

UCH-FC
Biotecnología
R173
C1

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS



MODIFICACIONES POST TRADUCCIONALES DE CDK5
Y SUS EFECTOS EN LA VIABILIDAD NEURONAL

OMAR ALEJANDRO RAMÍREZ GONZÁLEZ

2009

ESCUELA DE PREGRADO-FACULTAD DE CIENCIAS-UNIVERSIDAD DE CHILE



**MODIFICACIONES POST TRADUCCIONALES DE CDK5 Y SUS EFECTOS EN LA
VIABILIDAD NEURONAL**

**Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial
de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular**

OMAR ALEJANDRO RAMÍREZ GONZÁLEZ

Dr. Ricardo B. Maccioni

Director Seminario de Título

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

Comisión de Evaluación Seminario de Título

Dra. María Rosa Bono

Presidente Comisión

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

Dr. Alejandro Roth Metcalfe

Corrector

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

Santiago de Chile, 1 de Julio de 2009

**MEMORIA DE TÍTULO CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA
MOLECULAR**

Omar Alejandro Ramírez González

Director de Memoria: Dr. Ricardo Maccioni

Esta memoria se realizó en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, ubicado en Las Palmeras 3425, comuna de Ñuñoa, Santiago, Chile.

Teléfono: (02)9787828; Fax: (02)9787224

E-mail Alumno: ojanor@gmail.com

E-mail Director de Memoria: rmaccion@uchile.cl

Biografía

Nací en Santiago de Chile el 11 de Octubre de 1979. Sin embargo, me crié en la ciudad de Vicuña, Valle del Elqui en la IV Región. La riqueza de la vida prospera en esas tierras, y esto constituyó la inspiración necesaria que me llevó a interesarme por comprender los fenómenos biológicos. Continué con mi educación media en el Seminario Conciliar de La Serena, donde tuve mis primeros acercamientos con la formación científica. Ingresé a estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile en Santiago el año 1998. El año 2002 obtuve el grado



de Licenciado en Biotecnología Molecular, mientras realizaba este Seminario de Título en el Laboratorio de Biología Celular, Molecular y Neurociencias. El año 2004 ingresé a la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile a realizar el doctorado en Ciencias Biomédicas, el cual finalicé en Junio de 2009. Actualmente estoy desarrollando un Post-doctorado en el Laboratorio de Análisis de Imágenes Científicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, estudiando la relación entre la estructura y función de organelos en neuronas mediante técnicas microscopía óptica y análisis de imágenes.

Agradecimientos

Quiero agradecer al Laboratorio de Biología Celular, Molecular y Neurociencias, por haberme permitido realizar este Seminario de Título, en especial a las personas que trabajaron junto conmigo durante este periodo por su contribución al entorno humano y profesional en el cual fue realizado este trabajo; algunos de ellos son Claudia Huichalaf, Juan Pablo Muñoz, Felipe Opazo, Tomás Egaña, Rodrigo Quintanilla, Rubén Bosch, Daniel Orellana, Marcela Sjöberg y Ariadna Mendoza. En especial quisiera agradecer a mi Director de tesis Dr. Ricardo Maccioni por su apoyo en este proceso.

No puedo dejar de agradecer a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, en especial a sus científicos, estudiantes y amigos por brindarme su apoyo. Agradezco también al personal de la escuela de Pregrado, en especial a Juana López por su buena disposición y generosa ayuda.

Finalmente agradezco a mi familia: a mis padres José y Nancy por brindarme su apoyo incondicional durante todo este tiempo, a mis hermanos Maritza y Mauricio, abuelos y tíos.

Esta investigación fue financiada por: FONDECYT, Alzheimer's Association (U.S.A.) y por el Centro Internacional de Biomedicina (ICC).

INDICE DE MATERIAS

BIOGRAFÍA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
INDICE DE MATERIAS.....	vi
INDICE DE FIGURAS.....	viii
ABREVIATURAS.....	ix
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
Ciclinas y quinasas dependientes de ciclina.....	3
Cdk5: Una quinasa dependiente de ciclina atípica.....	3
Función de Cdk5 en el desarrollo del sistema nervioso.....	5
Participación de Cdk5 en la transmisión sináptica.....	7
Enfermedades neurodegenerativas asociadas a la proteína Cdk5.....	8
Hipótesis.....	11
Objetivo General.....	11
Objetivos Específicos.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
Materiales.....	12
Material biológico.....	12
Reactivos para cultivo de células.....	12
Reactivos para cultivos bacterianos	12

Anticuerpos	12
Enzimas.....	13
Materiales de electroforesis (PAGEs)	13
Reactivos analíticos y de biología molecular.....	13
Otros reactivos.....	13
Partidores.....	14
Plasmidios.....	15
Métodos.....	16
Mutagénesis sitio dirigidas.....	16
Purificación de proteínas recombinantes.....	17
Electroforesis de proteínas en condiciones denaturantes (SDS- PAGE).....	18
Inmunodetección de proteínas (western blots).....	18
Ensayos de actividad quinasa.....	19
Cuantificación de proteínas.....	20
Cultivo celular.....	20
Transfección de células PC12.....	20
Ensayos de viabilidad celular.....	21
RESULTADOS.....	22
Generación de mutaciones puntuales en Cdk5 mediante PCR.....	22
Purificación de proteínas recombinantes.....	26
Ensayos de actividad de Cdk5 recombinante obtenida a partir de extractos bacterianos.....	27

Efecto de la sobreexpresión de Cdk5-EYFP y Cdk5Y15F-EYFP en la morfología de células PC12.....	29
Ensayos de viabilidad celular.....	32
DISCUSIÓN.....	35
CONCLUSIÓN.....	40
BIBLIOGRAFÍA.....	42

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Inversión de las capas de la corteza en ratones knock-out de Cdk5.....	4
Figura 2. Visualización de la migración de neuronas en ratones Cdk5 +/+ y Cdk5 -/- a través de la introducción de EGFP en células de la zona ventricular mediante electroporación <i>in utero</i>	6
Figura 3. Esquema de la estructura de Cdk5 y p25 indicando las mutaciones introducidas en la enzima	23
Figura 4. Subclonamiento de Cdk5 en pET21-b	25
Figura 5. Esquema de la proteína de fusión Cdk5-GST	26
Figura 6. Actividad de Cdk5-GST y Cdk5Y15F-GST <i>in vitro</i>	28
Figura 7. Esquema de la proteína de fusión Cdk5-EYFP.....	29
Figura 8. Morfología de células PC12 transfectadas con pEYFP, Cdk5-EYFP y Cdk5Y15F-EYFP	31
Figura 9. Viabilidad de células PC12 transfectadas con Cdk5-EYFP y Cdk5Y15F-EYFP	33

ABREVIATURAS

ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albúmina de Suero Bovino
Cdks	Quinasas dependientes de ciclinas
Cdk5	Quinasa dependiente de ciclina 5
KDa	Kilo Dalton
K.O.	Knockout
Y15F	Mutación puntual de la Tirosina (Y) 15 por una Fenilalanina (F).
PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida
PBS	Tampón Salino de Fosfatos
PSSALRE	Secuencia peptídica de Cdk5 responsable de su unión a p35
SDS	Dodecil Sulfato Sódico
wt	Wild Type
PC12	Línea Celular de Feocromocitoma de Rata
CBF	Cyclin Box Fold
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EYFP	Enhanced Yellow Fluorescent Protein
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
APS	Persulfato de Amonio
PMSF	Phenylmethysulphonyl fluoride
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
BSA	Suero albúmina de bovino

IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
GST	Glutación transferasa
DTT	Ditiotreitol
dNTPs	Desoxirribonucleótidos
x-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside
DH5 α	Cepa de <i>Eschericchia coli</i>
BL21	Cepa de <i>Eschericchia coli</i>
COS-7	Línea de fibroblasto de mono verde
DMEM	Dubelco's Minimal Eagles Medium
FBS	Suero Fetal Bovino
DNA	Ácido desoxirribonucleico
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
OD	Densidad Óptica
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
HS	Suero de Caballo
NGF	Factor de Crecimiento Nervioso
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido etilenglicoltetraacético
GSH	Glutación reducido
MTT	3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5- 7-diphenyltetrazolium bromide

RESUMEN

La quinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5) está involucrada en procesos de migración, crecimiento neurítico y diferenciación neuronal. La actividad de Cdk5 en el sistema nervioso está regulada por la interacción con sus activadores específicos neuronales p35 y p39, y el nivel de activación es modulado a través de cambios en su estado de fosforilación. Diversas patologías neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, presentan alteraciones en la actividad de Cdk5. Se ha planteado que la fosforilación de Cdk5 en tirosina 15 contribuiría a regular su actividad, y a modular diversos procesos relacionados con la mantención de un fenotipo neuronal. La finalidad de este estudio es investigar algunos aspectos de la participación de la fosforilación del residuo tirosina 15 en la actividad de Cdk5 y su relación con la neuritogénesis y la sobrevivencia de células PC12. Con el objeto de dilucidar esto, introdujimos una mutación puntual en la secuencia codificante de Cdk5 cambiando la tirosina 15 por fenilalanina (Cdk5Y15F). Mediante ensayos de actividad *in vitro* realizados con proteínas recombinantes, observamos una disminución de la actividad enzimática del mutante Cdk5Y15F. No obstante, a pesar de esta disminución en la actividad enzimática, la expresión de Cdk5Y15F en la línea neuronal PC12 no produjo cambios significativos en el número y tamaño promedio de las neuritas comparada con Cdk5, resultados que sugieren que la regulación de Cdk5 en tirosina 15 no afecta la formación de neuritas al menos en este modelo celular. Por otra parte, utilizando ensayos de viabilidad celular observamos que la introducción de Y15F en Cdk5 tiene un efecto neuroprotector en células PC12 sometidas a estrés oxidativo mediante tratamientos con peróxido de hidrógeno, sugiriendo que esta modificación participa en alguna de las vías de muerte neuronal.

ABSTRACT

The cyclin dependent protein kinase 5 (Cdk5) participates in neuritogenesis, cell differentiation and migration processes of neuronal cells. The activity of Cdk5 in the nervous system is regulated by mean of the interaction with its specific neuronal activators p35 and p39, while the level of activation is modulated through changes of its intrinsic phosphorylation conditions. In neurodegenerative disorders like Alzheimer's disease Cdk5 activity becomes deregulated. It has been postulated that phosphorylation of Cdk5 in tyrosine 15 regulates its enzymatic activity and promotes neuritic growth in cultured neurons. The main goal of this research was to investigate some aspects on the role of the tyrosine 15 phosphorylation in the enzymatic activity of Cdk5, and their relationships with both neuritogenesis and cell survival in PC12 cells. To elucidate the role of tyrosine 15 on the activity and function of Cdk5, we introduced a point mutation on the coding sequence of Cdk5, changing the tyrosine 15 by phenylalanine (Cdk5Y15F), which results in a reduction of the enzymatic activity, as analyzed by *in vitro* assays performed with recombinant purified proteins. However, expression of Cdk5Y15F in the neuronal cell line PC12 did not cause significative changes in the average number and size of neurites. These results suggest that tyrosine 15 regulation of Cdk5 does not participate directly in neurite formation of PC12 cells. Additionally, cell survival assays of cells treated with hydrogen peroxide showed that introduction the Cdk5Y15F version of Cdk5 has a neuroprotective effect in PC12 cells exposed to oxidative stress conditions, suggesting that this phosphorylation in tyrosine 15 participates in the cascade of events that result in death of certain neuronal populations.

INTRODUCCIÓN

Ciclinas y quinasas dependientes de ciclina.

Las quinasas dependientes de ciclina (Cdks), son importantes reguladoras del ciclo celular en células eucarióticas. Estas constituyen una familia de quinasas de peso molecular intermedio, con especificidad por residuos de serina o treonina y que requieren para su activación de la unión a sus subunidades reguladoras llamadas ciclinas (Morgan, 1997; Maccioni y col., 2001; Ubersax y col., 2003; Cruz & Tsai, 2004).

Al igual que la mayoría de las quinasas, las Cdks son modificadas post traduccionalmente por quinasas y fosfatasa que regulan su actividad. Por ejemplo, la fosforilación de la treonina 160 del asa de activación (t-loop) de Cdk2 es necesaria para activar la quinasas, mientras que la fosforilación de treonina 14 por la quinasas de especificidad dual Wee1, tiene un efecto inhibitor (Zukerberg y col., 2000).

Cdk5: Una quinasas dependiente de ciclina atípica.

Algunas Cdks participan en eventos postmitóticos, posteriores a la división celular. Una de estas es Cdk5, proteína de 292 aminoácidos y 33,3 kDa de peso molecular. Se expresa en células diferenciadas e indiferenciadas como las neuronas, células sanguíneas, células germinales masculinas, células beta del páncreas, células del lente óptico y miocitos entre otras (Maccioni y col., 2003a, Rosales y col., 2004, Ubeda y col., 2004, Gao, 2004., Sahlgren y col. 2003). Cdk5 ha sido estudiada principalmente en el sistema nervioso central de mamíferos, donde su actividad está restringida a

neuronas postmitóticas, las cuales expresan sus activadores p35 y p39 (Ko y col. 2001). Cdk5 es importante para la correcta migración de las neuronas, y para formar el patrón de laminación del hipocampo, cerebelo y las capas de la corteza cerebral de ratones (Figura 1).

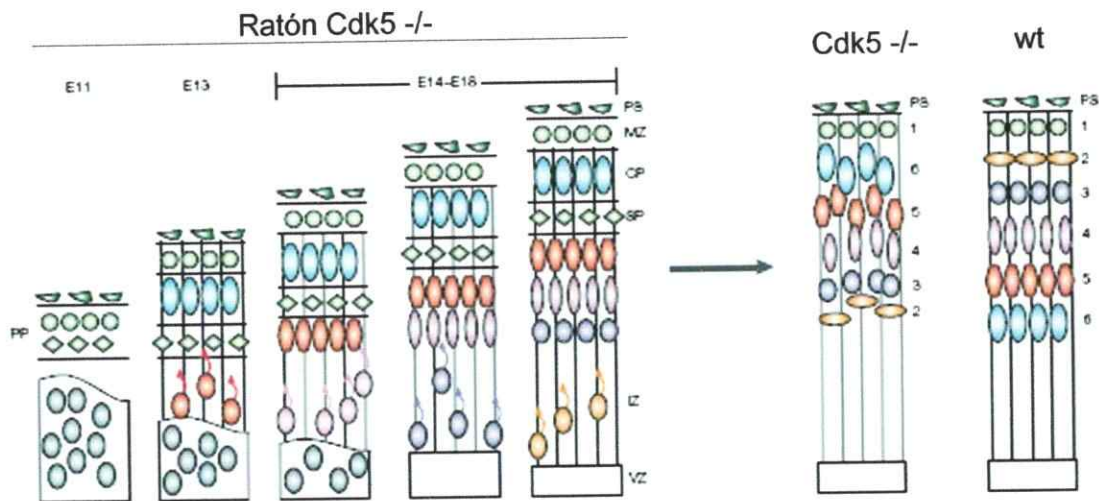


Figura 1. Inversión de las capas de la corteza en ratones knockout de Cdk5. En ratones mutantes post-preplaca como p35 $-/-$ y Cdk5 $-/-$, la separación de la preplaca es normal. La placa cortical (CP) está invertida, y las capas individuales están desorganizadas. De manera notable, la mayor parte de la placa cortical inicialmente se ubica debajo de la superficie pial (SP) en la zona intermedia superior (IZ). En los ratones p35 $-/-$, las neuronas de la placa cortical llegan hasta su destino final después del nacimiento. La muerte perinatal de los mutantes Cdk5 $-/-$ evita el estudio del posicionamiento final de las neuronas de la placa cortical en estos animales (Reproducido con modificaciones del artículo original de Gupta y col., 2002).

A pesar de que la secuencia aminoacídica de p35 tiene muy poca similitud con las ciclinas, su estructura terciaria es muy similar (Poon y col., 1997; Tarricone y col., 2001). Estudios estructurales realizados en la estructura cristalina del complejo Cdk5/p25, este último un producto del procesamiento proteolítico de p35, demuestran que el mecanismo de activación de Cdk5 es diferente de los ya conocidos para las otras Cdk5, y contribuyen a explicar las bases de la especificidad de la interacción Cdk5/p35 (Tarricone y col., 2001). El dominio de interacción de p25 contiene una topología similar al dominio *cyclin box fold* (CBF), elemento clave en la interfase Cdk5-

ciclinas. El CBF de p25 interactúa con Cdk5 estabilizando la conformación activa del t-loop de una forma que es muy similar a la interacción de ciclina A con Cdk2 (Morgan, 1997).

Sin embargo, existen diferencias importantes en el mecanismo de activación de Cdk5 respecto de otras Cdks. La principal es que Cdk5 no requiere la presencia de un grupo fosfato en el t-loop para su activación, y la fosforilación de su amino terminal en tirosina 15 participa en su activación (Zukerberg y col., 2000).

Función de Cdk5 en el desarrollo del sistema nervioso.

Como lo hemos planteado, el complejo Cdk5/p35 es importante durante el desarrollo del sistema nervioso, donde participa en diferenciación neuronal, migración, crecimiento axonal y sinaptogénesis, todos procesos necesarios para la correcta laminación de estructuras como la corteza, el cerebelo y el hipocampo (Paglini y col. 2001, Gupta y col. 2003, Beffert y col. 2004, Ko y col. 2001, Oshima y col. 2007). La delección del locus de Cdk5 o de ambos activadores p35 y p39, causa letalidad perinatal en los resultantes ratones KO, los cuales presentan serios defectos en la laminación de la corteza (Ko y col. 2001, Gupta y col., 2003, ver Figura 1).

En estos ratones se observa que las capas de la corteza están invertidas, de forma similar a lo que ocurre con el fenotipo *Reeler* *-/-*, apoyando la participación de Cdk5 en las vías de migración neuronal (Hirasawa y col. 2004, Beffert y col. 2004). Utilizando electroporación *in utero* para expresar EGFP en las neuronas de ratones knock out de Cdk5, se ha visualizado con claridad el efecto de la pérdida de función de Cdk5 en el proceso de migración y en la morfología neuronal de embriones E14 como se observa

en la figura 2 (Oshima y col. 2007). Estos estudios, relacionan al activador p35 con alteraciones en la migración a través de las guías gliales (Gupta y col. 2003).

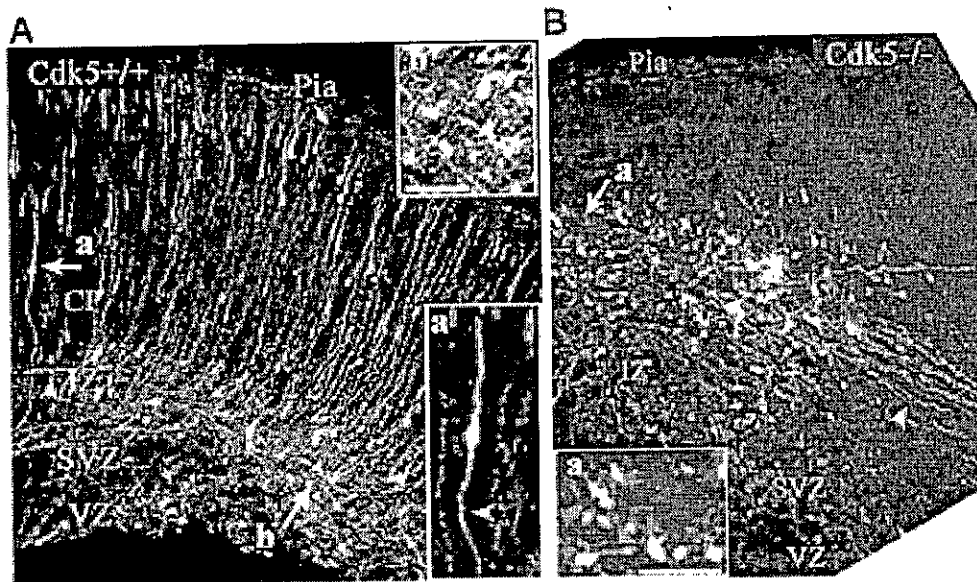


Figura 2. Visualización de la migración de neuronas en ratones *Cdk5 +/+* y *Cdk5 -/-* a través de la introducción de EGFP en células de la zona ventricular mediante electroporación *in utero*. EGFP fue introducida en embriones de ratones E14.5. A. *Cdk5 +/+* y (B) *Cdk5 -/-* y los cerebros fueron fijados en E17.5. Las secciones fueron teñidas con anticuerpo anti-EGFP. Los insertos muestran las zonas indicadas con flechas (a, b) a mayor magnificación. (A) En un periodo de tres días, las neuronas migraron en la CP con la típica forma bipolar (a) en los ratones *Cdk5 +/+*. Las neuronas que migran en la CP extienden sus procesos guías hacia la pia y sus axones (cabeza de flecha) hacia la VZ. En SVZ-IZ, se observa neuronas EGFP-positivas de forma multipolar (b). B. En contraste, en los ratones *Cdk5 -/-*, las neuronas están arrestadas en la SVZ-IZ con forma multipolar (a), y sus axones (cabeza de flecha) corren oblicuos en la SVZ-IZ. CP, placa cortical; SVZ, zona sub-ventricular; IZ, zona intermedia; VZ, zona ventricular. Barra de escala: 25 μm . (Reproducido de Oshima y col. 2007).

A nivel celular, la expresión de formas dominantes negativos de *Cdk5* en neuronas de hipocampo en cultivo, inhiben el crecimiento de neuritas (Paglini y Cáceres 2001; Rashid y col. 2001). *Cdk5* es una proteína multifuncional que se asocia intracelularmente con otras proteínas para interactuar con el citoesqueleto y formar complejos supramoleculares (Farias y col. 2002). Se ha logrado identificar a *Cdk5* formando parte de distintos complejos macromoleculares entre 60 y 670 kDa, donde está asociada con p35, p25, sinapsina, tau, CK1, β -catenina, y N-caderina (Ubeda y col., 2003). La interacción y fosforilación de β -catenina y δ -catenina por *Cdk5*, vincula a

esta quinasa en los procesos de migración a través de la formación de complejos de adhesión celular mediados por caderinas (Muñoz y col., 2007).

La quinasa de adhesión focal (FAK) es regulada por Cdk5 a través de su fosforilación en la serina 732; FAK es importante en la mantención de la estructura microtubular asociada al centrosoma que permite la translocación nuclear hacia el proceso guía del axón (Xie y col., 2003). En otro estudio se determinó que doblecortina (DCX), una proteína involucrada en la migración neuronal y en la dinámica del citoesqueleto, es sustrato de Cdk5 en la serina 297. La introducción de la mutación S297A en DCX ó la inhibición farmacológica de Cdk5 bloquea la habilidad de DCX para promover la migración en ensayos con neuronas granulares cerebelares (Tanaka y col., 2004).

Participación de Cdk5 en la transmisión sináptica.

Cdk5 también ha sido implicada en las vías de señalización activadas por el neurotransmisor dopamina. Estos trabajos apoyan el papel de Cdk5 como modulador de la respuesta a sustancias adictivas como la cocaína y la cafeína, por medio de la fosforilación de la fosfoproteína regulada por cAMP y dopamina (DARPP-32) (Chergui y col., 2004; Lindskog y col., 2002; Bibb y col., 1999).

Otras líneas de investigación indican que Cdk5 se encuentra enriquecida en la sinapsis, donde se ha encontrado que fosforila el extremo amino terminal de PSD-95, una proteína de andamio importante en la organización de canales iónicos y receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) en la densidad postsináptica (Morabito y col., 2004).

Consistentemente, Cdk5 regula la actividad de canales de calcio activados por voltaje tipo P/Q (Tomizawa y col., 2003a), y de receptores NMDA (Hawasli y col., 2007).

Estudios recientes demostraron que Cdk5 fosforila a dinamina I y amfifisina I, proteínas importantes en la endocitosis de vesículas sinápticas mediada por clatrina, identificándola como una proteína reguladora del reciclaje de vesículas sinápticas en el terminal nervioso (Tomizawa y col., 2003b). Otros estudios a nivel conductual en ratón sugieren que Cdk5 forma parte de los mecanismos de aprendizaje asociativo y consolidación de la memoria (Fischer y col., 2002; Angelo y col., 2003). Toda la evidencia anterior indica que Cdk5 estaría cumpliendo funciones reguladoras de la transmisión sináptica a nivel pre y postsináptico.

Enfermedades neurodegenerativas asociadas a la proteína Cdk5.

De la misma manera en que las quinasas dependientes de ciclina son importantes en el control del ciclo celular, Cdk5 es importante en el posicionamiento y función apropiada de las neuronas post mitóticas. La desregulación de las primeras es común en enfermedades como el cáncer, mientras que es frecuente hallar a Cdk5 sobreactivada en enfermedades neurodegenerativas.

Se ha demostrado que Cdk5, está desregulada en patologías como el Alzheimer y otras demencias (Álvarez et al., 1998; Muñoz et al., 2001; Maccioni et al., 2001a, b). Distintos estudios han demostrado un incremento de la actividad de Cdk5 en células en cultivo sometidas a condiciones neurotóxicas como estrés oxidativo, tratamientos con β -amiloide o isquemia (Cruz & Tsai, 2004). Esta hiperactivación contribuye al aumento anómalo de las formas polifosforiladas de la proteína tau, probablemente a través de

fosforilación directa, alterando la organización del citoesqueleto y llevando eventualmente a la muerte neuronal (Noble y col 2003; Zambrano et al., 2004). Esta desregulación estaría dada en parte, por un aumento en los niveles de p25 (Noble y col 2003; Cruz & Tsai, 2004), o por una estabilización anómala de complejo Cdk5/p35 en la membrana plasmática como consecuencia de modificaciones post traduccionales de Cdk5 (Álvarez y col., 2001; Maccioni y col., 2001a; Maccioni y col 2001b).

En estudios en cerebros *post mortem* de pacientes afectados por la enfermedad de Alzheimer, se ha observado la presencia de dos tipos de agregados proteicos: la placa amiloide, agregado extracelular compuesto por el péptido A β (1-42), y los ovillos neurofibrilares, compuestos por filamentos helicoidales pareados, que a su vez están formados por agregados de la proteína tau hiperfosforilada que ocurren intracelularmente (Maccioni y col., 2001a; Maccioni y col., 2001b). Esto se correlaciona con un aumento de la actividad de Cdk5 y niveles elevados de p25 en el líquido cefalorraquídeo de estos pacientes.

Estudios recientes han propuesto que este funcionamiento anómalo del complejo Cdk5/p25 podría activar la muerte celular a través de mecanismos que aún no se han determinado. Existe evidencia de que la fosforilación de p53, una proteína proapoptótica sustrato de Cdk5, estaría implicada en la muerte neuronal (Lee y col., 2007). Otros estudios proponen la participación de Cdk5 en la inducción de apoptosis por excitotoxicidad, a través del aumento de calcio intracelular por la activación del receptor de NMDA, cuya subunidad NR2A es blanco de Cdk5 (Hawasli y col., 2007).

Considerando la relevancia de los procesos fisiológicos y patológicos en los que participa Cdk5, el estudio de su regulación a nivel celular es importante para la comprensión de los mecanismos moleculares implicados en migración, diferenciación y neurodegeneración.

Una de las proteínas que interaccionan con Cdk5 en células neuronales es Cables, una proteína adaptadora que permite que c-Abl fosforile a Cdk5 en la tirosina 15. Esta fosforilación aumenta la actividad de Cdk5 (Zukerberg y col., 2000) y podría estar contribuyendo a la excitotoxicidad observada en neuronas en condiciones neurotóxicas como estrés oxidativo producido por tratamiento con peróxido de hidrógeno.

Partiendo sobre la base de la evidencia anterior, esta tesis está orientada a estudiar los efectos de la fosforilación de Cdk5 en tirosina 15 en la supervivencia de células PC12 y en su respuesta celular frente a condiciones de estrés oxidativo, utilizando mutagénesis sitio dirigida, ensayos de actividad enzimática *in vitro*, transfección de células PC12 y ensayos de viabilidad celular. La tesis está inserta en una investigación de vastas proyecciones que pretende aportar al conocimiento de los mecanismos moleculares que dan cuenta de la forma en que Cdk5 participa en respuestas fisiológicas finamente coordinadas y reguladas como la inducción de cambios morfológicos en células neuronales, o en contextos patológicos en el desencadenamiento de la muerte neuronal.

HIPÓTESIS

Basados en los antecedentes anteriores, planteamos la siguiente hipótesis: La fosforilación de Cdk5 en tirosina 15 conduce a variaciones en su actividad enzimática y a su vez produce cambios morfológicos en la línea PC12. Adicionalmente, sugerimos que esta modificación post traduccional, esta involucrada en eventos que conducen a la muerte neuronal.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar los cambios regulatorios de Cdk5 por la fosforilación en tirosina 15 evaluando el efecto de sustituciones puntuales de este residuo en la morfología y en la sobrevivencia de la línea neuronal PC12 frente a condiciones nocivas de estrés oxidativo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Introducir mutaciones en la tirosina 15 de Cdk5 que imiten un estado constitutivamente fosforilado y no fosforilado de la enzima.
- 2.- Estudiar la participación de la fosforilación de tirosina 15 en la actividad de Cdk5.
- 3.- Investigar el papel funcional de la fosforilación en tirosina 15 de Cdk5 en la morfología de células PC12.
- 4.- Investigar la participación de la fosforilación en tirosina 15 de Cdk5 en la respuesta de células PC12 expuestas a condiciones de estrés oxidativo.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Material biológico. En este estudio se utilizaron las cepas de *Escherichia coli* DH5 α y BL21 (Promega) para realizar técnicas de biología molecular y producir proteínas recombinantes respectivamente. Se utilizó la línea celular PC12 (feocromocitoma de rata -*Rattus norvegicus*-) para realizar los análisis morfológicos y los ensayos de sobrevivencia celular frente a tratamientos con peróxido de hidrógeno.

Reactivos para cultivo de células. Se utilizaron placas para cultivo celular NUNC, los medios de cultivo DMEM, MEM, suero fetal de bovino, Tripsina, EDTA, y antibióticos estreptomycin y penicilina Gibco BRL.

Reactivos para cultivos bacterianos. Estos incluyeron extracto de levadura (Merck, Darmstadt, Alemania), Peptona (Merck, Darmstadt, Alemania); Cloruro de Sodio (Merck, Darmstadt, Alemania), Agar-Agar (Sigma.), Ampicilina (U.S. Biologicals), Glucosa (Sigma.).

Anticuerpos. Los anticuerpos utilizados fueron: anti-Cdk5 C-8 (monoclonal); J-3 (policlonal) anti-Cdk5; C-19 (monoclonal) anti-p25/p35 y N-20 (monoclonal) anti-p35 fueron de Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA. EE.UU.); Anticuerpos secundarios conjugados a Peroxidasa HRP (Amersham Life).

Enzimas. Las enzimas incluyeron lisozima de Calbiochem; NcoI de Fermentas a HindIII de Fermentas; Tripsina fue de Invitrogen (Carlsbad, California, EE.UU); DNAsa de Novagen; T4 DNA ligasa de Fermentas; CIAP de Fermentas; Pfu polimerasa de Invitrogen (Carlsbad, California, EE.UU); y Taq polimerasa de Invitrogen (Carlsbad, California, EE.UU).

Materiales de electroforesis (PAGEs). Fueron SDS de Sigma; Tris-base de Sigma; TEMED de Merck, Darmstadt, Alemania); Persulfato de Amonio (APS); (Sigma); Archilamida de Merck, Darmstadt, Alemania; y Bis-Acrilamida de Sigma.

Reactivos analíticos y de biología molecular. Los reactivos NaCl, KCl, reactivos analíticos, ácidos, bases y alcoholes fueron obtenidos de MERCK. Las enzimas de restricción BamHI 5U/μl, Taq DNA polimerasa (5 U/μl), dNTPs (100 mM), 100 pb DNA ladder (1 μg/μl), lipofectamina, X-Gal, agarosa, DTT y tripsina fueron obtenidas de Invitrogen-GIBCO BRL Life Technologies Inc. El Bromuro de etidio, BSA, β-mercaptoetanol, SDS, EDTA, cicloheximida, IPTG fueron de Compañía Sigma Chemical CO. El [γ ³²P] dATP (3000 Ci/mmol, 10 μCi/μl) de PerkinElmer y la Histona H1 de Calbiochem.

Otros reactivos utilizados. Inhibidores de proteasa y fosfatasas: PMSF (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU); Leupeptina (Sigma); Aprotinina (Sigma); Pepstatina (Sigma); Ortovanadato de Sodio (Sigma); Fluoruro Sódico (Sigma); dNTP's; Cloruro de Calcio (CaCl₂) (Sigma.); Ditioneitol (DTT) (Merck, Darmstadt, Alemania); Cloruro de Manganeso (MnCl₂) (Sigma.); Cloruro de Magnesio (MgCl₂) (Merck, Darmstadt, Alemania); HEPES (Calbiochem); Glicina (Calbiochem); Agarosa (Sigma.); Bromuro de

Etidio (Sigma); Estándares 100pb y lamda HindIII (Winkler Ltda.); Tween 20 (Sigma.); EDTA (Sigma.); Albúmina de Suero de Bovino (BSA) (Winkler Ltda.); Membrana de Nitrocelulosa (Amersham Pharmacia Biotech.); Rojo Ponceau (Sigma.); Glutación reducido, Azul de Coomassie y Azul de Bromofenol fueron de Sigma; Glicerol de Winkler Ltda.; reactivo de Bradford de Biorad; películas radiográficas de Fuji Medical X-ray Film; Kit quimioluminencia de Western Lightning Chemoluminescence Reagent Plus (PerkinElmer Life Science Products); IPTG de Calbiochem; Imidazol de USBiologicals; Resina NTA-Ni de Quiagen; Resina de GST de Novagen; ATP frío (Sigma); [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP 3000 Ci/mmol, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ (PerkinElmer); Histona H1 de timo de ternero de Calbiochem; y Lipofectamine 2000; Invitrogen (Carlsbad, California, EE.UU).

Partidores. En la tabla 1 se muestra los partidores utilizados en la mutagénesis sitio dirigida¹ y el partidor utilizado para secuenciar Cdk5.

Tabla 1. Partidores utilizados en el estudio

Cdk5fwmutF:	5' AGA TTG GGG AAG GCA CCT <u>TCG</u> GAA CTG TG 3'
Cdk5fwmutE:	5' AGA TTG GGG AAG GCA CCG <u>AAG</u> GAA CTG TG 3'
Cdk5rvmut:	5' GGT GCC TTC CCC AAT CTT TTC CAG TTT CTC 3'
PET322:	5' TGC AGA TCT CGA TCC CGC 3'

¹ Los nucleótidos subrayados indican aquellos que son modificados a través de mutagénesis sitiodirigida.

Plásmidos. El cDNA de Cdk5 fue subclonado en el plásmido comercial pET-21b (Novagen), el cual tiene un promotor bacteriano de expresión constitutiva utilizado para la sobre expresión proteica en la cepa de *Escherichia coli* BL21. Por otra parte el cDNA de Cdk5 fue subclonado en el plásmido pEYFP-C (Clontech Laboratories, Inc.) para expresión proteica de la proteína fusión Cdk5-EYFP en células de mamífero.

MÉTODOS

En este trabajo se empleará principalmente técnicas de biología molecular que incluyen aislamiento y manipulación de DNA, subclonamiento, mutagénesis sitio dirigida, transformación de células por shock térmico, análisis de restricción y métodos bioquímicos como separación de proteínas en SDS-PAGE y westernblots.

Mutagénesis sitio dirigidas.

Se utilizó el cDNA de 880 pb de Cdk5 (Oshima y col. 1995) se encontraba previamente clonado en pGEX-2TK (donada por Dr. H. Pant, NIH). Para efectos de este estudio Cdk5 fue subclonada en los plásmidos pET21-b y pEYFP-C1 (ver tesis de Claudia Huichalaf, Programa de Biotecnología), donde se realizó la mutagénesis sitio dirigida utilizando el Kit QuikChange (Stratagene). Se amplificó el plásmido completo por medio de PCR utilizando un partidador mutagénico diseñado para introducir el cambio de bases necesarios para codificar un residuo de fenilalanina en lugar de tirosina en la secuencia de Cdk5, y un partidador inverso, denominados Cdk5fwmutF y Cdk5rvmut respectivamente (Tabla 1). La reacción de amplificación se realizó con el siguiente programa de PCR: denaturación inicial 94°C por 2 min, 23 ciclos de denaturación 94°C por 30 segundos, renaturación a 55°C por 30 segundos, extensión a 68°C por 6,5 minutos y una extensión final a 68°C por 10 minutos. Finalmente, se utilizó la cepa *E. coli* Dh5 α para transformar los productos de PCR. La presencia de las mutaciones fue verificada mediante secuenciación utilizando el partidador PET322, el cual hibrida en la secuencia del plásmido pET21-b.

Purificación de proteínas recombinantes.

Los clones bacterianos de la cepa BL21 que contienen plásmidos pGEX 2TK-p25 (p25-GST), pGEX 2TK-p35 (p35-GST) y pET21-b-Cdk5 (Cdk5-GST) fueron crecidos a 37°C hasta alcanzar una OD de 0.7, se agregó IPTG a una concentración de 1 mM y posteriormente las bacterias fueron incubadas a 30°C con agitación por 4 hrs. Finalmente fueron centrifugadas a 5000 rpm (rotor Sorval GSA) por 10 minutos a 4°C. Los pellets obtenidos fueron resuspendidos en PBS ó tampón de lisis (50 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, 5 mM imidazol pH 8.0), en una relación de 4 ml de PBS por cada 100 ml de cultivo bacteriano. Se adicionó lisozima a una concentración de 1 mg/ml y se incubó la mezcla por 30 min en hielo. Posteriormente, las muestras fueron sonicadas 6 ciclos de 10 seg utilizando una potencia de 40 W (Ultrasonic Processor). Luego se añadió Triton X-100 a una concentración final 0,5 % y la mezcla fue centrifugada a 10.000 g por 30 min a 4°C. Al sobrenadante obtenido se agregó Glutación-Sepharosa (Amersham Pharmacia) 50%, en una relación de 1 ml en 50 ml de cultivo bacteriano y se incubó a 4°C por 2 h. La mezcla fue centrifugada a 500 x g por 10 min a 4°C y se lavo el pellet 3 veces con PBS. Finalmente la proteína de fusión fue eluída adicionando tampón de elusión (Glutación 10 mM en 50mM Tris-HCl pH 7,6). La concentración de las proteínas fue determinada mediante el método de Bradford modificado (BioRad).

Bioquímica de proteínas

Electroforesis de proteínas en condiciones denaturantes (SDS-PAGE)

Las muestras de proteínas se mezclaron con tampón de carga 4X (125 mM tris, 2% SDS, 1% ditiotreitól, 5% glicerol, 0,003% azul de bromofenol, a pH 6,8) y luego se hirvieron por 5 minutos. Las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida-SDS al 12 ó al 15%, montados en cámaras *Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell* (Bio-Rad). Como estándares de peso molecular, se usaron marcadores de pesos moleculares *Precision Plus Protein Standards* (Bio-Rad). El gel se corrió a 100 V durante 2 a 3 horas en tampón de corrida (192 mM glicina, 25 mM tris, 0,1% SDS, a pH 8,3).

Inmunodetección de proteínas (*Western blot*)

Las proteínas separadas en geles en condiciones denaturantes, fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa en solución de transferencia (glicina 0,2 M, tris 25 mM pH 8,3, metanol 20%, SDS 0,01%), en un *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad) a 100 V por 1 h. La transferencia fue verificada tiñendo la membrana con solución de rojo Ponceau (Ponceau S 1,25%, ácido tricloroacético 25%, ácido sulfosalicílico 25%). La membrana fue incubada en solución de bloqueo (leche descremada 5 % en PBS por 1 h a temperatura ambiente). Luego se incubó con el anticuerpo primario en las diluciones apropiadas (BSA 3% en PBS-T) por una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se hizo 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS-T (Tween-20 0,05% en PBS). Finalmente se incubó la membrana con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano, diluido 1:10.000 en

solución de bloqueo (BSA 3% en PBS-T) por 1 h a temperatura ambiente y la membrana se lavó 3 veces por 10 min con PBS-T. La membrana se incubó con las soluciones del *kit* de quimioluminiscencia (*Western Lightning Chemoluminescence Reagent Plus, PerkinElmer Life Science Products*) y en oscuridad se expuso a una película fotográfica (*Fuji Medical X-ray Film*). Para el revelado y fijación de la película se usaron las soluciones comerciales revelador radiográfico G150 y fijador radiográfico G334 (AGFA).

Ensayos de actividad quinasa.

Los ensayos de actividad quinasa *in vitro*, se realizaron con las proteínas recombinantes Cdk5, p35 y p25 fusionadas a GST o 6x-His obtenidas mediante purificación por afinidad utilizando Glutación-Sepharosa (Amersham-Pharmacia) o Ni²⁺-NTA-agarosa respectivamente. En los ensayos con inmunoprecipitados, se utilizó 1 µg de proteína por ensayo, éstos fueron lavados tres veces con tampón quinasa previo a la reacción. Cdk5 más p35 ó p25 fueron preincubadas por 10 minutos a 4°C en tampón quinasa 1X (50 mM HEPES, 10 mM MgCl₂, 5 mM MnCl₂, 1 mM DTT, pH 7.5) más ATP 1µM. Finalmente una mezcla de 3 µg de Histona H1, 3 µCi [³²P] ATP y el complejo Cdk5-GST/p35-GST o Cdk5-GST/p25-GST se incubaron por 1 hora a 30 °C. Las reacciones fueron separadas en SDS-PAGE y la marca radioactiva incorporada se analizó en un Phosphoimager *Molecular Image* (BioRad).

Cuantificación de proteínas

Cada muestra de proteína (1-10 μ L) se diluyó en agua hasta alcanzar un volumen de 800 μ L y se agregó 200 μ L del reactivo de Bradford (Bio-Rad), luego se mezcló y se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro o lector de ELISA. La concentración se obtuvo extrapolando los valores de absorbancia de las muestras en una curva de calibración, preparada con BSA en el momento.

Cultivo celular

Se utilizó las líneas de células de feocromocitoma PC12 en los estudios morfológicos y en la respuesta a peróxido de hidrógeno. Las células PC12 fueron crecidas en DMEM (Gibco-BRL), suplementado con 10% suero de fetal bovino (FBS) y 5% de caballo (HS). Todos los cultivos fueron realizados en presencia de penicilina y estreptomina en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C.

Transfección de células PC12

Las transfecciones transientes de los clones de Cdk5-EYFP, en células PC12 se realizaron en placas NUNC de 35 mm utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Se utilizó 1 μ g de los DNAs pEYFP, Cdk5-EYFP wt y Cdk5Y15F-EYFP. La eficiencia de las transfecciones en células PC12 se determinó contando el número de células fluorescentes amarillas sobre el total. Se observó un porcentaje de transfección de 30-50%.

Ensayos de viabilidad celular

Células PC12 transfectadas con vector vacío, Cdk5-EYFP y Cdk5Y15F-EYFP, fueron sembradas en placas de 96 pocillos y crecidas en medio DMEM sin rojo fenol por 24 h a 37 °C en 5% CO₂, luego en presencia de NGF 100 ng/ml por 48 h y tratadas con peróxido de hidrógeno 100 μM por 20 min. Posteriormente, las células fueron lavadas con medio DMEM e incubadas con el reactivo MTT 5 mg/ml durante 4 h. Las células fueron lisadas y la reacción colorimétrica del MTT fue cuantificada en un lector de ELISA como la diferencia entre Abs₆₅₀ – Abs₅₄₀.

RESULTADOS

Generación de mutaciones puntuales en Cdk5 mediante PCR

Con la finalidad de investigar la participación de la modificación post traduccional por fosforilación en la actividad de Cdk5, diseñamos una estrategia de mutagénesis sitio dirigida, que se muestra en la Figura 3. Se investigó el efecto de la fosforilación de Cdk5 en tirosina 15 sobre su actividad quinasa mediante mutagénesis sitio dirigida basada en PCR (QuikChange, Stratagene). Con la finalidad de imitar la presencia o ausencia de las cargas negativas de un grupo fosfato la tirosina 15 fue remplazada por ácido glutámico y fenilalanina respectivamente. Para esto generamos dos enzimas con una mutación puntual cada una. En el primero de los mutantes se realizó un cambio en el codón TAT por TTC (5'→3') para sustituir la tirosina por una fenilalanina a fin de eliminar el grupo OH^- aceptor del fosfato. En el segundo mutante el codón TAT fue cambiado por GAA (5'→3') para cambiar la tirosina 15 por un ácido glutámico, con el fin de imitar una fosforilación permanente del residuo 15 de Cdk5, este residuo tiene carga negativa a pH fisiológico, por lo tanto es capaz de inducir un efecto similar a un fosfato. Estas sustituciones de residuos se encuentran entre las más utilizadas en mutaciones de residuos fosforilables (Zukerberg y col., 2000). En particular, se eligió fenilalanina para sustituir tirosina porque minimiza los cambios estructurales y las posibles consecuencias funcionales que podrían producirse, debido a que conserva el

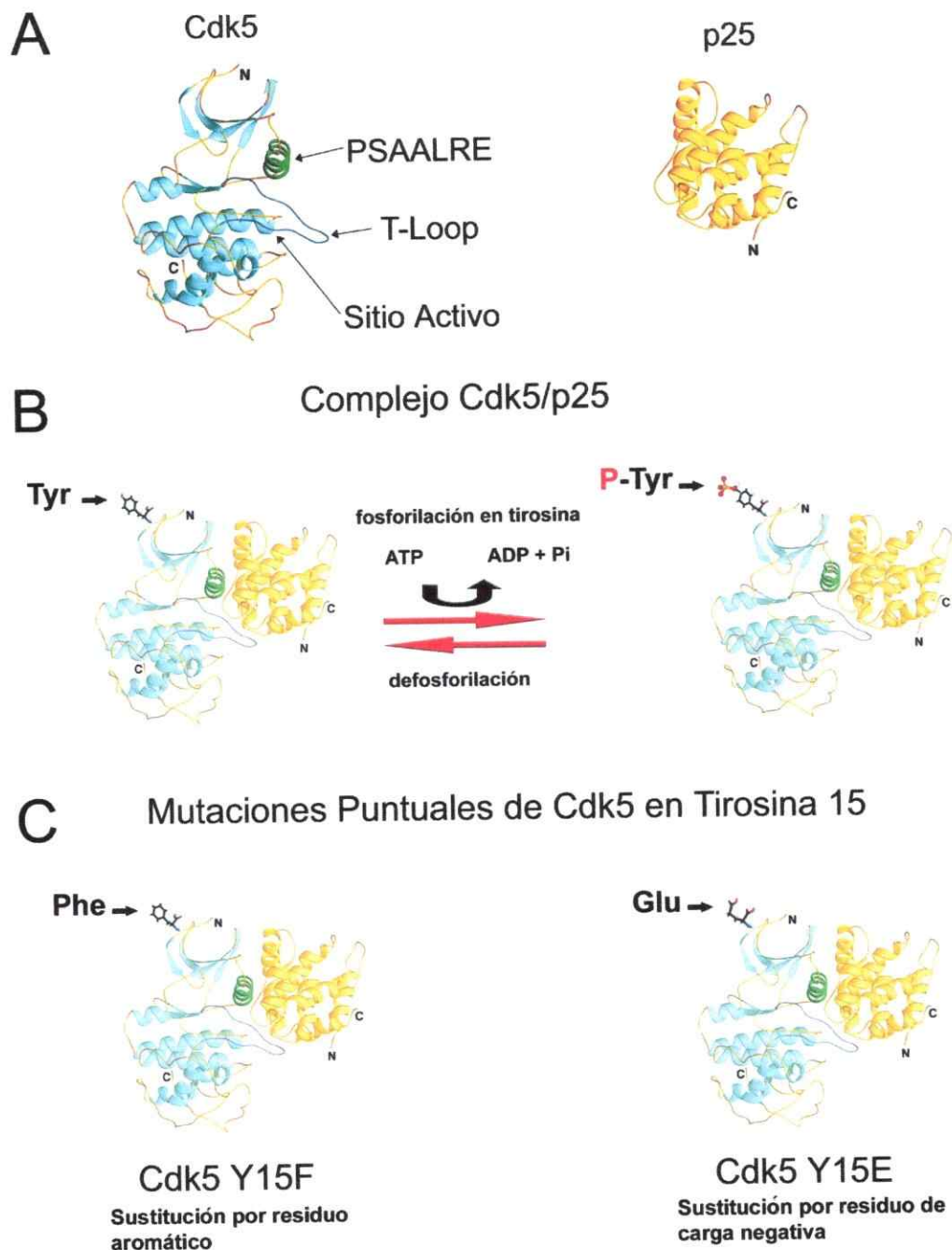


Figura 3. El esquema de la estructura de Cdk5 y p25 indicando las mutaciones introducidas en la enzima. A. Izquierda, esquema de cintas de la estructura de Cdk5; PSAALRE, secuencia de interacción con el activador p25; T-loop, asa de activación. Derecha, esquema de la estructura de p25. **B.** Esquema que ilustra el equilibrio entre el estado fosforilado y defosforilado del complejo Cdk5/p25 en la tirosina 15 de Cdk5. **C.** Izquierda; complejo Cdk5/p25 con la tirosina 15 de Cdk5 sustituida por fenilalanina, constituyendo una quinasa no fosforilable en este residuo. Derecha; complejo Cdk5/p25 con la tirosina 15 de Cdk5 sustituida por ácido glutámico, imitando una fosforilación constitutiva.

anillo aromático del residuo y por lo tanto, mantiene muchas de las interacciones químicas entre residuos vecinos. El ácido glutámico se usa habitualmente porque imita residuos fosforilados, aunque para el caso de la imitación de una tirosina fosforilada, se pierda el anillo aromático. Sin embargo, la región amino terminal de Cdk5 donde se efectúan estas mutaciones no ha podido ser resuelta por cristalización y difracción de rayos-x debido a que en las condiciones en que se cristaliza no posee estructura fija, sugiriendo una alta movilidad del extremo amino terminal de Cdk5.

La mutagénesis sitio dirigida se realizó a partir de los plásmidos pEYFP-C1 y pET21-b que contienen Cdk5 (Oshima y col. 1995). El subclonamiento de Cdk5 en pET21-b se realizó digiriendo el vector y el fragmento de Cdk5 con BamHI, purificando las respectivas bandas, tratando los fragmentos con CIAP y luego ligando a temperatura ambiente. Se transformó DH5 α con la reacción de ligación y se aisló DNA a partir de las colonias resistentes a antibiótico que crecieron. Los resultados de la ligazón del fragmento de Cdk5 al plásmido pET21-b se corroboraron digiriendo el DNA plasmidial aislado con la enzima de restricción BamHI (Figura 4). La digestión dio como resultado un fragmento de 4.500 bp y otro fragmento de 880 bp, ambos del tamaño esperado.

Para realizar las reacciones de amplificación del plásmido completo por medio de PCR se utilizó un partidor mutagénico que lleva incorporado el cambio de nucleótido que genera el cambio de residuo Y15F y un partidor inverso que amplifica en sentido contrario la otra hebra, denominados Cdk5fwmutF y Cdk5rvmut respectivamente. Se utilizó la cepa *E. coli* DH5 α para transformar y seleccionar los plásmidos obtenidos como productos de PCR. La mutación fue confirmada mediante secuenciación y no indicó errores en la región que codifica Cdk5.

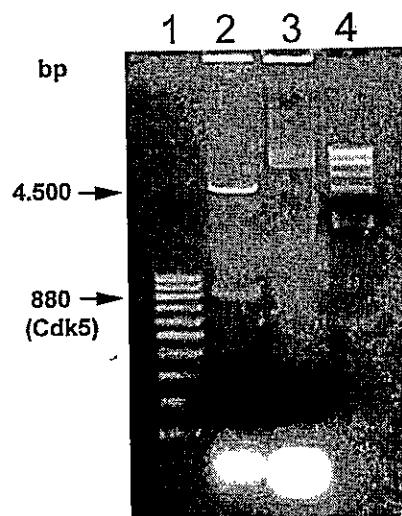


Figura 4. Subclonamiento de Cdk5 en pET21-b. Gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio; Carril 1: Estándar 100 bp; carril 2: DNA de Cdk5 subclonada en pET21-b digerida con BamHI para liberar el fragmento; carril 3: pET21-b-Cdk5 sin digerir; Carril 4: Lambda/HindIII.

Partidores utilizados en la mutagénesis:

Cdk5fwmutF: 5'-AGA TTG GGG AAG GCA CCT TCG GAA CTG TG-3' ²

Cdk5fwmutE: 5'-AGA TTG GGG AAG GCA CCT TCG GAA CTG TG-3'

Cdk5rvmut: 5'-GGT GCC TTC CCC AAT CTT TTC CAG TTT CTC-3'

² El cambio de codón para codificar una fenilalanina en lugar de una tirosina se muestra subrayado.

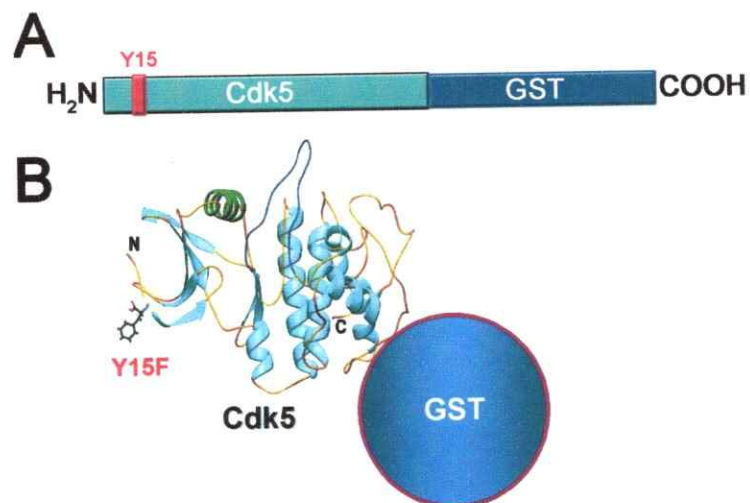


Figura 5. Esquema de la proteína de fusión Cdk5-GST. A. la quinasa Cdk5, indicando en rojo el residuo tirosina 15 en el extremo amino terminal. **B.** Se muestra esquema de la fusión de Cdk5Y15F con GST para su expresión y purificación a partir de extractos bacterianos.

Purificación de Cdk5 recombinante.

Los clones bacterianos de la cepa BL21 que expresan las proteínas de fusión p25-GST (en pGEX), Cdk5-GST wt, Cdk5Y15F-GST (Figuras 5 A y B) y Cdk5Y15E (en pET21-b) fueron crecidos 24 h a 37°C e inducidos con IPTG 1 mM por 4 h a 30°C, posteriormente las bacterias fueron centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos a 4°C. Los pellets obtenidos fueron resuspendidos en PBS y lisados mediante la adición de lisozima y sonicación. Luego se centrifugó y al sobrenadante se adicionó Glutatió-Sepharosa al 50% en una relación de 2 ml por cada 100 ml de cultivo bacteriano. La mezcla se incubó 2 h, se lavó con PBS y finalmente se eluyó con tampón de elución. Las proteínas recombinantes fueron enriquecidas por medio de un método de *batch* usando resina sepharosa con grupos GSH unidos en su matriz, de esta manera las proteínas fueron separadas por afinidad entre el dominio GST y la resina. La concentración de las proteínas fue determinada por medio del método de Bradford. Las

purificaciones fueron separadas en un SDS-PAGE. En el análisis del gel teñido con azul de coomasie, se observó proteínas de alto peso molecular, los cuales pueden ser agregados de la proteína de fusión que no se plegó correctamente. Además, se observó un bandeo de varias proteínas probablemente presentes en el extracto y que se unen de manera inespecífica a la sepharosa-GSH. Por otra parte, al comparar los eluidos de ambas proteínas, no se observó diferencias en el comportamiento electroforético entre la proteína wt y la mutante.

Ensayos de actividad de Cdk5 recombinante obtenida a partir de extractos bacterianos

Los ensayos actividad quinasa se realizaron en las condiciones indicadas en materiales y métodos utilizando histona H1 como sustrato. El ensayo fue realizado con Cdk5-GST wt, Cdk5Y15F-GST o Cdk5Y15E-GST en presencia o no de las proteínas recombinantes p35 y p25 fusionadas a GST (p35-GST, p25-GST) obtenidas en nuestro laboratorio. p25 es una forma truncada del activador p35 que posee mayor actividad y es detectado en abundancia en condiciones patológicas (Patrick y col., 1999).

La reacción fue detenida adicionando tampón de carga y posteriormente las proteínas fueron separadas en SDS-PAGE al 12 % y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron expuestas a una placa sensible a la radiación β para revelar la incorporación del grupo fosfato a la histona H1. Los resultados muestran que la actividad de Cdk5Y15F-GST está disminuida en comparación con la forma silvestre en aproximadamente un 30 % (n = 3). Además, se analizó el mutante Cdk5Y15E-GST, la cual mostró un aumento de su actividad en un 70 % sobre el wt (n = 2) (Figura 6).

Cabe destacar que en el ensayo control sin Cdk5 en la mezcla de la reacción, no se detecta fosforilación de histona H1, ni tampoco Cdk5 en el western blot. Este resultado fue consistentemente reproducible y no se realizó en el experimento mostrado en la figura 6.

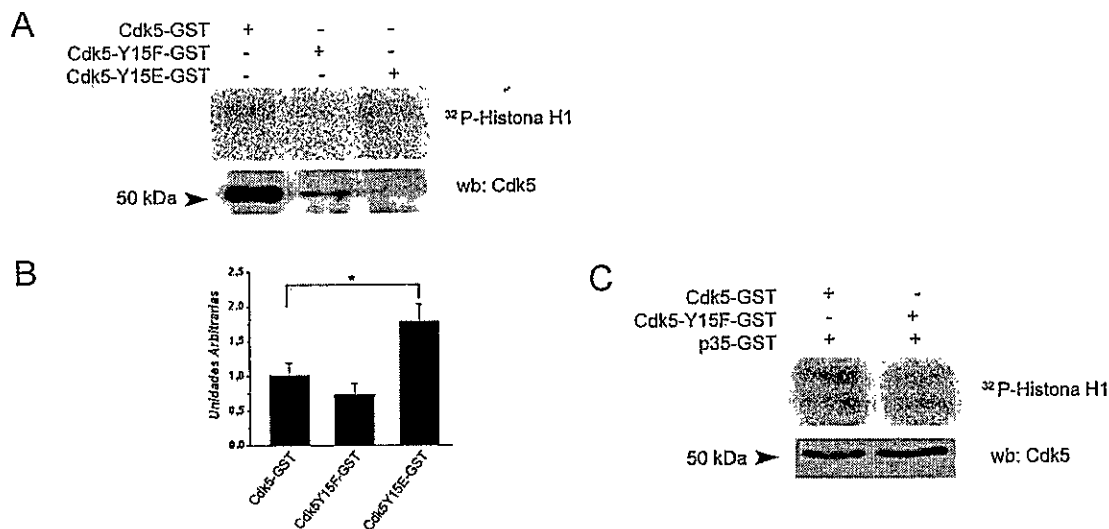


Figura 6. Actividad de Cdk5-GST y Cdk5Y15F-GST *in vitro*. El ensayo de actividad se realizó usando como sustrato histona H1 en las condiciones indicadas en métodos. Las reacciones se separaron en un SDS-PAGE 12% en condiciones denaturantes, luego fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La incorporación de ³²P fue detectada en un Phosphorimager (BioRad). Las mismas membranas fueron usadas para detectar los niveles de Cdk5 presentes en las reacciones mediante western blot. **A.** Los niveles de histona H1 fosforilada muestran que Cdk5Y15F-GST tiene una actividad menor que Cdk5-GST, (n = 3) y que Cdk5Y15E-GST tiene un nivel de actividad similar Cdk5-GST (n = 2). **B.** Cuantificación de la actividad de Cdk5-GST, Cdk5Y15F-GST y Cdk5Y15E-GST como fracción del control en unidades arbitrarias. Se observa que Cdk5Y15F-GST tiene tendencia a presentar niveles menores de actividad (70% del control), cambio que no es significativo según t-student, mientras que Cdk5Y15E-GST muestra mayor actividad (170 % del control), prueba t-student $p \leq 0,05$. Los valores corresponden a la media \pm SEM. **C.** Actividad de Cdk5-GST y Cdk5Y15F-GST en presencia de su activador p35. En estas condiciones el mutante Cdk5Y15F-GST tiene una actividad disminuida con respecto a Cdk5-GST.

La actividad de Cdk5 aumentó significativamente al incorporar el ácido glutámico en lugar de una tirosina en la posición 15 (mutación Cdk5-Y15E), lo cual indica que la fosforilación de éste residuo aumenta su actividad quinasa. Sin embargo, cuando sustituimos la tirosina por fenilalanina observamos una leve disminución que no es

estadísticamente significativa según t-student (ver Figura 6B). Una posible explicación es que la bacteria contiene quinasas con especificidad por residuos serina/treonina, que podrían estar fosforilando inespecíficamente a Cdk5-GST, Cdk5Y15F-GST y Cdk5Y15E-GST en estos residuos. En particular, se ha demostrado que la fosforilación en Ser159 de Cdk5 contribuye a aumentar su actividad quinasa (Sharma y col., 1999).

Efecto de la sobreexpresión de Cdk5-EYFP y Cdk5Y15F-EYFP en la morfología de células PC12

Decidimos investigar si la expresión de la forma mutada de Cdk5, tiene algún efecto en la morfología de células PC12. Para esto realizamos transfecciones transitorias en células PC12 de las proteínas Cdk5 y Cdk5Y15F fusionadas a la proteína fluorescente amarilla (EYFP) en el carboxilo terminal en el vector pEYFP (Figura 7). Mediante el análisis de la longitud y el número de neuritas que presentan las células PC12 transfectadas con las construcciones Cdk5-EYFP y Cdk5Y15F-EYFP, se estableció un criterio para evaluar la participación de Cdk5 en la morfología celular.

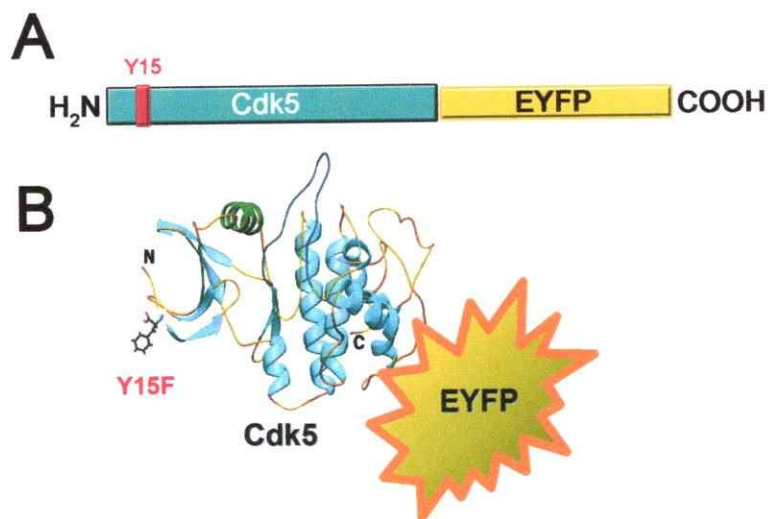


Figura 7. Esquema de la proteína de fusión Cdk5-EYFP. A. La quinasa Cdk5 se ha fusionado a través de su carboxilo terminal con la proteína fluorescente amarilla. **B.** Modelo de cintas de Cdk5 ilustrando la posición relativa de la proteína fluorescente amarilla respecto del sitio de interacción con p25 (PSAALRE, en verde) y la localización de la mutación puntual de la tirosina 15 por fenilalanina (Y15F).

El criterio para considerar una protrusión como neurita, fue que esta tuviese una longitud de 30 o más micrones de largo. Nuestros resultados muestran que al sobreexpresar Cdk5-EYFP por 48 h en células PC12, ocurre un cambio significativo en el número de neuritas totales (protrusiones $\geq 5 \mu\text{m}$ de largo) de las células PC12, sin embargo el largo total (\sum neuritas totales [μm]) permanece igual que el de las células transfectadas con EYFP (Figura 8). Sorprendentemente, la sobreexpresión de Cdk5Y15F-EYFP por 48 h en células PC12 también produjo un incremento significativo en el número de neuritas totales mientras el largo total se mantuvo sin cambios. El análisis morfométrico de la abundancia y largo de las neuritas se realizó en cinco series de 8 imágenes obtenidas en microscopio confocal. Para obtener mayor información acerca del fenotipo morfológico que presentaron las células en estudio se cuantificó los parámetros analizados, como se muestra en los gráficos (Figura 8).

Según estos resultados, la sobreexpresión de Cdk5 en las células PC12 induce un incremento en el número de neuritas independientemente de la posibilidad de fosforilación en tirosina 15 y el consecuente aumento de la actividad quinasa, sugiriendo que la fosforilación de Cdk5 en tirosina 15 no participa en el proceso de extensión de neuritas en esta línea neuronal. Por otra parte, los resultados evidencian que la sobreexpresión de cualquiera de estas formas de Cdk5-EYFP produce un aumento en el número de neuritas por célula y en el porcentaje de células que tienen neuritas, corroborando la participación de Cdk5 en procesos que tienen que ver con la mantención de un fenotipo neuronal diferenciado.

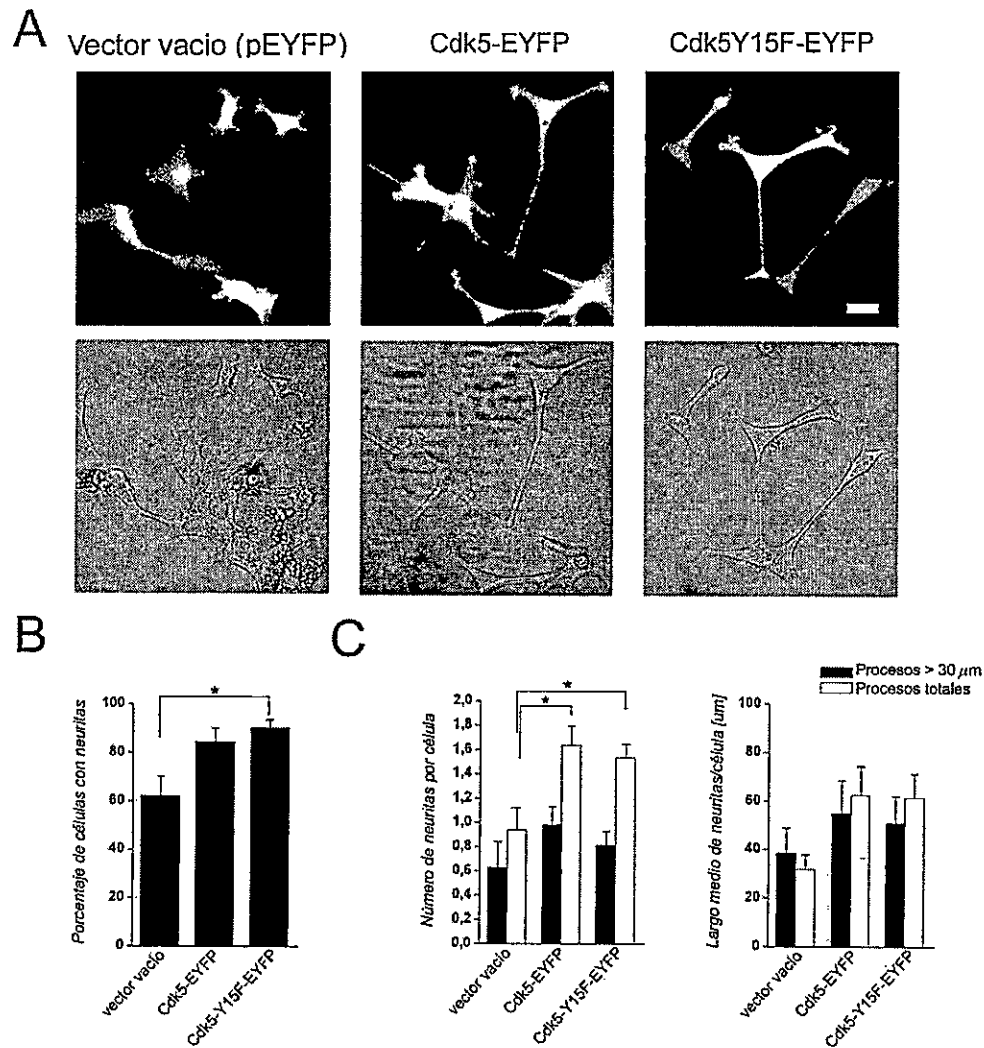


Figura 8. Morfología de células PC12 transfectadas con pEYFP, Cdk5-EYFP y Cdk5Y15F-EYFP. Las células PC12 fueron sembradas sobre cubreobjetos de vidrio en placas plásticas de 35 mm al 50% de confluencia. Las células se transfectaron y luego se mantuvieron por 48 horas antes de ser analizadas en el microscopio confocal. **A.** Las células fueron transfectadas con el vector pEYFP sin inserto que codifica para la proteína fluorescente amarilla, Cdk5-EYFP ó Cdk5Y15F-EYFP. Los paneles superiores muestran la fluorescencia de EYFP y en los paneles inferiores se muestra el contraste de fase. Las transfecciones de Cdk5-EYFP ó Cdk5Y15F-EYFP producen un aumento del número de neuritas por célula comparadas con el vector vacío, sin embargo el largo total de éstos no experimenta cambios significativos. Barra de escala, 20 μm. **B.** Cuantificación de parámetros morfológicos de células PC12 transfectadas con pEYFP, Cdk5-EYFP y Cdk5Y15F-EYFP. El gráfico muestra el porcentaje de células PC12 con neuritas de más de 30 μm de largo. Se puede observar que la fracción de neuronas que tienen neuritas aumenta levemente en las células PC12 transfectadas con ambas formas de Cdk5. **C.** Izquierda: cuantificación del número de neuritas de más de 30 μm de largo por célula (barras negras) y el número de neuritas totales (≥ 5 μm de largo) por célula (barras blancas). Derecha: cuantificación del largo neurítico (> 30 μm de largo) promedio por célula (barras negras) y el largo neurítico total (≥ 5 μm de largo) promedio por célula. n = 146 células, los valores corresponden a la media ± SEM. * p < 0,05 en el test de student con dos colas y tres grados de libertad.

Cabe destacar de estos resultados, que si bien la Cdk5Y15F-EYFP muestra menor actividad que la Cdk5-EYFP wt en ensayos de actividad quinasa *in vitro*, ésta mutación no tiene efectos en los parámetros morfológicos medidos como largo y número de procesos de la línea celular PC12.

Ensayos de viabilidad celular

En los cerebros de pacientes afectados con enfermedades neurodegenerativas como la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALS) o el Alzheimer, se produce un aumento de especies reactivas de oxígeno que portan los radicales libres responsables de producir daño oxidativo (Maccioni y col., 2001a). El estrés oxidativo tiene consecuencias dañinas para las neuronas expuestas y puede causar que éstas activen programas de muerte celular dañando importantes funciones cerebrales.

El papel de Cdk5 en procesos de muerte celular ha sido controversial hasta ahora. Se ha determinado que Cdk5 previene la muerte celular por apoptosis en células PC12, neuronas simpáticas y motoneuronas embrionarias a través de la inhibición indirecta de la fosforilación de JNK3 en la cascada de transducción de señales río abajo conducente a apoptosis (Li y col. 2002). En este contexto es importante hacer notar que Cdk5 regula los procesos de apoptosis que sufren los progenitores neuronales durante el desarrollo normal del sistema nervioso y en condiciones patológicas.

Para investigar la participación de Cdk5 en la respuesta al estrés oxidativo, células PC12 fueron transfectadas con la forma dominante negativa de Cdk5 y posteriormente fueron tratadas con H₂O₂, y se analizó el efecto sobre la viabilidad celular mediante

ensayos de MTT. Para este ensayo, las células PC12 fueron transfectadas durante 3 h, y 24 h después fueron tratadas con NGF 100 ng/ml. Se dejaron diferenciar durante 48 h y posteriormente se sometieron a estrés oxidativo adicionando al medio H_2O_2 100 μ M durante 20 min, este ensayo se realizó 5 veces (Figura 9).

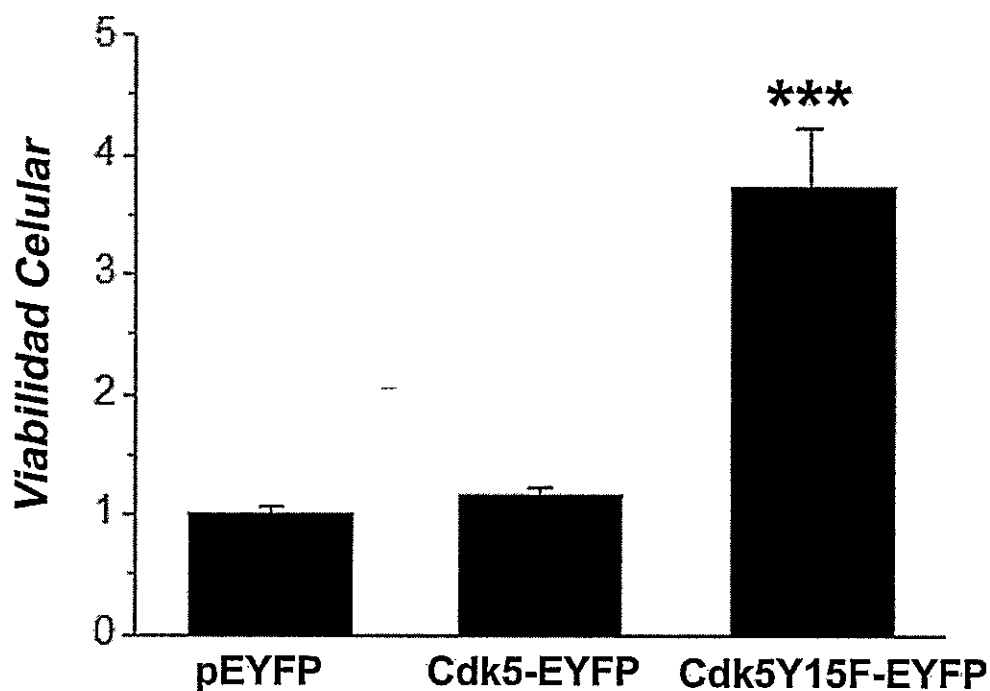


Figura 9. Viabilidad de células PC12 transfectadas con Cdk5-EYFP y Cdk5Y15F-EYFP. El gráfico muestra la fracción viable de células PC12 respecto del control. Las células fueron transfectadas con pEYFP, Cdk5-EYFP y Cdk5Y15F-EYFP, diferenciadas en presencia de NGF 100 ng/ml por 48 h y tratadas con peróxido de hidrógeno 100 pmol/ml por 20 min. Se realizó el ensayo de MTT a los lisados celulares y se cuantificó la reacción colorimétrica midiendo la absorbancia. Se puede observar que las células transfectadas con Cdk5 no presentan diferencias respecto de las células control transfectadas con el vector vacío, mientras que las células transfectadas con Cdk5Y15F-EYFP son significativamente más resistentes al daño por estrés oxidativo (casi un 300%). Los datos mostrados corresponden al promedio \pm SEM. * $p < 0,001$ $n = 5$.

El resultado del ensayo muestra que las células transfectadas con el dominante negativo Cdk5Y15F-EYFP presentan mayor viabilidad frente al estrés oxidativo, más de tres veces comparadas tanto con las células control transfectadas con el vector vacío pEYFP como con las células transfectadas con el vector que codifica para la forma wt de Cdk5 fusionada con EYFP (Figura 9).

DISCUSIÓN

En esta tesis hemos investigado aspectos específicos de la regulación de Cdk5, una quinasa que cumple importantes funciones en los mecanismos de migración, guía axonal y diferenciación neuronal en mamíferos. Específicamente se ha descrito su participación en estos eventos a través de la regulación de numerosos sustratos identificados tales como proteínas asociadas al citoesqueleto (tau, NF-M, NF-H, FAK), canales iónicos (NMDAR), proteínas relacionadas con exocitosis (munc-18, sinapsina I), y crecimiento (β -catenina), entre otras. Numerosos estudios previos han relacionado la desregulación de Cdk5 con procesos neurodegenerativos como en la enfermedad de Alzheimer y esclerosis lateral amiotrófica (Maccioni y col. 2001a).

La localización subcelular de la actividad de Cdk5 en neuronas está regulada por la presencia de sus activadores p39 y p35 y sus formas derivadas de procesamiento proteolítico p29 y p25 (Paglini et al., 1998). Además, su actividad es modulada por modificaciones post traduccionales como la fosforilación en la tirosina 15 de su amino terminal. La actividad de enzimas como Cdk5 las cuales mantienen el balance en la fosforilación de proteínas del citoesqueleto tales como tau y NF-H, se encuentra compartimentalizada en las neuronas de manera que la fosforilación de estas es mayor en el axón que en el soma. Sin embargo, en condiciones patológicas esta segregación se pierde y podemos encontrar tau y NF-H hiperfosforilados en los somas neuronales.

En esta tesis hemos investigado el papel de la fosforilación de tirosina 15 en la actividad quinasa de Cdk5 y cuál es su relevancia en los procesos de diferenciación y viabilidad neuronal. Los mutantes generados por PCR, en los cuales se sustituyó el

residuo tirosina 15 por fenilalanina (Y15F) y glutamato (Y15E), fueron utilizados en este estudio como dominante negativo y positivo de la fosforilación en este residuo. La caracterización de las actividades de estas formas mutantes se realizó en un sistema *in vitro* utilizando Cdk5 fusionada con GST (Cdk5-GST). Estas proteínas de fusión fueron expresadas en bacteria, purificadas y ensayadas en presencia o ausencia de p25-GST o p35-GST.

Estos ensayos indicaron que la forma Cdk5Y15F-GST es significativamente menos activa que la proteína nativa Cdk5-GST en un 30% (la cual se espera que esté defosforilada en el extracto bacteriano), por otra parte la mutante Y15E presentó mayor actividad, 70% más que Cdk5-GST. Curiosamente, las actividades fueron mayores en presencia de p35 que con p25, contrario a las publicaciones previas (Patrick y col., 1999). La purificación de las proteínas recombinantes se realizó por afinidad con una resina glutati6n sepharosa en *batch*, método mediante el cual se obtuvo un eluido enriquecido en las respectivas proteínas, pero no un alto porcentaje de pureza. El pobre nivel de pureza evidenciado en los geles de poliacrilamida teñidos con azul de coomasie (no mostrados), no es un impedimento para demostrar un cambio en la actividad de Cdk5. La forma silvestre de Cdk5-GST tiene un nivel de actividad relativo atribuible a la proteína recombinante, pues los ensayos de actividad con los extractos bacterianos sin Cdk5-GST no logran niveles detectables de fosforilaci6n por el método del ATP ³²γ. Los ensayos de actividad quinasa con la proteína Cdk5Y15F-GST indican una disminuci6n promedio de la actividad de un 30% respecto del control wt; a pesar de que esta disminuci6n no dio significativa en el test de student, la tendencia es clara, pues se observ6 en todos los experimentos. De manera similar, el mutante Cdk5-Y15E-GST present6 un aumento de actividad de un 70% respecto del control que no

fue significativo debido a la gran variabilidad de los valores, pero sin embargo con una clara tendencia. En los western blots realizados para normalizar la actividad quinasa, se observa que el comportamiento electroforético de las Cdk5 silvestres y mutantes fusionadas a GST es indistinguible, no obstante el cambio en su actividad.

Una vez determinado el efecto de la mutación Y15F sobre la actividad de Cdk5, nos interesó investigar si esta modificación tenía algún efecto en la morfología neuronal de las células PC12. Estas células de origen neuroendocrino tienen bajos niveles de expresión de Cdk5, por lo que constituyen un buen modelo para estudiar el efecto de Cdk5 exógena. Se utilizó Cdk5 fusionada a la proteína EYFP y Cdk5Y15F-EYFP con el objeto de visualizar aquellas células transfectadas por medio de la fluorescencia emitida por este reportero.

La proporción de neuronas con procesos aumentó significativamente cuando fueron transfectadas con Cdk5-EYFP ó Cdk5Y15F-EYFP comparadas con el vector vacío pEYFP (Figura 8B). Estos resultados sugieren que Cdk5 estaría participando en la inducción de la formación de procesos en las células PC12 de manera independiente de su fosforilación en tirosina 15. Si bien se demostró que la actividad de Cdk5Y15F-GST estaba disminuida con respecto a Cdk5-GST wt mediante ensayos de actividad quinasa, estos cambios no tienen un efecto en la inducción de una morfología de carácter neuronal según la medición de los parámetros de largo neurítico y número de procesos por célula PC12. Sin embargo, sería interesante evaluar los efectos de la sobreexpresión de Cdk5-EYFP ó Cdk5Y15F-EYFP en la diferenciación por privación de suero y/o tratamiento con NGF por 5 o más días tiempo en el cual las células PC12 desarrollan una morfología neuronal. Tampoco se incluyó una matriz de adhesión celular necesaria para proveer un sustrato para el crecimiento de los procesos.

Además resultados no publicados de nuestro laboratorio indican que la línea celular PC12 no es extremadamente sensible a una determinada concentración de Cdk5, sino en un rango que aumenta hasta diez veces la concentración de esta enzima.

Efectos de la sobreexpresión de Cdk5Y15F-YFP en la viabilidad de células PC12 sometidas a tratamientos con peróxido de hidrógeno.

Interesantemente, nuestros resultados sugieren que la fosforilación de Cdk5 en tirosina 15 participa en la determinación de la sobrevivencia neuronal. El ensayo de viabilidad neuronal realizado en células PC12 previamente transfectadas con las construcciones Cdk5-EYFP, muestran que la forma Cdk5Y15F-EYFP protege a las células PC12 de la muerte inducida por estrés oxidativo como en el caso de tratamiento con peróxido de hidrógeno.

Esto se correlaciona bien con la cascada de eventos descrita, en donde el estrés oxidativo producido por tratamientos con H_2O_2 activa a la quinasa c-Abl en osteoblastos (Li, 2005) y otros tipos celulares. Esta quinasa se encuentra río arriba de Cdk5, y en neuronas interactúan por medio del adaptador Cables permitiendo que c-Abl fosforile a Cdk5 en la tirosina 15 (Zukerberg y col., 2000).

De esta manera Cdk5 participa en la secuencia de eventos que conducen a la muerte neuronal, y adquiere sentido hecho de que las células PC12 transfectadas con Cdk5Y15F-EYFP aumentan su viabilidad frente a tratamientos con peróxido. En cuanto a lo que ocurre río abajo de Cdk5, se sabe que interactúa con p53 e incrementa su estabilidad mediante la fosforilación en Ser15, Ser33 y Ser46, induciendo un aumento de la actividad y la acumulación de p53 principalmente en el núcleo. Este efecto se ha observado en respuesta a estrés oxidativo producido por un dador de óxido nítrico. p53

estabilizada por Cdk5 es transcripcionalmente activa y resulta en la inducción de genes pro-apoptóticos y la subsiguiente apoptosis mediada por mitocondria en respuesta a estrés oxidativo (Lee y col. 2007).

De este modo hemos determinado que Cdk5, a través de su fosforilación en tirosina 15, participa en las vías de señalización que conducen a muerte en neuronas sometidas a tratamientos con peróxido de hidrógeno, pero no tiene un rol en los procesos de diferenciación en células PC12.

CONCLUSIÓN

En este trabajo investigamos el papel que cumple la fosforilación del residuo tirosina 15 de Cdk5 en su actividad, y ya que Cdk5 esta vinculada a cambios morfogénicos en la neurona, en el mantenimiento de una morfología neuronal y viabilidad celular en respuesta a tratamientos con peróxido de hidrógeno. La pregunta se abordó generando mutaciones puntuales en Cdk5, en las cuales se sustituyó la tirosina 15 por fenilalanina, produciendo así una quinasa no modificable mediante fosforilación en este residuo. Los ensayos de actividad quinasa *in vitro* realizados con la enzima recombinante, confirmaron que la actividad de Cdk5 es muy sensible a cambios en este residuo. La actividad enzimática del constructo Cdk5Y15F-GST está disminuida comparada con la enzima Cdk5-GST wt, indicando que este residuo cumple un papel regulador en la actividad quinasa de Cdk5.

Los resultados obtenidos en esta tesis nos permiten postular que la fosforilación de Cdk5 en tirosina 15 modifica la actividad de esta enzima, y que este cambio en la actividad quinasa no tiene una relación directa con los procesos crecimiento neurítico de las células PC12. Esto se desprende del análisis de los parámetros morfométricos de extensión de las neuritas y el número de procesos en células PC12 transfectadas con Cdk5-EYFP o Cdk5Y15F-EYFP mostrados en esta tesis.

Interesantemente, los ensayos de viabilidad celular sugieren que la fosforilación de la tirosina 15 de Cdk5 es importante en la sobrevivencia de las células PC12 sometidas a condiciones de daño neuronal como el estrés oxidativo causado por la exposición a

concentraciones nocivas de peróxido de hidrógeno. Así, un hallazgo de interés en esta tesis es que la variante mutada de Cdk5 confiere mayor resistencia a la acción de agentes promotores de daño neuronal como es el peróxido de hidrógeno, pero no tiene efectos sobre el desarrollo de neuritas en las células PC12.

BIBLIOGRAFÍA

Álvarez A., Toro R., Cáceres A., Maccioni RB. 1999. Inhibition of tau phosphorylating protein kinase Cdk5 prevents beta-amyloid-induced neuronal death. *FEBS Lett.* **459**: 421-426.

Álvarez A., Muñoz JP., Maccioni R.B. 2001. A Cdk5-p35 Stable Complex Is Involved in the β -Amyloid-Induced Deregulation of Cdk5 Activity in Hippocampal Neurons. *Experimental Cell Research* **264**: 266-274

Angelo M., Plattner F., Irvine E.E., Giese P. 2003. Improved reversal learning and altered fear conditioning in transgenic mice with regionally restricted p25 expression. *European Journal of Neuroscience* **18**: 423-431

Beffert U., Weeber EJ., Morfini G., Ko J., Brady ST., Tsai L-H, Sweatt JD., y Herz J. Joachim Herz. 2004. Reelin and Cyclin-Dependent Kinase 5-Dependent Signals Cooperate in Regulating Neuronal Migration and Synaptic Transmission. *The Journal of Neuroscience.* **24**:1897-1906.

Bibb J.A., Snyder G.L., Nishi A., Yan Z., Meijer L., Fienberg A.A., Tsai LH., Kwon Y.T., Giraultk JA, Czernik A.J., Huganir R.L., Hemmings H.C. Jr., Nairn A.C., Greengard P. 1999. Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 modulates dopamine signalling in neurons. *Nature* **402**:

Chergui K., Svenningsson P., Greengard P. 2004. Cyclin-dependent kinase 5 regulates dopaminergic and glutamatergic transmission in the striatum. *PNAS* **101**: 2191-2196

Cruz J.C., Tsai LH. 2004. A Jekyll and Hyde kinase: roles for Cdk5 in brain development and disease. *Current Opinion in Neurobiology* **14**:390-394

Gao CY., Stepp MA., Fariss R. y Zelenka P. 2004. Cdk5 regulates activation and localization of Src during corneal epithelial wound closure. *Journal of Cell Science* **117**: 4089-4098.

Farías GA., Muñoz JP., Garrido J y Maccioni RB. 2002. Tubulin, actin, and tau protein interactions and the study of their macromolecular assemblies. *Journal of Cellular Biochemistry*. **85**: 315-24.

Fischer A., Sananbenesi F., Schrick C., JSpiess J., Radulovic J. 2002. Cyclin-Dependent Kinase 5 Is Required for Associative Learning. *The Journal of Neuroscience* **22**: 3700-3707

Gupta A., Sanada K., Miyamoto D.T., Rovelstad S., Nadarajah B., Perlman A.L., Brunstrom J., Tsai LH. 2003. Layering defect in p35 deficiency is linked to improper neuronal-glia interaction in radial migration. *Nature Neuroscience* **6**: 1284-1291

Gupta A., Tsai LH. 2003. Cyclin-Dependent Kinase 5 and Neuronal Migration in the Neocortex. *Neurosignals* **12**:173-179

Hawasli AH., Benavides DR., Nguyen C., Kansy JW., Hayashi K., Chambon P., Greengard P., Powell CM., Cooper DC., y Bibb JA. 2007. Cyclin-Dependent Kinase 5 Governs Learning and Synaptic Plasticity Via Control of NMDA Degradation. *Nature Neuroscience* **7**: 880-886

Hirasawa M., Ohshima T., Takahashi S., Longenecker G., Honjo Y., Veeranna, Pant HC., Mikoshiba K., Brady R., y Kulkarni A. 2004. Perinatal abrogation of Cdk5 expression in brain results in neuronal migration defects. *PNAS*. **101**: 6249-6254.

Ko J., Humbert S., Bronson R.T., Takahashi S., Kulkarni A.B., Li E., Tsai LH. 2001. p35 and p39 Are Essential for Cyclin-Dependent Kinase 5 Function during Neurodevelopment. *The Journal of Neuroscience* **21**:6758–6771

Lee J-H., Kim H-S., Lee S-J. y Kim K-T. 2007. Stabilization and Activation of p53 induced by Cdk5 Contributes to Neuronal Cell Death. *Journal of Cell Science* **120**: 2259-2271.

Li B. 2005. c-Abl in oxidative stress, aging and cancer. *Cell Cycle*. **4**: 246-248.

Li B-S., Zhang L., Takahashi S., Ma W., Jaffe H., Kulkarni A. B. T Pant H. 2002. Cyclin-dependent kinase 5 prevents neuronal apoptosis by negative regulation of c-Jun N-terminal kinase 3. *The EMBO journal*. **21**: 324-333.

Lindskog M., Svenningsson P., Pozzi L., Kim Y., Fienberg A.A., Bibb J.A., Fredholm B.B., Nairn A.C., Greengard P., Fisone G. 2002. Involvement of DARPP-32 phosphorylation in the stimulant action of caffeine. *Nature* **418**.

Maccioni R.B., Muñoz JP., Barbeito L. 2001a. The Molecular Bases of Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders. *Archives of Medical Research* **32**: 367-381

Maccioni R.B., Otth C., Concha I.I., Muñoz JP. 2001b. The Protein Kinase Cdk5: Structural Aspects, roles in neurogenesis and involvement in Alzheimer's pathology. *Eur. J. Biochem* **268**: 1518-1527

Morabito MA., Sheng M. y Tsai LH. 2004. Cyclin-Dependent Kinase 5 Phosphorylates the N-Terminal Domain of the Postsynaptic Density Protein PSD-95 in Neurons. *The Journal of Neuroscience* **24**: 865-876.

Morgan D.O. 1997. Cyclin-Dependent Kinases: Engines, Clocks, and Microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**:261-91

Muñoz JP., Huichalaf C., Orellana D., Maccioni RB. 2007. Cdk5 Modulates β - and δ -Catenin/Pin1 Interactions in Neuronal Cells. *Journal of Cellular Biochemistry* **100**: 738-749.

Noble W., Olm V., Takata K., Casey E., O M., Meyerson J., Gaynor K., LaFrancois J., Wang L., Kondo T., Davies P., Burns M., Veeranna, Nixon R., Dickson D., Matsuoka Y.,

Ahlijanian M., Lau L.F., Duff K. 2003. Cdk5 Is a Key Factor in Tau Aggregation and Tangle Formation In Vivo. *Neuron* **38**: 555–565

Ohshima T., Nagle J.W., Pant H.C., Joshi J.B., Kozak C.A., Brady R.O., Kulkarni A.B. 1995. Molecular cloning and chromosomal mapping of the mouse cyclin-dependent kinase 5 gene. *Genomics*. **28**: 585-588.

Ohshima T., Hirasawa M., Tabata H., Mutoh T., Adachi T., Suzuki H., Saruta K., Iwasato T., Itohara S., Hashimoto M., Nakajima K., Ogawa M., Kulkarni A.B. y Mikoshiba K. 2007. Cdk5 is required for multipolar-to-bipolar transition during radial neuronal migration and proper dendrite development of pyramidal neurons in the cerebral cortex. *Development*. **134**: 2273-2282.

Paglini G., Pigino G., Kunda P., Morfina G., Maccioni R., Quiroga S., Ferreira A., Cáceres A. 1998. Evidence for the participation of the neuron-specific Cdk5 activator p35 during laminin-enhanced axonal growth. *The Journal of Neuroscience*. **18**: 9858-9869.

Paglini G. y Cáceres A. 2001. The role of the Cdk5/p35 kinase in neuronal development. *European Journal of Biochemistry*. **268**: 1528-1533.

Patrick GN., Zukerberg L., Nikolic M., de la Monte S., Dikkes P., Tsai LH. 1999. Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* **402**: 615–622.

Poon R.Y.C., Lew J., Hunter T. 1997. Identification of Functional Domains in the Neuronal Cdk5 Activator Protein. *The Journal of Biological Chemistry* **272**: 5703–5708.

Rashid T., Banerjee M., y Nikolic M. 2001. Phosphorylation of Pak1 by the p35/Cdk5 Kinase Affects Neuronal Morphology. *The Journal of Biological Chemistry*. **276**: 49043-49052.

Sahlgren C.M., Mikhailov A., Vaitinen S., Pallari HM., Kalimo H., Pant H.C., Eriksson J.E. 2003. Cdk5 Regulates the Organization of Nestin and Its Association with p35. *Molecular and Cellular Biology* **23**: 5090-5106

Tanaka T., Serneo F.F., Tseng HC., Kulkarni A.B., Tsai LH., Gleeson J.G. 2004. Cdk5 Phosphorylation of Doublecortin Ser297 Regulates Its Effect on Neuronal Migration. *Neuron* **41**: 215–227

Tarricone C., Dhavan R., Peng J., Areces L.B., Tsai LH., Musacchio A. 2001. Structure and Regulation of the CDK5-p25^{nck5a} Complex. *Molecular Cell* **8**: 657-669

Tomizawa K., Ohta J., Matsushita M., Moriwaki A., Li ST., Takei K. y Matsui H. 2003. Cdk5/p35 Regulates Neurotransmitter Release through Phosphorylation and Downregulation of P/Q-Type Voltage-Dependent Calcium Channel Activity. *The Journal of Neuroscience* **22**: 2590-2597.

Tomizawa K., Sunada S., Lu YF., Oda Y., Kinuta M., Ohshima T., Saito T., Wei FY., Matsushita M., Li ST., Tsutsui K., Hisanaga SI., Mikoshiba K., Takei K. y Matsui H.

2003. Cophosphorylation of amphiphysin I and dynamin I by Cdk5 regulates clathrin-mediated endocytosis of synaptic vesicles. *The Journal of Cell Biology* **163**: 813–824.

Ubeda M., Kemp D.M., Habener J.F. 2003. Glucose-Induced Expression of the Cyclin-Dependent Protein Kinase 5 Activator p35 Involved in Alzheimer's Disease Regulates Insulin Gene Transcription in Pancreatic Cells. *Endocrinology* **145**: 3023–3031

Ubersax J.A., Woodbury E.L., Quang P.N., Paraz M., Blethrow J.D., Shah K., Shokat K.M., Morgan D.O. 2003. Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature* **425**: 23–

Xie Z., Sanada K., Samuels B.A., Shih H., Tsai L.H. 2003. Serine 732 Phosphorylation of FAK by Cdk5 Is Important for Microtubule Organization, Nuclear Movement, and Neuronal Migration. *Cell* **114**: 469–482

Zambrano C. A., Egaña J. T., Núñez M. T., Maccioni R. B. y González-Billault C. (2004) Oxidative stress promotes tau dephosphorylation in neuronal cells. Role of Cdk5 and PP1. *Free Rad. Res. Med.* **36**: 1393-1402

Zukerberg L.R., Patrick G.N., Nikolic M., Humbert S., Wu C.L., Lanier L.M., Gertler B., Vidal M., Van Etten R.A., Tsai L.H. 2000. Cables links Cdk5 and c-Abl and facilitates Cdk5 tyrosine phosphorylation, kinase upregulation, and neurite outgrowth. *Neuron*. **26**: 633-646