

UCH-FC
DOC-BMEN
M843
C.1

**“Participación de p27 y Cdk5 en el proceso de
diferenciación neuronal”**

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

En cumplimiento parcial de los requisitos

Para optar al grado de

Doctor en Ciencias con Mención en Biología Molecular, Celular y
Neurociencias.

Facultad de Ciencias

Juan Pablo Muñoz Neculman

2004

Director de Tesis: Dr. Ricardo B. Maccioni

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Comisión de Postgrado de la facultad de Ciencias que la
Tesis de Doctorado Presentada por el candidato

Juan Pablo Muñoz Neculman

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito de
tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología
Molecular, Celular y Neurociencias en el examen de defensa de tesis rendido el
19 de Abril del año 2004.

Director de Tesis:

Dr. Ricardo B. Maccioni B.

Co-Director de Tesis:

Dr. Marco Tulio Nuñez

Comisión de evaluación de Tesis:

Dra. Maria Rosa Bono

Dr. José Chianale

Dr. Andrew Quest

The image shows three handwritten signatures in blue ink, each written over a horizontal line. The top signature is the most elaborate, with a large loop and a long horizontal stroke. The middle signature is more compact and cursive. The bottom signature is also cursive and appears to be written in a similar style to the middle one.

Dedicado a mis amados Padres

y a la mujer que amo

*Prefiera siempre aumentar sus aspiraciones en vez de sus recursos. Cuando usted tiene
mas aspiraciones que recursos, el resultado es la innovación. Pero, si tiene más
recursos que aspiraciones, nada nuevo sucede"*

C.K. Parhalad

"Tenemos que rechazar todo lo que nos limite"

Juan Salvador Gaviota

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco a mi tutor Prof. Dr. Ricardo B. Maccioni por su guía, apoyo y crítica durante el desarrollo de esta tesis y formación profesional.

Agradezco a mis compañeros y amigos del laboratorio, con los cuales compartí muy buenos momentos durante el transcurso de esta tesis, tanto en el ámbito profesional como del necesario esparcimiento.

Agradezco al gobierno de Chile por hacer posible el desarrollo científico de nuestro país, mediante iniciativas aventuradas y que demuestran gran confianza en la capacidad de creatividad e innovación de nuestros científicos.

Agradezco también a los miembros de mi comisión por sus comentarios y sugerencias durante el desarrollo de esta tesis.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

Este trabajo de tesis fue posible gracias al financiamiento proporcionado por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT) proyecto 1020155, Beca de Apoyo para la realización de Tesis de Doctorado de CONICYT e Iniciativa Científica Milenio MIDEPLAN, Instituto Milenio de estudios Avanzados CBB proyecto P99-031F.

INDICE DE MATERIAS

página

	INDICE DE MATERIAS.....	i
	INDICE DE ESQUEMAS FIGURAS.....	iv
	INDICE DE TABLAS.....	vi
	ABREVIATURAS.....	vii
1.	RESUMEN.....	1
	SUMMARY.....	3
2.	INTRODUCCIÓN.....	5
2.1.	Antecedentes generales.....	5
2.2.	Proteínas p27, c-myc y ciclina D1.....	7
2.3.	Cdk5/p35.....	10
2.3.1.	Regulación de Cdk5.....	11
2.4.	Funciones de Cdk5.....	13
2.4.1.	Cdk5 y diferenciación.....	13
2.4.2.	Cdk5 y migración neuronal.....	16
2.4.4.	Cdk5 y enfermedades neurodegenerativas.....	20
2.5.	Beta-catenina.....	21
2.5.1.	Beta-catenina y el sistema nervioso.....	24
2.6.	Delta-catenina.....	25
3.	HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....	28
3.1.	Hipótesis de Trabajo.....	28
3.2.	Objetivo general.....	28
3.3.	Objetivos específicos de la tesis.....	28

4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
4.1. MATERIALES.....	30
4.1.2. Material biológico.....	30
4.1.3. Reactivos.....	30
4.1.4. Reactivos y materiales para cultivo de células.....	30
4.1.5. Anticuerpos.....	31
4.1.6. Partidores.....	31
4.2. METODOS.....	32
4.2.1. Cultivo celular.....	32
4.2.2. Inmunoprecipitación.....	33
4.2.3. Ensayo de actividad quinasa.....	34
4.2.4. Tratamientos de termo estabilidad de p27.....	34
4.2.5. Inmunofluorescencia.....	35
4.2.6. RT-PCR.....	36
4.2.7. cDNA array.....	37
4.2.8. Transfección de células N2a.....	37
4.2.9. Mutaciones sitio-dirigidas.....	39
4.2.10. Purificación de proteínas recombinantes.....	39
4.2.11. Fraccionamiento subcelular de células de neuroblastoma N2a.....	41
5. RESULTADOS.....	42
5.1. Regulación de la proteína p27 en el proceso de diferenciación de células de neuroblastoma N2a.....	42
5.1.1. Niveles de p27 en neuroblastoma N2a sin diferenciar.....	42

5.1.2. p27 forma un complejo con ciclina D1 en células N2a sin diferenciar.....	48
5.1.3. Sobre-expresión de p27 en neuroblastoma N2a induce la formación de neuritas.....	49
5.1.4. Inhibición de la expresión de c-myc induce la formación de neuritas en células N2a.....	52
5.2. Regulación de Cdk5 en neuroblastoma N2a.....	57
5.3. Regulación de beta-catenina por el sistema Cdk5/p35.....	59
5.3.1 Distribución subcelular de Cdk5 y beta-catenina en el proceso de diferenciación celular.....	59
5.3.2. Fosforilación de beta-catenina por el sistema Cdk5/p35.....	60
5.4. Cdk5/p35 participa en la regulación de la proteína delta-catenina.....	65
5.4.1. Interacción de Cdk5 con delta-catenina en células neuronales.....	65
5.4.2. Fosforilación de delta-catenina por el sistema Cdk5/p35.....	70
6. DISCUSIÓN.....	74
6.1. Regulación de p27 en neuroblastoma N2a.....	74
6.2. Participación de Cdk5 en el proceso de diferenciación.....	77
6.3. Beta-catenina y Cdk5.....	81
6.4. Delta-catenina y Cdk5.....	85
7. BIBLIOGRAFÍA.....	94
8. ADDENDUM.....	116

INDICE DE ESQUEMAS Y FIGURAS.

Esquema 1.	Cdk5 es clave en procesos de migración neuronal, axonogénesis y guía neuronal.....	15
Esquema 2.	Migración anormal de los ratones knockout para Cdk5 ^{-/-} y p35 ^{-/-}	18
Figura 1.	Niveles de la proteína p27 en células de neuroblastoma N2A.....	44
Figura 2:	Cambios de expresión del transcrito de p27 en neuroblastoma N2A diferenciados con dbt-cAMP.....	45
Figura 3.	Recambio de la proteína p27 en células de neuroblastoma N2a.....	47
Figura 4.	Interacción de p27 con Ciclina D1 en células N2A.....	50
Figura 5.	Expresión de p27 induce la neuritogénesis de células N2A.....	51
Figura 6.	Niveles de c-myc en células de neuroblastoma N2A.	54
Figura 7.	Inhibición de la expresión de c-myc induce la Neuritogénesis de células N2A.....	55
Figura 8.	Inhibición de la expresión de ciclina D1 en células de neuroblastoma N2a.....	56
Figura 9.	Expresión de Cdk5 en células N2a diferenciadas con dbt-cAMP.....	58
Figura 10.	Interacción de beta-catenina con la quinasa Cdk5.....	63

Figura 11.	Identificación de aminoácidos fosforilados por Cdk5/p35 en beta-catenina.....	64
Figura 12.	Expresión y localización de delta-catenina en células neuronales.....	67
Figura 13.	Interacción de Cdk5/p35 con delta-catenina.....	68
Figura 14.	p35 interactúa con el dominio ARM de delta-catenina.....	71
Figura 15.	Regulación de delta-catenina por el sistema Cdk5/p35 en células N2A.....	72
Figura 16.	Ensayo de actividad quinasa utilizando delta-catenina como sustrato de Cdk5.....	73
Figura 17.	Esquema integrativo de eventos que transcurren en la diferenciación de neuroblastoma N2A.....	90

INDICE DE TABLAS.

TABLA 1.	Análisis de los cambios de expresión génica en células de neuroblastoma N2a diferenciadas con dbt-cAMP por 24 y 48 hrs.....	91
-----------------	---	----

ABREVIATURAS.

Cdk's	quinasas dependientes de ciclina.
cDNA	DNA complementario.
dATP	desoxiadenosina trifosfato.
DTT	ditiotreitól.
E. coli	Escherichia coli.
EDTA	ácido etilendiaminotetracético.
g	gramos.
M	molar.
min	minuto.
ml	mililitro.
mRNA	ácido ribonucleico mensajero.
N2a	Neuroblastoma de ratón
ng	nanogramo.
OD	densidad óptica.
PCR	reacción en cadena de la polimerasa.
RNA	ácido ribonucleico.
RNA poli(A+)	RNA poliadenilado.
rpm	revoluciones por minuto.
RT-PCR	reacción de transcripción reversa acoplada a PCR.
seg	segundo.
Taq pol	DNA polimerasa de Thermous aquaticus.

1. RESUMEN

Esta tesis se orienta a investigar diferentes aspectos moleculares que participan en procesos de diferenciación neuronal. En este contexto, enfocamos nuestro estudio principalmente a la proteína p27, un regulador de la actividad de las Cdk's del ciclo celular, y a la quinasa dependiente de ciclina, Cdk5, que participa directamente en la diferenciación celular. Los estudios fueron complementados con un análisis de las interacciones regulatorias entre este sistema con beta y delta-catenina.

La proteína p27 se asocia a los complejos Cdk/ciclina e inhibe su actividad, de este modo participa en la detención del ciclo celular y posterior diferenciación. Utilizando células de neuroblastoma N2a como modelo hemos investigado los mecanismos que regulan la transición desde un estado sin diferenciar a uno diferenciado con dibutilil-cAMP. En esta investigación observamos niveles elevados de la proteína p27 en células N2a sin diferenciar. Además, experimentos de co-inmunoprecipitación demostraron la asociación de p27 a ciclina D1 en estas células. Por otra parte, ensayos de termo estabilidad de p27 sugieren que esta proteína no posee modificaciones estructurales en las células N2a sin diferenciar que alteren su actividad inhibitoria.

En las células de neuroblastoma N2a inducidas a diferenciarse con dibutilil-cAMP se produjo un rápido descenso de los niveles de las proteínas p27 y ciclina D1. Posteriormente en estados diferenciados, se observó que p27 es sintetizada nuevamente para ejercer su actividad inhibitoria de las Cdk's del ciclo celular.

Por medio de estudios de co-inmunoprecipitación demostramos que la proteína ciclina D1 se asocia a la quinasa dependiente de ciclina Cdk5, asociación

que podría estar implicada en la ausencia de actividad de Cdk5 en células sin diferenciar. Al iniciarse el proceso de diferenciación neuronal, por una parte Cdk5 incrementa su expresión, y por otra su fosforilación endógena en tirosina 15. Una vez activa, esta quinasa participa en la regulación de proteínas implicadas directamente en los cambios celulares durante la diferenciación.

Beta-catenina es una proteína que interactúa con caderinas y forma complejos macromoleculares que participan en la adhesión celular. En esta tesis, logramos identificar la interacción y fosforilación de beta-catenina por el sistema Cdk5/p35. Uno de los aminoácidos fosforilados en beta-catenina por Cdk5 es serina 246, modificación que podría contribuir a los cambios de distribución de esta proteína. Además, observamos que el complejo Cdk5/p35 se asocia y fosforila a delta-catenina, una proteína localizada en el soma y dendritas de células nerviosas. Estas observaciones sugieren un mecanismo de regulación de beta y delta-catenina por Cdk5/p35, en el cual esta quinasa regularía cambios de distribución y degradación de estas proteínas en el proceso de diferenciación neuronal.

SUMMARY.

This thesis project sought to analyze molecular aspects associated with neuronal differentiation. The study focused mainly on protein p27, a cell cycle Cdk regulator, and the cyclin dependent kinase, Cdk5 that is involved in cellular differentiation. These studies were complemented by an analysis of the regulatory interactions of this kinase system with beta and delta-catenin.

The p27 protein is associated with the Cdk/cyclin complex thereby decreasing its activity and promoting cell cycle arrest as well as subsequent differentiation. Using the N2a neuroblastoma cell line as a model, mechanisms that regulate the transition from an undifferentiated to a differentiated phenotype in response to dibutyryl-cAMP were analyzed. Elevated levels of the protein p27 were detected in undifferentiated N2a cells. In addition, co-immunoprecipitation studies identified an association between p27 and cyclin D1 in these cells. On the other hand, thermostability assays of p27 suggest that this protein does not have structural modifications in undifferentiated N2a cells that could affect his inhibitory activity.

In neuroblastoma N2a cells induced to differentiate with dibutyryl-cAMP, a rapid decrease in the levels of p27 and cyclin D1 proteins was observed. Later on during N2a differentiation, re-synthesis of p27 protein was detected those was suggested to inhibit cell cycle Cdk activity.

In co-immunoprecipitation studies, we demonstrated that the cyclin D1 is associated with cyclin dependent kinase, Cdk5, and this interaction is associated with the loss of Cdk5 activity in undifferentiated cells. When neuronal differentiation is initiated, Cdk5 expression increases concomitant with phosphorylation on tyrosine 15.

This increase in Cdk5 activity is directly linked to initiation of processes required for differentiation.

Beta-catenin is a protein that interacts with cadherins and forms macromolecular complexes that participate in cellular adhesion. Experiment described here show β -catenin association with the Cdk5/p35 complex and is subsequently phosphorylated. Serine 246 of beta-catenin is a Cdk5 phosphorylation site, is suggested to play a role in controlling intracellular distribution of β -catenin. In addition, delta-catenin was associated with the Cdk5/p35 complex. This protein localizes to soma and dendrites of neurons. Association with the Cdk5/p35 thought to promote delta catenin phosphorylation.

Taken together these observations favor a model in which beta and delta-catenin distribution and degradation regulated by Cdk5/p35. In doing so, kinase is proposed to control the sequence of events leading to differentiation of N2a neuroblastoma cells.

2. INTRODUCCIÓN.

2.1. Antecedentes generales.

Los eventos de comunicación intracelular son de gran trascendencia en los diferentes tipos celulares, siendo el sistema nervioso un notable modelo de estudio. Este posee una complejidad y particularidad debido a la heterogeneidad de poblaciones celulares presentes en regiones específicas del cerebro. El estudio de los procesos que regulan la diferenciación de un neuroblasto a una neurona ha cobrado una gran importancia en la biología actual, debido al conjunto de cambios que ocurren en la transición desde un estado proliferativo a uno bioquímica y morfológicamente diferenciado.

Por otra parte, los mecanismos que regulan la función cerebral, implican un conjunto de factores que actúan en forma coordinada para mantener la homeostasis de las diferentes poblaciones de células neuronales. Existe una fina regulación de los procesos involucrados en la transmisión nerviosa y señalización celular en áreas específicas del cerebro. De este modo, es de gran relevancia investigar cuales son las funciones claves que se llevan a cabo en una célula neuronal, tanto en el marco de los mecanismos de polaridad celular, guía axonal, diferenciación y migración neuronal.

El proceso de neurogenesis contempla tanto la proliferación celular, la detención del ciclo celular y la posterior diferenciación de las células del sistema nervioso. La proliferación de los neuroblastos determina el tamaño de las diferentes regiones del sistema nervioso, por ejemplo, cuando la expresión de ciclina D1 es bloqueada en el tejido nervioso, la región cerebelar presenta defectos en la

proliferación celular (Fantl y cols., 1995; Huard y cols., 1999). Además, el bloqueo de proteínas inhibidoras del ciclo celular, tales como p21 y p27 o la sobre-expresión de beta-catenina, un transactivador de ciclina D1, originan el aumento del tamaño cerebral (Fero y cols., 1996; Chenn y McConnell, 1995).

Existen grandes incógnitas sobre como los componentes del ciclo celular se expresan y activan en diferentes regiones del cerebro, así como también sobre su papel en la regulación del número de ciclos celulares necesarios para desarrollar un área cerebral determinada (Cremisi y cols., 2003).

Por otro lado, la regulación del ciclo celular y de la diferenciación tanto en el espacio como en el tiempo en que los neuroblastos comienzan a diferenciarse parece ser de relevancia en el contexto del desarrollo. Un experimento bastante interesante ilustra la importancia del ciclo celular en la diferenciación neuronal. Células progenitoras de neuronas corticales de ratón, que son transplantadas en el cerebro de animales viejos, se diferencian en concordancia con medio celular en que fueron transplantadas (McConnell y Kaznowski, 1991). Pero solo se observaron estos resultados en células progenitoras en fase G1 o S del ciclo celular, aquellas transplantadas en fase M no se diferenciaban (McConnell y Kjaznowski, 1991). También se han descritos factores celulares intrínsecos que poseen elevados niveles en ciertas etapas del ciclo celular. Por ejemplo, el caso de las células de la retina de ratón, donde el factor de transcripción Prox1, crucial para la formación de las células horizontales de la retina, se expresa en altos niveles en la fase G2 del ciclo celular (Dyer y cols., 2003).

Las neuronas maduras no pueden entrar al ciclo celular y dividirse, por lo cual daños en el cerebro son devastadores en el funcionamiento del sistema nervioso. Diversas investigaciones han demostrado la existencia de células madre en áreas del cerebro adulto. Entre estas encontramos, la zona subventricular, giro dentado del hipocampo y algunas regiones de la retina (Gage y cols., 2000; Sommer y Rao, 2002). Estas células mantienen su naturaleza bajo precisos mecanismos de regulación. Ciclinas y Cdk's de estas células se expresan en niveles inferiores a los observados en retinoblastos en división (Ohnuma y cols., 2002). Por otra parte, las células madres están localizadas en regiones específicas, que parecieran mantener su naturaleza multipotencial (Weiss y cols., 1996; Martens y col., 2000; Doetsch y col., 2002). De este modo, la fase del ciclo celular en que se encuentre un neuroblasto es importante para inducir los mecanismos de diferenciación.

2.2. Proteínas p27, c-myc y ciclina D1.

La actividad de un conjunto de proteínas tales como Cdk's y sus reguladores son controlados tanto espacial y temporalmente para promover los cambios celulares durante el ciclo celular de una célula no diferenciada (Nakagawara y cols., 1998). El mecanismo de división celular necesita de varias proteínas quinasas y sus activadores, los cuales son necesarios para que el ciclo celular proceda. La función de estas proteínas quinasas es modulada por señales tales como, cambios de expresión, modificaciones postraduccionales e interacción proteína-proteína (Murray, 2004). Por otra parte la dilucidación de los factores reguladores implicados en la detención del ciclo celular, parece ser de gran importancia para comprender las

anormalidades celulares implicadas en la patogénesis del cáncer (Li y Sun, 1998; Krimpenfort y cols., 2001; Nigg y cols., 2001).

Una de las proteínas de relevancia en la regulación del ciclo celular es p27, un inhibidor de un amplio espectro de complejos Cdk's/ciclina que participan en el ciclo celular. El factor p27 participa en la inhibición de Cdk 1, 2, 4, 6 asociados a ciclinas A, E o D (Toyoshima y cols., 1994; Nomura y cols., 1997; Bastians y cols., 1998; Vidal y Koff, 2000). La inhibición del complejo Cdk2/ciclina E por p27 es un proceso importante en la transición de la fase G1 a S del ciclo celular (Zetterberg y cols., 1995; Hu y cols., 1999; Hulleman y cols., 1999). Además, la sobre-expresión de p27 produce la detención del ciclo celular en G1 (Poliak y cols., 1994). Por otra parte ratones *knockout* en p27 son viables, pero presentan anomalías en su desarrollo. Se encontró que la mayor parte de los órganos de estos animales son de mayor tamaño, posiblemente porque presentan un mayor número de ciclos de división, previos a la diferenciación. Además, éstos animales tienden a formar tumores (Kiyokawa y cols., 1996; Fero y cols., 1996; Lloyd y cols., 1999; Bergmann y cols., 2001).

Diversas investigaciones han mostrado que p27 incrementa su expresión en células que son inducidas a su diferenciación (Perez-Juste y Aranda, 1999; Matsuo y cols., 2001). La proteína p27 está también implicada en la diferenciación de células del lente ocular, placenta, pulmón y neuronas (Zhang y col., 1998; Ohnuma., 2003).

Tanto la proteína p27, como otras proteínas del ciclo celular, tales como ciclinas, parecen tener un rol importante en el desarrollo del sistema nervioso. Los ratones *knockout* de p27 desarrollan cerebros con mayor tamaño, pero algunas regiones tienden a ser más grandes que otras, este efecto puede tener relación con

la expresión específica de ciertos componentes de la maquinaria del ciclo celular en diferentes regiones del cerebro (Nakayama y cols., 1996; Fero y cols., 1996). Un ejemplo de esta situación es la expresión de ciclina D1 en cerebro de ratón. La expresión de esta proteína está restringida al la retina y el cerebelo (Fanti y cols., 1995; Huard y cols., 1999). Además, ratones *knockout* de ciclina D1 muestran alteraciones en la proliferación de la región retinal y cerebelar (Fanti y cols., 1995; Huard y cols., 1999).

En células progenitoras gliales, p27 incrementa gradualmente su expresión y cuando alcanza niveles suficientemente altos para detener el ciclo celular, se origina la diferenciación hacia oligodendrocitos (Ohnuma y cols., 1997; Durand y Raff., 2000). Por otra parte, en el desarrollo del sistema nervioso de *Xenopus*, la proteína p27Xic1, un homólogo de p27 de mamífero, presenta elevados niveles de expresión en los progenitores neuronales, en cambio al inhibir su expresión se previene la diferenciación de estas neuronas (Vernon y cols., 2003).

Una observación bastante interesante es la participación de p27Xic1 en la formación de células gliales, donde se ha demostrado que p27 participaría tanto en la detención del ciclo celular como en la diferenciación de éstas células gliales (Ohnuma y cols., 1999). Mas aún, p27 sería una proteína bifuncional, con un dominio responsable de la inhibición de la actividad quinasa, y otro de la inducción de la diferenciación glial (Ohnuma y cols., 1999).

Adicionalmente, se ha demostrado una relación entre los cambios de expresión del oncogen c-myc y de p27 (Vlach y cols., 1996; Mateyak y cols., 1999). La disminución de la expresión de c-myc esta relacionado con incrementos de la expresión de p27, en la detención del ciclo celular (Vlach y cols., 1996; Bergmann y

cols., 2001). Algunas evidencias indican que c-myc activa la expresión de proteínas que están implicadas en el secuestro y degradación de p27 (Bouchard y cols., 1999; O'Hagan y cols., 2000). Esta relación parece ser de gran importancia y ha sido un aspecto de atención en esta tesis, ya que incrementos de la expresión de c-myc originan descensos en los niveles de p27 en células tumorales (D'Agnano y cols., 2001).

Diferentes laboratorios han demostrado que complejos de Cdk4, Cdk6 y ciclina D1 participan de forma no catalítica en la progresión de la fase G1 del ciclo celular, secuestrando los inhibidores del ciclo, p21 y p27. De este modo, se previene su participación en el bloqueo de la actividad del complejo Cdk2/ciclina E (Perez-Roger y cols., 1999; O'Brien y cols., 2001). Así, la expresión de ciclina D1 en células que no se encuentran diferenciadas tendría una función dual, controlando por una parte la actividad de las quinasas Cdk4 y Cdk6, y por otra a la proteína inhibidora p27 (Polyak y cols., 1994; Perez-Roger y cols., 1999; O'Brien y cols., 2001).

Tanto ciclina D1 como c-myc son reguladas transcripcionalmente por el sistema beta-catenina TCF/LEF (He y cols., 1998; Tetsu y cols., 1999). La expresión de estas proteínas esta relacionada con un incremento en la proliferación y en el control de la forma celular (Galderisi y col., 2003).

2.3. Cdk5/p35.

Cdk5 es una serina-treonina quinasa dirigida por prolina, que se expresa en células diferenciadas, tales como neuronas, músculo, células sanguíneas, células germinales masculinas y células del lente óptico (Chen y Studzinski., 2001; Lazaro y cols., 1997; Godert y cols., 2003; Hirooka y cols., 1996, Hellmich y cols., 1992). Su

función es clave en eventos de migración y diferenciación de neuronas, además de un conjunto de procesos que regulan la plasticidad neuronal (Maccioni y cols., 2001a, 2001b).

Esta enzima fosforila proteínas que participan en la organización del citoesqueleto, tales como, MAP1b, tau, neurofilamentos, Pak 1, filamina, además de proteínas de las vesículas sinápticas, proteínas asociadas a la adhesión celular y transporte intracelular (Humbert y cols., 2000; Pigo y cols., 1997; Kobayashi y cols., 1993; Shuang y cols., 1998; Shetty y cols., 1995). Originalmente se pensaba que el papel de esta quinasa era exclusivo de los procesos regulatorios del sistema nervioso, pero recientes descubrimientos han determinado que posee importancia en la diferenciación de células no neuronales (Chen y Studzinski., 2001; Lazaro y cols., 1997).

2.3.1. Regulación de Cdk5.

La regulación de Cdk5 esta gobernada por interacción proteína-proteína con p39, p35 y p25, una forma truncada de p35 (Tsai y cols., 1996). La proteína p35 es el activador mejor estudiado, conformada por 307 aminoácidos, posee dos regiones con funciones específicas, la región NH₂-terminal, p10, de 98 aminoácidos, y la región C-terminal truncada de 209 aminoácidos, denominada p25 (Patrick y cols., 1998; Tang y cols., 1997).

La región p10 contiene una señal de miristoilación que es crucial para la unión de p35 a la membrana plasmática. Además, este segmento de la proteína contiene la señal de degradación por el proteosoma (Patrick y cols., 1999). El segmento p25

contiene una región rica en prolina y el dominio de interacción con Cdk5 necesario para la activación de esta quinasa (Tang y cols., 1997).

Tanto p35 como p39 no poseen una homología de secuencia significativa con las ciclinas de ciclo celular, tales como ciclina A o E. Sin embargo, se ha demostrado un alto grado de semejanza en la estructura terciaria con ciclina A (Tang y cols., 1997). Mediante el análisis estructural de estas proteínas se ha planteado que en forma similar al complejo Cdk1/ ciclina A, un dominio PSSARE de Cdk5 participaría en la interacción con p35 (Tsai y cols., 1996; Humbert y cols., 2000; Kusakawa y cols 2000; Patrick y cols., 1998).

Estudios de cristalografía han revelado que el complejo formado por la interacción directa de p25 con Cdk5, adopta una conformación indistinguible de sus homólogos del ciclo celular Cdk1/ciclina A. Además, se ha descrito que la fosforilación endógena de Cdk5 en los residuos de tirosina 15 y serina 159, regulan la actividad de la quinasa en forma positiva (Zukerberg y cols., 2000; Tarricone y cols., 2001; Sharma y cols., 1999).

El efecto de la fosforilación en tirosina 15 sobre Cdk5 presenta rasgos únicos, ya que diversas investigaciones han demostrado que en Cdk's convencionales, esta modificación postraducciona l inhibe la actividad quinasa, en tanto que la fosforilación de Cdk5 incrementa su actividad enzimática. De este modo, surge gran interés en la investigación de este proceso, ya que parece ser crucial en el desarrollo neuronal (Zukerberg y cols., 2000; Sharma y cols., 1999). La exclusiva expresión de los activadores de Cdk5, p35 y p39, en células en proceso de diferenciación y la corta vida media de estas proteínas son un paso limitante en el control de la actividad de

Cdk5. De esta forma la especificidad del sustrato y localización es regulada con mucha precisión en estas proteínas (Humbert y cols., 2000; Patrick y cols., 1998).

2.4. Funciones de Cdk5.

2.4.1. Cdk5 y diferenciación.

La proteína Cdk5 es ubicua, en cambio sus activadores p35 y p39 solo se expresan en células que se están diferenciando. Se ha demostrado que p35 se expresa en células neuronales, células germinales masculinas y femeninas, miocitos y células sanguíneas en diferenciación (Lazaro y cols., 1997; Godet y cols., 2003; Lee y cols., 2004).

Estudios de inhibición de la expresión de Cdk5 utilizando oligonucleótidos antisentido indican que éstos causan la disminución en la formación de neuritas en macroneuronas (Pigino y cols., 1997). Adicionalmente la transfección de un plasmidio que codifica para un dominante negativo de Cdk5 en su actividad quinasa, produce un efecto similar (Paglini y cols., 1998).

Al sobre-expresar p35 o Cdk5, se produce la inducción del crecimiento neurítico. Además tanto GDNF y Semaforina 3A activan Cdk5 e inducen el crecimiento neurítico. Este proceso está asociado a la actividad de Cdk5 sobre la dinámica del citoesqueleto de actina y el ensamblaje de los microtúbulos (Sasaki y cols., 2002; Ledda y cols., 2002).

En las neuronas, el sistema Cdk5/p35 es un modulador de Rac1, una GTPasa implicada en el crecimiento de neuritas, migración neuronal, facilitación axonal y

"axonal pathfinding" (Nickolic y cols., 1998; Rashid y cols., 2001; Nickolic y cols., 2002).

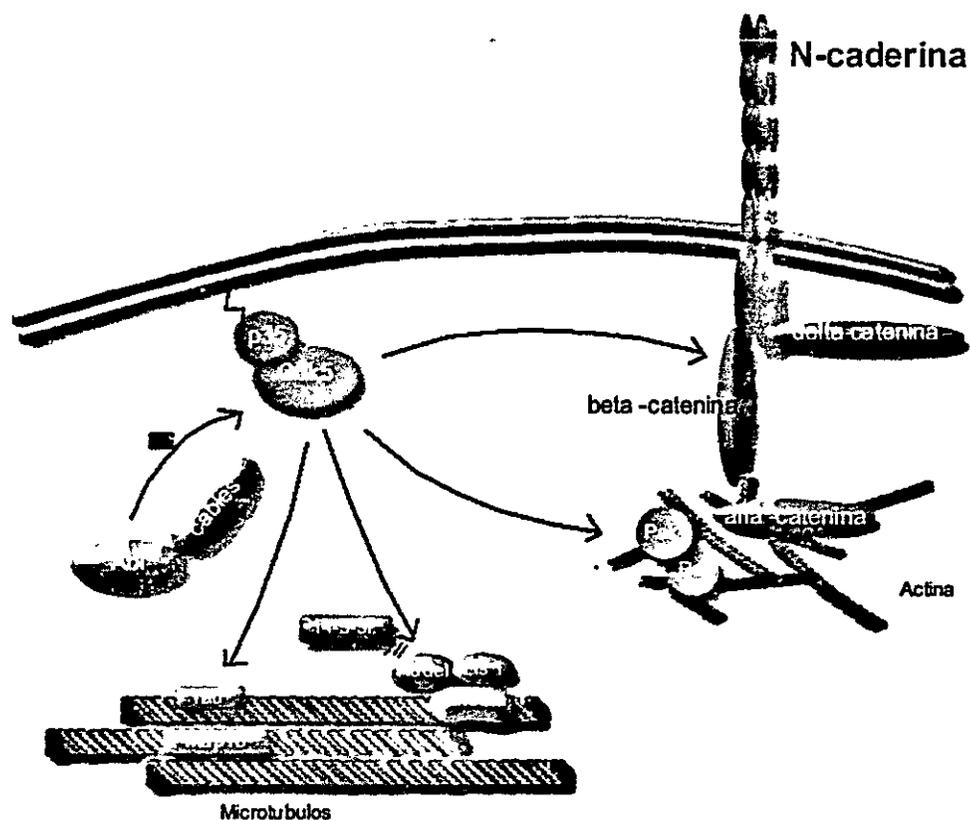
El sistema Cdk5/p35 interactúa con Rac1 en su forma activa, y de ese modo fosforila y regula negativamente Pak1, una serina-treonina quinasa que participa en la reorganización del citoesqueleto de actina (Nickolic y cols., 1998; Mendoza y cols., datos no publicados). Adicionalmente Pak1 activa Abl una tirosina quinasa que fosforila Cdk5 en tirosina 15 y produce el incremento en su actividad (Nickolic y cols., 1998). De esta forma se produce un sistema de regulación por retroalimentación negativa en el cual incrementos de actividad de Pak1 son regulados negativamente por Cdk5 (Nickolic y cols., 1998).

La formación de neuritas implica tanto la reorganización de actina como de los microtúbulos, es un proceso que contribuye a los cambios de plasticidad neuronal necesarios para la formación de lamelipodios y filopodios. Cdk5, al parecer contribuiría a coordinar la reorganización del citoesqueleto, regulando proteínas que participan en la organización del citoesqueleto de actina, tales como beta-catenina, Pak1, Rac1 y proteínas reguladoras de la dinámica de microtúbulos, como son la tau y Map1b (Kobayashi y cols., 1993; Hosoi y cols., 1995; Nickolic y cols., 1998; Humbert y cols., 2000; Zhong y cols., 2003).

Los isotipos de tau forman parte importante de la regulación de la plasticidad del citoesqueleto. Esta proteína sufre distintas fosforilaciones por Cdk5 en epítomos específicos que participan en la regulación de la interacción con los microtúbulos (Kobayashi y cols., 1993; Muñoz y cols., 2000; Maccioni y cols., 2001).

La proteína tau es clave durante la formación de neuritas en la diferenciación de neuroblastoma, donde participa en la estabilización de microtúbulos y modulación de la plasticidad celular (Trincsek y cols., 1995; Saragoni y cols., 2000).

Adicionalmente, los ratones deficientes en Cdk5 y p35 presentan defectos en la fasciculación y dirección de los axones, revelando una función del sistema Cdk5 en el proceso de guía axonal (Ohshima y cols., 1996; Ohshima y cols., 1999; Chae y cols., 1997, Ko y cols., 2001). Este conjunto de observaciones demuestra claramente que Cdk5 juega un papel importante tanto en la extensión de neuritas, guía axonal y migración de las neuronas (Esquema 1).



Esquema 1. Cdk5 es clave en procesos de migración neuronal, axonogénesis y guía neuronal. Se indican las relaciones entre las diferentes proteínas reguladoras que intervienen en este proceso (Gupta y cols., 2002).

2.4.2. Cdk5 y migración neuronal.

La pérdida de función de la Cdk5 origina letalidad embrionaria. Los ratones deficientes en Cdk5 manifiestan alteraciones en el posicionamiento de las neuronas del hipocampo, corteza y cerebelo, mas aun se produce la inversión de las capas de la corteza cerebral (Gupta y cols., 2002). La delección de p35 no es letal, posiblemente por la compensación con la proteína p39, pero los animales *knockout* en p35 presentan importantes alteraciones en el mecanismo de migración neuronal (Chae y cols., 1997; Kwon y cols., 1999).

La neocorteza cerebral esta formada por 6 capas que se organizan secuencialmente durante el desarrollo embrionario (E11-E18), desde la zona ventricular (ZV) a la superficie pial (SP) (Gupta y cols., 2002). En la etapa E11 del desarrollo embrionario un grupo de neuronas posmitóticas migran desde la zona ventricular hacia la superficie pial formando una capa celular denominada preplaca (PP). Posteriormente, en la etapa E13 un segundo grupo de neuronas migra radialmente desde la ZV y divide la preplaca PP, en la zona marginal (ZM) y la subplaca (SP), formándose entre estas la placa cortical (PC). Durante el resto del desarrollo embrionario, E14-E18, nuevos grupos de neuronas migran radialmente de la ZV y atraviesan la SP y se posicionan bajo la ZM. En el cerebro adulto la SP degenera (Gupta y cols., 2002).

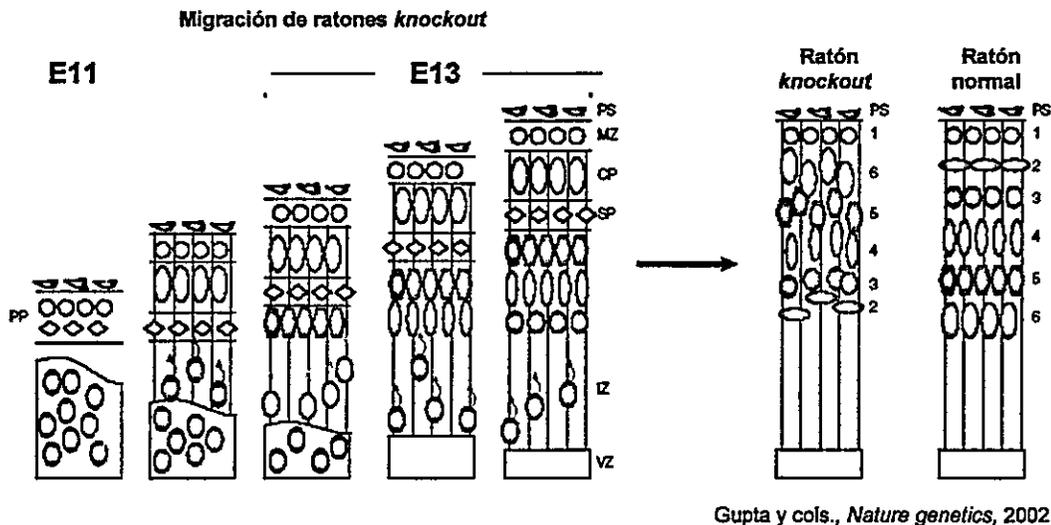
Cabe destacar que la generación de las capas neuronales se realiza de un modo "*inside-out*", donde las neuronas que migran mas temprano están en las capas más profundas de PC, mientras que las que migran mas tardíamente se localizan superficialmente (Angevine y Sidman., 1961; Gonzales y cols., 1997).

Los ratones *knockout* de p35 y Cdk5 presentan una inversión en la corteza cerebral, debido a alteraciones en el proceso de migración de modo "*inside-out*".

Esquema 2.

En el proceso de migración las neuronas en la neocorteza emprenden dos tipos de migración radial: de translocación y de locomoción. En la translocación, las neuronas dan origen a una prolongación que se ancla a la superficie pial, luego por medio de la retracción de la prolongación, el soma de la neurona se desplaza hacia la zona pial (Nadarajah y cols., 2002). Por otra parte, la migración de tipo locomoción, es un proceso dependiente de la glia radial, aquí las neuronas se mueven a lo largo de la fibra de la glia radial desde la ZV a las capas más superficiales (Pearlman y cols., 1998; Morris y cols., 1998).

Es bastante interesante el proceso de migración que se origina en ratones p35^{-/-}, donde se ha demostrado que se produce un modelo distinto al de migración neuronal denominado "*branched migration*" donde las neuronas remplazan el mecanismo de locomoción, por un mecanismo independiente de glia radial. En este tipo de migración las neuronas migran lentamente en zig-zag, y su interacción con la glia radial se ve disminuida. Así las neuronas p35^{-/-} presentan una migración menos eficientemente a través de las capas de la corteza y se produce la inversión de la placa cortical (Kwon y cols., 1999; Gupta y cols., 2003).



Esquema 2: Migración anormal de los ratones *knockout* para *Cdk5*^{-/-} y *p35*^{-/-}. Los ratones *knockout* de *Cdk5* y *p35* presentan inversión de la placa cortical y desorganización de las capas individuales (ratón *knockout*), con relación al desarrollo normal de la migración (ratón normal). Solo los ratones *p35*^{-/-} llegan a nacer, los ratones *Cdk5*^{-/-} mueren antes de nacer, revelando la importancia de *Cdk5* en el desarrollo embrionario. La onda de neuronas (verde, celeste, rojo, violeta) migra desde la ZV, pero no alcanza a atravesar las neuronas que previamente se han posicionado. Se observa inversión y desorganización neuronal, además, los axones que atraviesan la corteza se desarrollan anormalmente (Gupta y cols., 2002).

La función del sistema *Cdk5/p35* en la migración es de gran importancia, ya que se ha demostrado que en neuronas de ratones *p35*^{-/-} transfectadas con cDNA de *p35* *in utero*, se produce la reversión de los efectos de migración en zig-zag. De

esta forma, estos datos muestran un importante rol de p35 directamente en el mecanismo de migración por locomoción (Gupta y cols., 2002).

Recientes investigaciones han demostrado que Cdk5 fosforila a la proteína Nudel, la cual interactúa con la proteína motora dineína y Lis 1 (Niethammer y cols., 2000) (Esquema 1). Lis 1 es un producto génico asociado a la enfermedad de Liscencefalia, la cual se caracteriza por un aumento en el volumen de los ventrículos, alteraciones en la migración neuronal, disminución en los surcos y comisuras de la corteza cerebral. La causa de esta anomalía podría estar relacionada con la alteración del transporte intracelular mediado por dineína en el citoesqueleto de microtúbulos (Xiang, 2003).

Por otra parte, la actividad motora de dineína es regulada por la interacción con las proteínas Nudel y Lis 1. Recientes investigaciones han demostrado que Cdk5 fosforila Nudel y la proteína 14-3-3 ϵ contribuye a mantener el estado fosforilado, esta modificación contribuiría de forma positiva al transporte mediado por dineína. De este modo, se establece una conexión entre la actividad de Cdk5 y la regulación del transporte intracelular (Niethammer y cols., 2000; Toyooka y cols., 2003)(Esquema 1).

Mediante estudios de doble híbrido se ha demostrado que p35 interactúa directamente con beta-catenina (Kwon y cols., 2000). Neuronas corticales de rata tratadas con roscovitina, un inhibidor de la actividad de Cdk5, forman agregados mediados por la interacción entre N-caderina de las células neuronales. Por otro lado, incrementos en la actividad de Cdk5, producen la disminución de la adhesión celular (Homayouni y cols., 2000; Kwon y cols., 2000; Kesavapany y cols., 2001).

De este modo, la pérdida de actividad Cdk5/p35 podría estar implicada en la pérdida de adhesión célula-matriz extracelular y aumento de la interacción célula-célula. Diversas investigaciones han demostrado una directa relación entre los cambios de adhesión celular, la formación de neuritas y diferenciación (Matsunaga y cols., 1988; Esch y cols., 2000; Togashi y cols., 2002; Marthies y cols., 2002). Cdk5 puede ser un componente del mecanismo regulador que integra adhesión celular con diferenciación y migración.

2.4.4. Cdk5 y enfermedades neurodegenerativas.

Trabajos de nuestro laboratorio, y del grupo de Tsai en Harvard han demostrado que la actividad de la quinasa Cdk5 incrementa en condiciones de neurotoxicidad, tales como estrés oxidativo, daño por isquemia o tratamiento con beta-amiloide. Para explicar la causa de este proceso se han presentado dos hipótesis, la interpretación de nuestro laboratorio, sugiere que Cdk5 formaría un complejo más estable con p35 en condiciones de estrés celular, originado posiblemente por la modificación postraducciona de Cdk5, en residuos tales como, tirosina 15 o serina 159 (Alvarez y cols., 1999; 2001; Maccioni y cols., 2001). Hay una serie de evidencias que apoyan esta hipótesis, entre ellas la identificación del complejo Cdk5/p35 y los estudios estructura-función de este complejo (Alvarez y cols., 2001, Oth y cols., 2003). Por otra parte, el grupo de Tsai ha propuesto que el incremento de la actividad de Cdk5 se debe la inducción del procesamiento proteolítico de p35 por calpaina. En este mecanismo se formaría p25, proteína con una mayor vida media que p35 y que se distribuye tanto en el soma como en el

núcleo celular, de esta forma Cdk5 se activaría anormalmente en diferentes compartimentos subcelulares (Patrick y cols., 1999).

Actualmente ya se tiene bastante claro el efecto del incremento de la actividad de Cdk5 sobre las células neuronales. Nuestro laboratorio realizó los primeros hallazgos que llevaron a vincular el sistema del péptido beta-amiloide con las modificaciones de tau al interior de las neuronas. En efecto, el tratamiento de neuronas de hipocampo de rata con el péptido beta-amiloide, incrementa la actividad de Cdk5 y también la fosforilación de tau, principal proteína que conforma los filamentos helicoidales pareados (PHFs). Además, se ha demostrado que ratones transgénicos en Cdk5 y p25 incrementan la fosforilación de tau, como también la apoptosis de las células neuronales. Por lo tanto, la participación de Cdk5 en los procesos que promueven la neurodegeneración es de gran relevancia, y actualmente diversos grupos han dirigido sus investigaciones a la búsqueda de inhibidores de esta proteína con fines terapéuticos (Ortega y cols., 2002; Wesierska-Gadek y cols., 2003; Cruz y cols., 2003; Zapata y cols., 2004).

2.5. Beta-catenina.

Beta-catenina una proteína de gran importancia en procesos de migración, adhesión y de proliferación celular, esta compuesta por un extremo NH₂-terminal de aproximadamente 130 aminoácidos seguidos por 12 secuencias repetidas en *tandem* de 42 aminoácidos, y un extremo carboxilo terminal de 100 aminoácidos (Huber y cols., 1997).

Las regiones COO- y NH₂-terminales son de carácter ácido, mientras que la región de repeticiones denominada dominio *armadillo* posee un carácter básico (Kemler y cols., 1993; Wodarz y cols., 1998).

Beta-catenina interactúa con caderina, promoviendo señalizaciones desde el medio extracelular a proteínas integrales del citoesqueleto de actina y microtúbulos (Barth y cols., 1997; Levenberg y cols., 1998). Además participa como transactivador en la regulación de genes involucrados en proliferación, tamaño celular y diferenciación (Polakis, 2000). La función de esta proteína en compartimentos citoplasmáticos y nucleares es regulada principalmente por modificaciones postraduccionales (Rubinfeld y cols., 1996; Polakis, 2000).

Los niveles de la proteína beta-catenina son regulados por una "vía de señalización canónica "Wnt/beta-catenina". En esta vía, la glicoproteína extracelular WNT, induce la expresión de los receptores de membrana *frizzled* y LRP (proteína relacionada al receptor de lipoproteína) (Bhanot y cols., 1996; Tamai y cols., 2000). La formación del complejo Wnt/ *frizzled* /LRP señala sobre la proteína *disheveled* (Dhs) y bloquea la actividad de Gsk3 β , una quinasa que fosforila a beta-catenina en los residuos 41, 37 y 33 y que es responsable de la señalización de degradación de beta-catenina por el proteosoma (Mao y cols., 2001).

En ausencia de la señal Wnt, beta-catenina se mantiene en bajos niveles en el citoplasma. En esta situación, beta-catenina interactúa con APC y axina, dos proteínas de andamio que contribuyen a la formación de un complejo multiproteico de degradación (Rubinfeld y cols., 1993; Ikeda y cols., 1998). Luego, en etapas más avanzadas beta-catenina es fosforilada por caseína quinasa I (CK I) y Gsk3 β en la

región NH2 terminal y reconocida por la proteína Fbw1, uno de los componentes de la ubiquitina ligasa de beta-catenina (Aberle y cols., 1997). Finalmente, se produce ubiquitinación y degradación de la proteína (Hart y cols., 1998; Kikuchi y cols., 2003).

Por otra parte, cuando beta-catenina es fosforilada en la tirosina 645, interactúa con el factor de transcripción TCF/LEF y transloca al núcleo (Miller y Moon, 1996; Willer y Nusse, 1998). Esta asociación regula la activación de genes tales como c-jun, c-myc y ciclina D1, proteínas claves en la regulación de los procesos de proliferación celular (Tetsu y McCormick., 1999; He y cols., 1998). La inducción descontrolada de estos genes conduce a la proliferación anormal y cáncer (Polakis, 2000).

Recientes trabajos han demostrado que beta-catenina contribuye a la activación de Slug, un represor transcripcional de E-caderina. De este modo la disminución en la membrana plasmática de caderina conduce a cambios en la plasticidad celular, migración y diferenciación (Conacci-Sorrell y cols., 2003). Adicionalmente, se ha descrito que la expresión de caderinas, es imprescindible para la correcta localización y función de las neuronas posmigratorias (Tomaselli y cols 1998).

El efecto transactivador de beta-catenina también está asociado a la expresión de metaloproteasa-1, una enzima importante en el proceso de degradación y reorganización de la matriz extracelular (Takahashi y cols., 2002).

En desarrollo de *Hydra*, beta-catenina/TCF participa en el crecimiento polarizado del organismo, como también en la formación del eje antero posterior (Hobmayer y cols., 2000).

2.5.1. Beta-catenina y el sistema nervioso.

La proteína beta-catenina se expresa en altos niveles tanto en los procesos neuríticos y sinápticos en etapas tempranas y tardías del desarrollo neuronal. Investigaciones han demostrado la participación de Wnt y beta-catenina en el desarrollo y regulación de la arquitectura del cerebro. Específicamente, la sobre-expresión de beta-catenina incrementa el tamaño de la corteza y regula la formación de precursores neuronales, mientras que la pérdida de función de Wnt causa malformaciones en diferentes partes del cerebro (Chenn y Walsh, 2002; 2003; Zechener y cols., 2003).

Embriones de ratones transgénicos, que sobre-expresan un mutante de beta-catenina que no es reconocido por la maquinaria del proteosoma, desarrollan cerebros de mayor tamaño, que presentan incrementos en la superficie total de la corteza cerebral y aumento en los giros y surcos semejantes a los mamíferos superiores (Chenn y Walsh, 2002). En estos animales se observó mayor número de precursores neuronales en el área de la corteza cerebral. La sobre-expresión de esta proteína no originó grandes anomalías en la expansión horizontal de la corteza, ni disrupción en el desarrollo normal (Chenn y Walsh, 2002; 2003).

El mecanismo por el cual beta-catenina incrementa la población de precursores esta ligado a una mayor capacidad de las células a re-ingresar al ciclo celular después que se han dividido (Chenn y Walsh, 2002).

Por otra parte, un análisis mas detallado del fenotipo de estos ratones, demuestran deficiencias en el proceso de migración neuronal. Un mayor número de neuronas se mantiene en la zona ventricular de la corteza cerebral, y no son capaces

de migrar a las zonas más periféricas de la corteza, también se ve afectada la migración en el estriado y amígdala (Chenn y Wash, 2003).

2.6. Delta-catenina.

La proteína delta-catenina pertenece a la familia de proteínas con dominio de *armadillo*, posee 10 repeticiones de este tipo, de 43 aminoácidos y pesa alrededor de 160 kDa (Lu y cols., 1999). Esta proteína tiene una alta homología con beta-catenina y en forma similar interactúa con N-caderina y participa en la formación de complejos de adhesión. Los sitios de interacción con N-caderina difieren, ya que beta-catenina interactúa con la región carboxi-terminal, mientras delta-catenina con la región de yuxtamembrana (Lu y cols., 1999; Ho y cols., 2000) (Esquema 1).

Aunque inicialmente se identificó como una proteína de expresión específica del tejido nervioso, recientes investigaciones han demostrado que se expresa en células madre endodermales, células gliales, células pancreáticas, células PC12 y P19 (Paffenholz y cols., 1997; 1999; Zhou y cols., 1999; Kawamura y cols., 1999; Lu y cols., 2002).

La expresión de esta proteína en el tejido nervioso es dependiente del estado de desarrollo del cerebro. En etapas tempranas de migración neuronal, delta-catenina se expresa homogéneamente en las células precursoras de la ZV, luego al originarse la migración de estas neuronas, decrecen los niveles de la proteína. Finalmente en etapas tardías de migración neuronal, delta-catenina se expresa nuevamente y participa en la formación de uniones célula-célula mediadas por N-caderina (Ho y cols., 2000).

En el tejido nervioso adulto, delta-catenina se expresa específicamente en las dendritas y en el soma neuronal, posiblemente participando en procesos de neurosecreción y arborización de las dendritas (Lu y cols., 2002; Kim y cols., 2002).

Delta-catenina posee en las regiones flanqueantes del dominio de *armadillo* un conjunto de secuencias que son potenciales sitios de interacción proteína-proteína, proteína-lípido y fosforilación endógena (Lu y cols., 1999).

Estudios recientes han demostrado la participación de delta-catenina en la reorganización del citoesqueleto, cambios en la elongación y arborización de las dendritas (Lu y cols., 2002; Kim y cols., 2002; Martínez y cols., 2003).

La sobre-expresión de delta-catenina en células PC12, 3T3 y neuronas de hipocampo inducen la formación de neuritas y ramificaciones (Kim y cols., 2002; Martínez y cols., 2003). Por otra parte, la tirosina quinasa Abl interactúa con delta-catenina y F-actina y además, fosforila delta-catenina en el extremo amino-terminal (Martínez y cols., 2003). Además, cuando la actividad de Abl se ve disminuida en células PC12 que sobre-expresan delta-catenina, se origina un incremento en la formación de neuritas. Este efecto sugiere la modulación de delta-catenina por Abl, en la inducción de la formación neuritas.

Adicionalmente, se ha demostrado que delta-catenina interactúa directamente con cortactina, originando el reclutamiento de Arp 2/3 y polimerización de F-actina, efecto que conduce a la elongación de neuritas (Lu y cols., 2002; Martínez y cols., 2003).

Alternativamente la fosforilación de delta-catenina y cortactina por tirosina quinasas de la familia *Srs* origina la pérdida de interacción de estas proteínas, y conduce la formación de ramificaciones en las neuritas. De este modo delta-catenina

parece participar en la regulación del balance entre la formación de prolongaciones y la ramificación de estas. Además, la sobre-expresión de delta-catenina contribuiría a la inhibición de Rho y a la formación de ramificaciones en las neuritas (Martinez y cols., 2003).

En este trabajo de tesis se analizó la regulación de p27, un inhibidor de Cdk's del ciclo celular y su relación a ciclina D1 y c-myc, proteínas involucradas en el proceso de detención del ciclo celular y diferenciación de neuroblastoma. Además se investigó el papel de la quinasa Cdk5 en el proceso de diferenciación y su relación con la regulación de beta y delta-catenina, proteínas que participan en adhesión celular y neuritogenesis.

A partir de estos resultados, observamos que ciclina D1 se asocia a p27 y a Cdk5 en células sin diferenciar. En etapas tempranas de diferenciación los niveles de ciclina D1 y p27 disminuyen. Posteriormente, en etapas tardías del proceso de diferenciación neuronal, p27 incrementa su expresión, y Cdk5 se activa, lo que conduce a su participación en la reorganización del citoesqueleto y fosforilación de beta y delta-catenina.

Beta-catenina sería fosforilada en los residuos serina 191 y 246, donde el residuo serina 246 estaría implicado en la asociación de esta proteína con APC. Adicionalmente los niveles de delta-catenina parecen ser regulados por la actividad de Cdk5.

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.

3.1. Hipótesis de Trabajo.

La proteína p27 y el sistema Cdk5/p35 participan directamente en el proceso de diferenciación de células de neuroblastoma N2a. Cdk5 fosforila a beta y delta-catenina y contribuye así a los cambios de la plasticidad neuronal.

3.2. Objetivo general.

Estudiar las proteínas p27 y Cdk5 en el proceso de diferenciación, y analizar a beta y delta-catenina como sustratos del sistema Cdk5/p35.

3.3. Objetivos específicos de la tesis.

- 1.- Analizar la regulación de p27 en el proceso de diferenciación de células de neuroblastoma N2a.
- 2.- Estudiar los procesos que regulan la actividad de Cdk5 en la diferenciación de neuroblastoma N2a.
- 3.- Analizar la localización subcelular de la proteína beta-catenina y del sistema Cdk5/p35 en el proceso de diferenciación de células de neuroblastoma en cultivo inducida por dbt-cAMP.

4.- Identificar los aminoácidos fosforilados en beta-catenina por Cdk5 durante la diferenciación de células de neuroblastoma N2a.

5.- Analizar la interacción entre delta-catenina y el sistema Cdk5/p35.

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1. MATERIALES.

4.1.2. Material biológico.

Cepa *E. coli* BL21 y DH5 α de Promega. Ratas de la cepa *Sprague-Dawley*, provenientes del Bioterio de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

4.1.3. Reactivos.

De MERCK Química Chilena se obtuvieron: Sales, reactivos analíticos, ácidos, bases y alcoholes. De Invitrogen-GIBCO BRL Life Technologies Inc.: Enzimas de restricción, transcriptasa reversa RNasa H- SUPERScript™ II (200 u/ μ l), Taq DNA polimerasa (5 U/ μ l), dNTPs (100 mM), 100 pb DNA ladder (1 μ g/ μ l), lipofectamina, Trizol, X-Gal agarosa, DTT y triptona. De la Compañía Sigma Chemical CO: Bromuro de etidio, BSA, β -mercaptoetanol, SDS, EDTA, cicloheximida, IPTG. PerkinElmer: [γ ³²P] dATP (3000 Ci/mmol, 10 μ Ci/ μ l). Roscovitina y histona H1 (Calbiochem).

4.1.4. Reactivos y materiales para cultivo de células.

Las placas para cultivo celular fueron adquiridas en NUNC, los medios de cultivo: DMEM, MEM, suero fetal de bovino, suplemento B27, Tripsina, EDTA, y los antibióticos estreptomina, penicilina, gentamicina e hygromicina fueron adquiridos de Gibco BRL. Polilisina se obtuvo en Sigma Chemical CO.

4.1.5. Anticuerpos.

Los anticuerpos Cdk5 (C9), Cdk5-pTyr15, p35 (C19), p35 (N20), ciclina D1, p27kip, c-myc y beta-catenina y GST fueron adquiridos de Santa Cruz Biotechnology. Anticuerpo dirigido contra delta-catenina se adquirió en MDC Signal Transduction BD. Anticuerpos primarios para actina y secundarios acoplados a FITC y TRICT fueron adquiridos de Sigma Chemical CO. Anticuerpos anti V5-tag se obtuvo de Invitrogene.

4.1.6. Partidores.

p27 SNS:	5'-TAACCCGGGACTTGGAGAAG-3'
p27 AS:	5'-GCTTCTTGGGCGTCTGCTC-3'
beta-actina SNS:	5'-TCTACAATGAGCTGCGTGTG-3'
beta-actina AS:	5'-TACATGGCTGGGGTGTGAA-3'
c-myc SNS:	5'-ATGCCCTCAACGTGAACTTC-3'
c-myc AS:	5'-CCTCTTCTCCACAGACACCAC-3'
beta catAsS191A:	5'-CCAGACACGCTATCATGCGTGCTCCTCAGATGGT-3'
beta catAsS246A:	5'-GCCCTGGTGAAAATGCTTGGTGAACCAGTGGATTTTC-3'
beta catAsS604A:	5'-TTTGTGCAGCTGCTTTATGCTCCCATTGAAAAC-3'
beta catSns R1:	5'-ACGCATGATAGCGTGTCTGGAAGCTTCCTT-3'
beta catSns R2:	5'-ACCAAGCATTTCACCAGGGCAGGAATGCCTC-3'
beta catSns R3:	5'-ATAAAGCAGCGTCACAAACAATGGAATG-3'
beta cat 5' BamH1:	5'-GGATCCCATGGCTACTCAAGCTGATTTG-3'
beta cat 3' Xba I:	5'-TCTAGATCAATGGTGTGATGGTGTGATGATG-3'

4.2. METODOS.

4.2.1. Cultivo celular.

Cultivos de células de neuroblastoma N2a en la mayoría de los experimentos, y de Cos 7 en estudios puntuales, fueron utilizados para esta investigación. Estas células fueron crecidas en medio Dulbecco's Eagles's modificado (DMEM) (Gibco-BRL), suplementado con 5% suero fetal de bovino, 100 U/ml penicilina y 100 U/ml estreptomina. Las células fueron crecidas con 5% CO₂ a 37°C. El crecimiento de neuritas en células N2a fue promovido mediante el cultivo de estas células en DMEM más 0.25% de suero fetal de bovino, y 5mM dibutilil cAMP (db-cAMP) (Sigma, St. Louis, MO). Después de 12, 24 y 48 hrs. de tratamiento, las células mostraron una morfología diferenciada con largos procesos neuríticos (Muñoz y cols., 2000). Para los experimentos con cicloheximida, las células N2a fueron tratadas con 10 ng/ml de cicloheximida en presencia o ausencia de dbt-cAMP.

Células PC12 que expresan establemente delta-catenina fueron donadas por Keneth Kosik de Harvard University Medical School. Estas células fueron crecidas en DMEM 10% FBS/ 5 % HS, 100 U/ml penicilina, 100 U/ml estreptomina con 5% CO₂ a 37°C. Además, se agregó higromicina 25 µg/ml y genitocina 100 µg/ml para mantener la expresión estable de delta-catenina (Lu y cols., 2002).

Los cultivos de neuronas corticales se realizaron por el método descrito por Banker y Cowan (1977). Cerebros de embriones de rata Sprague-Dawley de 18 días fueron utilizados para extraer neuronas corticales. Las células sembradas en placas cubiertas con polilisina en medio MEM suplementado con 10 % suero fetal de bovino,

posteriormente fueron mantenidas en MEM suplementado con B27 (Gibco BRL), y antibióticos 100 U/ml penicilina y 100 U/ml estreptomicina (Banker y Cowan, 1977).

4.2.2. Inmunoprecipitación.

Células de neuroblastoma en algunos estudios, ó cerebros de rata en otros, fueron homogenizaron en tampón RIPA (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA 1% NP-40, 0.5% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS, 100 µg/ml PMSF, 2 µg/ml aprotinina, 2 µM leupeptina, y 1 µg/ml pepstatina). Posteriormente los homogenizados fueron centrifugados a 20.000Xg por 30 min. a 4°C. Las proteínas contenidas en el sobrenadante fueron cuantificadas por medio del método de Bradford modificado (BioRad).

Muestras entre 200-500 µg de extractos de proteína fueron incubadas con 5 µl de proteína A o G 50% (Sigma) por 30 min. a 4°C, de acuerdo al procedimiento estándar en uso en nuestro laboratorio (Alvarez y cols., 2001). Esta mezcla se centrifugó a 100Xg por 10 min. a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Posteriormente, esta mezcla fue incubada con en anticuerpo primario por toda la noche a 4°C, luego se agregan 5 µl de proteína A o G al 50% por 2 hrs. a 4 °C. Los inmunocomplejos se recuperaron mediante centrifugación a 100Xg por 10 min. a 4°C, el pellet obtenido fue lavado 3 veces con tampón RIPA. Los lavados consisten en la adición de 500 µl de tampón RIPA a los pellet, suave agitación y finalmente centrifugación a 100Xg por 10 min. a 4°C. Los pellet que contienen los inmunocomplejos se fraccionarán en SDS/PAGE o son utilizadas para experimentos de actividad quinasa.

4.2.3. Ensayo de actividad quinasa.

Para realizar los ensayos de actividad quinasa *in vitro*, los inmunoprecipitados fueron lavados una vez con tampón quinasa (50 mM HEPES, 10 mM MgCl₂, 5 mM MnCl₂, 1 mM DTT, pH 7.5) y posteriormente fueron incubados en tampón quinasa que contenía 2.5 µg de Histona H1, 5 µCi [³²P] ATP en un volumen final de 50 µl. La reacción se incubó por 1 hora a 30 °C.

Los ensayos de actividad quinasa con proteínas recombinantes, se realizaron con proteínas Cdk5, p35 y p25 fusionadas a GST obtenidas mediante la purificación de afinidad con Glutation-Sepharosa (Amersham-Pharmacia). Las proteínas fueron cuantificadas por el método de Bradford y se utilizó 1 µg de proteína para cada ensayo. Para realizar los ensayos de actividad quinasa, Cdk5 más p35 o la proteína truncada p25 fueron preincubadas por 30 minutos a 4°C en tampón quinasa 1X mas ATP 1µM. Finalmente una mezcla de beta o delta-catenina , γ [³²P]ATP y el complejo Cdk5/p35 o Cdk5/p25 se incubaron por 1 hora a 30 °C. Las muestras fueron fraccionadas en SDS-PAGE y analizadas mediante un equipo *Molecular Image* (BioRad).

4.2.4. Tratamientos de termo estabilidad de p27.

Los tratamientos de termo-estabilidad se realizaron mediante el método descrito por O'Brien y cols., 2001. Los inmunoprecipitados de p27 obtenidos a partir de células N2a en proliferación fueron sonicados en tampón 50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl y centrifugados a 13000Xg por 10 min. a 4°C. Posteriormente las

muestras fueron calentadas a 100°C por dos minutos, enfriadas rápidamente en hielo y finalmente centrifugada a 13000Xg por 5 minutos a 4°C. De esta forma las proteínas termolábiles, y los complejos de Cdk's fueron eliminados del extracto y la proteína p27 termoestable contenida en el sobrenadante fue utilizada para los ensayos de actividad quinasa. Posteriormente, inmunocomplejos de Cdk2 obtenidos a partir de células de N2a sin diferenciar fueron incubados por 1 hora a 30 °C con estos extractos termoestables de p27, en presencia de tampón quinasa, ATP, histona H1 y γ [³²P]ATP.

4.2.5. Inmunofluorescencia.

Para realizar los ensayos de inmunofluorescencia, células de neuroblastoma N2a fueron fijadas en 4% de paraformaldehído por 15 minutos, y permeabilizadas con 0.1% Triton X-100 por 1 minuto. Posteriormente, las células fueron incubadas con el anticuerpo primario por 2 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda o a 4°C por toda la noche. Las células fueron lavadas con PBS 1X, 3 veces por 5 minutos, y luego incubadas con el anticuerpo secundario acoplado a FITC o TRICT (Sigma, St Louis, MO), por una hora a temperatura ambiente. Finalmente las células fueron lavadas 3 veces en PBS 1X y montadas con FluorSave (Calbiochem). Las células fueron analizadas posteriormente por medio de microscopia confocal (LSM 510 META Zeiss).

4.2.6. RT-PCR.

A partir de cultivos de células de neuroblastoma N2a diferenciadas y sin diferenciar, se extrajo RNA total por medio del método de TRIZOL (Gibco-BRL, Life Technology). El RNA obtenido fue cuantificado por medio de espectrofotometría a 260 nm. La reacción de RT-PCR se realizó con 3 µg de RNA total, a los cuales 100ng de partidores al azar fueron adicionados, la mezcla se llevó a un volumen de 12 µl. Las muestras posteriormente fueron incubadas por 10 minutos a 70°C seguido por la adición de 4µl de tampón de transcripción 5X, 2 µl 0.1 mM DTT, 1 µl dNTP 10 mM, y 200 U SuperScript II (Gibco-BRL, Life Technology). La mezcla fue incubada por 50 minutos a 42 °C. El volumen final de reacción fue 20 µl. En la reacción de PCR, números variables de ciclos y montos totales de cDNA sintetizados fueron utilizados para evaluar la linealidad de la reacción. Para la reacción de PCR de p27 se realizó en un tampón que contenía, 1X tampón de PCR, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM de cada nucleótido, 10 pmol de los partidores p27, 5 pmol de los partidores β-actina, y 0.25 U de Taq polimerasa (Gibco-BRL, Life Technology). La amplificación de p27 y beta-actina se realizó en el mismo tubo de reacción, manteniendo la relación 2:1 de la concentración de partidores. El programa utilizado fue el siguiente: denaturación inicial, 94°C por 3 min, denaturación 94°C for 40s, reasociación a 57°C por 45s, extensión de la reacción a 72°C por 5 minutos. La amplificación se realizó en 30 ciclos.

La amplificación de c-myc, fue realizada con un protocolo equivalente al utilizado para p27-beta-actina. El número de ciclos fue de 30 y la temperatura de re-

asociación 57°C por 45 s. El volumen de reacción fue 50 μ l y los productos fueron fraccionados en geles de 1.8% agarosa/TAE y teñidos con bromuro de etidio (0.5 μ g/ml).

4.2.7. cDNA array.

RNA total células sin diferenciar y diferenciadas por 24 y 48 hrs. fueron extraídas por el método de TRIZOL (Gibco-BRL, Life Technology). Posteriormente, las preparaciones de RNA fueron tratadas con DNasa y luego el RNA poli A+ fue extraído por medio de un sistema de oligo dT unido a estreptavidina-biotina, siguiendo el protocolo de *Atlas Mouse cDNA arrays* (Clontech Laboratories, Inc.). El RNA poli A+ fue utilizado como templado para la síntesis de cDNA marcado con [α^{32} P] ATP. Las sondas de cDNA (2×10^3 cpm/ μ l) fueron hibridadas a una membrana *AtlasTM mouse cDNA expression arrays* de 588 genes (Nº 7741-1 Clontech Laboratories, Inc.). Posteriormente los *array* fueron expuestos en un film auto radiográfico por 3 días. La señal de hibridación fue analizada con el software Kodak Digital Science 1D 3.0.2 (Kodak).

4.2.8. Transfección de células N2a.

Oligonucleótidos fosfotiodados complementarios al mensajero de c-myc: oligonucleótido en dirección antisentido (5'-GAAGTTCACGTTGAGGGGCAT-3') y el oligonucleótido en dirección sentido (5'-ATGCCCTCAACGTGAACTTC-3') al mRNA de c-myc fueron transfectados en células N2a (Paria y cols., 1992). La mezcla de

lipofectamina 2000 (Gibco-BRL, Life Technology) y oligonucleótidos fue adicionada al medio de cultivo de N2a en presencia de 5% suero fetal de bovino a una concentración de 1 μ M de los oligonucleótidos por 48 hrs. Bajo estas condiciones las células no presentan toxicidad. El medio de cultivo fue cambiado cada 24 horas.

Para inhibir la expresión de ciclina D1 se transfectaron 2 μ g de un plasmidio pcDNA3.1-As D1 que transcribe una región de 700 nucleótidos en dirección antisentido al transcrito de ciclina D1, por 10 hrs. Posteriormente el medio fue cambiado por DMEM 5% de suero fetal de bovino y las células se mantuvieron por 24 horas adicionales. Finalmente, las células fueron homogenizadas en RIPA.

Para la transfección de los clones de beta-catenina y delta-catenina en células N2a y Cos 7 se utilizó un procedimiento equivalente al descrito anteriormente. La eficiencia de las transfecciones en células N2a fue entre un 60-70%, para este análisis se utilizó como marcador un plasmidio pEGFP (Clontech Laboratories, Inc.).

Los estudios de expresión condicionada de p35 se realizaron mediante el uso de un plasmidio pBI que expresaba bidireccionalmente p35 y GFP, diseñado en el laboratorio del Christian Gonzalez-Billault (Universidad de Chile). Células de neuroblastoma N2a tTa, que expresan establemente el transactivador dependiente de tetraciclina fueron transfectadas en forma transiente por 48 hrs. con el vector pBI o el plasmidio pBI p35-GFP. Para inhibir la expresión de p35 en las células transfectadas se utilizó tetraciclina a una concentración de 1 μ g/ml en el medio de cultivo. Por medio de este tratamiento se observa la inhibición de la expresión de GFP y p35. Utilizando microscopía de fluorescencia se determinó que la eficiencia de la transfección de estas células fue de alrededor de un 60%.

4.2.9. Mutaciones sitio-dirigidas.

A partir del plasmidio pcDNA 3.1-V5 que contenía beta-catenina humana (Invitrogen-GeneStore H-X87838M), se realizó la mutagénesis sitio-dirigida, utilizando el Kit GeneTailor (Invitrogen). Para realizar las reacciones de amplificación del plasmidio completo por medio de PCR se utilizaron 3 partidores mutagénicos y 3 partidores inversos, denominados S191A, S191G, S246A, R1, R2 y R3 (ver Materiales). Cada reacción de amplificación se realizó con el siguiente programa: denaturación inicial 94°C por 30 seg, 25 ciclos de denaturación 94°C por 1 minuto, reasociación a 55°C por 45 segundos, extensión a 68°C por 6 minutos y una extensión final a 64°C por 10 minutos. Finalmente, se utilizó la cepa *E.coli Dh5 α* para transformar los productos de PCR. Las mutaciones fueron analizadas mediante secuenciación.

4.2.10. Purificación de proteínas recombinantes.

Los clones bacterianos que contienen plasmidios pGex-Cdk5, pGex-p35 y pGex-p25 fueron donados por Harish Pant (NIH, U.S.A.), el clon de pGex-beta-catenina se obtuvo por medio del subclonamiento por PCR del cDNA de beta-catenina contenido en el plasmidio pcDNA-beta-catenina-V5, con partidores que contenían los sitios de restricción cohesivos Bam H1 en el extremo 5' y Xba I en el extremo 3' (Invitrogen-GeneStore). Las bacterias se crecieron a 37°C hasta alcanzar una OD de 0.6, y se agregó IPTG a una concentración de 100 μ M. Posteriormente

las células fueron incubadas a 28 °C por 3 hrs. y finalmente centrifugadas a 3000 rpm (rotor Sorvall GSA) por 15 minutos a 4°C. Las pellas obtenidas fueron resuspendidas en PBS, en una relación de 4 ml de PBS por 100 ml de cultivo bacteriano. Se adiciono lisozima a una concentración de 1 mg/ml y se incubo la mezcla por 30 min. a 4°C. Posteriormente, las muestras fueron sonicadas 6 ciclos de 10 seg. a un poder de 40 (Ultrasonic Processor). Luego se añadió Triton X-100 a una concentración final 0,5 % y la mezcla fue centrifugada a 10000xg por 30 min. a 4°C. Al sobrenadante obtenido se agrego Glutation-Sepharosa (Amersham Pharmacia) al 50%, en una relación de 2 ml por cada 100 ml de cultivo bacteriano y se incubo a 4 °C por 2 hrs. La mezcla fue centrifugada a 500xg por 10 min. a 4°C y se lavo el pellet 3 veces con PBS. Finalmente la proteína de fusión fue eluida adicionando tampón de elusión (Glutation 10 mM en 50mM TrisHCl pH7,6).

La concentración de las proteínas fue determinada por medio del método de Bradford modificado (BioRad).

La proteína delta-catenina recombinante fue extraída de células PC12- δ -catenina (ver métodos 4.2.1). Las células fueron homogenizadas en tampón RIPA , para luego inmunoprecipitar delta-catenina con un anticuerpo monoclonal dirigido a un epítipo del amino terminal de esta proteína (MDC Signal Transduction BD). El procedimiento de inmunoprecipitación es similar al descrito previamente (métodos 4.2.2). Los inmunoprecipitados de delta-catenina posteriormente fueron utilizados para realizar los ensayos de actividad quinasa con Cdk5 recombinante.

4.2.11. Fraccionamiento subcelular de células de neuroblastoma N2a.

Se utilizó el método descrito por Vleurick y cols. (1999). Las células de neuroblastoma N2a fueron homogenizadas en tampón ST (0.25 M sacarosa, 5 mM Tris-HCL pH 7.5) y centrifugadas a 400xg por 12 min. a 4°C. La pella obtenida corresponde a la fracción que contiene los núcleos y membrana plasmática (fracción N) y fracción soluble corresponde a la fracción citoplasmática (fracción C).

La fracción C fue centrifugada a 100.000xg por 1 hr. a 4°C, y la fracción N fue mezclada con una solución que contiene Percoll 20%, 0.25 mM EDTA, 0.5 mM MOPS, 0.25 M sacarosa y 2.5 mM Tris-HCl pH 7,5. Posteriormente, la fracción N fue centrifugada a 1500xg por 15 min. y se obtuvo una pellet que corresponde a la fracción nuclear y una capa fibrosa de membrana plasmática en el sobrenadante. Los núcleos fueron lavados 3 veces con tampón ST a 400xg por 5 min. a 4°C.

La fracción de membrana plasmática es diluida con una solución hipotónica 1mM NaHCO₃ pH 7.5 para disgregar los organelos asociados a la membrana y se centrifuga a 100000xg por 1 hr a 4°C. Los extractos de cada fracción son finalmente diluidos en RIPA. La purificación de los núcleos fue analizada por medio de la inmunodetección de Histona H1.

5. RESULTADOS.

5.1. Regulación de la proteína p27 en el proceso de diferenciación de células de neuroblastoma N2a.

5.1.1. Niveles de p27 en neuroblastoma N2a sin diferenciar.

En este estudio investigamos el proceso de diferenciación neuronal en células N2a. Estas células pueden ser diferenciadas por medio del tratamiento con dbt-cAMP. Frente a este tratamiento las células forman procesos neuríticos y detienen el ciclo celular (Saragoni y cols., 2000).

Una de las proteínas en la que se centró este estudio es p27, un inhibidor de un amplio espectro de complejos Cdk/ciclina, entre los cuales se encuentran las quinasas Cdk1, 2, 4, 6 asociados a alguna de las ciclinas A, E o D (Toyoshima y cols., 1994; Bastians y cols., 1998). Esta proteína presenta gran interés debido a que esta involucrada en los procesos de detención y diferenciación celular en varios tipos celulares. Una de las funciones más importantes de p27, está relacionada con la transición de G1 a S del ciclo celular, donde inhibe la activación de Cdk2/ciclina E (Poliak y cols., 1994; Toyoshima y cols., 1994; Alkarain y cols., 2004). Adicionalmente, en células neuronales y de neuroblastoma su expresión contribuye a la salida del ciclo celular y posterior diferenciación celular (Garcia-Silva y cols., 2002; Ohnuma y Harris., 2003).

Por medio de inmunodetección se analizaron los niveles de p27 en células N2a sin diferenciar y diferenciadas con dbt-cAMP. En la Figura 1A (panel izquierdo) se observa que p27 presenta altos niveles en células N2A sin diferenciar, mientras

que las células diferenciadas con dbt-cAMP por 12 y 24 hrs. muestran un descenso en los niveles de esta proteína. Posteriormente, a las 48 hrs. del proceso de diferenciación, los niveles de p27 incrementan sin alcanzar los niveles del control no-diferenciado (n=10). Estos resultados muestran una variación de los niveles de la proteína p27 en el curso del tiempo (Figura 1A panel derecho) en el proceso de diferenciación de las células de neuroblastoma N2a.

Cuando estudiamos la expresión de otras proteínas que participan en la regulación del ciclo celular, tales como ciclina E, Cdk2, Cdk4, y Cdk6, no encontramos cambios de expresión de estas proteínas, sin embargo, los niveles de ciclina D1 disminuyeron dramáticamente en las primeras 12 hrs. de transcurrida la diferenciación inducida por dbt-cAMP (n=3) (Figura 1B).

El análisis de la expresión del transcrito de p27 por medio de estudios de *cDNA array* y RT-PCR en células de neuroblastoma N2a mostraron que los niveles del mensajero incrementaba a medida que transcurría la diferenciación (Figuras 2A y B). En el estudio de RT-PCR de la Figura 2A podemos observar que el mRNA de p27, presenta altos niveles basales de expresión en células sin diferenciar, y que estos aumentan alrededor de un 20 % en las células diferenciadas con dbt-cAMP por 48 hrs. (n=5). Además, en la Figura 2B se observa, mediante los estudios de *cDNA array* la detección del transcrito de p27 a las 48 hrs. de diferenciación. En las Figuras 2B y 2C, se pueden apreciar también los cambios de expresión de c-myc y ciclina D1 mediante el estudio de *cDNA array*.

Las diferencias en la detección observada en el ensayo de RT-PCR en relación a los estudios de *cDNA array* de deben a la diferente sensibilidad de las metodologías. Adicionalmente, en este trabajo analizamos la expresión de varios

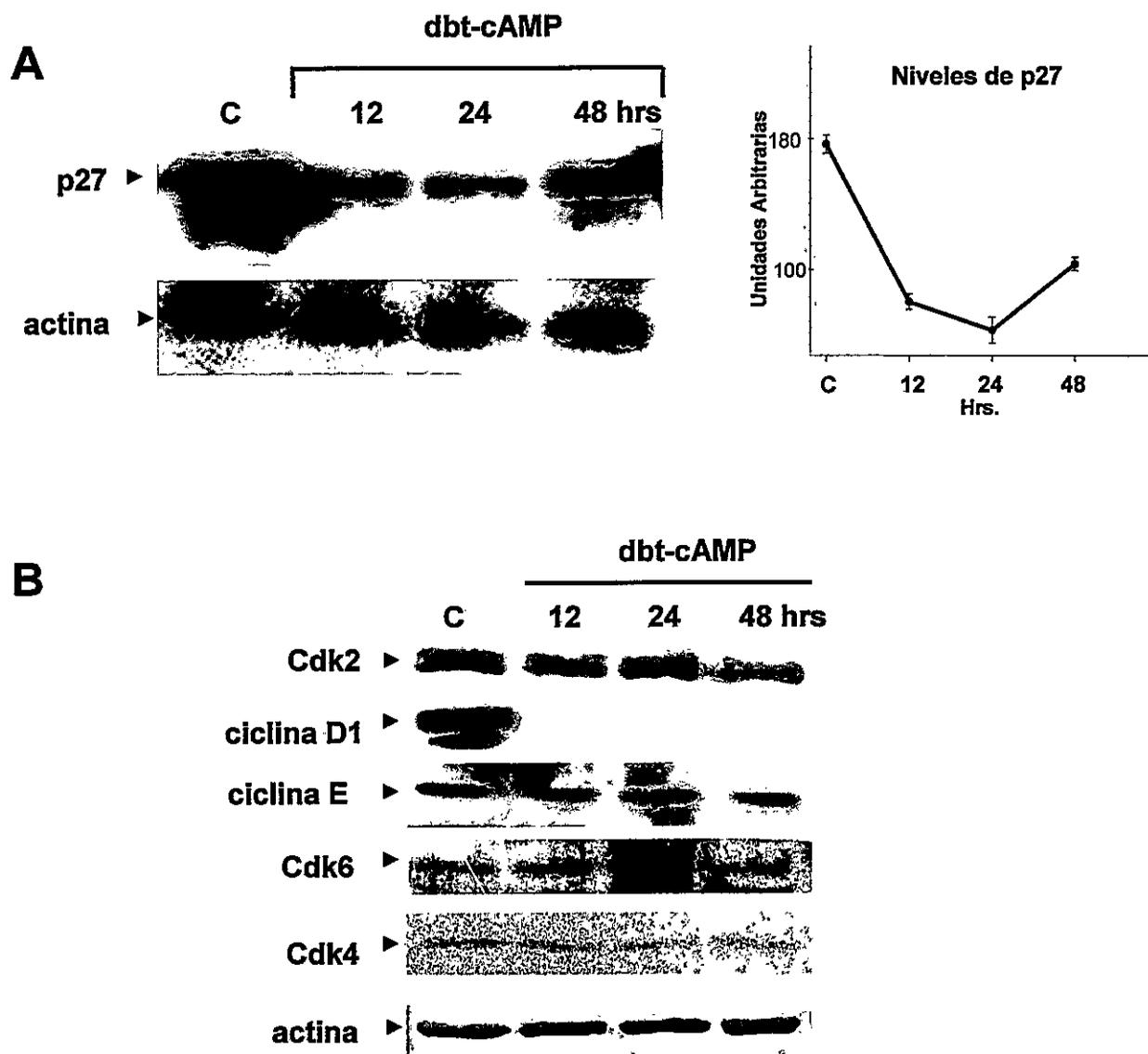


Figura 1. Niveles de la proteína p27 en células de neuroblastoma N2A. Panel A: (Izquierda) Inmunodetección de p27 en células N2A control y diferenciadas con dbt-cAMP 5 mM por 12, 24 y 48 hrs. (Derecha) Análisis densitométrico de la expresión de p27 en células N2a diferenciadas (n=10). **Panel B:** Inmunodetección de proteínas asociadas al ciclo celular en células de neuroblastoma N2A diferenciadas con dbt-cAMP 5 mM por 12, 24 y 48 hrs (n=3). Actina fue utilizada como control de carga en estos experimentos.

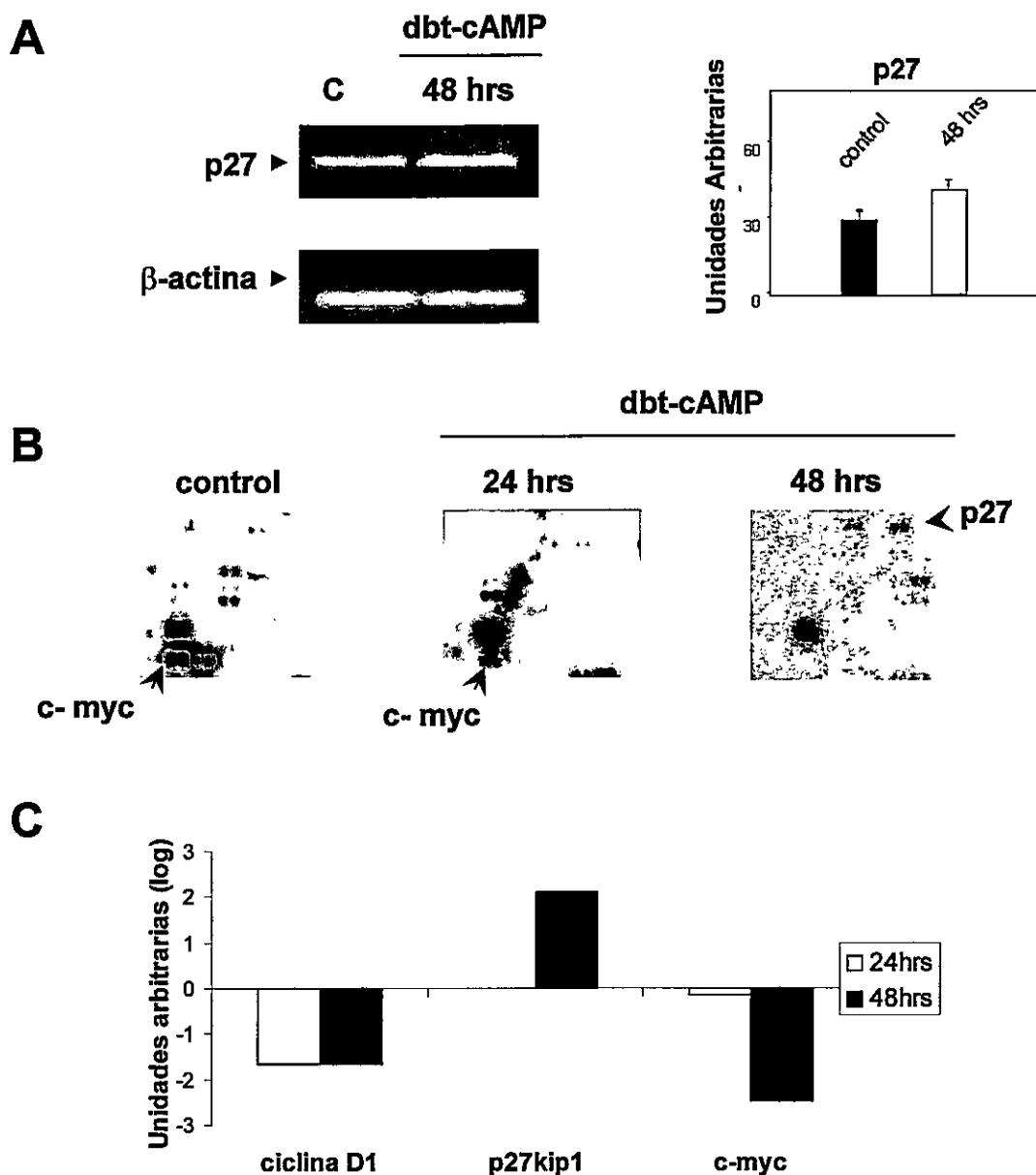


Figura 2: Cambios de expresión del transcrito de p27 en neuroblastoma N2A diferenciados con dbt-cAMP. Panel A: Análisis de RT-PCR del transcrito de p27 en células control y diferenciadas con dbt-cAMP 5 mM por 48 hrs. (n=5). **Panel B:** Análisis de cDNA array de los transcritos de p27 y c-myc en células de neuroblastoma N2a diferenciadas con dbt-cAMP 5 mM por 24 y 48 hrs. (n=2). **Panel C:** Análisis densitométrico de los transcritos de p27, c-myc y ciclina D1 (en unidades arbitrarias) de estudios de cDNA array de 24 y 48 hrs de diferenciación de neuroblastoma N2a con dbt-cAMP (n=2).

genes implicados en la diferenciación de neuroblastoma N2a. A partir de estos resultados observamos que los transcritos de ciclina D1, H-ras y B-raf, disminuían su expresión en las 24 y 48 hrs. de diferenciación. Estos genes participan en la proliferación celular, y se ha observado que la disminución de su expresión contribuye a la diferenciación celular. La Tabla 1 resume los cambios en la expresión de un conjunto de genes derivado de los resultados del análisis mediante *cDNA array* en células de neuroblastoma N2a en proceso de diferenciación.

Cabe señalar, que el análisis de los niveles de la proteína p27 muestra que éstos son altos en células sin diferenciar comparado con las células diferenciadas. En cambio, el análisis de expresión génica de p27 muestra que el transcrito incrementa a medida que se diferencia el neuroblastoma N2a. Estos resultados derivados de las Figuras 1 y 2, nos sugieren que los niveles de proteína p27 presente en células N2a sin diferenciar y diferenciadas, pueden estar asociados tanto a los niveles del transcrito como al recambio de la proteína.

De este modo, con el fin de estudiar la regulación de la proteína p27 en células N2a, fue de interés analizar el recambio de esta proteína en el proceso de diferenciación. Para ello, células N2a sin diferenciar fueron incubadas con cicloheximida o co-incubadas con cicloheximida más dbt-cAMP por diferentes periodos. En la Figura 3, podemos observar en las células tratadas con dbt-cAMP más cicloheximida, una disminución de los niveles de p27 a partir de las 4 hrs., mientras que en las células sin diferenciar la proteína p27 disminuyó sus niveles a las 18 hrs. de tratamiento (n=3). Estos resultados indican que la inducción a diferenciarse de las células N2a con dbt-cAMP, conlleva un incremento en el recambio de la proteína p27.

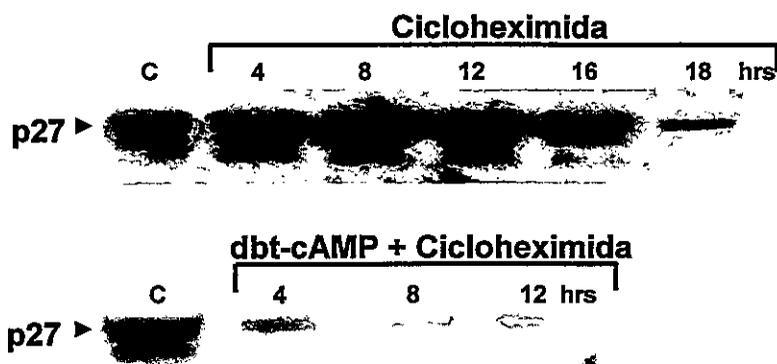


Figura 3. Recambio de la proteína p27 en células de neuroblastoma N2a. Células N2A fueron incubadas con cicloheximida o co-incubadas con cicloheximida mas dbt-cAMP 5 mM por diferentes intervalos de tiempo. El recambio de la proteína p27 fue analizado por inmunodetección de esta proteína en los homogenizados totales de estas células. C, controles sin tratar (n=3).

5.1.2. p27 forma un complejo con ciclina D1 en células N2a sin diferenciar.

Investigaciones previas demostraron que p27 esta asociada a ciclina D1 y que además, en células sin diferenciar su actividad inhibitoria de las Cdk's del ciclo celular se encuentra disminuída (O'Brien y cols., 2001). Sobre la base de este antecedente se realizaron experimentos de inmunolocalización y de co-inmunoprecipitación de estas proteínas en células N2a. En la Figura 4 A, se puede apreciar que p27 y ciclina D1 se distribuyen homogéneamente en las células de neuroblastoma sin diferenciar. Por otra parte, en la Figura 4B se muestra el ensayo de co-inmunoprecipitación de p27 y ciclina D1 en células N2a, donde los resultados muestran la asociación de estas proteínas en células sin diferenciar. Cabe destacar, que ciclina D1 se encuentra inicialmente expresada en altos niveles en células N2a sin diferenciar, luego al transcurrir el proceso de diferenciación, su expresión cae rápidamente (Figura 1 B).

Estos resultados nos sugieren que en células sin diferenciar, la asociación de ciclina D1 a p27 podría estar relacionada con el bloqueo de su actividad sobre el sistema Cdk2/ciclina E.

Con el objeto de investigar la capacidad de la proteína p27 de células N2a sin diferenciar para inhibir la actividad de Cdk2, se realizaron ensayos de actividad quinasa de Cdk2 en presencia de p27 termoestable, proveniente de células N2a sin diferenciar. En este estudio fue de importancia analizar sí la función de la proteína p27, en células N2a sin diferenciar estaba alterada por algún tipo de modificación en la proteína o por interacción con otras proteínas. Para ello, se inmunoprecipitó p27 de células N2a sin diferenciar, y por medio de sonicación y calentamiento de los inmunocomplejos, se separó p27 termoestable de las proteínas a las cuales se

encontraba asociada (O'Brien et al., 2001). En la Figura 4C se muestran los ensayos de actividad quinasa de Cdk2 sobre el sustrato histona H1, utilizando la proteína p27 termoestable como inhibidor (Figura 4C, panel izquierdo y derecho). Podemos observar que mezclando Cdk2 y p27 en una proporción 1:2 ó 1:1 se produce la inhibición de la actividad quinasa de Cdk2 (n=3) (Figura 4C, panel derecho).

Estos resultados, en conjunto con el estudio de co-inmunoprecipitación, sugieren que la proteína p27 no posee modificaciones estructurales en las células N2a sin diferenciar que alteren su actividad inhibitoria. Además, posiblemente ciclina D1 participaría en el secuestro de esta proteína.

5.1.3. Sobre-expresión de p27 en neuroblastoma N2a induce la formación de neuritas.

La expresión del transcrito y de la proteína p27 juega un rol importante en la diferenciación de neuroblastoma, ejerciendo su acción sobre las Cdk's del ciclo celular (Perez-Juste y Aranda, 1999). Además, la participación de p27 en células de glia-Muller parece ser limitante tanto para detención del ciclo, como para el inicio de la diferenciación (Ohnuma y cols., 1999).

Para evaluar los efectos de la expresión de p27 en neuroblastoma sin diferenciar, estas células fueron transfectadas en forma transiente con el cDNA de p27 murino, clonado en un vector pcDNA 3.1 (donado por K. Miskimins, University of South Dakota). Alrededor de un 30% de las células transfectadas contenían neuritas, y se observó un incremento de la expresión de p27 de alrededor de tres veces en las células transfectadas (n=3) (Figura 5). Por otra parte, también se observó que incrementos en la expresión de p27 conducen a una disminución en la expresión de

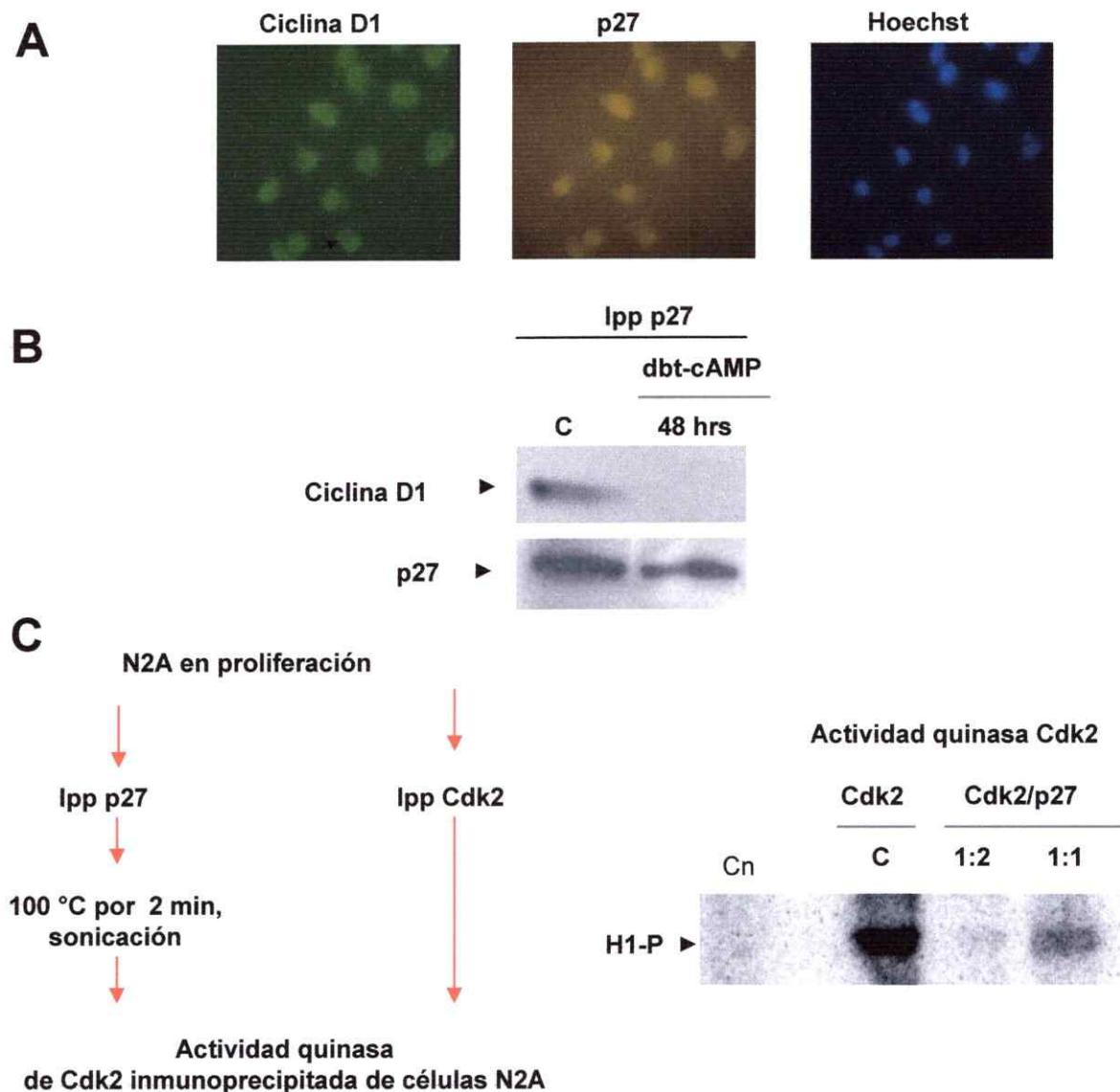


Figura 4. Interacción de p27 con Ciclina D1 en células N2A. Panel A: Inmunofluorescencia de ciclina D1 (izquierda) y p27 (centro) en células de neuroblastoma N2a. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst (derecha). **Panel B:** Co-inmunoprecipitación de ciclina D1 con p27 en extractos de células N2A sin diferenciar y diferenciadas con dbt-cAMP 5mM por 48 hrs. Los inmunoprecipitados fueron analizados por medio de inmunodetección. **Panel C:** Actividad quinasa de Cdk2 en presencia de p27 termoestable obtenida a partir de extractos de células de neuroblastoma N2A sin diferenciar. Histona H1 fue utilizada como sustrato de la quinasa. La proteína p27 fue inmunoprecipitada a partir de extractos de N2A y posteriormente fue calentada a 100 °C por 2 min. (Cn) control sin sustrato Histona H1, (C) Actividad quinasa de Cdk2 inmnoiprecipitada de células N2A, (1:2) y (1:1) representan la actividad quinasa de Cdk2 en presencia de diluciones de p27 termoestable.

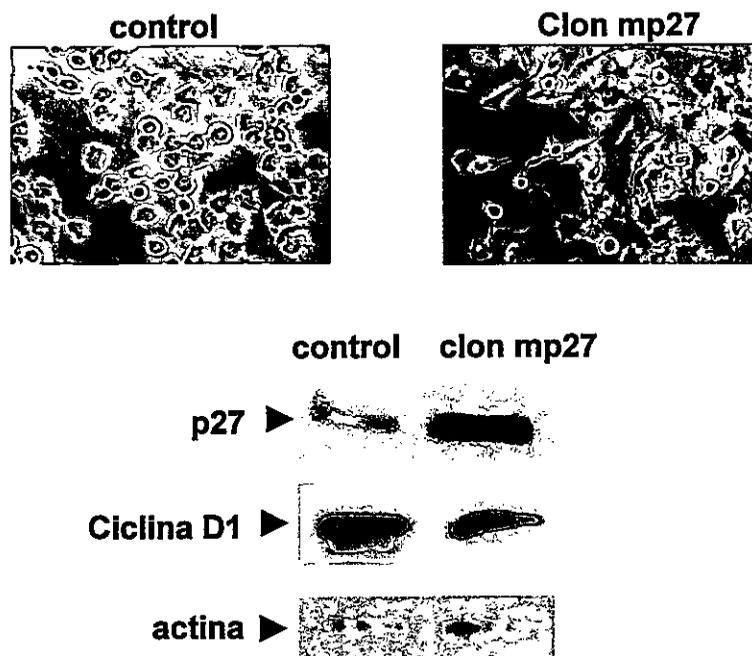


Figura 5. Expresión de p27 induce la neuritogénesis de células N2A. Panel superior: Células N2A fueron transfectadas con un plasmidio que codifica para la proteína p27 de ratón (mp27). (Control) corresponde a la transfección de las células con pcDNA 3.1. Las células transfectadas fueron analizadas después de 48 hrs por microscopía de contraste (40 X). **Panel Inferior:** Inmunodetección de p27 y ciclina D1 en células control y transfectadas con el plasmidio mp27. Actina fue utilizada como control de carga en estos experimentos (n=3).

ciclina D1, resultados que se asemejan a los eventos tempranos de diferenciación inducidos por dbt-cAMP en N2a (Figura 5).

Estos resultados nos muestran que la sobre-expresión de p27 conduce al descenso parcial de los niveles de ciclina D1 en estas células, como también a la formación de pequeños procesos neuríticos.

5.1.4. Inhibición de la expresión de c-myc induce la formación de neuritas en células N2a.

La diferenciación celular conduce a la disminución de la expresión tanto en transcrito y la proteína c-myc. Este evento parece tener gran importancia en la diferenciación y tiene relación con los cambios de expresión de p27 (Vlach y cols., 1996). En la Figura 2B y 6, se puede observar mediante estudios de *cDNA array*, RT-PCR e inmunodetección una disminución progresiva en los niveles de c-myc durante en curso de la diferenciación de neuroblastoma N2a con dbt-cAMP. Por consiguiente, observamos una correlación entre el descenso de la expresión en el transcrito y en la proteína c-myc durante la diferenciación. Este resultado está en concordancia con la disminución de la función de c-myc en células diferenciadas (Perez-Juste y Aranda, 1999).

Para evaluar los efectos de la inhibición de c-myc sobre las células N2a sin diferenciar, se realizaron experimentos de transfección usando oligonucleótidos antisentido dirigidos a la región 1.396-1.416 del mRNA de c-myc (n=3) (Figura 7). Investigaciones previas han demostrado que estos oligonucleótidos son altamente específicos para el transcrito de c-myc (Paria y cols., 1992).

El tratamiento con oligonucleótidos antisentido por 48 hrs. produjo la inhibición de alrededor de un 40% de la expresión de c-myc. También se observó la detención de la proliferación celular y la formación de pequeñas neuritas en un 20-30% de las células (Figura 7). Por otro lado, los niveles de las proteínas ciclina D1 y p27 disminuyeron en las células transfectadas con estos oligonucleótidos (Figura 7, panel inferior, n=3). Estas observaciones concuerdan con los cambios observados en la proteína p27 en etapas tempranas de diferenciación de células N2a inducida por dbt-cAMP, posiblemente la inhibición de c-myc contribuye con el incremento del recambio de p27 (Bouchard y cols., 1999; O'Hagan y cols., 2000) (Figura 1A).

Mediante el análisis de estos estudios, podemos sugerir que la inhibición de c-myc por medio de oligonucleótidos antisentidos contribuye a la diferenciación de las células de neuroblastoma N2a.

Ciclina D1, es una proteína que induce a la proliferación celular, y su sobreexpresión esta relacionada con algunos tipos de cáncer. El bloqueo de ciclina D1 origina la disminución del tamaño de algunas áreas del tejido nervioso, tal como el cerebelo (Huard y cols., 1999). De este modo, nos pareció interesante analizar el efecto de la inhibición de la expresión de ciclina D1 sobre las proteínas que estudiamos en células N2a sin diferenciar. Para ello, se realizaron ensayos de inhibición de la expresión de ciclina D1, utilizando un plasmidio que transcribe un segmento antisentido al mRNA de ciclina D1 de 700 nucleótidos (ver sección Materiales y Métodos). Las células transfectadas no exhibieron cambios morfológicos, y como se muestra en la Figura 8, las proteínas p27 y c-myc no presentaron cambios en su expresión (n=3).

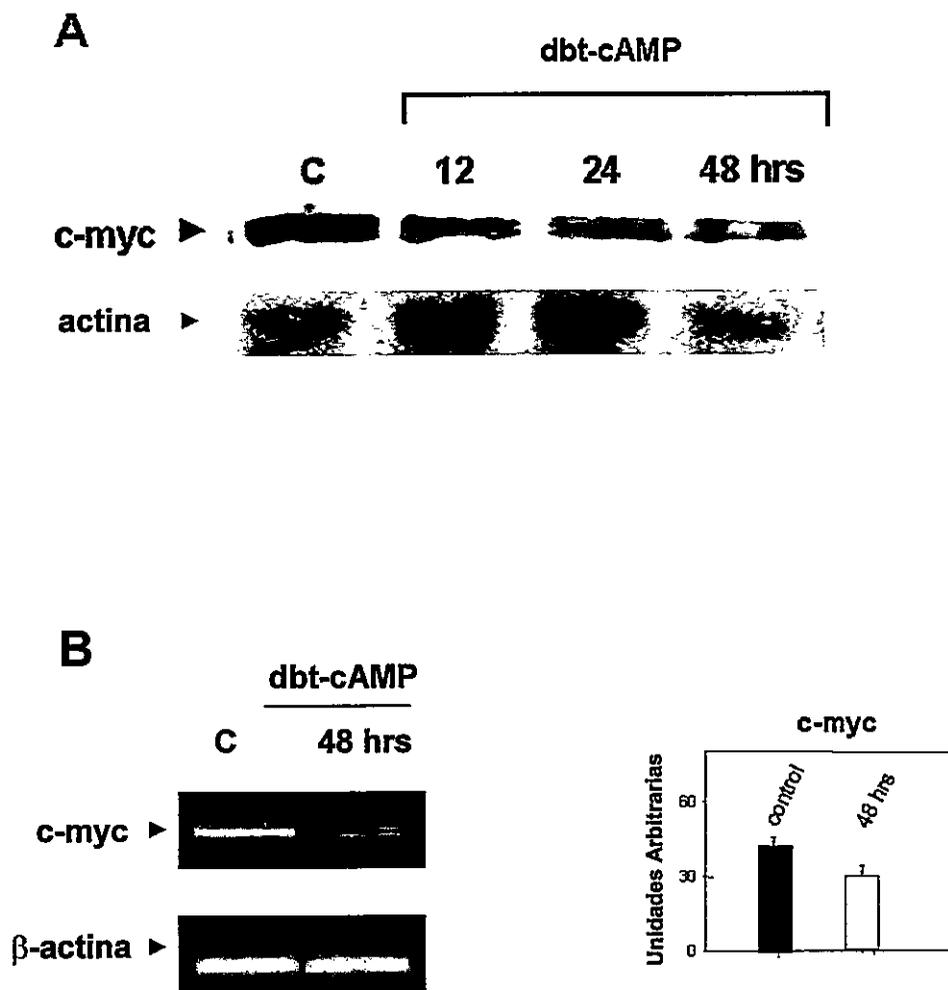


Figura 6. Niveles de c-myc en células de neuroblastoma N2A. Panel A: Inmunodetección de c-myc en células N2A control y diferenciadas con dbt-cAMP 5 mM por 12, 24 y 48 hrs. (n=3). Actina fue utilizada como control de carga en estos experimentos. **Panel B:** Análisis de RT-PCR del transcritos de c-myc en células control y diferenciadas con dbt-cAMP 5 mM por 48 hrs. (n=5).

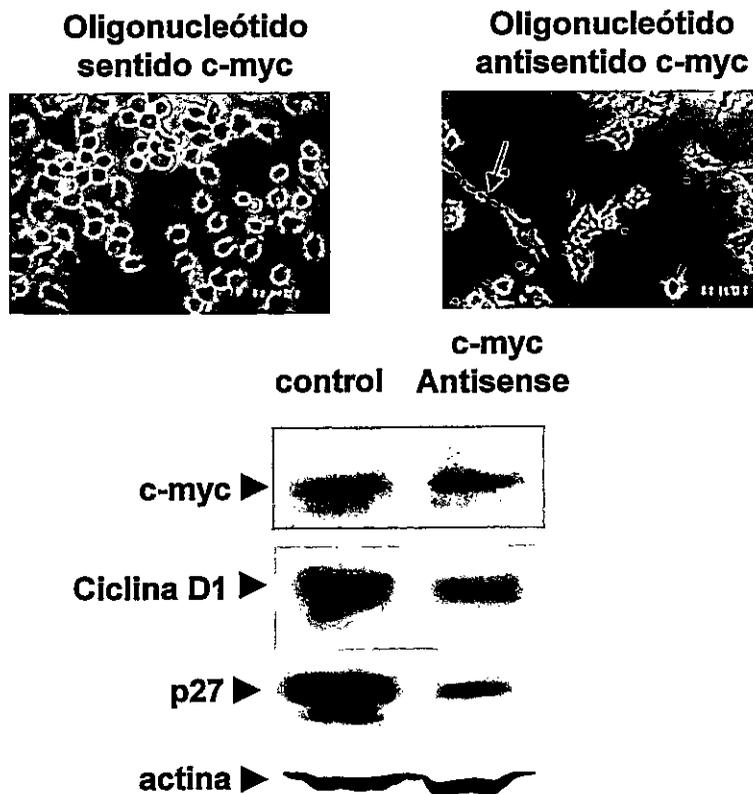


Figura 7. Inhibición de la expresión de c-myc induce la neuritogénesis de células N2A. (Superior) Células tratadas con oligonucleótidos sentido y antisentido al mensajero de c-myc por 48 hrs (n=3). La formación de neuritas en las células N2a es indicada por una flecha. (Inferior) Inmunodetección de ciclina D1 y p27 en las células N2A tratadas con los oligonucleótidos sentido y antisentido al mensajero de c-myc por 48 hrs. Actina fue utilizada como control de carga. Las células transfectadas fueron analizadas por microscopia de contraste (40 X).

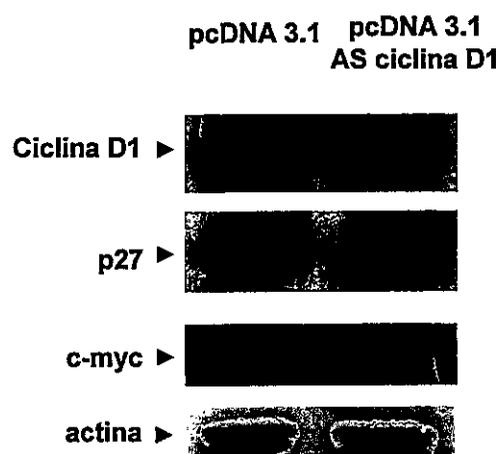


Figura 8. Inhibición de la expresión de ciclina D1 en células de neuroblastoma N2a. Células de neuroblastoma N2a fueron transfectadas con un plasmidio pcDNA3.1 y un plasmidio que transcribe para un oligonucleótido antisentido de ciclina D1 (pcDNA 3.1 AS ciclina D1). En la figura se observa la inmunodetección de ciclina D1, c-myc y p27 en las células N2a transfectadas por 48 hrs. Actina fue utilizada como control de carga (n=3).

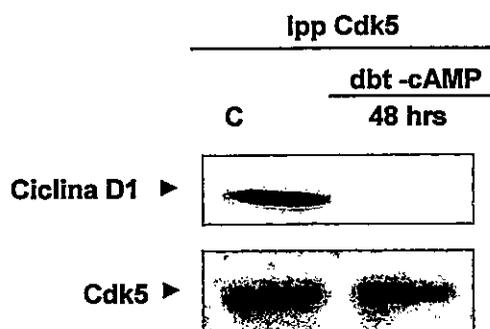
5.2. Regulación de Cdk5 en neuroblastoma N2a.

La quinasa Cdk5 se expresa en forma ubicua en todos los tejidos, pero se ha encontrado en forma activa sólo en células en proceso de diferenciación (Tsai y cols., 1993; Nickolic y cols., 1996). Por otra parte, el dominio de interacción de Cdk5 con p35 es estructuralmente similar al dominio de interacción de Cdk4 o 6 con ciclina D1 (Maccioni y cols., 2001b). Por consiguiente, es probable que ciclina D1 y Cdk5 interactúen en células sin diferenciar y que esta asociación esté relacionada con la regulación de Cdk5 en células en proliferación.

Con el objeto de investigar si Cdk5 está asociada a ciclina D1, analizamos por medio de co-inmunoprecipitación la interacción entre ambas proteínas. En la Figura 9A, podemos observar que Cdk5 co-inmuno-precipitaba junto a ciclina D1 en células N2a sin diferenciar. Estos resultados sugieren que Cdk5, en las células que se encuentran en activa proliferación, podría estar secuestrada por ciclina D1 en forma similar a lo que ocurre con p27.

Cuando analizamos la expresión de Cdk5 en la diferenciación de N2a observamos que los niveles de la proteína incrementan a medida que transcurre la diferenciación, además, utilizando un anticuerpo dirigido a Cdk5 fosforilada en tirosina 15, una modificación postraduccional en Cdk5 que potencia su actividad, también observamos incrementos en la tinción (Figura 9 B). Se ha descrito que la fosforilación de Cdk5 en esta tirosina potencia su actividad en neuronas corticales (Zukerberg y cols., 2001). Este resultado nos muestra que Cdk5 incrementa tanto su expresión como su fosforilación endógena en células N2a diferenciadas, de este modo, sería capaz ejercer sus efectos sobre la reorganización del citoesqueleto.

A



B

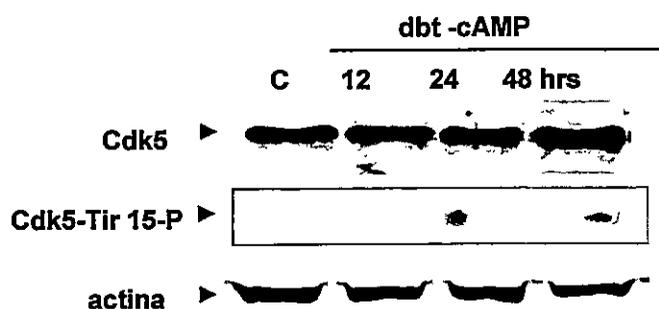


Figura 9: Expresión de Cdk5 en células N2a diferenciadas con dbt-cAMP.
Panel A: Co-inmunoprecipitación de Cdk5 con ciclina D1 en células de neuroblastoma N2A. **Panel B:** Inmunodetección de Cdk5 total y Cdk5 fosforilada en tirosina 15 en células N2A diferenciadas con dbt-cAMP por 0, 12, 24 y 48 hrs. Actina fue utilizada como control de carga (n=3).

5.3. Regulación de beta-catenina por el sistema Cdk5/p35.

5.3.1. Distribución subcelular de Cdk5 y beta-catenina en el proceso de diferenciación celular.

Se ha descrito por medio de técnicas de doble híbrido que la proteína activadora de Cdk5, p35, está asociada a beta-catenina, una proteína que participa como transactivador, regulando la expresión de ciclina D1 y c-myc en el ciclo celular y que además, participa en los eventos de adhesión celular, donde interactúa con N-caderina y alfa-catenina (Kwon y cols., 2000). Basándose en estos importantes antecedentes, investigamos la participación del sistema Cdk5/p35 en la regulación de beta-catenina.

Para analizar la distribución de beta-catenina y Cdk5 en células de neuroblastoma, se realizaron estudios de inmunofluorescencia por microscopia confocal, en células diferenciadas con dbt-cAMP durante 48 hrs. En la Figura 10A se puede apreciar una distribución homogénea de Cdk5 en toda la célula, y en el caso de beta-catenina se observa una distribución mayoritaria en la membrana plasmática y en los sitios de contacto célula-célula. Por otra parte, el análisis muestra que beta-catenina y Cdk5 co-localizan en dominios discretos comunes de la membrana plasmática (Figura 10A).

Adicionalmente, por medio de estudios de fraccionamiento subcelular, se analizó la distribución de beta-catenina en el núcleo, citoplasma y membrana plasmática de células N2a sin diferenciar y diferenciadas con dbt-cAMP por 48 hrs. Como se observa en la Figura 10 B, beta-catenina incrementa su distribución en la fracción nuclear de las células diferenciadas. Este resultado sugiere que en células

diferenciadas se podría inducir la translocación de beta-catenina al núcleo de la célula (n=3). Las fracciones citoplasmática y de membrana plasmática de beta-catenina no cambian su distribución en las células diferenciadas.

Por otra parte, en la Figura 10C se puede observar por medio de co-inmunoprecipitación, la asociación de Cdk5 y beta-catenina en cerebro de rata, tanto en estadios embrionario E18 como en cerebro adulto (n=3). Estos resultados demuestran que el sistema Cdk/p35 esta asociado a beta-catenina y podría ejercer un efecto regulador sobre esta proteína.

5.3.2. Fosforilación de beta-catenina por el sistema Cdk5/p35.

Con el objeto de investigar la fosforilación de beta-catenina por el sistema Cdk5/p35, realizamos ensayos de actividad quínasa utilizando Cdk5 asociada a p35 o p25, una forma truncada de p35, que se ha demostrado que participa en la regulación de Cdk5 en procesos neurodegenerativos (Patrick y cols., 1999). En la Figura 11A se muestra la fosforilación de la proteína recombinante beta-catenina-GST por la quínasa Cdk5 cuando es activada por p35 o p25. Además, se observa que la fosforilación de beta-catenina es inhibida al co-incubar la reacción con roscovitina 10 μ M, un inhibidor selectivo de Cdk5.

Considerando estas observaciones en un contexto global, nos interesó analizar los aminoácidos fosforilados en beta-catenina por Cdk5. De este modo, utilizando el programa NetPhos 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos>) se encontraron tres posibles sitios de fosforilación en la secuencia de la proteína

beta-catenina. Estos sitios corresponden a serina 191, 246 y 604, ubicados en la región de armadillo y el extremo carboxilo terminal de beta-catenina (Huber y cols., 2001).

Con el objeto de evaluar si alguno de estos sitios es fosforilado por Cdk5, beta-catenina humana clonada en un vector de expresión pcDNA-V5 (Invitrogen GeneStore H-X87838M) fue mutada por medio de un sistema de Gene Taylor PCR (Invitrogene) en cada uno de los tres posibles sitios de fosforilación. Los aminoácidos serina fueron remplazados por alanina para producir dominantes negativos en los posibles sitios de fosforilación. Posteriormente, las construcciones fueron transfectadas transientemente en células COS-7 por 48 hrs. Estas células sobre-expresan eficientemente beta-catenina, otorgando así un buen sistema para obtener la proteína mutada.

Las células COS-7 transfectadas con las diferentes construcciones de beta-catenina fueron utilizadas para inmunoprecipitar beta-catenina-V5 con un anticuerpo dirigido al epítipo V5.

Al realizar ensayos de actividad quinasa *in vitro* de Cdk5/p35 sobre las proteínas recombinantes de beta-catenina, se observó un claro descenso en la fosforilación en los mutantes S191A y S246A de beta-catenina, comparados con la fosforilación de la proteína sin mutar. Sin embargo, el mutante en serina 604 no presentó cambios significativos y repetitivos en la disminución de la señal de fosforilación. De este modo, estos resultados sugieren que serina 191 y serina 246 son posibles sitios fosforilados por la quinasa Cdk5 (n=3) (Figura 11B).

Para investigar la distribución subcelular de estos mutantes de beta-catenina se realizaron transfecciones transientes en células N2a con los plasmidios que

codifican para dominantes negativos de los sitios de fosforilación de beta-catenina - V5. En la Figura 11C se observa la localización del epítipo V5 de beta-catenina y de la tubulina en estas células. Mediante este método no se observaron cambios de distribución de los mutantes de beta-catenina comparados a la beta-catenina sin mutar.

Estas observaciones sugieren así, que Cdk5/p35 fosforilaría beta-catenina en el sitio serina 191 y 246, donde este último sitio parece estar relacionado con el aumento en el recambio de beta-catenina (Ryo y cols., 2001).

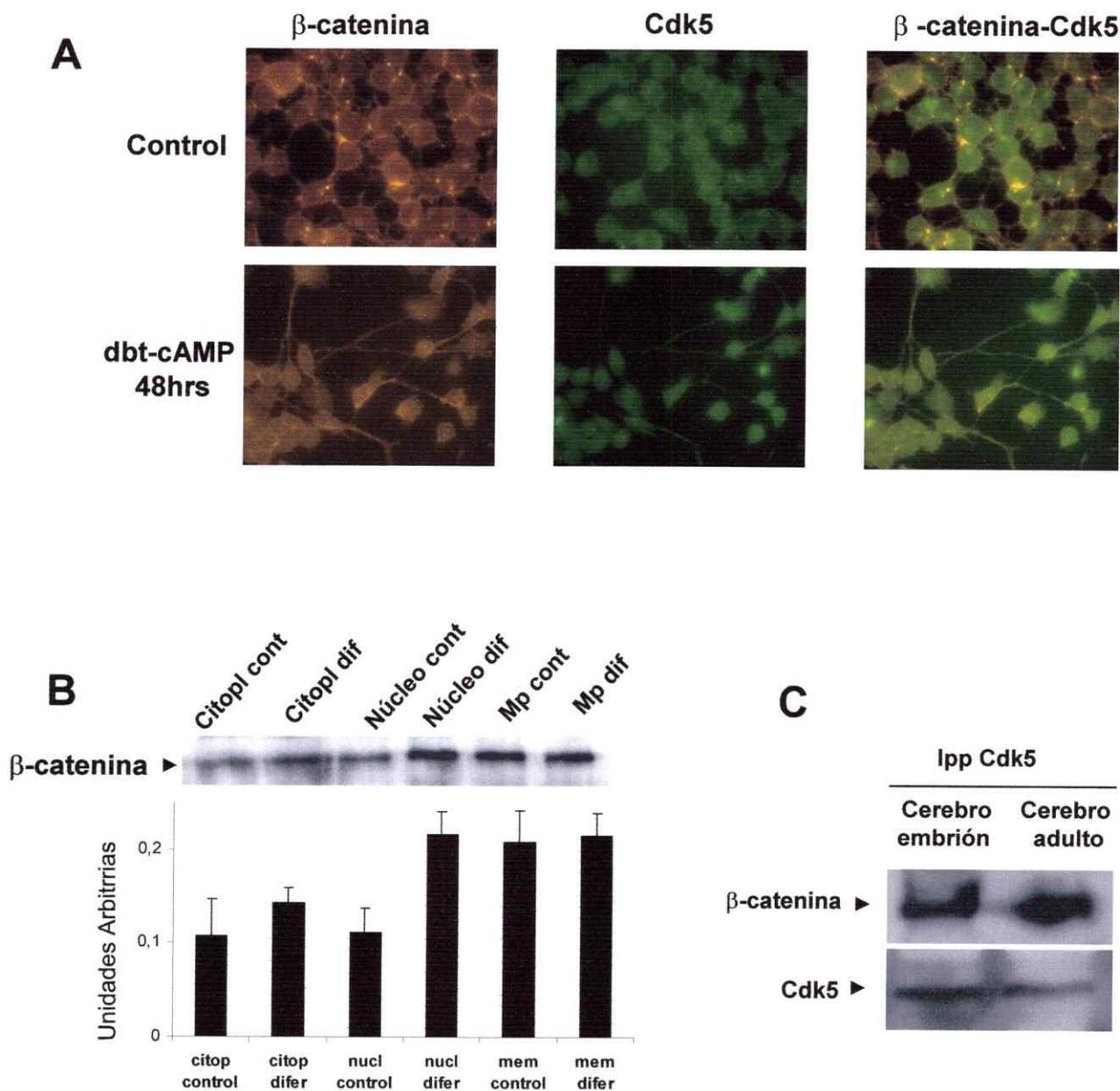


Figura 10. Interacción de beta-catenina con la quinasa Cdk5. Panel A: Colocalización de beta-catenina y Cdk5 en células de neuroblastoma N2A. En rojo tinción de beta-catenina, en verde Cdk5 y en amarillo se observa la colocalización de estas proteínas. **Panel B:** Detección de beta-catenina en extractos de citoplasma (citopl), núcleo y membrana plasmática (Mp) de células N2a diferenciadas con dbt-cAMP 5 mM por 48 hrs. (n=3). **Panel C:** Co-inmunoprecipitación de Cdk5 con beta-catenina en extractos de cerebro de rata, tanto en estadios embrionario E18 como en cerebro adulto (n=3).

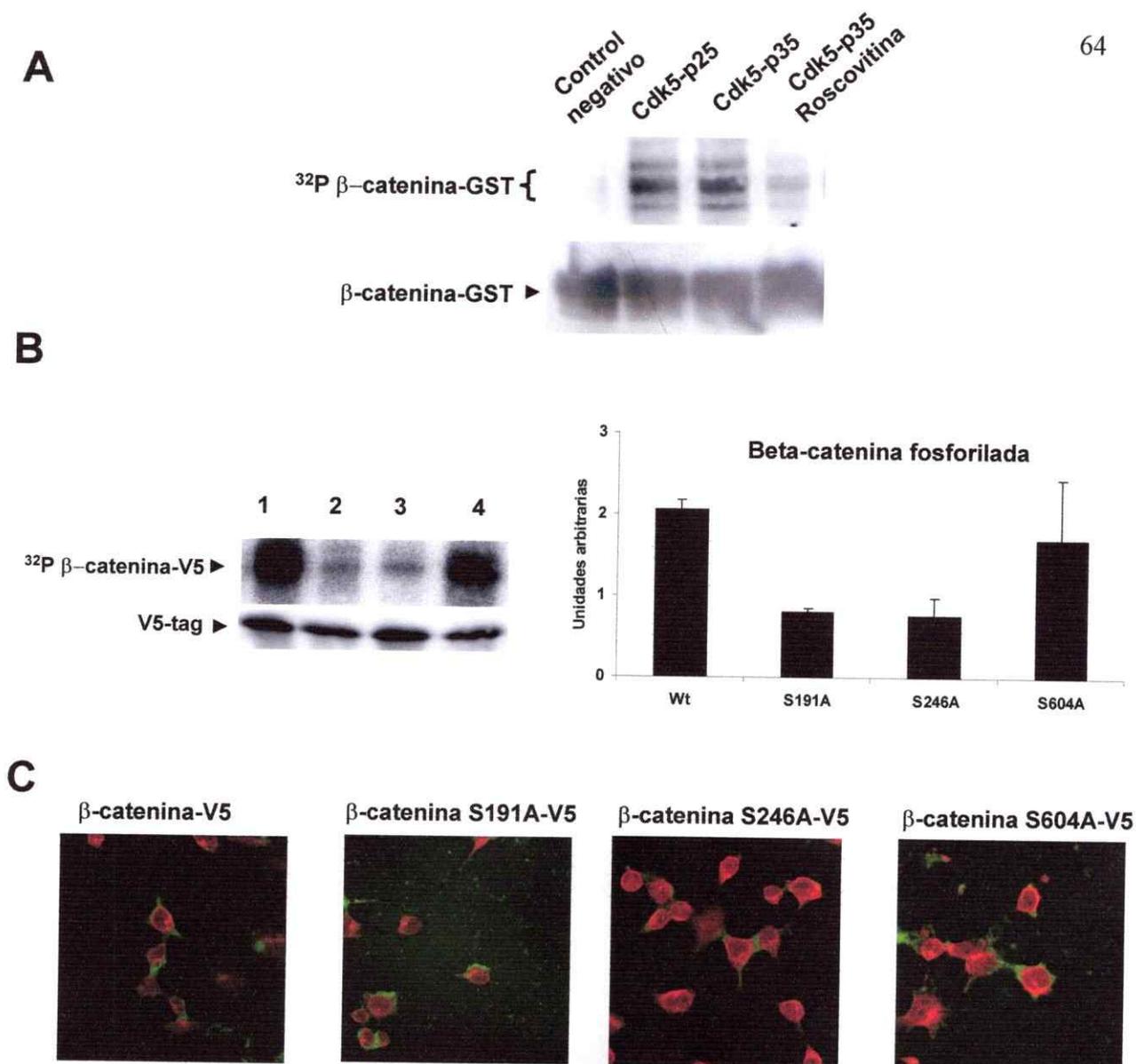


Figura 11. Identificación de aminoácidos fosforilados por Cdk5/p35 en beta-catenina. **Panel A:** Fosforilación de beta-catenina por Cdk5/p35 y Cdk5/p25 *in vitro*. Beta-catenina-GST fue incubada con el complejo Cdk5-GST/p35-GST o Cdk5-GST/p25-GST en presencia de $[\gamma^{32}\text{P}]$ dATP. El control negativo corresponde a beta-catenina-GST incubada con GST. Roscovitina $10\ \mu\text{M}$ fue utilizado como inhibidor de la quinasa Cdk5. **Panel B:** Fosforilación de beta-catenina-V5 y sus mutantes por Cdk5/p35 *in vitro*. Izquierda: Separación por SDS-PAGE de las construcciones de beta-catenina-V5 fosforiladas por Cdk5/p35 en presencia de $[\gamma^{32}\text{P}]$ dATP. Carril 1: beta catenina-V5; carril 2: beta-catenina S191A-V5; carril 3: beta-catenina S246A-V5; carril 4: beta-catenina S604A-V5. Derecha: Análisis densitométrico de la fosforilación de las construcciones de beta-catenina-V5 ($n=3$). Las reacciones de fosforilación fueron normalizadas por medio de la inmunodetección del epítopo V5 en las proteínas fosforiladas. **Panel C:** Células de neuroblastoma N2A fueron transfectadas con la construcción de beta-catenina-V5 y sus mutantes. En verde se observa la inmunodetección del tag-V5 de las construcciones de beta-catenina-V5 y en rojo se observa beta-tubulina.

5.4. Cdk5/p35 participa en la regulación de la proteína delta-catenina.

5.4.1. Interacción de Cdk5 con delta-catenina en células neuronales.

Delta-catenina es una proteína implicada en adhesión celular y pertenece a la familia de proteínas con dominio de *armadillo*. Se expresa en tejido nervioso y se localiza en el soma y dendritas de las células neuronales (Lu y cols., 1999). En forma similar a beta-catenina, delta-catenina interactúa con caderina y participa en la formación de los focos de adhesión (Barth y cols., 1997). Cambios de expresión de delta-catenina ocurren en el proceso de migración neuronal, donde parece ser clave en etapas tempranas de éste, para la interacción célula-célula y en etapas tardías del desarrollo del sistema nervioso con la formación de dendritas (Ho y cols., 2000).

Cuando analizamos la secuencia de la proteína delta-catenina por medio del programa NetPhos 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos>), encontramos una serie de posibles sitios de fosforilación por Cdk5. Además estos sitios estarían localizados principalmente en la región de armadillo. De este modo nos interesó estudiar si delta-catenina era sustrato de Cdk5/p35 en células neuronales.

Con el objeto de investigar la expresión de esta proteína en células neuronales, realizamos estudios de inmunodetección en células corticales cultivadas entre 0 y 10 días para inducir su diferenciación. En la Figura 12A, se muestra que delta-catenina incrementa su expresión entre el segundo y tercer día de crecimiento, mientras que beta-catenina no cambia sus niveles en el curso de la diferenciación (n=3). Por otra parte, utilizando estudios de inmunolocalización de p35 y delta-catenina en células corticales cultivadas por 7 días, observamos que p35 se

distribuye en forma homogénea en estas células. En cambio delta-catenina exhibió una distribución preferencial en el soma y en las dendritas (Figura 12B). El análisis por microscopia confocal, mostró que p35 y delta-catenina co-localizan en el soma y dendritas de las neuronas corticales (Figura 12 B).

Adicionalmente nos interesó analizar la interacción entre el sistema Cdk5/p35 y delta-catenina. En las Figuras 13A y 13B se puede observar que Cdk5 y delta-catenina se encuentran asociadas en extractos de cerebro de rata y células de neuroblastoma N2a. Además, al utilizar anticuerpos dirigidos a Cdk5 o delta-catenina, se produce co-inmunoprecipitación de estas proteínas (n=3) (Figura 13A y B).

Por otro lado, como se observa más abajo en la Figura 13C se muestran los resultados de los ensayos de *pull down*, en los cuales se incubaron extractos de cerebro adulto con Cdk5 o p35 fusionadas a GST. En este estudio, sólo p35-GST es capaz de interactuar con delta-catenina. El ensayo de *pull down* con Cdk5-GST no muestra una señal en la inmunodetección, resultado que sugiere que la asociación con delta-catenina es débil o que para la interacción es necesaria la presencia de p35 (n=3) (Figura 13C).

Con el objeto de investigar si la región de armadillo esta implicada en la interacción de delta-catenina y p35 se realizaron también ensayos de *pull down*. Para ello, construcciones de delta-catenina en su extensión total o solo la región de armadillo fusionados a GFP, fueron transfectadas en células Cos7, las cuales no expresan delta-catenina. Posteriormente, extractos de estas células fueron utilizados

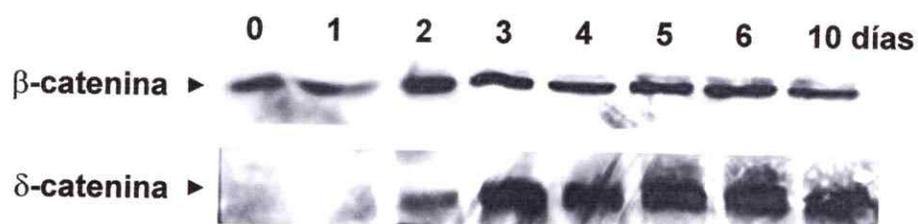
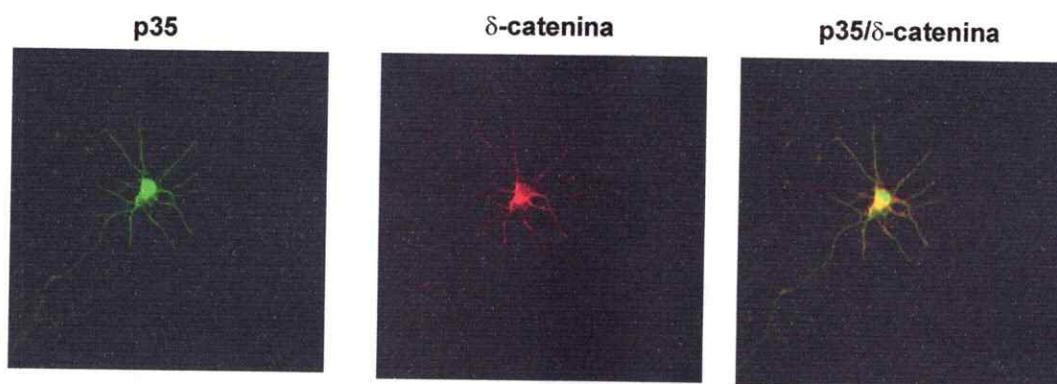
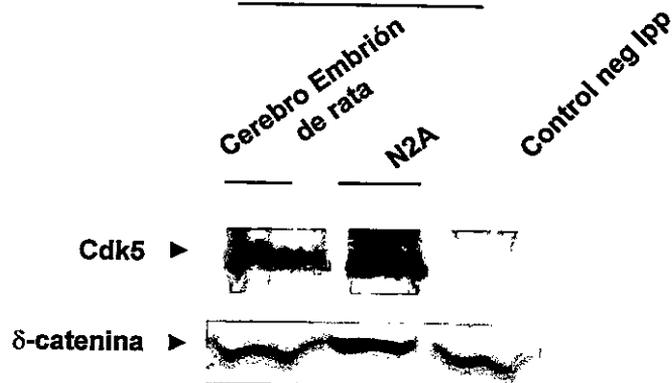
A**B**

Figura 12. Expresión y localización de delta-catenina en células neuronales.
Panel A: Inmunodetección de beta-catenina y delta-catenina en células corticales de embrión de rata diferenciadas de 0 a 10 días. **Panel B:** Co-localización de delta-catenina y p35 en neuronas corticales de embrión de rata E18, cultivadas por 7 días. En verde p35, en rojo delta-catenina y en amarillo se muestra la colocalización de estas dos proteínas en el soma y dendritas de las neuronas corticales (n=3).

AIpp
δ-catenina

68

**B**

Ipp Cdk5

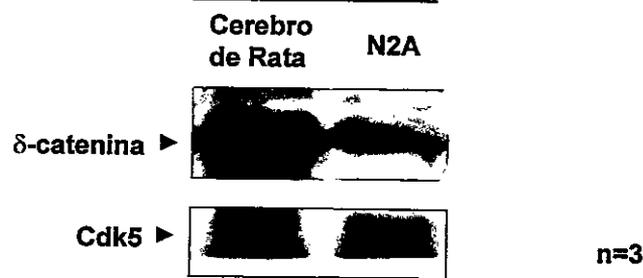
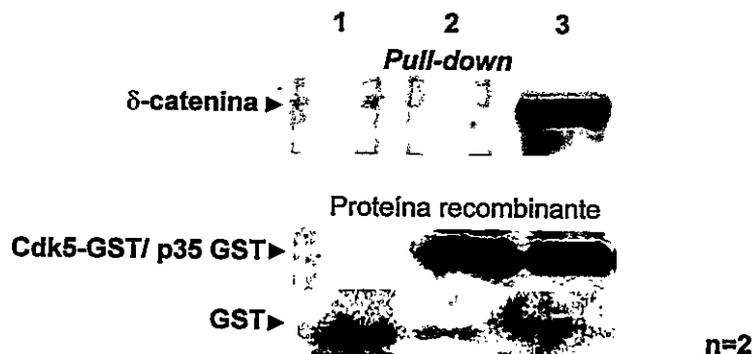
**C**

Figura 13. Interacción de Cdk5/p35 con delta-catenina. Panel A, B: Co-inmunoprecipitación de delta-catenina y Cdk5 en extractos de cerebro de rata y neuroblastoma N2A. Las proteínas inmunoprecipitadas fueron separadas en un gel de SDS-PAGE y posteriormente transferidos en membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron inmunodetectadas utilizando un anticuerpo dirigido a Cdk5 y delta-catenina respectivamente. Panel C: Ensayo de pull-down. Extractos de cerebro de rata fueron incubados con construcciones de p35 y Cdk5 fusionados a GST. Los complejos fueron analizados por Western blot. Carril 1: Extractos de cerebro de rata incubado con GST; carril 2: Extractos de cerebro de rata incubado con Cdk5-GST; carril 3: Extractos de cerebro de rata incubado con p35-GST. Panel superior: Pull-down de delta-catenina con p35-GST. Panel inferior: Inmunodetección de las proteínas recombinantes utilizadas en este estudio con un anticuerpo anti-GST.

para realizar los ensayos de *pull-down* con p35-GST. En la Figura 14 se observa que p35-GST interactúa con la región de armadillo de 1 a 10. Por otra parte, tanto delta-catenina en su extensión total, como también la construcción que tiene 5 de los dominios de *armadillo* interactúa con p35-GST (Figuras 14B y C). De este modo, estos resultados nos sugieren que delta-catenina interactúa con p35 y que la región de *armadillo* estaría participando en esta asociación. La interacción de delta-catenina con p35 pareciera ser similar a la que ocurre entre beta-catenina y p35.

A partir de este hallazgo, parte de la investigación se centró en los procesos relacionados entre la actividad de Cdk5 y la regulación de delta-catenina. Por medio de inmunodetección de delta-catenina en células N2a diferenciadas con dbt-cAMP observamos que los niveles de esta proteína disminuían a medida que se diferenciaban las células, donde a las 48 hrs. de diferenciación no se observó la presencia de delta-catenina (Figura 15A).

Con el fin de analizar la relación entre la actividad de sistema Cdk5/p35 y delta-catenina, se utilizó un sistema de expresión condicionada de la proteína p35 en células N2a-tTa, que expresan constitutivamente el transactivador dependiente de tetraciclina (ver Material y Métodos). Células N2a tTA se transfectaron con un plasmidio PBI-p35-GFP, que expresa en forma bidireccional p35 y GFP. Cuando las células N2a-tTa son tratadas con tetraciclina la expresión de GFP y p35 fue inhibida.

En la Figura 15 B se observa que las células N2a-tTa que son transfectadas con el plasmidio pBI p35-GFP disminuyen los niveles de la proteína delta-catenina en comparación a las células transfectadas solo con el vector pBI. Por otro lado, cuando las células transfectadas con el plasmidio pBI p35-GFP eran tratadas con

tetraciclina, los niveles de delta-catenina se mantenían similares a los de las células transfectadas con el vector pBI (Figura 15B).

Estos resultados sugieren que p35 y la actividad de Cdk5/p35 estarían relacionadas con la variación de los niveles de la proteína delta-catenina.

5.4.2. Fosforilación de delta-catenina por el sistema Cdk5/p35.

Para analizar la posible fosforilación de delta-catenina por la quinasa Cdk5, se realizaron ensayos de actividad quinasa *in vitro*, en los cuales se utilizó como sustrato delta-catenina purificada de células PC12- δ -catenina (ver Materiales y Métodos). En la Figura 16 se muestra el ensayo de actividad quinasa *in vitro* de Cdk5/p35 y Cdk5/p25. En este estudio se observó que delta-catenina era fosforilada por ambos complejos, y además cuando la reacción es co-incubada con roscovitina 10 μ M, se observó un marcado descenso en la fosforilación de la proteína (n=3).

Estos resultados demuestran que Cdk5 fosforila delta-catenina *in vitro*, y que esta modificación puede estar relacionada con el recambio de la proteína delta-catenina en el proceso de diferenciación.

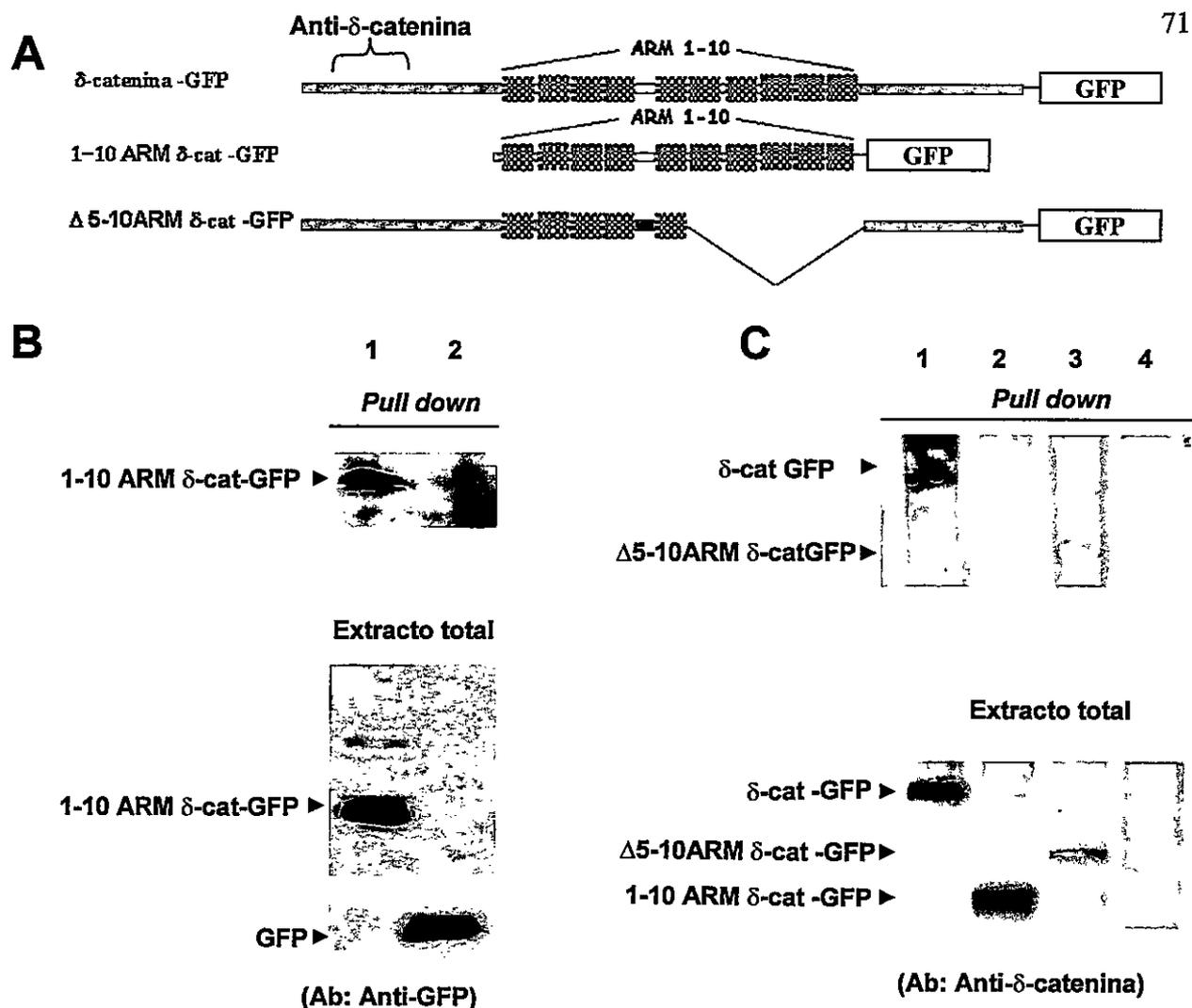


Figura 14. p35 interactúa con el dominio ARM de delta-catenina. Las construcciones de delta-catenina-GFP fueron transfectadas en células Cos7, posteriormente los extractos de estas células transfectadas fueron incubados con GST o p35-GST y se realizaron ensayos de pull-down. **Panel A:** Construcciones de delta-catenina fusionadas a GFP utilizadas en este estudio. **Panel B:** Ensayo de pull-down. Carril 1: células Cos7 transfectadas con 1-10 ARM δ -cat-GFP; carril 2: células Cos7 transfectadas con pEGFP. Panel superior: Pull-down de p35 con 1-10 ARM δ -cat-GFP. Panel inferior: Inmunodetección de las proteínas de fusión GFP en los extractos totales de las células Cos7 utilizados en el ensayo. **Panel C:** Ensayo de pull-down. Carril 1: células Cos7 transfectadas con δ -cat GFP; carril 2: células Cos 7 transfectadas con 1-10 ARM δ -cat -GFP; carril 3: células Cos7 transfectadas con Δ 5-10ARM δ -cat-GFP; carril 4: células Cos 7 transfectadas con pEGFP. Panel superior: Pull-down de p35 con δ -cat-GFP y 5-10ARM δ -cat-GFP. Panel inferior: Inmunodetección de delta-catenina en los extractos totales de células Cos7 utilizados en el ensayo (n=3).

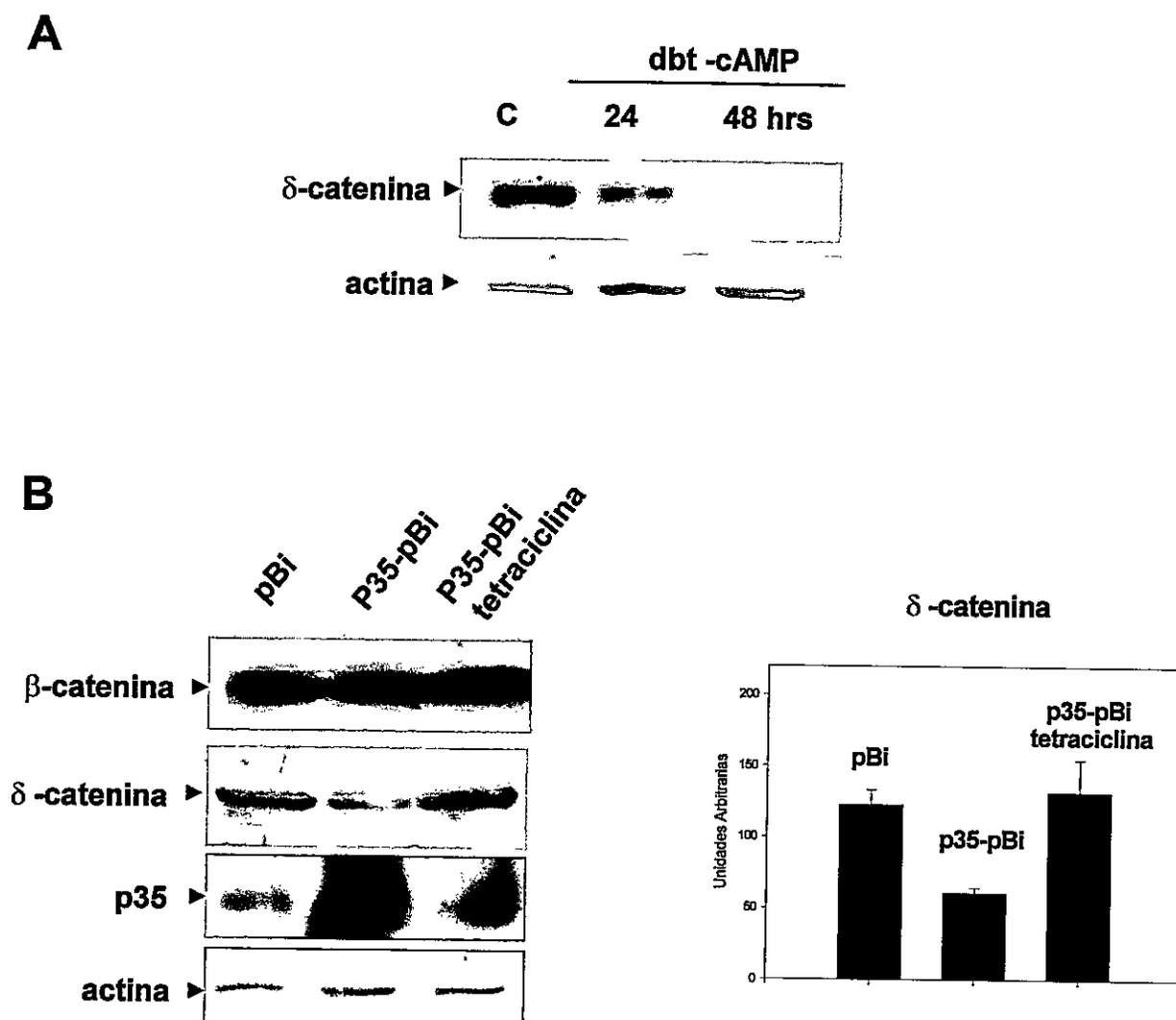


Figura 15. Regulación de delta-catenina por el sistema Cdk5/p35 en células N2A. Panel A. Inmunodetección de delta-catenina en células de neuroblastoma N2A diferenciadas por 0, 24 y 48 hrs. con dbt-cAMP 5 mM. **Panel B:** Células de neuroblastoma N2A que expresan el transactivador condicionado a tetraciclina tTa fueron transfectadas con el plasmidio p35-pBi-GFP por 48 hrs. en presencia y ausencia de tetraciclina 1 μ g/ml. La proteína p35 es sobre-expresada en ausencia de tetraciclina en las células N2a tTa. En presencia de tetraciclina la sobre-expresión es inhibida. Izquierda: Beta y delta-catenina se inmunodetectaron en los extractos de las células transfectadas. Derecha: Análisis densitométrico de los niveles de delta-catenina en las células N2A tTa trasfectadas con p35 en presencia y ausencia de tetraciclina. La proteína actina fue utilizada como control de carga (n=3).

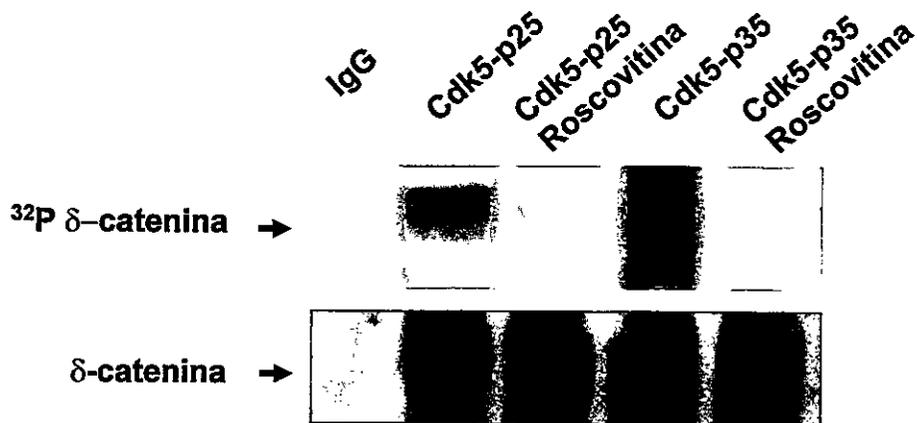


Figura 16. Ensayo de actividad quinasa utilizando delta-catenina como sustrato de Cdk5. Fosforilación de delta-catenina por Cdk5/p35 y Cdk5/p25 *in vitro*. La proteína delta-catenina fue inmunoprecipitada a partir de células PC12- δ -cat que expresan establemente esta proteína. Posteriormente delta-catenina fue fosforilada con Cdk5-GST/p35-GST o Cdk5-GST/p25-GST. Roscovitina 10 μ M un inhibidor de Cdk5, se utilizó como inhibidor de la reacción. IgG, control negativo de la inmunoprecipitación de delta-catenina de células PC12 (n=3).

6. DISCUSIÓN.

6.1. Regulación de p27 en neuroblastoma N2a.

La proteína p27 es un inhibidor de quinasas dependientes de ciclina del ciclo celular (Cdk's), que interactúa directamente con los complejos Cdk/ciclina, y bloquea el acceso del ATP al sitio activo de la enzima (Nomura y cols., 1997). La relación entre p27 y diferenciación celular ha sido descrita en varias investigaciones, donde parece cumplir un papel importante, tanto para detención del ciclo celular, como también en el proceso de diferenciación (Perez-Juste y Aranda, 1999; Baldassarre y cols., 2000; Durand y cols., 2000; Ohnuma y Harris, 2003).

En este trabajo, hemos observado que en células de neuroblastoma N2a sin diferenciar, la proteína p27 se encuentra en niveles elevados. Sin embargo, cuando se induce la diferenciación con dbt-cAMP, los niveles de la proteína p27 disminuyen gradualmente entre las 12 y 24 hrs. Posteriormente, a las 48 hrs. de diferenciación los niveles de la proteína incrementan. Este incremento de la proteína es concordante con el aumento del transcrito de p27 observado mediante *cDNA array* y RT-PCR (Figura 1 y 2).

Mediante el uso de *cDNA array* y RT-PCR demostramos también que la expresión de los transcritos de c-myc y de p27 cambian en forma coordinada durante el proceso de diferenciación de células N2a, donde a medida que el transcrito de p27 incrementa el de c-myc disminuye. A diferencia de p27, los niveles de la proteína c-myc varían en concordancia con los de su mRNA (Figura 2 y 6).

La presencia de altos niveles de p27 en células sin diferenciar, lleva a postular que bajo estas condiciones, p27 no ejerce su actividad regulatoria sobre las

Cdk's. Esta propiedad ha sido descrita en al células NIH-3T3 que son transformadas por la proteína E5/E8 del virus papiloma tipo 4 (O'Brien y cols., 2001).

Por otra parte, cuando analizamos el recambio de la proteína p27, observamos que este proceso transcurre en las primeras 4 hrs. en las células que son inducidas a diferenciarse con dbt-cAMP, mientras que en las células sin diferenciar el recambio transcurre alrededor de las 18 hrs (Figura3).

Una observación interesante, es la variación de la expresión de ciclina D1 en el proceso de diferenciación. Esta proteína muestra altos niveles de expresión en células sin diferenciar, pero en células inducidas a diferenciación, los niveles caen dramáticamente en las primeras 12 hrs. de tratamiento. Estos resultados están de acuerdo con los estudios previos que demostraron que ciclina D1 se encuentra en altos niveles en células tumorales (Yu y cols., 2001).

Nuestros experimentos de inmunoprecipitación demostraron que ciclina D1 se encuentra en un complejo junto a p27 en neuroblastoma sin diferenciar. De este modo podemos especular, que la asociación de p27 a ciclina D1 en células sin diferenciar esta relacionada tanto con el silenciamiento de la actividad de p27, como con la degradación de p27 observada en las primeras etapas de diferenciación (figura 1 y 4).

Utilizando una aproximación experimental que aprovecha las propiedades de termo estabilidad de p27, observamos que esta proteína, extraída de células N2a sin diferenciar, mantiene su capacidad de inhibir la actividad quinasa de Cdk2. De este modo, p27 posiblemente se encontraría secuestrada en estas células y no habría sufrido modificaciones estructurales (figura 4).

Esta evidencia sugiere que la secuencia de eventos en un curso temporal podría ser: (i) acumulación de complejos ciclina D1/p27 en células sin diferenciar, (ii) degradación de complejos ciclina D1/p27, (iii) síntesis de novo de p27, (iv) detención del ciclo celular, y (v) diferenciación. Posteriores estudios se requieren para definir la relación precisa en los mecanismos moleculares involucrados en este proceso.

Un análisis de estos resultados indican que existe una coordinación entre los cambios de expresión que presenta c-myc y p27 en la transición entre el estado no diferenciado y diferenciado de las células N2a. Por otra parte, la transfección con un clon de cDNA que codifica para la proteína p27 de ratón conduce a la formación de pequeños procesos neuríticos (figura 5). Esta observación nos sugiere que p27 estaría contribuyendo tanto a la detención del ciclo celular como a estimular la diferenciación en estas células. Durante el proceso de diferenciación de células gliales-Muller en *Xenopus*, p27 participa como inhibidor de Cdk's y favorece la diferenciación, además, la región NH₂-terminar parece ser importante en este proceso (Ohnuma y cols., 1999).

Por otra parte, el tratamiento de células N2a con oligonucleótidos antisentido dirigidos al transcrito de c-myc promueven la formación de pequeñas neuritas, y la disminución de los niveles de las proteínas ciclina D1 y p27. Los resultados mostrados por esta estrategia experimental concuerdan con descensos en los niveles de p27 y ciclina D1 que se producen en las primeras 12 hrs de diferenciación de células N2a con dbt-cAMP. De este modo la disminución del transcrito de c-myc podría estar involucrada en la regulación de la proteína p27 (Bouchard y cols., 1999; O'Hagan y cols., 2000). Estudios de inhibición de la expresión de ciclina D1 no

produjeron cambios en la expresión de c-myc y p27 y no se produjeron alteraciones en el fenotipo celular (figura 7 y 8).

En este estudio se ha demostrado que la proteína p27 se encuentra en un complejo junto a ciclina D1 en células N2a sin diferenciar. Además, estos resultados indican que en el proceso de diferenciación esta situación cambia, el complejo es degradado, p27 es re-expresado, mientras que la expresión de ciclina D1 es inhibida. De esta forma p27 produce efectos inhibitorios sobre las Cdk's del ciclo celular.

6.2. Participación de Cdk5 en el proceso de diferenciación.

La proteína Cdk5 participa en diversos procesos implicados en el metabolismo neuronal, tales como neurosecreción y reorganización de citoesqueleto, que son necesarios para que se originen los cambios de plasticidad celular implicados en procesos de sinapsis, desarrollo neurítico y migración neuronal. Los primeros hallazgos referentes a esta quinasa asociaron su actividad únicamente a la regulación mediada por la directa interacción con las proteínas, p35 y p39, ambas con una estructura terciaria similar a las ciclinas del ciclo celular. Basándose en esta evidencia, la expresión de los activadores de Cdk5 sería limitante para la activación de la quinasa. Al analizar los datos de la estructura cristalográfica de Cdk5/p25 se observa que la conformación obtenida en este complejo es semejante a la conformación del complejo Cdk1/ciclina A en su forma más activa (Tang y cols., 1997; Tarricone y cols., 2001).

Diversas investigaciones demostraron que la fosforilación en treonina 160 de las Cdk's del ciclo celular, regulan positivamente la actividad de estas quinasa, en tanto la fosforilación en treonina 14 y tirosina 15 origina la disminución de la

actividad. La regulación por fosforilación de las Cdk's del ciclo celular es mediada por la familia de quinasas Wee1 y la familia de fosfatasas Cdc25 (Saha y cols., 1997; Watanabe y cols., 1995).

La actividad de Cdk5 es inducida por la asociación a p35, pero se ha descubierto que además, posee regulación postraducciona mediada por fosforilación en serina 159 y tirosina 15, donde ambas producen la activación de la quinasa (Zukerberg y cols., 2000; Sharma y cols., 1999).

Cuando analizamos la proteína Cdk5 en las células de neuroblastoma N2a encontramos que a mediada que se origina la diferenciación se induce tanto un incremento de los niveles de Cdk5, como la fosforilación endógena en tirosina 15 (Figura 9). Este proceso está en concordancia con el requerimiento celular de la actividad de Cdk5 para coordinar los cambios en el citoesqueleto necesarios para la formación de neuritas. Estudios del grupo de L.H. Tsai han identificado a Abl como la tirosina quinasa que fosforila el residuo de tirosina 15 en Cdk5. Abl es una enzima que se encuentra en compartimentos tanto nucleares como citoplasmáticos de la célula y el bloqueo de su expresión origina la desorganización del citoesqueleto de actina en el neuroepitelio y alteración en el desarrollo del tubo neuronal (Zukerberg y cols., 2000). Es bastante interesante la relación de Abl con procesos que regulan adhesión celular. Abl interactúa con el complejo de membrana ROBO/Slit, y controla así el proceso de guía axonal. En esta situación beta-catenina es fosforilada por Abl y ROBO interactúa con N-caderina, impidiendo la formación de los focos de adhesión. Al disminuir la concentración de Split extracelular tanto ROBO como Abl dejan de ejercer su efecto sobre beta-catenina y N-caderina y se forman focos de adhesión, en los cuales se organiza el citoesqueleto de actina, cambiando la

plasticidad neuronal (Rhee y cols., 2002; Zukerberg y cols., 2000; Sharma y cols., 1999).

Del mismo modo que Abl incrementa la actividad quinasa de Cdk5 y participa en la reorganización de actina, este proceso puede favorecer un mecanismo necesario para el desarrollo normal de los axones. Se ha descrito que la actividad de Cdk5 regula negativamente el proceso de adhesión celular, por medio de la directa interacción del complejo Cdk5/p35 con beta-catenina. De este modo probablemente existe una conexión entre los efectos directos de Abl sobre la formación de complejos de adhesión y su efecto la actividad quinasa de Cdk5.

Por otra parte, una proteína denominada Cables, funciona como conexión transitoria entre Cdk5 y Abl. Una vez que Abl fosforila Cdk5, esta quinasa interactúa con p35 y fosforilaría a Cables produciendo la disociación del complejo Abl-Cables-Cdk5. La proteína Cables se expresa específicamente en los conos de crecimiento axonal, involucrando así un papel en la generación de nuevas prolongaciones (Zukerberg y cols., 2000).

En este contexto, la fosforilación de Cdk5 parece ser de real importancia en la regulación específica en ciertas regiones de la neurona. Aunque no ha habido nuevos aportes sobre el efecto de la fosforilación en tirosina 15 de Cdk5 en la su estructura tridimensional, observaciones en nuestro laboratorio demostraron que la transfección de mutantes en la fosforilación en tirosina 15, disminuyen la formación de neuritas en células PC12 diferenciadas con NGF (resultados no publicados).

Cdk5 se expresa constitutivamente en todas las células, pero es activa solo en células en diferenciación, tales como, neuronas, miocitos y células sanguíneas. En células que se encuentran en proliferación su función no ha sido determinada, pero

se ha propuesto que posee una actividad crucial en los procesos de apoptosis celular (Neystat y cols., 2001; Zhang y cols., 1997).

Al analizar la interacción de Cdk5 con ciclina D1, hemos demostrado que estas proteínas se encuentran asociadas en células N2a sin diferenciar, y que esta interacción podría estar contribuyendo al bloqueo de la actividad de Cdk5 en estas células (Figura 9). En la presente investigación se observó además que ciclina D1 participaría en la regulación de p27 por medio del secuestro e inhibición de su actividad. Podríamos postular así, que un proceso equivalente podría ocurrir en el caso de Cdk5 en células sin diferenciar (Muñoz y cols., 2003).

Recientes publicaciones indican que Cdk5 participaría en la inducción de la apoptosis mediante la interacción con ciclina D1, donde se ha observado que incrementos de expresión y actividad quinasa de Cdk5 se correlacionan con incrementos de expresión de ciclina D1 en células tumorales que fueron transplantadas en ratones (Yin y cols., 1999). Por otra parte, en procesos neurodegenerativos, tales como los de la enfermedad de Alzheimer, se ha observado la re-expresión de ciclina D1 y varias otras proteínas involucradas en el ciclo celular en neuronas maduras. Se postula que estos cambios en la expresión de proteínas del ciclo celular estarían involucrados en la apoptosis de células neuronales (Hamdane y cols., 2003; Hoozemans y cols., 2002).

Posiblemente Cdk5 interactúa con ciclina D1 en condiciones normales de proliferación, y existen otras proteínas involucradas en mantener la regulación de su actividad. Sin embargo, es necesario realizar investigaciones adicionales para determinar la precisa conexión funcional entre ciclina D1 y Cdk5.

Es bastante interesante mencionar además, que las características del complejo formado entre Cdk5 y p35 y su fosforilación endógena, participan posiblemente en el escape de la inhibición de su actividad quinasa mediada por la expresión de p27 (Lee y cols., 1997). Esta observación demuestra que las características estructurales del complejo Cdk5 hacen que su efecto sea específico tanto temporal como espacial en la célula. Anomalías de su actividad alteran su función subcelular. Además se ha demostrado que Cdk5 interactúa con p25 y origina la anormal fosforilación de p53 y retinoblastoma (Zhang y cols., 2002; Kato y cols., 1999).

6.3. Beta-catenina y Cdk5.

Beta y delta-catenina son proteínas que participan en la formación de complejos de adhesión mediados por caderinas. Ambas proteínas poseen dominios de *armadillo*, los cuales son fundamentales para la interacción proteína-proteína (Kemler y cols., 1993). Utilizando estrategias de doble híbrido se ha observado que p35 interactúa con beta-catenina, y esta interacción estaría implicada en los cambios de adhesión de neuronas corticales. Por otra parte, se ha demostrado que beta-catenina es sustrato de Cdk5 (Kwon y cols., 2000; Kesavapany y cols., 2000). En este trabajo de tesis hemos identificado dos posibles sitios fosforilados por Cdk5/p35 en beta-catenina: serina 191 y serina 246 (figura 10 y 11). El sitio serina 246, se encuentra localizado en el dominio de *armadillo* de beta-catenina, en la región de interacción con la proteína APC, una proteína de andamio involucrada en la degradación de beta-catenina (Rubinfeld y cols., 1993). La fosforilación de aminoácidos localizados en esta región favorecen la degradación de beta-catenina,

de este modo la posible fosforilación en serina 246 por Cdk5, puede estar involucrada en regular cambios en los niveles de la proteína beta-catenina (Graham y cols., 2000).

Por otra parte, beta-catenina no cambia significativamente su expresión en células N2a diferenciadas con dbt-cAMP ni en neuronas corticales de cerebro de embrión de rata. Esta observación indica que su regulación es mediada principalmente por mecanismos de recambio de la proteína y por modificaciones postraduccionales, las cuales controlan su distribución subcelular.

Adicionalmente, se ha demostrado que Pin 1, una prolil-isomerasa interactúa con beta-catenina fosforilada en serina 246 y bloquea la interacción de ésta con APC. De este modo PIN1 inhibe la degradación de beta-catenina, y contribuye a con su función como transactivador en el núcleo (Ryo y cols., 2001; 2003).

Durante el proceso de diferenciación, se originan importantes cambios en la adhesión célula-célula, y entre células y matriz extracelular. En este proceso se produce un cambio dinámico de la adhesión celular, para dar lugar a la formación de neuritas.

La regulación de beta-catenina por el sistema Cdk5, al parecer, participaría en la reorganización del citoesqueleto que ocurre durante la formación de las neuritas. La sobre-expresión de beta-catenina en neuronas corticales incrementa la arborización de las neuritas, en un proceso independiente de la actividad transactivadora de beta-catenina. De este modo, existe una función directa de la actividad de beta-catenina en procesos que regulan la formación de dendritas, posiblemente potenciando la formación de los focos de organización de citoesqueleto

de actina y microtúbulos en la membrana plasmática, necesarios para desarrollar y estabilizar nuevas ramificaciones dendríticas (Yu y cols., 2003).

Por otra parte beta-catenina interactúa con alfa-catenina, proteína que se encuentra asociada directamente con los filamentos de actina, Lis 1 y APC (Berrueta y cols., 1999; Ligon y cols., 2001). La proteína Lis1 interactúa con dineina, y ésta a su vez funciona como un motor intracelular que transporta proteínas del citoesqueleto necesarias para la formación de las prolongaciones en el crecimiento neurítico.

La actividad del sistema Cdk5/p35 sobre beta-catenina originaría así la pérdida de interacción de esta proteína con N-caderina, la liberación de beta-catenina podría funcionar como un evento de desensamblaje de focos de adhesión necesarios para originar cambios de la citoarquitectura celular y contribuir al desarrollo de neuritas (Kwon y cols., 2000).

Además la proteína Cdk5 /p35 contribuiría paralelamente a regular la dinámica de actina, por medio de su regulación negativa de PAK1, una proteína que es activada en diferenciación por efecto de la GTPasa Rac1 (Nickolic y cols., 1998; Rashid y cols., 2001).

Cuando Pak1 activa Tiam, esta proteína fosforilaría a cofilina y se produciría así el desensamblaje de los filamentos de actina. Pak1 también activa Abl, una tirosina quinasa que incrementa la actividad de Cdk5. Finalmente, Cdk5 fosforila a PAK1 en treonina 212 e inhibe su actividad (Nickolic y cols., 2002). De esta forma Cdk5, por medio de un sistema de retroalimentación negativa, podría participar en un fino mecanismo de regulación implicado en la dinámica tanto del citoesqueleto de actina como de los microtúbulos (Cross y cols., 1993; Maccioni y Cambiazo, 1995).

Cabe mencionar la posible implicancia de la actividad de Cdk5 sobre beta-catenina, en procesos neurodegenerativos. Es bastante conocido que beta-catenina disminuye sus niveles en pacientes con la enfermedad de Alzheimer. Además en cultivos de neuronas tratados con beta-amilode, disminuyen los niveles de beta-catenina mientras que Cdk5 incrementa su actividad (Zhang y cols., 1998; Alvarez y cols., 1999; 2001). De este modo, es posible que Cdk5 anormalmente activa, fosforile a la beta-catenina en epítomos que son determinantes para su asociación con APC y posterior degradación por el proteosoma.

Un resultado bastante interesante es la contribución de Pin1 una proli isomerasa, a la regulación de beta-catenina. Pin 1 produciría la isomerización de la región fosforilada en serina 246, impidiendo la interacción con APC y por lo tanto la degradación de beta-catenina (Ryo y cols., 2001). En cerebros de pacientes con la enfermedad de Alzheimer, la proteína Pin1 se encuentra capturada por los filamentos pareados helicoidales (PHF), disminuyendo los niveles intracelulares de esta proteína y por lo tanto su capacidad ejercer su función (Lu y cols., 1999b; Hamdane y cols., 2003). De esta forma, el análisis global de estos resultados sugiere que en la enfermedad de Alzheimer, la disminución de los niveles de beta-catenina sería potenciada por el incremento de la actividad de la quinasa de Cdk5. Esta fosforilaría un sitio regulatorio de beta-catenina es serina 246, como también la disminución de los niveles de Pin1, proteína que bloquearía finalmente la degradación mediada por el proteosoma de beta-catenina.

6.4. Delta-catenina y Cdk5.

Delta-catenina, es una proteína que se expresa en el soma y en las dendritas de células neuronales y participa en la formación de los focos de adhesión mediante su asociación a N-caderina (Lu y cols., 1999). En este trabajo, observamos que delta-catenina colocaliza con p35, en dendritas y el soma de neuronas corticales. Además, nuestros resultados muestran que estas proteínas se asocian *in vitro* y la región de *armadillo* de delta-catenina posiblemente esta implicada en la interacción directa entre ambas proteínas (Figuras 13 y 14). Adicionalmente, Cdk5/p35 fosforila a la proteína delta-catenina y nuestros resultados sugieren que participaría en la regulación de los niveles de esta proteína (Figura 16).

Al analizar los cultivos de neuronas corticales de embrión de rata diferenciadas por 10 días, se observó un incremento en la expresión de delta-catenina a partir del segundo día de diferenciación, resultado que se correlaciona con el incremento en la formación de dendritas. Curiosamente, en células de neuroblastoma N2a que son diferenciadas con dbt-cAMP se origina la disminución de los niveles de delta-catenina (figuras 12 y 15). Posiblemente este resultado está asociado con el fenotipo que originan las células N2a diferencias, el cual se ha demostrado mediante el uso de marcadores moleculares que correspondería a un tipo axonal (Fowler y cols., 2001).

Adicionalmente, observamos que cuando p35 es sobre-expresada en forma condicionada en células de neuroblastoma N2a, se produce una disminución de los niveles de delta-catenina, efecto que es revertido cuando se inhibe la expresión de p35 (figura 15). Estas observaciones nos sugieren un mecanismo de regulación de

delta-catenina, donde el sistema Cdk5/p35 podría estar involucrado en la regulación de la distribución en dendritas o axones de esta proteína.

La función de delta-catenina parece estar regulada por cambios en los patrones de fosforilación endógena. La modificación postraducciona de esta proteína contribuiría a una función destinada a mantener un balance entre la elongación o ramificación de las neuritas (Martinez y cols.,2003). En el proceso de elongación de neuritas, delta-catenina interactúa con cortactina, se produce el ensamblaje de los complejos ARP2/3 y se organiza el citoesqueleto de actina, en cambio cuando delta-catenina es fosforilada en residuos de tirosina, por quinasas como Abl y Src, se bloquea la participación de delta-catenina en la nucleación de los filamentos de actina (Martinez y cols., 2003).

Al analizar el efecto de la fosforilación de delta-catenina mediado por Cdk5, posiblemente nos encontramos con otro sistema de regulación post-traducciona en el cual los niveles de delta-catenina son necesariamente disminuidos en células N2a en diferenciación con el propósito de facilitar la elongación de las neuritas. Altos niveles de delta-catenina en el sistema contribuirían a la formación de ramificaciones, esto no se observa en nuestro modelo celular, el cual solo manifiesta el aumento de la longitud de neuritas en la diferenciación.

Cdk5 y p35 se distribuyen tanto en axones como en dendritas durante todo el desarrollo de células neuronales, además, un incremento de la actividad de Cdk5 coincide con incrementos de la actividad de Abl, de este modo, la fosforilación de delta-catenina por Cdk5/p35 podría estar involucrada funcionalmente con la actividad de Abl para potenciar la formación de ramificaciones en dendritas.

Diferentes Rho GTPasas inducen cambios en la dinámica del citoesqueleto que conducen a la formación de ramificaciones dendríticas, por ejemplo, incrementos de la actividad de RhoA disminuye de la formación de ramificaciones, mientras que Rac1 promueve la formación y estabilización (Nickolic y cols., 2002).

Se ha sugerido un sistema de *crosstalk* entre las Rho GTPasa, en el cual Rho A es activado por Rac1 e inhibido por Cdc42, luego cuando RhoA activo, actúa negativamente sobre Rac1. De este modo se origina un sistema dinámico en la formación de ramificaciones dendríticas. Recientes estudios han demostrado que estímulos glutamanérgicos inducen la formación de ramificaciones y arborización para la formación de nuevas sinapsis. En este proceso la actividad de Rac1 incrementa y una vez que las ramificaciones han sido desarrolladas, RhoA es activada y se origina la detención del proceso, en cambio en neuronas no estimuladas la actividad de RhoA es alta y la de Rac 1 es baja (Li y cols., 2002, Sin y cols., 2002).

Los antecedentes derivados de publicaciones recientes indican que en neuronas corticales, tanto la sobre-expresión, como la fosforilación en tirosina de delta-catenina contribuiría con la inhibición de RhoA, lo cual conduciría a un incremento en las ramificaciones de las dendritas (Martinez y cols. 2003; Lu y cols., 2002).

Posiblemente delta-catenina cumpliría dos importantes funciones: una en eventos que preceden en proceso de migración neuronal, en etapas de desarrollo embrionario E11-E18, en procesos de interacción célula-célula. En esta etapa, cuando los progenitores neuronales comienzan a migrar, la expresión de delta-catenina disminuye, contribuyendo a los cambios a la pérdida de adhesión necesaria.

para originar un cambio en la dinámica de la plasticidad del citoesqueleto. Otra función sería ejercida en etapas adultas, donde delta-catenina jugaría un papel en los procesos de ramificación de dendritas, evento necesario para que se originen nuevas conexiones. Cdk5/p35, podría participar en la fosforilación de delta-catenina y contribuir a potenciar la inhibición de RhoA (Ho y cols., 2000).

En la Figura 17 se esquematizan de manera general los resultados obtenidos en este trabajo. En las células de neuroblastoma N2a sin diferenciar se origina la acumulación de la proteína p27, y esta proteína no ejerce su efecto sobre las quinasas dependientes de ciclina posiblemente debido a su asociación con ciclina D1 (O'Brien y cols., 2001). Luego, al transcurrir la diferenciación, este complejo es degradado. Posteriormente, en etapas tardías de diferenciación p27 es sintetizado nuevamente. Adicionalmente la proteína c-myc disminuye su expresión en la diferenciación, efecto que estaría directamente relacionado al recambio de p27 (O'Hagan y cols., 2000).

En tanto la proteína Cdk5 que se expresa ubicuamente, y en células sin diferenciar estaría asociada a ciclina D1. En etapas más avanzadas del proceso de diferenciación, Cdk5 incrementaría su actividad durante la diferenciación por medio de un incremento de expresión, interacción con p35 y la fosforilación endógena. Por otro lado, durante el proceso de diferenciación, beta y delta-catenina serían fosforiladas por el sistema Cdk5/p35, y esta modificación contribuiría a la disociación de estas proteínas de N-caderina (Kwon y cols., 2000).

Las poblaciones de beta y delta-catenina posteriormente serían posiblemente degradadas o se redistribuirían. De este modo se produciría la reorganización de los focos de adhesión en las células neuronales, evento necesario para la formación de

neuritas. Finalmente, en este trabajo sugerimos que tanto beta como delta-catenina serían sustratos de Cd5/p35, y la fosforilación originada por esta quinasa produciría cambios importantes en la organización del citoesqueleto y los focos de adhesión en células en proceso de diferenciación.

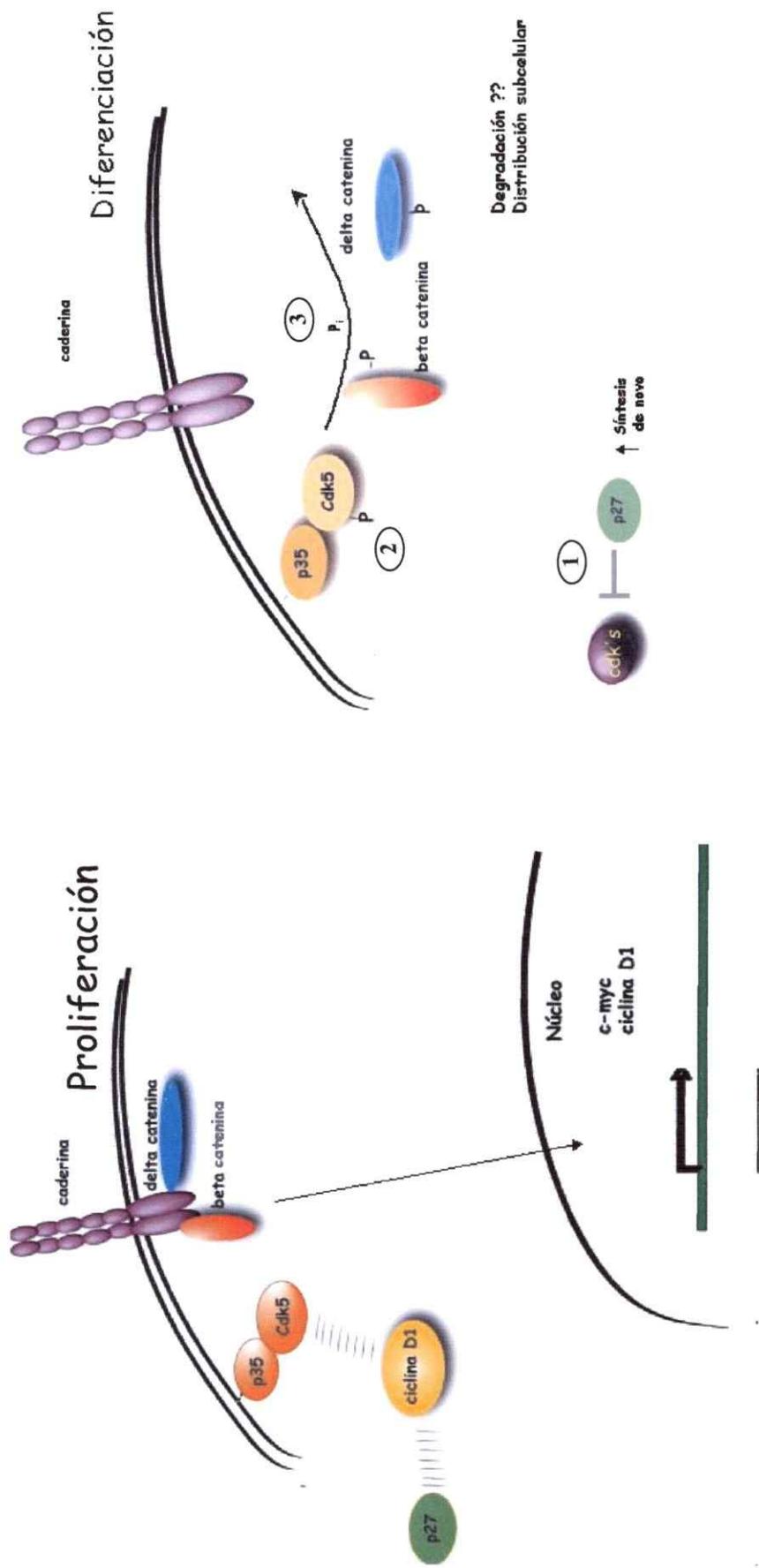


Figura 17. Esquema integrativo de eventos que transcurren en la diferenciación de neuroblastoma N2A. En las células de neuroblastoma N2a sin diferenciar la proteína p27 se encuentra acumulada y asociada a ciclina D1. Luego, al transcurrir la diferenciación, este complejo es degradado. Posteriormente, en etapas tardías de diferenciación p27 es sintetizado nuevamente (1). En tanto la proteína Cdk5 en células sin diferenciar estaría asociada a ciclina D1, y en etapas más avanzadas del proceso de diferenciación, Cdk5 incrementaría su actividad mediante un incremento de expresión, interacción con p35 y la fosforilación endógena (2). Por otro lado, durante el proceso de diferenciación, beta y delta-catenina serían fosforiladas por el sistema Cdk5/p35, y esta modificación contribuiría a la disociación de estas proteínas de N-caderina (Kwon y cols., 2000) (3). Las poblaciones de beta y delta-catenina posteriormente serían posiblemente degradadas o se redistribuirían.

Tabla 1

Cambios en la expresión génica en células N2A diferenciadas 24 y 48 hrs con dbt-cAMP			
TRANSCRITO		24 hrs/control	48hrs/control
Factores de transcripción			
LCK		-1,69452875	-1,69452875
Csf-1 receptor		0	1,86111137
BRCA2		0	1,93477007
H-ras po		-0,49846789	-1,82000689
B-mib protooncogene		1,966675	0
ret protooncogene		-1,90883428	-1,90883428
Ear-2		-1,74663101	-1,74663101
thyroid hormone receptor		0,4877563	-1,64473928
Jun D		-1,53473812	-1,53473812
Ski protooncogene		-1,74974416	-1,74974416
c-fos		-1,66352652	-1,66352652
sky protooncogene		-0,26081519	-2,09386211
cot protooncogene		-0,19615747	-1,97950494
TTF1		0,06051413	0,28480267
A-raf protooncogen		-1,83915792	-1,83915792
c-myc		-0,14274234	-2,46445423
B raf protooncogene		-0,58394972	-2,34788703
Ciclo celular			
cyclin A1		0	1,84983909
cyclin B1		1,77487628	0
p19n ink4		-1,80553035	-1,80553035
cyclin D1		-1,66830739	-1,66830739
p27kip1		0	2,09716209
cdk4		0,42187194	-1,69575461
prothymosin alpha		0,44462868	-0,21453235
Tob antiprolif		0	1,70457717
Estres celular			
HSP84		-0,1040729	-2,35033999
P-1-450		0	1,47466204
HMG1		-1,70973938	-1,70973938
ERp72 RE stress protein		-0,08488949	-1,88340402
MmMre 11		-1,44893776	-1,44893776
oxidative stress indu prot mRNA		0,25229967	-1,78145703
Moduladores intracelulares			
Rab2		-1,55159135	-1,55159135
RBRbeta cis-11 retin recep		-1,32212085	-1,32212085
NF-kb p65		0	# VALORI
transducin		-1,61979736	-1,61979736
Stat 6		-1,41101274	-1,41101274
14-3-3 prot		-0,40476314	-2,15221034
cortactin		-1,60868855	-1,60868855
transcription factorA10		-1,6558006	-1,6558006
Dv2		0,05538753	-1,56073211
IRF1		-1,31632698	-1,31632698
Cas		-1,49475172	-1,49475172
IKB alpha		0,00282831	-1,88787765
MAPK		-0,3127959	-2,00568048
I-kB beta		-1,53683401	-1,53683401
zyxin		0,12283051	-1,49903289

Tabla 1

Cambios en la expresión génica en células N2A diferenciadas 24 y 48 hrs con dbt-cAMP

TRANSCRITO	24 hrs/control	48hrs/control
Proteínas asociadas a apoptosis		
TDAG51	-2,00903167	-2,00903167
GST mu	-0,08661705	-0,40674011
neuronal death protein	0	1,83763681
NME2	-0,13523947	-2,37157444
GST YF-YF	-0,05373679	-0,65663074
BAG1	-0,35024685	-2,2506767
FAF 1	-1,47482907	-1,47482907
p55cdc	-1,81633154	-1,81633154
Bak apoptosis reg	-0,65300008	-2,22871349
Fas l recep	-1,39571205	-1,39571205
sitomrlisin 3	-1,39323924	-1,39323924
BAX	-0,18388701	-0,25384988
glutation reductase	-0,16074119	-2,29817225
PKB	-0,2438292	0,10531075
XPG	0	2,6071429
XPAC	0	2,3261317
translin	-1,83888099	-1,83888099
XRCC5	-1,33922188	-1,33922188
HR21spA	0,07924703	-1,96902839
ShcC adaptor	-1,92919579	-1,92919579
MHR23B	-0,48975459	-0,38757185
Rag 1	-1,76310429	0,20646173
MmRad52	-1,04610771	-1,04610771
Proteínas asociadas a DNA		
Mph-1	0	1,77359717
MOEN1	0	2,03372221
adipocit diff	-0,14460798	-0,16875373
engrailed protein (EN2) ho	0	1,96344342
ATBF1	0	2,53535522
SEF 2	-1,29482285	-1,29482285
GATA 3 tran fac	0	1,82421039
DRTF1 polipep 1	-1,96763335	-1,96763335
RIP 15	-0,28013256	-1,96025375
mGCM1	-1,41270291	-1,41270291
nuclear factor related p45	-0,0613452	0,29490186
T lymphocyte act prot	-0,30349029	-2,10482732
ZIF/268	-0,52932648	-2,31896334
CACCC Box bind prot BKLF	0	1,46044292
ikaros DNA bind prot	-0,02572933	-1,55283228
YB1 DNA binding protein	-0,01689888	-2,30236362
MusSox17	0	2,07029236
PAX 8	0	1,71610573
CTCF	-1,91251827	-1,91251827
cdx2	-0,19627179	-1,99344014
HMG 14	-0,37435828	-2,35173371
split hand /foot gene	-0,00794391	-0,41076131
ZFX	-0,27007901	-1,73265518

Cambios en la expresión génica en células N2A diferenciadas 24 y 48 hrs con dbt-cAMP					
TRANSCRITO		24 hrs/control	48hrs/control		
Factores de crecimiento					
EPOR		0	2,20310546		
ORPHAN RECEPTOR		0	1,82577939		
b-FGF -R		-1,36009983	-1,36009983		
G93		0	2,0964041		
granulocyte-macrop sfr		-0,12700343	-2,42846392		
lymphotoxin receptor		-0,03366706	-1,93859895		
ERBB3 recep		-1,83257299	0,08613456		
c-neu		0	2,07009857		
Proteínas de matriz extracelular					
LPSR		0	2,20966071		
cell surface glicoprotein MAC1alpha su		0	2,45720964		
laminin receptor		0,32513664	-1,8015911		
dystroglican 1		-1,78446329	-1,78446329		
INTEGRIN ALPHA 3 PRECURSOR		0	1,3073413		
integrin beta		-1,40256059	-1,40256059		
angiogenin		-0,33024692	-1,45370391		
BMP1		-1,68743035	-1,68743035		
Thrombomodulin		0	0		
THPO		-1,35304941	-1,35304941		
BMP-8a+		0	2,37555306		
TGFB1		-0,18550794	-2,10414515		
MADR2		-1,3674005	0,26575544		
IGFBP-6		0,15740589	1,02776052		
uromodulin		0	2,25362663		
follistatin		-1,41729371	-1,41729371		
IGFBP4		0,0861932	-0,05590557		
neuroleukin		-0,10659296	0,26034536		
somatomrdin A		0	1,32062953		
Proteínas del citoesqueleto					
cytokeratin 18		0	1,86929943		
MYL 6		-0,0663674	-0,3549338		
Rab-3b ras-related protein		-0,49462976	-2,31781351		
cathepsin B1		-1,59418309	-1,59418309		
ICE		-1,24997063	-1,24997063		
ACE		-1,91520181	-2,02537694		
cathepsin D		-0,19328588	-2,25942386		
cytotoxic cell protease 2		-0,39332977	-1,8543092		
cathepsin L		-0,90534563	-0,90534563		

* Los datos muestran el logaritmo (log) de la razón entre la expresión del transcrito en células diferenciadas 24 y 48 hrs sobre la expresión del transcrito en condiciones control.

** Cada uno de los datos fueron normalizados con respecto a beta-actina.

7. BIBLIOGRAFIA.

Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. (1997) Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* 16:3797-3804.

Alkarain A, Jordan R, Slingerland J. (2004) p27 Deregulation in Breast Cancer: Prognostic Significance and Implications for Therapy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 9:67-80.

Alvarez A, Munoz JP, Maccioni RB. (2001) A Cdk5-p35 stable complex is involved in the beta-amyloid-induced deregulation of Cdk5 activity in hippocampal neurons. *Exp Cell Res.* 264:266-274.

Alvarez A, Toro R, Caceres A, Maccioni RB. (1999) Inhibition of tau phosphorylating protein kinase cdk5 prevents beta-amyloid-induced neuronal death. *FEBS Lett.* 459:421-426.

Angevine J. Jr and Sidman R.L. (1961) Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature* 192: 766-768.

Baldassarre G, Boccia A, Bruni P, Sandomenico C, Barone MV, Pepe S, Angrisano T, Belletti B, Motti ML, Fusco A, Viglietto G. (2000) Retinoic acid induces neuronal differentiation of embryonal carcinoma cells by reducing proteasome-dependent proteolysis of the cyclin-dependent inhibitor p27. *Cell Growth Differ* 11:517-526

Banker GA, Cowan WM. (1977) Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res.* 126:397-342.

Barth AI, Nathke IS, Nelson WJ. (1997) Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol.* 9:683-690.

Bastians H, Townsley FM, Ruderman JV. (1998) The cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) induces N-terminal proteolytic cleavage of cyclin A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:15374-15381

Bhanot P, Brink M, Samos CH, Hsieh JC, Wang Y, Macke JP, Andrew D, Nathans J, Nusse R. (1996) A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature.* 382:225-230.

Bergmann E, Wanzel M, Weber A, Shin I, Christiansen H, Eilers M. (2001) Expression of P27(KIP1) is prognostic and independent of MYCN amplification in human neuroblastoma. *Int J Cancer* 95: 176-183

Berrueta L, Tirnauer JS, Schuyler SC, Pellman D, Bierer BE. (1999) The APC-associated protein EB1 associates with components of the dynactin complex and cytoplasmic dynein intermediate chain. *Curr Biol.* 9:425-428.

Bouchard C, Thieke K, Maier A, Saffrich R, Hanley-Hyde J, Ansorge W, Reed S, Sicinski P, Bartek J, Eilers M. (1999) Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *EMBO J* 18: 5321-5333

Chae T, Kwon YT, Bronson R, Dikkes P, Li E, Tsai LH. (1997) Mice lacking p35, a neuronal specific activator of Cdk5, display cortical lamination defects, seizures, and adult lethality. *Neuron.* 18:29-42.

Chen F, Studzinski GP (2001) Expression of the neuronal cyclin-dependent kinase 5 activator p35Nck5a in human monocytic cells is associated with differentiation. *Blood* 97:3763-3767.

Chenn A, McConnell SK. (1995) Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis. *Cell.* 82:631-641.

Chenn A, Walsh CA. (2002) Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science*. 297:365-369.

Chenn A, Walsh CA. (2003) Increased neuronal production, enlarged forebrains and cytoarchitectural distortions in beta-catenin overexpressing transgenic mice. *Cereb Cortex*. 13:599-606.

Conacci-Sorrell M, Simcha I, Ben-Yedidia T, Blechman J, Savagner P, Ben-Ze'ev (2003) Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK. *J Cell Biol*. 163:847-857.

Cremisi F, Philpott A, Ohnuma S. (2003) Cell cycle and cell fate interactions in neural development. *Curr Opin Neurobiol*. 13:26-33.

Cross D, Farias G, Dominguez J, Avila J, Maccioni RB. (1994) Carboxyl terminal sequences of beta-tubulin involved in the interaction of HMW-MAPs. Studies using site-specific antibodies. *Mol Cell Biochem*. 132:81-90.

Cruz JC, Tseng HC, Goldman JA, Shih H, Tsai LH. (2003) Aberrant Cdk5 activation by p25 triggers pathological events leading to neurodegeneration and neurofibrillary tangles. *Neuron*. 40:471-483.

D'Agnano I, Valentini A, Fornari C, Bucci B, Starace G, Felsani A, Citro G. (2001) Myc down-regulation induces apoptosis in M14 melanoma cells by increasing p27(kip1) levels. *Oncogene*. 20:2814-2825.

Doetsch, F., Petreanu, L., Caille, I., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2002). EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron*. 36: 1021-1034.

Durand, B. and Raff, M. (2000). A cell-intrinsic timer that operates during oligodendrocyte development. *Bioessays* 22: 64-71.

Dyer MA, Livesey FJ, Cepko CL, Oliver G. (2003) Prox1 function controls progenitor cell proliferation and horizontal cell genesis in the mammalian retina. *Nat Genet.* 34:53-58.

Esch T, Lemmon V, Banker G. (2000) Differential effects of NgCAM and N-cadherin on the development of axons and dendrites by cultured hippocampal neurons. *J Neurocytol.* 29:215-223.

Fantl, V., Stamp, G., Andrews, A., Rosewell, I., and Dickson, C. (1995). Mice lacking cyclin D1 are small and show defects in eye and mammary gland development. *Genes Dev.* 9: 2364-2372

Fero ML, Rivkin M, Tasch M, Porter P, Carow CE, Firpo E, Polyak K, Tsai LH, Broudy V, and Perlmutter RM. *et al.* (1996). A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell* 85: 733-74

Fowler MJ, Flaskos J, McLean WG, Hargreaves AJ. (2001) Effects of neuropathic and non-neuropathic isomers of tricresyl phosphate and their microsomal activation on the production of axon-like processes by differentiating mouse N2a neuroblastoma cells. *J Neurochem.* 7:671-8.

Gage FH, Kempermann G, Palmer TD, Peterson DA, Ray J. (1998) Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus. *J Neurobiol.* 36:249-266.

Galderisi U, Jori FP, Giordano A. (2003) Cell cycle regulation and neural differentiation. *Oncogene.* 22:5208-1529

Garcia-Silva S, Perez-Juste G, Aranda A. (2002) Cell cycle control by the thyroid hormone in neuroblastoma cells. *Toxicology*. 181-182:179-182

Godet M, Damestoy A, Mouradian S, Rudkin BB, Durand P. (2003) Key Role for Cyclin-Dependent Kinases in the First and Second Meiotic Divisions of Rat Spermatocytes. *Biol Reprod* 70: 1147-1152.

Gonzalez JL, Russo CJ, Goldowitz D, Sweet HO, Davisson MT, Walsh CA. (1997) Birthdate and cell marker analysis of scrambler: a novel mutation affecting cortical development with a reeler-like phenotype. *J Neurosci*. 17:9204-9211.

Graham TA, Weaver C, Mao F, Kimelman D, Xu W. (2000) Crystal structure of a beta-catenin/Tcf complex. *Cell*. 103:885-896.

Gupta A, Sanada K, Miyamoto DT, Rovelstad S, Nadarajah B, Pearlman AL, Brunstrom J, Tsai LH. (2003) Layering defect in p35 deficiency is linked to improper neuronal-glia interaction in radial migration. *Nat Neurosci*. 6 :1284-1291.

Gupta A, Tsai LH, Wynshaw-Boris A. (2002) Life is a journey: a genetic look at neocortical development. *Nat Rev Genet*. 3:342-355.

Hamdane M, Delobel P, Sambo AV, Smet C, Begard S, Violleau A, Landrieu I, Delacourte A, Lippens G, Flament S, Buee L. (2003) Neurofibrillary degeneration of the Alzheimer-type: an alternate pathway to neuronal apoptosis? *Biochem Pharmacol*. 66:1619-1625.

Hart MJ, de los Santos R, Albert IN, Rubinfeld B, Polakis P. (1998) Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta. *Curr Biol*. 8:573-581.

He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. (1998) Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*. 281:1509-1512.

Hellmich MR, Pant HC, Wada E, Battey JF.(1992) Neuronal cdc2-like kinase: a cdc2-related protein kinase with predominantly neuronal expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:10867-10871.

Hirooka K, Tomizawa K, Matsui H, Tokuda M, Itano T, Hasegawa E, Wang JH, Hatase O. (1996) Developmental alteration of the expression and kinase activity of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5)/p35nck5a in the rat retina. *J Neurochem*. 67:2478-2483.

Ho C, Zhou J, Medina M, Goto T, Jacobson M, Bhide PG, Kosik KS. (2000) delta-catenin is a nervous system-specific adherens junction protein which undergoes dynamic relocalization during development. *J Comp Neurol*. 420:261-276.

Hobmayer B, Rentzsch F, Kuhn K, Happel CM, von Laue CC, Snyder P, Rothbacher U, Holstein TW. (2000) WNT signalling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan Hydra. *Nature*. 407: 186 – 189.

Homayouni R, Curran T. (2000) Cortical development: Cdk5 gets into sticky situations *Curr Biol* 10:R331-R334.

Hu W, Bellone CJ, Baldassare JJ. (1999) RhoA stimulates p27(Kip) degradation through its regulation of cyclin E/CDK2 activity. *J Biol Chem* 274: 3396-3401.

Humbert S, Lanier LM, Tsai LH.(2000) Synaptic localization of p39, a neuronal activator of cdk5. *Neuroreport*. 11:2213-2216.

Hoozemans JJ, Bruckner MK, Rozemuller AJ, Veerhuis R, Eikelenboom P, Arendt T. (2002) Cyclin D1 and cyclin E are co-localized with cyclo-oxygenase 2 (COX-2) in pyramidal neurons in Alzheimer disease temporal cortex. *J Neuropathol Exp Neurol*.61: 678-688.

Hosoi T, Uchiyama M, Okumura E, Saito T, Ishiguro K, Uchida T, Okuyama A, Kishimoto T, Hisanaga S. (1995) Evidence for cdk5 as a major activity phosphorylating tau protein in porcine brain extract. *J Biochem (Tokyo)* 117:741-749.

Huard, J.M., Forster, C.C., Carter, M.L., Sicinski, P., and Ross, M.E. (1999). Cerebellar histogenesis is disturbed in mice lacking cyclin D2. *Development* 126: 1927-1935

Huber AH, Nelson WJ, Weis WI. (1997) Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell*. 90:871-882.

Huber AH, Weis WI. (2001) The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell*. 105:391-402.

Hulleman E, Bijvelt JJ, Verkleij AJ, Verrips CT, Boonstra J. (1999) Integrin signaling at the M/G1 transition induces expression of cyclin E. *Exp Cell Res* 253: 422-431.

Humbert, S., Dhavan, R., and Tsai, L. (2000) p39 activates cdk5 in neurons, and is associated with the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 113: 975-83

Ikeda S, Kishida S, Yamamoto H, Murai H, Koyama S, Kikuchi A. (1998) Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin. *EMBO J*. 17:1371-1384.

Kawamura Y., Fan Q., Hayashi H., Michikawa M., Yanagisawa K. and Komano H., (1999) Expression of the mRNA for two isoforms of neural plakophilin related arm-repeat protein/-catenin in rodent neurons and glial cells. *Neurosci. Lett.* 277:185-188.

Kato G, Maeda S. (1999) Neuron-specific Cdk5 kinase is responsible for mitosis-independent phosphorylation of c-Src at Ser75 in human Y79 retinoblastoma cells. *J Biochem (Tokyo)*. 126:957-961.

Kemler R (1993) From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet* 9:317-21

Kesavapany S, Lau KF, McLoughlin DM, Brownlees J, Ackerley S, Leigh PN, Shaw CE, Miller CC. (2001) p35/cdk5 binds and phosphorylates beta-catenin and regulates beta-catenin/presenilin-1 interaction. *Eur J Neurosci* 13:241-247.

Kikuchi A. (2003) Tumor formation by genetic mutations in the components of the Wnt signaling pathway. *Cancer Sci.* 94:225-229.

Kim K, Sirota A, Chen Yh YH, Jones SB, Dudek R, Lanford GW, Thakore C, Lu Q. (2002) Dendrite-like process formation and cytoskeletal remodeling regulated by delta-catenin expression. *Exp Cell Res.* 275:171-184.

Kiyokawa H, Kineman RD, Manova-Todorova KO, Soares VC, Hoffman ES, Ono M, Khanam D, Hayday AC, Frohman LA, Koff A. (1996) Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(Kip1). *Cell.* 85:721-732.

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

Kobayashi S, Ishiguro K, Omori A, Takamatsu M, Arioka M, Imahori K, Uchida T. (1993) A cdc2-related kinase PSSALRE/cdk5 is homologous with the 30 kDa subunit of tau protein kinase II, a proline-directed protein kinase associated with microtubule. *FEBS lett.* 342: 203-208

Krimpenfort P, Quon KC, Mooi WJ, Loonstra A, Berns A. (2001). Loss of p16Ink4a confers susceptibility to metastatic melanoma in mice. *Nature* 413: 83-86

Kusakawa G, Saito T, Onuki R, Ishiguro K, Kishimoto T, Hisanaga S. (2000) Calpain-dependent proteolytic cleavage of the p35 cyclin-dependent kinase 5 activator to p25. *J Biol Chem.* 275:17166-17172.

Kwon YT, Gupta A, Zhou Y, Nikolic M, Tsai LH. (2000) Regulation of N-cadherin-mediated adhesion by the p35-Cdk5 kinase. *Curr Biol.* 10:363-372.

Kwon YT, Tsai LH, Crandall JE. (1999) Callosal axon guidance defects in p35(-/-) mice. *J Comp Neurol.* 415:218-229.

Lazaro JB, Kitzmann M, Poul MA, Vandromme M, Lamb NJ, Fernandez A (1997) Cyclin dependent kinase 5, cdk5, is a positive regulator of myogenesis in mouse C2 cells. *J Cell Sci* 110 :1251-60.

Ledda F, Paratcha G, Ibanez CF. (2002) Target-derived GFRalpha1 as an attractive guidance signal for developing sensory and sympathetic axons via activation of Cdk5. *Neuron.* 36:387-401.

Lee MH, Nikolic M, Baptista CA, Lai E, Tsai LH, Massague J. (1996) The brain-specific activator p35 allows Cdk5 to escape inhibition by p27Kip1 in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:3259-3263.

Lee KY, Rosales JL, Lee BC, Chung SH, Fukui Y, Lee NS, Lee KY, Jeong YG. (2004) Cdk5/p35 expression in the mouse ovary. *Mol Cells* 17:17-22.

Levenberg S, Sadot E, Goichberg P, Geiger B. (1998) Cadherin-mediated transmembrane interactions. *Cell Adhes Commun.* 6:161-170.

Li DM, Sun H. (1998). PTEN/MMAC1/TEP1 suppresses the tumorigenicity and induces G1 cell cycle arrest in human glioblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15406-15411

Li Z, Aizenman CD, Cline HT.(2002) Regulation of rho GTPases by crosstalk and neuronal activity in vivo. *Neuron.* 33:741-750.

Ligon LA, Karki S, Tokito M, Holzbaur EL. (2001) Dynein binds to beta-catenin and may tether microtubules at adherens junctions. *Nat Cell Biol.* 3:913-7.

Lloyd RV., Erickson LA., Jin L, Kulig E, Qian X, Cheville JC, Scheithauer BW. (1999) p27kip1: a multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers. *Am J Pathol.* 154:313-323.

Lu Q, Paredes M, Medina M, Zhou J, Cavallo R, Peifer M, Orecchio L, Kosik KS. (1999a) delta-catenin, an adhesive junction-associated protein which promotes cell scattering. *J Cell Biol.* 144:519-32.

Lu PJ, Wulf G, Zhou XZ, Davies P, Lu KP. (1999b) The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature.*399: 784-788.

Lu Q, Mukhopadhyay NK, Griffin JD, Paredes M, Medina M, Kosik KS. (2002) Brain armadillo protein delta-catenin interacts with Abl tyrosine kinase and modulates cellular morphogenesis in response to growth factors. *J Neurosci Res.* 67:618-624.

Maccioni RB, Cambiazo V. (1995) Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly. *Physiol Rev.* 75:835-864.

Maccioni RB, Munoz JP, Barbeito L. (2001a) The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch Med Res.* 32:367-381.

Maccioni RB, Oth C, Concha II, Munoz JP. (2001b) The protein kinase Cdk5. Structural aspects, roles in neurogenesis and involvement in Alzheimer's pathology. *Eur J Biochem.* 268:1518-1527.

Mao J, Wang J, Liu B, Pan W, Farr GH 3rd, Flynn C, Yuan H, Takada S, Kimelman D, Li L, Wu D. (2001) Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol Cell.* 7:801-809.

Marthiens V, Padilla F, Lambert M, Mege RM. (2002) Complementary expression and regulation of cadherins 6 and 11 during specific steps of motoneuron differentiation. *Mol Cell Neurosci.* 20:458-475.

Martens, J.A. and Winston, F. (2003). Recent advances in understanding chromatin remodeling by Swi/Snf complexes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13, 136-142.

Mateyak MK, Obaya AJ, Sedivy JM. (1999) c-Myc regulates cyclin D-Cdk4 and Cdk6 activity but affects cell cycle progression at multiple independent points. *Mol Cell Biol* 19:4672-4683

Matsunaga M, Hatta K, Takeichi M. (1998) Role of N-cadherin cell adhesion molecules in the histogenesis of neural retina. *Neuron.* 1:289-295.

Matsuo T, Seth P, Thiele CJ. (2001) Increased expression of p27Kip1 arrests neuroblastoma cell growth. *Med Pediatr Oncols.* 36:97-99.

McConnell SK, Kaznowski CE. (1991) Cell cycle dependence of laminar determination in developing neocortex. *Science*. 254:282-285.

Miller JR, Moon RT (1996) Signal transduction through beta-catenin and specification of cell fate during embryogenesis. *Genes Dev* 10:2527-2539

Morris NR, Efimov VP, Xiang X. (1998) Nuclear migration, nucleokinesis and lissencephaly. *Trends Cell Biol.* 8:467-470.

Munoz JP, Alvarez A, Maccioni RB. (2000) Increase in the expression of the neuronal cyclin-dependent protein kinase Cdk-5 during differentiation of N2A neuroblastoma cells. *Neuroreport*. 11:2733-2738.

Munoz JP, Sanchez JR, Maccioni RB. (2003) Regulation of p27 in the process of neuroblastoma N2A differentiation. *J Cell Biochem.* 89:539-549.

Murray AW. (2004) Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell*. 116:221-234.

Nadarajah B, Parnavelas JG. (2002) Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci.* 3:423-432.

Nakagawara A. (1998). Molecular basis of spontaneous regression of neuroblastoma: role of neurotrophic signals and genetic abnormalities. *Hum Cell* 11:115-124

Nakayama, K., Ishida, N., Shirane, M., Inomata, A., Inoue, T., Shishido, N., Horii, I., and Loh, D.Y. (1996). Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell* 85: 707-720

Neystat M, Rzhetskaya M, Oo TF, Kholodilov N, Yarygina O, Wilson A, El-Khodori BF, Burke RE. (2001) Expression of cyclin-dependent kinase 5 and its activator p35 in

models of induced apoptotic death in neurons of the substantia nigra in vivo. *J Neurochem.* 77:1611-1625.

Niethammer M, Smith DS, Ayala R, Peng J, Ko J, Lee MS, Morabito M, Tsai LH. (2000) NUDEL is a novel Cdk5 substrate that associates with LIS1 and cytoplasmic dynein. *Neuron.* 28:697-711.

Nigg EA. (2001) Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:21-32

Nikolic M, Dudek H, Kwon YT, Ramos YF, Tsai LH. (1996) The cdk5/p35 kinase is essential for neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Genes Dev.* 10:816-825.

Nikolic M, Chou MM, Lu W, Mayer BJ, Tsai LH. (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 Rho GTPases and associated kinases in regulating neurite outgrowth. *Int J Biochem Cell Biol.* 34:731-745.

Nomura H, Sawada Y, Fujinaga K, Ohtaki S. (1997) Cloning and characterization of rat p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor *Gene* 191:211-218

O'Brien V, Grindlay GJ, Campo MS. (2001) Cell transformation by the E5/E8 protein of bovine papillomavirus type 4. p27(Kip1), elevated through increased protein synthesis is sequestered by cyclin D1-CDK4 complexes. *J Biol Chem* 276: 33861-33868.

O'Hagan RC, Ohh M, David G, de Alboran IM, Alt FW, Kaelin WG Jr, DePinho RA. (2000) Myc-enhanced expression of Cul1 promotes ubiquitin-dependent proteolysis and cell cycle progression. *Genes Dev* 14: 2185-2191.

Ohshima T, Gilmore EC, Longenecker G, Jacobowitz DM, Brady RO, Herrup K, Kulkarni AB. (1999) Migration defects of cdk5(-/-) neurons in the developing cerebellum is cell autonomous. *J Neurosci.* 19:6017-6026.

Ohshima T, Ward JM, Huh CG, Longenecker G, Veeranna, Pant HC, Brady RO, Martin LJ, Kulkarni AB. (1996) Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:11173-11178.

Ohnuma S, Harris WA. (1997) Accumulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1 and the timing of oligodendrocyte differentiation. *EMBO J.* 16:306-317.

Ohnuma S, Philpott A, Wang K, Holt CE, Harris WA. (1999) p27Xic1, a Cdk inhibitor, promotes the determination of glial cells in *Xenopus* retina. *Cell.* 99:499-510.

Ohnuma S, Hopper S, Wang KC, Philpott A, Harris WA. (2002) Co-ordinating retinal histogenesis: early cell cycle exit enhances early cell fate determination in the *Xenopus* retina. *Development.* 129:2435-2446.

Ohnuma S and Harris WA (2003) Neurogenesis and the cell cycle. *Neuron.* 40:199-208

Ortega MA, Montoya ME, Zarranz B, Jaso A, Aldana I, Leclerc S, Meijer L, Monge A. (2002) Pyrazolo[3,4-b]quinoxalines. A new class of cyclin-dependent kinases inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 10:2177-2184.

Oth C, Concha II, Arendt T, Stieler J, Schliebs R, Gonzalez-Billault C, Maccioni RB. (2002) AbetaPP induces cdk5-dependent tau hyperphosphorylation in transgenic mice Tg2576. *J Alzheimers Dis.* 4:417-430.

Paffenholz R. and Franke W. W. (1997) Identification and localization of a neurally expressed member of the plakoglobin/armadillo multigene family. *Differentiation* 61: 293–304.

Paffenholz R., Kuhn C., Grund C., Stehr S. and Franke W. W. (1999) The arm-repeat protein NPRAP (Neurojungin) is a constituent of the plaques of the outer limiting zone in the retina, defining a novel type of adhering junction. *Exp. Cell Res.* 250: 452–464.

Paglioni G, Pigino G, Kunda P, Morfini G, Maccioni R, Quiroga S, Ferreira A, Caceres A. (1998) Evidence for the participation of the neuron-specific CDK5 activator P35 during laminin-enhanced axonal growth. *J Neurosci.* 18:9858-9869.

Paria BC, Dey SK, Andrews GK. (1992) Antisense c-myc effects on preimplantation mouse embryo development. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 10051-10055.

Patrick, G.N., Zhou P., Kwon, Y.T., Howley, P.M., Tsai, L.H. (1998) p35, the neuronal-specific activator of cyclin-dependent kinase 5 is degraded by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 273:24057-64.

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.

Pearlman AL, Faust PL, Hatten ME, Brunstrom JE. (1998) New directions for neuronal migration. *Curr Opin Neurobiol.* 8:45-54.

Perez-Juste G, Aranda A. (1999) The cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is involved in thyroid hormone-mediated neuronal differentiation. *J Biol Chem* 274:5026-5031

Perez-Roger I, Kim SH, Griffiths B, Sewing A, Land H. (1999) Cyclins D1 and D2 mediate myc-induced proliferation via sequestration of p27(Kip1) and p21(Cip1). *EMBO J.* 18:5310-5320

Pigino G, Paglini G, Ulloa L, Avila J, Caceres A. (1997) Analysis of the expression, distribution and function of cyclin dependent kinase 5 (cdk5) in developing cerebellar macroneurons. *J Cell Sci.* 110 :257-270.

Polakis P (2000) Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 14:1837-51.

Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, Koff A. (1994) p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 8:9-22

Rashid T, Banerjee M, Nikolic M. (2001) Phosphorylation of Pak1 by the p35/Cdk5 kinase affects neuronal morphology. *J Biol Chem.*276: 49043-49052.

Rhee J, Mahfooz NS, Arregui C, Lilien J, Balsamo J, VanBerkum MF. (2002) Activation of the repulsive receptor Roundabout inhibits N-cadherin-mediated cell adhesion. *Nat Cell Biol.* 4:798-805.

Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Muller O, Chamberlain SH, Masiarz FR, Munemitsu S, Polakis P. (1993) Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science.* 262:1731-1734.

Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Fiol C, Munemitsu S, Polakis P. (1996) Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science.* 272:1023-1026.

Ryo A, Liou YC, Lu KP, Wulf G. (2003) Prolyl isomerase Pin1: a catalyst for oncogenesis and a potential therapeutic target in cancer. *J Cell Sci.*116:773-783.

Ryo A, Nakamura M, Wulf G, Liou YC, Lu KP. (2001) Pin1 regulates turnover and subcellular localization of beta-catenin by inhibiting its interaction with APC. *Nat Cell Biol.* 3:793-801.

Saha P, Eichbaum Q, Silberman ED, Mayer BJ, Dutta A. (1997) p21CIP1 and Cdc25A: competition between an inhibitor and an activator of cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Biol.* 17:4338-4345.

Saragoni L, Hernandez P, Maccioni RB (2000) Differential association of tau with subsets of microtubules containing posttranslationally-modified tubulin variants in neuroblastoma cells. *Neurochem Res* 25:59-70

Sasaki Y, Cheng C, Uchida Y, Nakajima O, Ohshima T, Yagi T, Taniguchi M, Nakayama T, Kishida R, Kudo Y, Ohno S, Nakamura F, Goshima Y. (2002) Fyn and Cdk5 mediate semaphorin-3A signaling, which is involved in regulation of dendrite orientation in cerebral cortex. *Neuron.* 35:907-920.

Sharma P, Sharma M, Amin ND, Albers RW, Pant HC. (1999) Regulation of cyclin-dependent kinase 5 catalytic activity by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:11156-11160.

Shetty KT, Kaech S, Link WT, Jaffe H, Flores CM, Wray S, Pant HC, Beushausen S. (1995) Molecular characterization of a neuronal-specific protein that stimulates the activity of Cdk5. *J Neurochem.* 64:1988-1995.

Shuang R, Zhang L, Fletcher A, Groblewski GE, Pevsner J, Stuenkel EL. (1998) Regulation of Munc-18/syntaxin 1A interaction by cyclin-dependent kinase 5 in nerve endings. *J Biol Chem.* 273:4957-4966.

Sin WC, Haas K, Ruthazer ES, Cline HT. (2002) Dendrite growth increased by visual activity requires NMDA receptor and Rho GTPases. *Nature*. 419:475-480.

Sommer L, Rao M. (2002) Neural stem cells and regulation of cell number. *Prog Neurobiol*. 66:1-18.

Takahashi M, Tsunoda T, Seiki M, Nakamura Y, and Furukawa Y. (2002) Identification of membrane-type matrix metalloproteinase-1 as a target of the β -catenin/Tcf4 complex in human colorectal cancers. *Oncogene*. 21:5861-5867.

Tamai K, Semenov M, Kato Y, Spokony R, Liu C, Katsuyama Y, Hess F, Saint-Jeannet JP, He X. (2000) LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature*. 407:530-535.

Tang D, Chun AC, Zhang M, Wang JH. (1997) Cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) activation domain of neuronal Cdk5 activator. Evidence of the existence of cyclin fold in neuronal Cdk5a activator. *J Biol Chem*. 272:12318-12327.

Tarricone C, Dhavan R, Peng J, Areces LB, Tsai LH, Musacchio A. (2001) Structure and regulation of the CDK5-p25(nck5a) complex. *Mol Cell*. 8:657-669.

Tetsu O, McCormick F (1999) Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*. 398:422-426.

Togashi H, Abe K, Mizoguchi A, Takaoka K, Chisaka O, Takeichi M. (2002) Cadherin regulates dendritic spine morphogenesis. *Neuron*. 35:77-89.

Tomaselli KJ, Neugebauer KM, Bixby JL, Lillien J, Reichardt LF. (1998) N-cadherin and integrins: two receptor systems that mediate neuronal process outgrowth on astrocyte surfaces. *Neuron*. 1:33-43.

Toyo-oka K, Shionoya A, Gambello MJ, Cardoso C, Leventer R, Ward HL, Ayala R, Tsai LH, Dobyns W, Ledbetter D, Hirotsune S, Wynshaw-Boris A. (2003) 14-3-3epsilon is important for neuronal migration by binding to NUDEL: a molecular explanation for Miller-Dieker syndrome. *Nat Genet.* 34:274-285.

Toyoshima H, Hunter T. (1994) p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell.* 78:67-74.

Trinczek B, Biernat J, Baumann K, Mandelkow EM, Mandelkow E. (1995) Domains of tau protein, differential phosphorylation, and dynamic instability of microtubules. *Mol Biol Cell.* 6:1887-1902.

Tsai LH, Takahashi T, Caviness VS Jr, Harlow E. (1993) Activity and expression pattern of cyclin-dependent kinase 5 in the embryonic mouse nervous system. *Development.* 119:1029-1040.

Tsai, L.H., Delalle, I., Caviness, V.S. Jr, Chae, T., Harlow, E. (1996) p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5. *Nature* 371:419-23

Vernon, A.E., Devine, C., and Philpott, A. (2003) The cdk inhibitor p27Xic1 is required for differentiation of primary neurones in *Xenopus*. *Development* 130: 85-92

Vidal A, Koff. (2000) A Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause *Gene* 247:1-15

Vlach J, Hennecke S, Alevizopoulos K, Conti D, Amati B. (1996) Growth arrest by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is abrogated by c-Myc. *EMBO J* 15: 6595-6604

Vleurick L, Kuhn ER, Decuypere E, Van Veldhoven PP. (1999) Isolation of plasma membranes and Golgi apparatus from a single chicken liver homogenate. *J Cell Biochem.* 72:349-355.

Watanabe N, Broome M, Hunter T. (1995) Regulation of the human WEE1Hu CDK tyrosine 15-kinase during the cell cycle. *EMBO J.*14:1878-1891.

Weiss, S., Dunne, C., Hewson, J., Wohl, C., Wheatley, M., Peterson, A.C., and Reynolds, B.A. (1996). Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J. Neurosci.* 16: 7599-7609.

Wesierska-Gadek J, Gueorguieva M, Horky M. (2003) Dual action of cyclin-dependent kinase inhibitors: induction of cell cycle arrest and apoptosis. A comparison of the effects exerted by roscovitine and cisplatin. *Pol J Pharmacols.* 55:895-902.

Willert K, Nusse R (1998) Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Curr Opin Genet Dev* 8:95-102

Wodarz A, Nusse R (1998) Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 114:59-88

Xiang X. (2003) LIS1 at the microtubule plus end and its role in dynein-mediated nuclear migration. *J Cell Biol.* 160:289-290.

Yin MB, Toth K, Cao S, Guo B, Frank C, Slocum HK, Rustum YM. (1999) Involvement of cyclin D1-cdk5 overexpression and MCM3 cleavage in bax-associated spontaneous apoptosis and differentiation in an A253 human head and neck carcinoma xenograft model. *Int J Cancer.*83: 341-348.

Yu Q, Geng Y, Sicinski P. (2001) Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation. *Nature*. 411:1017-1021.

Yu X, Malenka RC. (2003) Beta-catenin is critical for dendritic morphogenesis. *Nat Neurosci*.6:1169-1177.

Zapata-Torres G, Opazo F, Salgado C, Munoz JP, Krautwurst H, Mascayano C, Sepulveda-Boza S, Maccioni RB, Cassels BK. (2004) Effects of natural flavones and flavonols on the kinase activity of Cdk5. *J Nat Prod*. 67:416-420.

Zechner D, Fujita Y, Hulsken J, Muller T, Walther I, Taketo MM, Crenshaw EB 3rd, Birchmeier W, Birchmeier C. (2003) beta-Catenin signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system. *Dev Biol*. 258:406-448.

Zetterberg A, Larsson O, Wiman KG. (1995) What is the restriction point? *Curr Opin Cell Biol* 7: 835-842

Zhang J, Krishnamurthy PK, Johnson GV. (2002) Cdk5 phosphorylates p53 and regulates its activity. *J Neurochem*. 81:307-313.

Zhang Q, Ahuja HS, Zakeri ZF, Wolgemuth DJ. (1997) Cyclin-dependent kinase 5 is associated with apoptotic cell death during development and tissue remodeling. *Dev Biol*.183:222-233.

Zhang, P., Wong, C., DePinho, R.A., Harper, J.W., and Elledge, S.J. (1998). Cooperation between the Cdk inhibitors p27(KIP1) and p57(KIP2) in the control of tissue growth and development. *Genes Dev*. 12: 3162-316

Zhang Z, Hartmann H, Do VM, Abramowski D, Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M, Sommer B, van de Wetering M, Clevers H, Saftig P, De Strooper B, He X, Yankner

BA. (1998) Destabilization of beta-catenin by mutations in presenilin-1 potentiates neuronal apoptosis. *Nature*. 395:698-702.

Zhong JL, Banerjee MD, Nikolic M. (2003) Pak1 and its T212 phosphorylated form accumulate in neurones and epithelial cells of the developing rodent. *Dev Dyn*. 228:121-127.

Zhou J, Liyanage U, Medina M, Ho C, Simmons A. D., Lovett M. and Kosik K. S.,(1999) Presenilin 1 interaction in the brain with a novel member of the Armadillo family. *Neuroreport* 8 : 2085–2090.

Zukerberg LR, Patrick GN, Nikolic M, Humbert S, Wu CL, Lanier LM, Gertler B, Vidal M, Van Etten RA, Tsai LH. (2000) Cables links Cdk5 and c-Abl and facilitates Cdk5 tyrosine phosphorylation, kinase upregulation, and neurite outgrowth. *Neuron*. 26:633-646.

8. ADDENDUM.

Publicaciones durante el curso de la tesis.

Muñoz JP., Kosik KS. and. Maccioni R B (2004) The protein complex cdk5/p35 interact with delta-catenin (*En preparacion*).

Zapata-Torres G, Opazo F, Salgado C, Munoz JP, Krautwurst H, Mascayano C, Sepulveda-Boza S, Maccioni RB, Cassels BK. (2004) Effects of Natural Flavones and Flavonols on the Kinase Activity of Cdk5. *J Nat Prod.* 67:416-420.

Munoz JP, Sanchez JR, Maccioni RB. (2003) Regulation of p27 in the process of neuroblastoma N2A differentiation. *J Cell Biochem.* 89:539-49.

Farias GA, Munoz JP, Garrido J, Maccioni RB. (2002) Tubulin, actin, and tau protein interactions and the study of their macromolecular assemblies. *J Cell Biochem.* 85:315-24.

Maccioni RB, Munoz JP, Barbeito L. (2001) The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch Med Res.* 32:367-81.

Alvarez A, Munoz JP, Maccioni RB (2001) A Cdk5-p35 stable complex is involved in the beta-amyloid-induced deregulation of Cdk5 activity in hippocampal neurons. *Exp Cell Res.* 264:266-74.

Maccioni RB, Otth C, Concha II, Munoz JP. (2001) The protein kinase Cdk5. Structural aspects, roles in neurogenesis and involvement in Alzheimer's pathology. *Eur J Biochem.* 268:1518-27.

Munoz JP, Alvarez A, Maccioni RB. (2000) Increase in the expression of the neuronal cyclin-dependent protein kinase cdk-5 during differentiation of N2A neuroblastoma cells. *Neuroreport.* 11:2733-8.

Cross DC, Munoz JP, Hernandez P, Maccioni RB. (2000) Nuclear and cytoplasmic tau proteins from human nonneuronal cells share common structural and functional features with brain tau. *J Cell Biochem.* 78:305-17.