran entre los factores moleculares claves para los cambios en la estructura del citoesqueleto durante la neuritogénesis neuronal, en lo referido a la estabilización de los microtúbulos que nacen desde el cuerpo celular y culminan en la punta de las neuritas, y en asociación a la dinamicidad que se requiere para los cambios de forma y el desarrollo de nuevas prolongaciones celulares (Witte *et al*, 2008). Al analizar los resultados obtenidos en este objetivo, es coherente asociar el aumento de las proteínas asociadas a microtúbulos con la necesidad de las células de modular y estabilizar los microtúbulos que se encuentran sosteniendo las prolongaciones en las células N1E 115 diferenciadas, como también ocurre en las neuronas. Existen cambios variables en la masa de las distintas MAPs. En neuronas, se pueden evidenciar funciones celulares con cierto grado de redundancia (Di Tella *et al*, 1996), mientras otros estudios apuntan a que la función de las MAPs puede resultar sinérgica (González-Billault *et al*, 2002). Sin embargo, es importante destacar que los niveles de expresión son distintos y característicos para las diferentes MAPs a nivel temporal y espacial. Es así como MAP1B es la primera MAP en expresarse durante el desarrollo del sistema nervioso, mientras que MAP1A lo hace posteriormente, en neuronas maduras (Goold y

Gordon-Weeks, 2001). Y mientras MAP1B se localiza a lo largo de toda la célula, MAP2 lo hace preferentemente en las dendritas (Halpain y Dehmelt, 2006). De esta forma, si bien se pueden asociar funciones en común, también existe una tendencia a la complementación entre las diferentes proteínas. Esto puede dar cuenta que mientras algunas MAPs poseen un rol importante para la iniciación del proceso de neuritogénesis, que desembocará posteriormente en el desarrollo de polaridad, otras puedan tener una función asociada a la mantención de la polaridad y la maduración terminal de las neuronas, más que a la iniciación misma del proceso.

Hemos analizado una serie de similitudes a nivel bioquímico y morfológico referente a lo ocurrido durante la diferenciación en las neuronas de hipocampo y las células N1E 115. Sin embargo, es necesario mencionar que aparentemente, no existe el mismo proceso de regulación temporal observado en neuronas, donde los aumentos de expresión son diferentes para las distintas MAPs (Riederer y Matus, 1985; resultados no mostrados), mientras que en las células N1E 115 todas las MAPs sufren aumentos significativos de masa y aproximadamente equivalentes (Figura 8).

En este punto, no sólo nos enfocamos en analizar las MAPs clásicas, sino que decidimos estudiar que ocurría durante la diferenciación de las células N1E 115 con un grupo de proteínas que se asocian a los microtúbulos, y que no caen en la categoría de las MAPs convencionales. Un hecho que resultó interesante fue que la proteína LIS1, que se ha descrito como una proteína capaz de unirse a microtúbulos, no presentó un cambio significativo durante la diferenciación, como las otras MAPs convencionales.

LIS1 es una proteína que posee varias funciones celulares, pero no hay evidencias de que participe directamente en el proceso de neuritogénesis (Bielas *et al*, 2004). Un resultado similar fue descrito en el neuroblastoma humano SH-SY5Y, donde se reportó una disminución de LIS1 cuando las células eran diferenciadas con ácido retinoico (Messi *et al*, 2008). En varios estudios se ha postulado que su función no se relaciona directamente con la diferenciación neuronal, sino más bien con la migración, proceso en el cual interactúa con otra proteína MAP, la doblecortina (Reiner *et al*, 2002; Messi *et al*, 2008). Llama la atención que, a diferencia de LIS1, la doblecortina, presenta un fuerte aumento en la diferenciación, debido a que la interacción de ambas proteínas permite modular la estabilidad de microtúbulos, por una suerte de competición por unirse a éstos (Gdalyahu *et al*, 2004). Es por ello que resultaría interesante profundizar este resultado, a fin de comprender los mecanismos que podrían modular la interacción cruzada entre ambas proteínas durante dos procesos diferentes, como lo son la neuritogénesis y la migración neuronal.

Otro de los candidatos que fue interesante de analizar es la proteína CRMP2. En el contexto de este estudio, demostramos que tanto en la diferenciación de las células N1E 115 como durante la polarización de las neuronas de hipocampo de rata, ocurre un aumento en su expresión (Wang L y Strittmatter S, 1996). La CRMP2 es una proteína que tiene un dominio de unión a heterodímeros de tubulina, y su función ha sido vinculada con un rol importante en polaridad, ya que su sobreexpresión es capaz de generar neuronas con múltiples axones (Inagaki *et al*, 2001), y su transfección en neuroblastomas es capaz de inducir el crecimiento de neuritas (Arimura *et al*, 2005). El

rol de esta proteína tiene que ver con el transporte de dímeros de tubulina hacia el extremo distal del axón, por medio de su interacción con la proteína kinesina1 (Kimura *et al*, 2005). De esta forma, su aumento va relacionado a un mayor desplazamiento de heterodímeros de tubulina para el crecimiento de los microtúbulos, desde el cuerpo celular hacia los conos de crecimiento de las neuritas (Arimura *et al*, 2005).

Finalmente, la última proteína asociada a microtúbulos estudiada en este trabajo fue la SCG10. Perteneciente a la familia de las *stathminas*, posee una función asociada al aumento de la dinamicidad de los microtúbulos, y su actividad se encuentra determinada por la fosforilación en 4 residuos de aminoácidos bien descritos (Antonsson *et al*, 1998). Si bien su participación durante la diferenciación neuronal está descrita (Morii *et al*, 2006), su función aún no es completamente clara. Estudios de esta proteína en células PC12 dieron cuenta de un aumento de su expresión dependiente de la diferenciación inducida por NGF, mientras que la diferenciación dependiente de DBcAMP no lo hizo (Stein *et al*, 1988). Esto podría indicar que el proceso de extensión de neuritas por sí mismo no es capaz de inducir un aumento en su expresión. A pesar que su rol fisiológico ya ha sido estudiado en varios trabajos en neuronas hipocampales (Morii *et al*, 2006; Grenningloh *et al*, 2004), los mecanismos que regulan su expresión resultan complejos e involucran mecanismos de control post-transcripcionales, que pueden ir asociados también a su correcta localización (Hannan *et al*, 1996). Finalmente, en neuronas de rata no se ve una disminución evidente de esta proteína antes de los 3 días de cultivo *in vitro*, a diferencia de lo que ocurre en las células N1E 115 diferenciadas (Figura 10; Di Paolo *et al*, 1997), aunque hay una leve baja en su masa. En

neuronas cultivadas sobre 14 días *in vitro*, se ha observado una fuerte disminución de su masa, así como también en el cerebro de ratones adultos, lo que indicaría que la expresión de esta proteína es abundante sólo durante el desarrollo del cerebro (Grenningloh *et al*, 2004; Di Paolo *et al*, 1997). Esta hipótesis está respaldada por un estudio que determinó que la SCG10 es proteolizada por la familia de las calpaínas, una vez que el citoesqueleto de microtúbulos adquiere una mayor estabilidad (Vega *et al*, 2006).

8.2.3 La diferenciación indujo cambios en los niveles y actividad de proteínas de señalización.

Los cambios asociados a la diferenciación neuronal deben ser explicados en un contexto de señalización intracelular. Por ello, en este punto decidimos investigar que ocurría con los niveles y la actividad de un conjunto de proteínas de señalización, cuyas funciones –de acuerdo a datos bibliográficos previos- podrían ser relevantes para facilitar la elongación de las neuritas en nuestro modelo de diferenciación neuronal. Entre estas proteínas, el complejo CDK5/p35 posee un rol esencial para el crecimiento de neuritas y la diferenciación neuronal. Su rol se basa principalmente en la fosforilación de proteínas moduladoras del citoesqueleto específicas de neuronas, y su ausencia en ratones genera la muerte perinatal y un desarrollo del cerebro aberrante (Ohshima *et al*, 1996). Sin embargo, entre los resultados obtenidos para la diferenciación en las células N1E 155 no se observó un cambio significativo en la expresión ni de la proteína quinasa CDK5 ni de su activador neuroespecífico p35 (Figura 11). En la literatura no se han

encontrado cambios evidentes en la expresión de CDK5 durante la diferenciación en neuronas (Yan y Ziff, 1995; Harada *et al.*, 2001), pero sí se han detectado cambios en su actividad durante la diferenciación dependiente de NGF en células PC12 y un aumento de p35 durante la polarización de neuronas de hipocampo de rata (datos no mostrados; Yan y Ziff, 1995). Los experimentos de interacción entre ambas proteínas demostraron que durante la diferenciación se favorece la formación del complejo CDK5-p35, sugiriendo de esta forma que aumentaría su actividad durante la neuritogénesis.

Por otro lado, se esperaba que la expresión de p35 aumentara frente a la activación de CDK5, y de esta forma, pudiera dar cuenta de la activación de la proteína CDK5. Se ha descrito que p35 aumenta rápidamente su expresión durante las primeras 48 horas después de la diferenciación, y posteriormente se reduce drásticamente a niveles basales en PC12 (Harada *et al.*, 2001). De esta forma, p35 podría ser una señal de diferenciación temprana, y cuando las células se encuentran diferenciadas, ésta podría ser encontrada ya en niveles normales. Adicionalmente, CDK5 también puede ser activado por la proteína p39, lo que puede dar cuenta de una suerte de redundancia entre las funciones de p35 y p39 (Ko *et al.*, 2001).

Otra quinasa relevante para la diferenciación es la JNK. Esta proteína se encuentra activa cuando está fosforilada, y su actividad es fundamental para el desarrollo del axón, pero no de las neuritas menores en neuronas primarias en cultivo (Mignorance Le-Meur, 2006). Además, se ha determinado que la JNK activa está exclusivamente enriquecida en la punta del axón emergente (Oliva *et al.*, 2006). Además, como esta

proteína se activa con la vía de señalización de las MAPKs, que a la vez se pueden activar por medio del AMP cíclico (Stork y Schmitt *et al*, 2002), se podría esperar cambios en la actividad de JNK durante la diferenciación, que le permitan regular la dinámica del citoesqueleto o la transcripción de proteínas, gracias a la fosforilación de la MAP1B y la activación de factores de transcripción como ATF-2 y ELK-1, (Oliva *et al*, 2006; Bogoyevitch y Kobe, 2006). Además, debido a que existen varios estudios donde se demuestra que si JNK está ausente o en su forma inactiva se inhibe el crecimiento neurítico (Oliva *et al*, 2006), se puede establecer que es fundamental para la diferenciación neuronal.

Por ello, proponemos que los cambios asociados a la actividad de estas dos proteínas de señalización pueden explicar en parte el fenotipo diferenciado de las células N1E 115. Es importante mencionar que ciertamente existe un repertorio amplio de proteínas de señalización. Y el uso de nuestro modelo de diferenciación servirá para caracterizar la participación de otras cascadas de señalización que contribuyan a la diferenciación neuronal.

8.2.4 Proteínas que regulan la polimerización de los microfilamentos de actina

Los cambios morfológicos que afectan la estabilidad y el ensamblaje del citoesqueleto modulan coordinadamente tanto a microtúbulos como a microfilamentos de actina. Y es por esto que decidimos analizar que ocurría con las proteínas que regulan las propiedades dinámicas de los microfilamentos de actina durante la diferenciación.

Determinamos que existe un fino control de la dinámica del citoesqueleto de actina, a través del aumento en la activación de las GTPasas rac1 y cdc42, mientras que la RhoA sufría una disminución en su actividad, pero también en su masa. Se ha descrito que rac1 y cdc42 son fundamentales para la formación de lamelipodios y filopodios, respectivamente, mientras que la RhoA activa es capaz de generar el colapso de las neuritas (Luo, 2000). Desde este punto de vista, podemos correlacionar el aumento de la actividad de estas 2 GTPasas con la abundante formación de lamelipodios y filopodios durante la diferenciación de las células N1E 115 (Figura 7), mientras que la disminución de la actividad de RhoA podría ser necesaria para llevar a cabo la diferenciación. Se ha determinado que rac1/cdc42 podrían inducir la degradación de RhoA por medio de la ubiquitina ligasa Smurf1 en las zonas de avance celular (Wang *et al*, 2003), mientras que al introducir un RNA que interfiere con la expresión de RhoA se desencadena el desarrollo de neuritas en las células PC12 (Fan *et al*, 2008). Adicionalmente, se determinó la activación y un aumento de los niveles de la quinasa pak1 como consecuencia de la activación de rac1, un hecho que se encuentra bien descrito. Esta activación en pak1 trae consecuencias a nivel de la dinámica del citoesqueleto, ya que desencadena una serie de rearrreglos en los microfilamentos de actina que resultan fundamentales para la elongación de las neuritas y la formación de los lamelipodios y los filopodios (Yang *et al.*, 1998).

Este proceso se encuentra modulado en gran parte por una proteína de unión a actina, la cofilina, que al ser fosforilada permiten el aumento de la dinámica y la formación de nuevos polímeros de actina (Sarmiere y Bamburg, 2004). Por medio del

uso de anticuerpos capaces de reconocer cofilina fosforilada y total, se pudo establecer una razón de fosforilación de cofilina respecto al total, durante la diferenciación neuronal de la línea N1E 115. El aumento en la fosforilación de cofilina fue notablemente significativo, corroborando que esta vía es muy importante para los cambios de morfología del citoesqueleto de actina que ocurren durante la diferenciación neuronal, y que es necesaria una fosforilación de actina para poder potenciar la formación de lamelipodios y filopodios.

Por otro lado, se analizó cómo se veía alterada la polimerización global de actina en toda la célula durante la diferenciación. Para ello, se realizó un ensayo in vitro de separación de la actina globular de la fibrilar, gracias a una ultracentrifugación a 100000g. El resultado nos revela que existe un importante aumento en la polimerización de actina, que resulta significativo al normalizar la actina fibrilar en la actina globular (Figura 18B). De esta forma, se puede destacar la relevancia que tiene la fosforilación de cofilina para permitir el crecimiento de nuevos polímeros de actina, que resultan fundamentales para generar la fuerza motriz para el futuro crecimiento de las neuritas (Da Silva y Dotti, 2002).

8.3 La diferenciación del neuroblastoma N1E 115 puede ser inducida por la modulación de la actividad de las calpaínas.

La diferenciación necesita que ciertos factores se enriquezcan en dominios específicos para que pueda proceder, y la acumulación de estos factores puede ocurrir

por transporte y/o retención selectiva en la mayoría de los casos. No obstante esto, también se hace necesario que otras tantas proteínas vean disminuida su actividad o su masa para que se lleve a cabo la diferenciación (Yan *et al*, 2006; Schwamborn *et al*, 2007). Dentro de este contexto, las calpaínas poseen un rol muy importante en la fisiología celular, siendo capaces de clivar específicamente numerosas proteínas que controlan el citoesqueleto neuronal. Ya se ha evidenciado que las calpaínas poseen un rol en la inhibición de la formación de ramificaciones en el segmento inicial de neuronas *in vitro* (Mignorance Le-Meur *et al*, 2008). En otros trabajos, se ha mencionado su papel en la diferenciación de células musculares, adipocitos y osteoblastos (Moyen *et al*, 2004; Patel y Lane, 1999; Murray *et al*, 1999), pero las calpaínas aún no se han asociado directamente con el proceso de diferenciación neuronal.

Por ello, inicialmente se analizó si las isoformas I y II de las calpaínas sufrían cambios de masa durante la diferenciación. En las células N1E 115 diferenciadas, se pudo evidenciar una disminución significativa de la masa de calpaína II, responsable de aproximadamente el 90% de la actividad calpaína total (Oshima *et al*, 1989), mientras que la isoforma I no presentó cambios significativos.

A continuación, para analizar si la disminución de la actividad de las calpaínas genera un cambio morfológico en las células indiferenciadas, se utilizó un inhibidor farmacológico, el ALLM, a diferentes concentraciones (0 a 40 μM , ver Materiales y Métodos). El resultado de la inhibición de las calpaínas generó células capaces de

extender largas neuritas en concentraciones desde los 10 μM , pero el efecto se vio más potenciado a 30 μM . La concentración de 40 μM afectó la supervivencia de la célula, y no fue capaz de generar mayores patrones de diferenciación que las células con una concentración de ALLM de 30 μM (ver Figura 20).

Debido a que la inhibición farmacológica de las calpaínas fue capaz de inducir la diferenciación de las células N1E 115 por sí misma, posteriormente quisimos analizar si el inhibidor endógeno de la actividad de las calpaínas, la calpastatina, experimentaba cambios de abundancia durante la diferenciación neuronal dependiente de dbcAMP . Sin embargo, contra lo esperado, se encontró una disminución de la calpastatina luego de 5 días de inducida la diferenciación. El estudio bioquímico a tiempos cortos de inducción de la diferenciación sugiere que su masa aumenta significativamente durante las primeras horas, y este aumento se podría correlacionar con cambios en la actividad de la calpaína 2.

Finalmente, se quiso analizar que ocurre con la proteína quinasa PKA, la cual se encuentra descrita que es capaz de modular la actividad de las calpaínas por medio de su fosforilación (Franco y Huttenlocher, 2005). Por ello, se analizó cómo variaba la actividad quinasa de PKA por medio de un western blot, gracias a un anticuerpo capaz de reconocer proteínas fosforiladas por PKA. El resultado fue un fuerte aumento de la actividad quinasa de la PKA luego de inducida la diferenciación mediada por DBcAMP . Este aumento en la actividad de PKA en respuesta a DBcAMP ha sido ampliamente

demostrado en la literatura y se estableció como nuestro modelo control (Siraha *et al*, 2002; Mignorance Le-Meur *et al*, 2008). Interesantemente, la inhibición de las calpaínas también indujo un aumento significativo de la actividad de PKA (Figura 21). Por esto, el aumento de la actividad de PKA puede resultar un hecho clave para desencadenar la diferenciación. Sin embargo, no se ha dilucidado en forma clara cómo la inhibición de las calpaínas podría generar un aumento de la actividad de la PKA. Se determinó que las calpaínas son capaces de clivar a la PKA e inactivarla (Liang *et al*, 2007), por ello, una explicación es que si las calpaínas están inhibidas, la degradación de PKA se podría minimizar.

Por último, vale la pena discutir que en este trabajo se muestra evidencia de que las calpaínas efectivamente poseen un rol en la diferenciación neuronal. Sin embargo, los mecanismos implicados no se encuentran bien definidos. Se demostró que el ALLM desencadena un aumento en la actividad de PKA al igual que el DBcAMP, sin embargo, la morfología que presentan las células con cada uno de estos tratamientos difiere bastante: para el caso del tratamiento con DBcAMP, las células son capaces de extender muchas prolongaciones de mediana longitud, comparadas con las largas neuritas generadas por el tratamiento basado en ALLM, donde se observó que la gran mayoría de las células tenía sólo 2 prolongaciones (similar a una neurona bipolar). Esta diferencia en la morfología generada por ambos compuestos y nuestros resultados dan cuenta de que podrían existir vías de señalización que no son completamente comunes en ambos procesos, y es un tema que debe estudiarse mucho más a fondo, para entender los

mecanismos que permiten que la sola inhibición de las calpaínas sea capaz de desencadenar la neuritogénesis de esta línea celular.

8.4 El neuroblastoma N1E 115 es un buen modelo para hacer estudios de pérdida o ganancia de función.

Debido a que las neuronas son células que poseen una muy baja eficiencia de transfección de DNA y de RNA de interferencia con los distintos métodos existentes, las líneas celulares suelen ser de utilidad para realizar estudios de ganancia y pérdida de función. Para ello, la línea celular N1E 115, que es capaz de expresar las proteínas específicas del sistema nervioso central, puede resultar una herramienta de utilidad para llevar a cabo este tipo de experimentos. Procedimos a analizar en nuestro modelo el efecto de la transfección de plasmidios codificantes para 2 proteínas moduladoras de la polimerización de microtúbulos: la CRMP-2, cuya actividad permite el desplazamiento de los heterodímeros de α y β tubulina hacia el extremo más de los microtúbulos, y la proteína desestabilizadora de microtúbulos, SCG10, que contribuye a la regulación de la estabilidad dinámica de éstos en el extremo más.

La morfología de las células transfectadas con la CRMP2 silvestre resultó ser similar a la de una célula diferenciada, con la extensión de cortas prolongaciones 24 horas post- transfección, mientras que a las 36 horas se observaron neuritas de longitudes superiores a 25 μm (Figura 22). Este resultado es similar a aquel obtenido en

neuronas, donde la sobreexpresión de CRMP-2 desencadena la aparición de neuronas multiaxónicas, con una pérdida de la polaridad (Inagaki *et al*, 2001).

En el caso de la SCG10, se utilizaron variantes con mutaciones puntuales que activan o inactivan a la proteína, en conjunto con GFP, un método eficiente que asegura una cotransfección cercana al 95% de las células (Dandekara *et al*, 2005). Los resultados obtenidos para este experimento pueden ser algo contradictorios. Por un lado, la sobreexpresión de SCG10 fue capaz de inducir el desarrollo de neuritas en las células, debido a que podría contribuir al aumento de la dinámica de microtúbulos que es necesaria para el inicio de la neuritogénesis. Sin embargo, si bien estas prolongaciones resultaron ser abundantes, resultaron de longitudes que no superaron los 30 μm , longitud muy inferior a las encontradas en células completamente diferenciadas con DBcAMP. Se podría pensar que la SCG10 es importante a la hora de la generación de las neuritas, sin embargo, es necesaria una pérdida de actividad posterior para que dichas neuritas se extiendan.

El plasmidio que también generó un efecto morfológico significativo en las células N1E 115 resultó ser la dominante negativa SCG10-4D (S50D, S62D, S73D y S97D), la cual emula a la proteína SCG10 completamente fosforilada, que representa su estado de menor actividad. Esta mutante fue capaz de inducir el desarrollo de una menor cantidad de neuritas que la sobreexpresión de la proteína silvestre, pero fue capaz de inducir neuritas más largas. Se ha descrito que una dominante negativa de SCG10 (S62D

y S73D) es capaz de generar axones más largos en neuronas, debido a que los microtúbulos adquieren una mayor estabilidad (Tataruk *et al*, 2006).

En vista de los resultados obtenidos gracias a la transfección de las mutantes de SCG10, combinados a los experimentos con células N1E 115 diferenciadas, se puede apreciar que la proteína SCG10 posee un rol dinamizante de microtúbulos, que podría ser clave para el inicio de la neuritogénesis, generando los dímeros de α y β tubulina necesarios para fomentar la polimerización de los microtúbulos que permitan una consolidación en la neuritas nacientes (Manna *et al*, 2007). Una vez definida una neurita, la SCG10 podría perder relevancia, dando cuenta de una disminución de su actividad una vez que las células ya se encuentran diferenciadas (Di Paolo *et al*, 1997). Cabe destacar que también existe la stathmina, una proteína homóloga de la SCG10, que también tiene un efecto despolimerizante de los microtúbulos, aunque esta se expresa en todos los tipos celulares (Grenningloh *et al*, 2004). Por ello, ambas podrían estar regulando y complementando su función en células neuronales.

8.5 Comparación de las células de neuroblastoma N1E 115 diferenciadas y las neuronas primarias en cultivo.

Finalmente, decidimos investigar si los cambios asociados a la diferenciación de las células en el modelo de neuroblastoma N1E 115, poseía un correlato con los cambios

encontrados en neuronas primarias en cultivo. Por un lado, se evidenció un aumento de la masa de las proteínas asociadas a microtúbulos MAP1B, MAP2 y tau en ambos modelos. Sin embargo, la proteína MAP1A, que aumenta significativamente sus niveles en las células N1E 115 diferenciadas, no varió su nivel de expresión durante los primeros 3 días en neuronas cultivadas *in vitro*, equivalente al período en que se genera el desarrollo de polaridad en las neuronas hipocampales de rata (Dotti *et al*, 1988). Esto se puede deber a que existen diferencias temporales en la expresión de las proteínas MAPs. Se ha descrito que MAP1B es la primera proteína MAP en expresarse durante el desarrollo, mientras MAP1A lo hace preferentemente cuando las neuronas se encuentran maduras (Halpain y Dehmelt, 2006). Por otro lado, se encuentra una similitud referente a las 2 quinasas que se analizaron en este trabajo y que resultan claves para la modulación de las MAPs en las células N1E 115 diferenciadas y en neuronas polarizadas: por un lado, existe un aumento en la masa de JNK1 y 2, las cuales se encuentran río debajo de la cascada de señalización dependiente de MAPK, mientras que CDK5 se encontraría más activa, debido a que existe un aumento en la masa de su activador neuroespecífico, p35 (Smith *et al*, 2001). En tanto, otra proteína, como la CRMP2, también tiene un aumento en su masa similar a lo ocurrido en el neuroblastoma N1E 115 diferenciado, mientras que no se aprecia una disminución evidente en SCG10, a pesar de que existe una baja en su masa.

Por otro lado, al hacer un paralelo respecto a las proteínas moduladoras de actina de la vía de LIMK/ cofilina, también se pueden apreciar resultados bastante coherentes entre lo ocurrido durante la diferenciación del neuroblastoma y la polarización neuronal.

Existe un aumento en la masa de la quinasa pak1 desde el día 2 en las neuronas *in vitro*, que se ajusta a los aumentos en la fosforilación de LIMK1 y cofilina, para posteriormente decaer al día 3. Esto podría dar cuenta de una fina modulación de los filamentos de actina, donde las fases de polimerización y despolimerización son capaces de regular la elongación de las neuritas, e incluso definir el axón (Bradke y Dotti, 2000).

Finalmente, si bien durante este trabajo se han establecido una serie de paralelos entre los procesos de extensión neurítica entre la línea celular N1E 115 y cultivos de neuronas de hipocampo *in vitro*, existe una diferencia que va más allá de la extensión de procesos: lograr que una célula pueda generar 2 compartimentos tan diferentes a nivel funcional y bioquímico como lo son los axones y las dendritas. En la Figura 25 se muestra cómo una neurona posee una compartimentalización bioquímica de 2 proteínas muy estudiadas: MAP2 y tau desfosforilada (reconocida por el anticuerpo tau1). Durante el estadio 2, poseen una morfología similar al de un neuroblastoma diferenciado, es decir, extiende varias neuritas y las proteínas MAP2 y tau se observan a través de toda la célula. Sin embargo, al entrar al estadio 3, la neurona determina su axón, y se observa que la señal para tau1 se concentra sólo en el soma y en el axón, mientras que la MAP2 se encuentra enriquecida en el compartimento somatodentrítico. Por otro lado, una célula N1E 115 diferenciada no es capaz de generar una identidad de dendrita o axón en sus neuritas, por lo que cada neurita es equivalente con cualquiera de las otras. De hecho, las proteínas marcadoras de dendritas (como MAP2) y las de axón (como tau desfosforilado o MAP1B fosforilado) se difunden a través de toda la célula (Figura 25), lo que impide que un neuroblastoma se pueda utilizar para el estudio de la polaridad neuronal. Sin

embargo, con toda la evidencia que se obtuvo en este trabajo, la línea celular N1E 115 es capaz de emular en forma similar el proceso de neuritogénesis neuronal, tanto bioquímica como morfológicamente, lo que hace a estas células comparables a neuronas jóvenes que no han desarrollado polaridad.

Por ello, se propone a esta línea celular como un modelo de gran competencia para el estudio de la diferenciación, siendo capaz de expresar las proteínas que son tejido- específicas de cerebro, desencadenar una serie de eventos morfológicos y bioquímicos similares a aquellos que ocurren durante la diferenciación de una neurona en cultivo, y que es un gran modelo para estudios de ganancia y pérdida de función, debido a su facilidad para la manipulación genética, a diferencia de lo que ocurre con las neuronas. Finalmente, es ideal para estudios de alto rendimiento, ya que como se encuentra en constante división, se puede conseguir una gran cantidad de células en poco tiempo.

9.- CONCLUSIONES

1. El DBcAMP es un método efectivo para diferenciar la línea celular N1E 115 hacia una morfología de tipo neurona. Estas células desarrollaron neuritas con longitudes varias veces superiores respecto al diámetro celular, y se estima que el 82% de las células en cultivo se diferenció.
2. Por medio de Inmunocitoquímica, se analizó los cambios producidos durante la diferenciación neuronal mediante dbcAMP modifica el citoesqueleto de tubulina y actina. Se aprecian estructuras características de cultivos neuronales diferenciados, como prolongaciones neuríticas primarias y secundarias, la formación de conos de crecimiento y el aumento de la dinámica de microtúbulos en la parte distal de las neuritas.
3. Se pudo comprobar que muchas de las proteínas reguladoras de microtúbulos sufren cambios en la masa durante la diferenciación neuronal. De esta forma, las proteínas estabilizadoras de microtúbulos aumentaron su expresión, mientras que la proteína desestabilizadora de microtúbulos, SCG10, disminuye su masa. A partir de ello, se infiere que en neuronas diferenciadas debe existir una

estabilización de los microtúbulos que permita la mantención de la morfología neuronal, una vez que éstas se encuentran maduras.

4. Durante la diferenciación neuronal de las células N1E 115, también existe una activación de varias vías de señalización. De esta forma, se observó un aumento en la actividad de quinasas como CDK5, JNK y PKA, la activación de GTPasas como rac1 y cdc42, y la inactivación de RhoA. Estas vías resultan de alta relevancia para el control de la dinámica de los microtúbulos y los filamentos de actina.
5. Se evidenció un aumento en la polimerización de filamentos de actina durante la diferenciación. Esto se puede correlacionar con el aumento en la fosforilación de cofilina y la activación de las GTPasas rac1 y cdc42, que inducen la polimerización de los filamentos de actina.
6. Se demostró que no sólo los aumentos de la expresión de proteínas permiten desencadenar el proceso de diferenciación. Se determinó que la familia de proteasas activadas por calcio, las calpaínas, tienen un papel fundamental para la neuritogénesis, y que se requiere una disminución de su actividad para llevar a cabo la diferenciación. Además, se demostró que la inhibición farmacológica de las calpaínas corresponde a un método alternativo para generar la diferenciación del neuroblastoma N1E 115.

7. Se demostró que la línea celular N1E 115 constituye un modelo útil para realizar transfecciones, ya que permite obtener eficiencias de transfección cercanas al 50%. La sobreexpresión de la CRMP-2 y la SCG10 generaron morfologías que se pueden correlacionar a aquellas que fueron obtenidas en cultivos primarios de neuronas.

8. Se comparó los procesos de diferenciación neuronal en las células N1E 115 con el desarrollo de polaridad de neuronas de hipocampo de rata. Se observó una serie de diferencias, como el aumento de la expresión de las proteínas MAPs, y la activación de las vías de señalización de CDK5 y JNK. Sin embargo, una gran diferencia entre ambos procesos es que los neuroblastomas diferenciados no poseen la polaridad bioquímica y funcional alcanzada por las neuronas, por lo que constituye un modelo simplificado de la neuritogénesis.

9.-REFERENCIAS

- Abemayor E y Sidell N (1989). Human neuroblastoma cell lines as models for in vitro study of neoplastic and neuronal differentiation. *Env Health Perspectives* 80: 3-15.
- Amano T, Richelson E y Nirenberg N (1972). Neurotransmitter synthesis by neuroblastoma clones. *PNAS* 69: 258-263.
- Antonsson B, Kassel D, Di Paolo G, Lutjens R, Riederer B y Grenningloh G (1998). Identification of in Vitro Phosphorylation Sites in the Growth Cone Protein SCG10. *J. Bio. Chem.* 273:8439-8446.
- Arber S, Barbayannis F, Hanser H, Schneider C, Stanyon C, Bernard O y Caroni P (1998). Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* 393: 805-809.
- Arimura N, Ménager C, Fukata Y y Kaibuchi K (2004). Role of CRMP-2 in Neuronal Polarity. *J. Neurobiol.* 58: 34-47.
- Arimura N y Kaibuchi K (2007). Molecular mechanisms regulating neuronal polarity via phosphorylation signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* 3:194-205
- Banker G, Cowan M(1977). Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res.* 126: 397-442.
- Binder, L.I., Frankfurter, A. and Rebhun L.I. (1985). The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J. Cell Biol.* 101:1371- 1378.
- Bogoyevitch M y Kobe B (2006). Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. *Microbiol and Mol Biol Reviews* 70: 1061-1095.

Bradford M (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–254.

Bradke F y Dotti C (1999). The Role of Local Actin Instability in Axon. *Science* 283: 1931-1934.

Briançon-Marjollet A, Ghogha A, Nawabi H, Triki I, Auziol C, Fromont S, Piché C, Enslin H, Chebli K, Cloutier J, Castellani V, Debant A y Lamarche-Vane N (2008). Trio mediates Netrin-1-induced Rac1 activation in axon outgrowth and guidance. *Mol and Cell Biol*28: 2314-2323.

Caspi M, Atlas R, Kantor A, Sapir T y Reiner O (2000). Interaction between LIS1 and DCX, two lissencephaly gene products. *Human Molecular Genetics* 9: 2205-2213.

Clejan S, Dotson R, Wolf E y Corb M (1996). Morphological differentiation of N1E-115 neuroblastoma cells by dimethyl sulfoxide activation of lipid second messengers. *Experimental Cell Research* 1:16-27.

Conde C y Cáceres A (2009). Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci.* 10: 319-32.

Cosgaya JM, Garcia-Villalba P, Perona R y Aranda A (1996). Comparison of the Effects of Retinoic Acid and Nerve Growth Factor on PC12 Cell Proliferation, Differentiation, and Gene Expression. *J. Neurochem.* 66: 89-98.

Craig A y Banker G (1994). Neuronal Polarity. *Annual Review of Neuroscience* 17: 267-310.

Da Silva J y Dotti C (2002). Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuriteogenesis. *Nat Rev Neurosci* 3: 694-704.

Dandekara D, Kumarb M, Ladhab J, Ganesh K y Mitra D (2005). A quantitative method for normalization of transfection efficiency using enhanced green fluorescent protein. *Analytical Biochem*342: 341-344.

- Dehmelt L y Halpain S (2005). The MAP2/tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biology* 6: 240-249.
- Deng W, Obrocka M, Fischer I y Prockop, D (2001). In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Bioch. and Biophys. Res. Comm.* 282: 148-152.
- Di Paolo G, Lutjens R, Osan-Sand A, Sobel A, Catsicas S y Grenningloh G (1997). Differential distribution of stathmina y SCG10 in developing neurons in culture. *J of Neurosci Res* 50: 1000-1009.
- Di Tella M, Feiguin F, Carri N, Kosik K y Cáceres A (1996). MAP-1B/TAU functional redundancy during laminin-enhanced axonal growth. *J. Cell Sci.* 109:467-477.
- Dotti C, Sullivan C y Banker G (1988). The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J of Neurosci.* 8: 1454-1468.
- Edwards D, Sanders L, Bokoch G y Gill G (1999). Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nature Cell Biol* 1: 253-259.
- Etienne-Manneville S y Hall A (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420: 629-635.
- Fan Y, Pang C, Harvey A, Cui Q (2008). Marked effect of RhoA-specific shRNA-producing plasmids on neurite growth in PC12 cells. *Neuroscience letter* 440: 170-175.
- Foletti D, Prekeris R y Scheller, R (1999). Generation maintenance of neuronal polarity: mechanisms of transport and targeting. *Neuron* 23: 641-644.
- Franco S y Huttenlocher A (2005). Regulation cell migration: calpains make the cut. *J of Cell Sci* 118: 3829-3838.
- Fukata Y, Itoh T, Kimura T, Ménager C, Nishimura T, Shiromizu T, Watanabe H, Inagaki N, Iwamatsu A, Hotani H y Kaibuchi K (2002). CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nature Cell Biology* 4:108-115.

Garvalov B, Flynn K, Neukirchen D, Meyn L, Teusch N, Wu X, Brakebusch C, Bamberg J y Bradke F (2007). Cdc42 regulates cofilin during the establishment of neuronal polarity. *J of Neurosci* 27:13117-13129.

Gdalyahu A, Ghosh I, Levy T, Sapir T, Sapoznik S, Fishler Y, Azoulai D y Reiner O (2004). DCX, a new mediator of the JNK pathway. *The EMBO Journal* 23: 823–832.

Glesson J, Allen K, Fox J, Lamperti E, Berkovic S, Scheffer I, Cooper E, Dobyns W, Minnerath S, Ross M y Walsh C (1998). Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. *Cell* 92:63–72.

González-Billault C, Engelke M, Jiménez-Mateos E, Wandosell F, Cáceres A y Ávila J (2002). Participation of structural microtubule-associated proteins (MAPs) in the development of neuronal polarity. *J. of Neurosci. Res.* 67:713–719.

González-Billault C, Jiménez-Mateos E, Cáceres A, Díaz-Nido J, Wandosell F y Ávila J (2004). Microtubule-Associated Protein 1B Function during Normal Development, Regeneration, and Pathological Conditions in the Nervous System. *J. Neurobiol.* 58:48-59.

Greene L y Tischler A (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73: 2424-2428.

Grenningloh G, Soehrman S, Bondallaz P, Ruchti E y Cadas H (2004). Role of the microtubule destabilizing proteins SCG10 and stathmin in neuronal growth. *J. Neurobiol* 58:60-69.

Gungabissoon R y Bamberg J (2003). Regulation of growth cone actin dynamics by ADF/cofilin. *J of Histochem and Cytochem* 51: 411-420.

Halpain S y Dehmelt L (2006). The MAP1 family of microtubule-associated proteins. *Genome Biology* 7:224-232.

Hannan A, Henke R, Weinberger R, Sentry J y Jeffrey P (1996). Differential induction and intracellular localization of SCG10 messenger RNA is associated with neuronal differentiation. *Neuroscience* 72:889-900.

Harada T, Morooka T, Ogawa S y Nishida E (2001). ERK induces p35, a neuron-specific activator of Cdk5, through induction of Egr1. *Nat Cell Biol* 3: 453-459.

Hayashi K, Ohshima T y Mikoshiba K (2002). Pak1 is involved in dendrite initiation as a downstream effector of rac1 in cortical neurons. *Mol. and Cell Neurosc* 20: 579-594.

Horton A y Ehlers M (2003). Neuronal Polarity and Trafficking. *Neuron* 40: 277-295.

Huang E y Reichardt L (2003). Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu. Rev. Biochem* 72: 609-642.

Inagaki N, Chihara K, Arimura N, Ménager C, Kawano Y, Matsuo N, Nishimura T, Amano M y Kaibuchi K (2001). CRMP-2 induces axons in cultured hippocampal neurons. *Nature Neuroscience* 4:781-782.

Jacobs T, Causeret F, Nishimura Y, Terao M, Norman A, Hoshino M y Nikolic M (2007). Localized activation of pak controls neuronal polarity and morphology. *J of Neurosci* 27: 8604-8615.

Jenkins A, Franks P y Lieb W (1996). Actions of general anaesthetics on 5-HT₃ receptors in N1E-115 neuroblastoma cells. *J. Pharmacol.* 117: 1507-1515.

Kimura T, Watanabe H, Iwamatsu A y Kaibuchi K (2005). Tubulin and CRMP-2 complex is transported via Kinesin-1. *J. Neurochem.* 93:1371-1382.

Ko J, Humbert S, Bronson R, Takahashi S, Kulkarni A, Li E y Tsai L (2001). p35 and p39 are essential for cyclin-dependent kinase 5 function during neurodevelopment. *J. Neurosci.* 21: 6758-6771.

Kobayashi M, Nagata S, Kita Y, Nakatsu N, Ihara S, Kaibuchi K, Kuroda S, Ui M, Iba H, Konishi H, Kikkawa U, Saitoh U y Fukui Y (1997). Expression of a constitutively active phosphatidylinositol 3-kinase induces process formation in rat PC12 cells. *JBC* 272: 16089-16092.

Kruman I, Kostenko M, Gordon R, Popov V y Umansky R (1993) Differentiation and apoptosis of murine neuroblastoma cells N1E 115. *Biochem. and Biophys. Res.* 191: 1309-1318.

Kunda P, Paglini G, Quiroga S, Kosik K y Cáceres A (2001). Evidence for the involvement of *tiam1* in axon formation. *J of Neurosci* 21:2361–2372.

Lane J, Martin T, Mansel R y Jiang W (2008). The expression and prognostic value of the guanine nucleotide exchange factors (GEFs) Trio, Vav1 and TIAM-1 in human breast cancer. *Int Semin Surg Oncol.* 5: 23-29.

Liang Z, Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K y Gong C (2007). Down-regulation of cAMP-dependent protein kinase by over-activated calpain in Alzheimer disease brain. *J of Neurochem* 103: 2462-2470.

Lowery L y Van Vactor D (2009). The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10:332-343.

Luo L. (2002). Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18:601–635.

Ma X, Johnson R, Mains R y Eipper B (2001). Expression of kalirin, a neuronal GDP/GTP exchange factor of the trio family, in the central nervous system of the adult Rat. *J Comp Neurol.* 429: 388–402.

Manna T, Grenningloh G, Miller H y Wilson L (2007). Stathmin family protein SCG10 differentially regulates the plus and minus end dynamics of microtubules at steady state in vitro: implications for its role in neurite outgrowth. *Biochem* 46: 3543-3552.

Messi E, Florian M, Caccia C, Zanisi M y Maggi R. (2008). Retinoic acid reduces human neuroblastoma cell migration and invasiveness: effects on DCX, LIS1, neurofilaments-68 and vimentin expression. *Biomed Central Cancer* 8: 30-42.

Mingorance-Le Meur A (2006). JNK gives axons a second chance. *J of Neurosci* 26: 12104-12105.

Mingorance-Le Meur A y O'Connor T (2008). Neurite consolidation is an active process requiring constant repression of protrusive activity. *EMBO J* 28: 248-260.

Mitchison T y Kirschner M (1988). Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* 1:761-772.

Mitsuharu E, Kazumasa O y Kensaku M (2007). LIM Kinase and Slingshot are critical for neurite extension. *J. Biol. Chem.* 282: 13692–13702.

Morii H., Shiraishi-Yamaguchi Y. y Mori N. (2006). SCG10, a microtubule destabilizing factor, stimulates the neurite outgrowth by modulating microtubule dynamics in rat hippocampal primary cultured neurons. *J. Neurobiol.* 66: 1101–1114.

Moyen C, Goudenege S, Poussard S, Sassi A, Brustis J y Cottin P (2004). Involvement of microcalpain (CAPN 1) in muscle cell differentiation. *The Int J of Biochem and Cell Biol* 36: 728–743.

Muñoz J, Álvarez A y Maccioni R (2000). Increase in the expression of the neuronal cyclin-dependent protein kinase cdk-5 during differentiation of N2A neuroblastoma cells. *Neuroreport* 11:2733-2738.

Murray S, Grisanti M, Bentley G, Kahn A, Urist M y Brochmann-Murray (1997). The Calpain-Calpastatin System and Cellular Proliferation and Differentiation in Rodent Osteoblastic Cells. *Experimental Cell Research* 233: 297-309.

Nakata T y Hirokawa N (2007). Neuronal Polarity and the Kinesin Superfamily Proteins. *Science* 372: 6-12.

Newsome T, Schmidt S, Dietzl G, Keleman K, Asling B, Debant A y Dickson B (2000) Trio combines with dock to regulate Pak activity during photoreceptor axon pathfinding in *Drosophila*. *Cell* 101: 283–294.

Nikolic M, Chou M, Lu W, Mayer B y Tsai L (1998). The p35/Cdk5 kinase is a neuron specific Rac effector that inhibits Pak1 activity. *Nature* 395: 194-198.

Nikolic M (2002). The role of GTPases and associated kinases in regulating neurite outgrowth. *Int J Biochem Cell Biol.* 7:731-745.

Oh J, Karlmark Raja K, Shin J, Pollak A, Hengstscha M y Lubec G (2006) Cytoskeleton changes following differentiation of N1E-115 neuroblastoma cell line. *Aminoacids* 31: 289–298

Oliva A, Atkins C, Copenagle L y Banker G (2006). Activated JNK is required for axon formation. *J Neurosci* 26: 9462-9470.

Oshima M, Koizumi S, Fujita K y Guroff G (1989). Nerve Growth Factor- induced decrease in the calpain activity of PC12 cells. *J of Biol Chem* 264: 20811-20816.

Pak C, Flynn K y Bamburg J (2008). Actin binding proteins take the reins in growth cones. *Nat Neurisci Rev* 9: 136-147.

Patel Y y Lane D (1999). Role of calpain in adipocyte differentiation. *PNAS* 96: 1279–1284.

Pichet J y Ciccarone V (2000). Transfection of Mammalian Cells in 96-Well Plates with Lipofectamine 2000 Reagent. *Focus* 21: 58-68.

Pigino G, Paglini G, Ulloa L, Ávila J y Cáceres A (1997). Analysis of the expression, distribution and function of cyclin dependent kinase 5 in developing cerebellar macroneurons. *J Cell Sci* 110, 257-270.

Reiner O, Cahana A, Escamez T y Martinez S(2002). Lis1- No more no less. *Mol Psychiatry.* 7:12-16.

Riederer B y Matus A (1985). Differential expresión of disctint microtubule- associated proteins during brain development. PNAS 82, 6006-6009.

Ruthel G y Banker G (1998). Actin- dependent anterograde movement of growth-cone like structures along growing hippocampal axons: a novel form of axonal transport? Cell Mot and Cytoskeleton 40: 160-173.

Shiraha H, Glading A, Chou J, Jia Z y Wells A (2002). Activation of calpain II by epidermal growth factor is limited by PKA phosphorylation of calpain II. Mol Cell Biol 22: 2716-2727.

Shmueli O, Gdalyahu A, Sorokina K, Nevo E, Avivi A y Reiner O (2001). DCX in PC12 cells: CREB- mediated transcription and neurite outgrowth. Human Molecular Genetics 10: 1061-1070.

Sánchez S, Jiménez C, Carrera A, Díaz-Nido J, Ávila J y Wandosell F (2004). A cAMP activated pathway, including PKA and PI3K, regulates neuronal differentiation. Neurochem. Internat. 44: 231-242.

Sapir T, Cahana A, Seger R, Nekhai S y Reiner O (1999). LIS1 is a microtubule-associated phosphoprotein. Eur. J. Biochem. 265: 181-188.

Sarmiere P y Bamburg R (2004). Regulation of the neuronal actin cytoskeleton by ADF/cofilin. J. Neurobiol. 58: 103-117, 2004

Sarner S, Kozma R, Ahmed S y Lim L (2000). Phosphatidylinositol 3-kinase, cdc42, and rac1 act downstream of ras in integrin-dependent neurite outgrowth in N1E-115 neuroblastoma cell. Mol. Cell Biol. 20:158-172.

Satoh T, Nakamura S, Taga T, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T y Kaziro Y (1988) Induction of neuronal differentiation in PC12 cells by b-cell stimulatory factor 2/interleukin 6. Mol. Cell Biol. 8: 3546-3549.

Schwamborn J, Muller M, Becker A y Puschel A (2007). Ubiquitination of the GTPase Rap1B by the ubiquitin ligase Smurf2 is required for the establishment of neuronal polarity. *The EMBO Journal* 26: 1410–1422.

Smith C, Andertona B, Davis R y Gallob J (1995). Tau isoform expression and phosphorylation state during differentiation of cultured neuronal cells. *Fed. Europ. Biochem. Soc. Letters* 375: 243-248.

Smith D, Greer P y Tsai L (2001). Cdk5 on the brain. *Cell growth and differentiation* 12: 277-283.

Stanyon C y Bernard O (1999). LIM kinase 1. *Int J Biochem Cell Biol.* 31:389-94.

Stork P y Schmitt J (2002). Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends in Cell Biol* 12: 258-266.

Tanaka E y Sabry J (1995) Making the Connection: Cytoskeletal Rearrangements during Growth Cone Guidance. *Cell* 83: 171-176.

Tataruk T, Ostman N, Li W, Björkblom B, Padzik A, Zdrojewska J, Hongisto V, Herdegen T, Konopka W, Courtney M y Coffey E (2006). JNK1 phosphorylation of SCG10 determines microtubule dynamics and axodendritic length. *J Cell Biol* 173: 265-277.

Tojima T e Ito E (2004). Signal transduction cascades underlying de novo protein síntesis required for neuronal morphogenesis in differentiating neurons. *Progress in Neurobiology* 72: 183–193.

Toriyama M, Shimada T, Kim K, Mitsuba M, Nomura E, Katsuta K, Sakumura Y, Roepstorff P y Inagaki N (2006). Shootin1: a protein involved in the organization of an asymmetric signal for neuronal polarization. *J Cell Biol* 175: 147-157.

Ulloa L, Díez-Guerra F, Ávila J y Díaz-Nido J (1994). Localization of differentially phosphorylated isoforms of microtubule-associated protein 1B in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci* 61: 211-223.

Vallee R (1990). Molecular characterization of high molecular weight microtubule associated proteins: some answers, many questions. *Cell Motil. Cytoskeleton* 15: 204-209.

Van Troys M, Huyck L, Leyman S, Dhaese S, Vandekerckhove J y Ampe C (2008). Ins and outs of ADF/cofilin activity and regulation. *Eur. J. Cell Biol.* 87: 649-667.

Vega I, Hamano T, Propost J, Grenningloh G y Yen S (2006). Taxol and tau overexpression induced calpain-dependent degradation of the microtubule-destabilizing protein SCG10. *Experimental Neurology* 202: 152-160.

Wang H, Zhang Y, Ozdamar B, Ogunjimi A, Alexandrova E, Thomsen G y Wrana J (2003). Regulation of cell polarity and protrusion formation by targeting RhoA for degradation. *Science* 302, 1775-1779.

Wang L y Strittmatter S (1996). A family of rat CRMP genes is differentially expressed in the nervous system. *J of Neurosci* 16: 6197-6207.

Watabe-Uchida M, Govek E y Van Aelst L (2006). Regulators of Rho GTPases in neuronal development. *J of Neurosci* 26: 10633-10635.

Witte H, Neurkirchen D y Bradke F (2008). Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. *J Cell Biol.* 180: 619-632.

Yan D, Guo L y Wang Y (2006). Requirement of dendritic Akt degradation by the ubiquit-proteosoma system for neuronal polarity. *J of Cell Biol* 174: 415-424.

Yan G y Ziff, E (1995). NGF regulates the PC12 cell cycle machinery through specific inhibition of the Cdk kinases and induction of cyclin D1. *J Neurosci* 15: 6200-6212.

Yang N, Higushi O, Ohashi K, Nagata K, Wada A, Kangawa K, Nishida E y Mizuno K (1998). Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature* 393: 809-812.

Yang J y Widmann C (2001). Antiapoptotic Signaling Generated by Caspase-Induced Cleavage of RasGAP. *Mol Cell Biol* 16:5346-5358.

Yakubchik Y, Abramovici H, Maillet J, Daher E, Obagi C, Parks R, Topham M y Gee S (2005). Regulation of neurite outgrowth in N1E-115 cells through PDZ-mediated recruitment of diacylglycerol kinase. *Mol and Cell Biol* 25: 7289-7302.