

UCH-FC
Biotecnología

V722
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA DE PREGRADO



**“DETERMINACIÓN DEL ROL DE PRPK (p53-RELATED
PROTEIN KINASE) EN EL DESARROLLO Y MANTENCIÓN DE
POLARIDAD NEURONAL”**

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

DAVID LEONARDO VILLARROEL CAMPOS

Director de Seminario de Título:

Dr. Christian González-Billault

Agosto de 2011

Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr. David Villarroel Campos

“DETERMINACIÓN DEL ROL DE PRPK (p53-RELATED PROTEIN KINASE) EN EL DESARROLLO Y MANTENCIÓN DE POLARIDAD NEURONAL”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología molecular.

Dr. Christian González-Billault

Director Seminario de Título

A blue ink signature of Christian González-Billault, written over a horizontal line.



Comisión de Evaluación

Dra. Magdalena Sanhueza

Presidenta Comisión

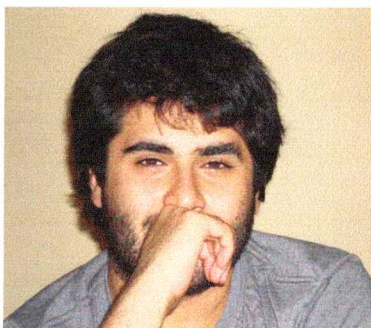
A black ink signature of Magdalena Sanhueza, written over a horizontal line.

Dr. Álvaro Glavic

Evaluador

A blue ink signature of Álvaro Glavic, written over a horizontal line.

Biografía



Nací en Punta Arenas en 1987, soy hijo de Betty Campos, profesora, y de Andrés Villarroel, liquidador de seguros. Estudié en la Escuela República de Croacia y en el Liceo Juan Bautista Contardi.

El 2006 vine a Santiago a estudiar biotecnología, durante algunos años viví en la Residencia Universitaria Cardenal Caro, en el centro de Santiago.

En la Universidad me entretuvieron más los ramos de investigación o conocimiento básico, que los aplicados, por eso quise ser parte de un laboratorio que tiene una mirada celular y molecular de ciertos aspectos acotados a la neurociencia y el desarrollo del sistema nervioso.

Actualmente curso el Magister en Ciencias Biológicas que se imparte en esta misma facultad.



Agradecimientos

Quiero agradecer a mis papás por apoyarme hasta el día de hoy en prácticamente lo que se me ocurra. A pesar de la distancia nunca he dejado de sentir su respaldo y su confianza.

Dar gracias a los compañeros de laboratorio por enseñarme algunas técnicas y el estado del arte de los temas que acá se manejan. En especial a la Cristi, Daniel Henríquez y Daniel Bórquez por sus asesorías en trabajo de laboratorio, biología molecular e inmunofluorescencias, respectivamente. También a mis compañeras Sarah y Yessia, por haber hecho los trabajos en grupo sin ningún problema juntos, durante toda la carrera. A Ricardo por aportar el dato preciso en muchas conversaciones, y a Dafne porque desde hace un tiempo, me siento apoyado por ella.

Además, hacer extensivos estos agradecimientos a la comisión evaluadora por todos los aportes proporcionados a este trabajo. Y por supuesto a Christian González por guiar este seminario de título y enmarcarlo dentro de sus proyectos.



ÍNDICE

Lista de abreviaturas	vii
Resumen	ix
Abstract	xi
Introducción	1
Objetivos	7
Materiales y Métodos	8
Resultados	13
Pull down de Lc1 – GST y PRPK	13
Expresión de PRPK en cerebro embrionario de rata	16
Localización subcelular de PRPK, p53 y P-p53	17
Clonamiento de PRPK WT	21
Sobreexpresión de PRPK en neuronas en cultivo	24
Discusión	26
Conclusiones	33
Bibliografía	34
Anexo	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Pull down de Lc1 – GST y PRPK	15
Figura 2. Expresión de PRPK en los estadios iniciales de polarización neuronal	16
Figura 3. Localización subcelular de PRPK, p53 Y P-p53	18
Figura 4. Cuantificación de la fluorescencia de P-p53 y PRPK	20
Figura 5. Comparación de la fluorescencia entre el eje del axón y el cono de crecimiento	21
Figura 6. Clonamiento y verificación de la expresión de PRPK	23
Figura 7. Sobreexpresión de PRPK en neuronas en cultivo	25
Figura Anexa 1	39
Figura Anexa 2	40
Figura Anexa 3	41

LISTA DE ABREVIATURAS

Akt:	PKB (protein kinase B)
Arp 2/3:	actin related protein 2/3
aPKC:	atypical protein kinase C
Cdc42:	cell division cycle 42
CRMP2:	collapsin response mediator protein
DIV:	Días <i>in vitro</i>
GSK3 β :	glycogen synthase kinase 3 β
IF:	Inmunofluorescencia
IL-2:	Interleukina 2
Lc1:	Cadena liviana de MAP1B
LIMK1:	LIM domain kinase 1
MAP1B:	Microtubule-associated protein 1B
MLC:	Myosin light chain
p53:	protein 53 o también tp53 (tumor protein 53)
PAR3:	partitioning defect 3
PAR6:	partitioning defect 6
PI3 kinasa:	phosphatidylinositol-3 kinasa



PIP ₃ :	phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
P-p53:	p53 fosforilada en el residuo Ser 15
PRPK:	p53-related protein kinase
Rac1:	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RAP1B:	Ras-related protein 1B
RhoA:	Ras homolog gene family, member A
ROCK:	Rho-associated protein kinase, o Rho kinasa
STEF:	SIF and Tiam 1-like exchange factor
Tiam1:	T-cell lymphoma invasion and metastasis 1
TP53RK:	tumor protein 53-related kinase, otro nombre de PRPK
WT:	<i>Wild type</i> , silvestre

Durante el cuerpo de este trabajo se utiliza el término *kinasa* y no *quinasa*, por ser la forma más utilizada en la literatura citada.

RESUMEN

Las neuronas son células altamente polarizadas, con un compartimento axonal y uno somatodendrítico molecular y funcionalmente distintos, los que son esenciales para el flujo de información en el sistema nervioso. Entender cómo se genera esta polaridad y posterior elongación del axón es fundamental para el estudio del desarrollo neuronal. La dinámica del citoesqueleto es un determinante clave para el surgimiento y mantención de polaridad, siendo su regulación el blanco efector de muchas vías intrínsecas involucradas en este proceso. Es el caso de MAP1B (microtubule-associated protein 1B), proteína estabilizadora de los microtúbulos, cuya ausencia provoca un retardo en la elongación del axón. En un ensayo de doble híbrido que buscaba nuevos interactores de la cadena liviana de MAP1B (Lc1) para así sugerir nuevas funciones de la proteína, un interactor resultó ser PRPK (p53-related protein kinase) una kinasa que fosforila a p53. El objetivo principal de este trabajo es establecer si PRPK tiene un rol en el desarrollo de polaridad o la elongación del axón; los objetivos específicos comprenden estudiar los niveles de expresión y localización de PRPK, además de corroborar la interacción con MAP1B a través de *Pull down* con Lc1 – GST. Los estudios de expresión y localización de las proteínas se hicieron mediante Western blot e inmunofluorescencia, usando cultivos de neuronas hipocampales de embriones de rata, un modelo estereotipado y ampliamente usado en estudios de polaridad. El rol funcional de PRPK se verificó sobreexpresando la proteína de *D. melanogaster* en neuronas en cultivo y viendo el fenotipo resultante. Los resultados indican que ambas proteínas interactúan y que no existe una distribución diferencial de PRPK ni cambios en su expresión durante la axonogénesis. Finalmente la sobreexpresión de PRPK altera la normal elongación del axón. Estos

resultados deben ser complementados con experimentos que consideren la utilización de formas dominante negativas o constitutivamente activa de PRPK y p53, para analizar su función en neuronas en cultivo y su rol en la vía de RhoA/ROCK.

ABSTRACT

Neurons are highly polarized cells, showing an axonal and a somatodendritic domain, which are different in molecular composition and functions. These compartments are essential to support the information flow through the nervous system. Unraveling the acquisition of polarity and axon outgrowth is a fundamental issue to understand neuronal development. Cytoskeleton dynamic is a key factor promoting the establishment and maintenance of polarity, since it is a target of several intrinsic pathways involved in this process. This is the case for MAP1B (microtubule-associated protein 1B), a microtubule stabilizing protein, the absence of which induces a retardation in axon elongation. In a previous yeast two hybrid assay to get novel interactors for MAP1B (using the MAP1B light chain (Lc1) as a bait), we found the PRPK (p53-related protein kinase) as a specific Lc1 interactor. Therefore, the goal major aim of this work is to determine whether PRPK has a role in the development of polarity. The specific aims are: to study of PRPK expression levels, its subcellular localization and also to verify its interaction with MAP1B using *Pull down assay* with Lc1 – GST. The expression assays and subcellular localization experiments were done through Western blot and immunofluorescence using cultured rat embryonic hippocampal neurons, a stereotyped and widely accepted model in polarity. The functional role of PRPK was analyzed by overexpressing the *D. melanogaster* protein in cultured neurons, and then looking for changes in the axonal elongation phenotype. The results confirmed the interaction between PRPK and LC1, indicated no changes either in the expression or subcellular localization of PRPK and finally, showed that the overexpression of PRPK alter the axonal elongation. These results should be complemented with experiments analyzing the contribution of both constitutively active

and dominant negative forms of PRPK and p53, to the development of an axon and their functional involvement in the RhoA/ROCK pathway.



INTRODUCCIÓN

Las neuronas están entre las células más polarizadas del organismo, contando con un compartimento axonal y uno somatodendrítico; ambos funcional, estructural y bioquímicamente distintos, lo que sustenta la integración y el flujo de información en el sistema nervioso. Esta comunicación, llevada a cabo a través de la sinápsis, en su forma canónica contempla el arribo de una señal eléctrica al terminal presináptico (axonal), la cual es transformada en una señal química mediante la liberación de neurotransmisores. Éstos a su vez se unen a canales de iones activados por la unión del ligando, en el terminal postsináptico (dendritas), donde se restablece la señal eléctrica. Del proceso de transmisión sináptica resulta evidente la importancia de la asimetría neuronal. Sin embargo el precursor neuronal no exhibe esta compartimentalización, debiendo ocurrir una ruptura previa de la simetría para generar una célula completamente funcional (Guerrier y Polleux, 2007).

Algunos estudios han puesto en evidencia que el desarrollo de polaridad *in vivo* sucede en sincronía con la migración neuronal (Barnes y Polleux, 2009), sin embargo la observación de que neuronas hipocampales aisladas en cultivo pueden desarrollar dominios axonal y dendríticos; logrando establecer polaridad (Banker y Cowan, 1979; Bartlett y Banker, 1984); hicieron de este modelo uno de los más empleados. Las neuronas en cultivo obtienen su forma característica a través de una secuencia de eventos estereotipada; en la cual, luego de la disgregación del tejido y siembra de las neuronas en sustratos adherentes, se observa la aparición de una estructura muy dinámica del tipo lamelipodio alrededor de la periferia de la célula, en lo que se conoce

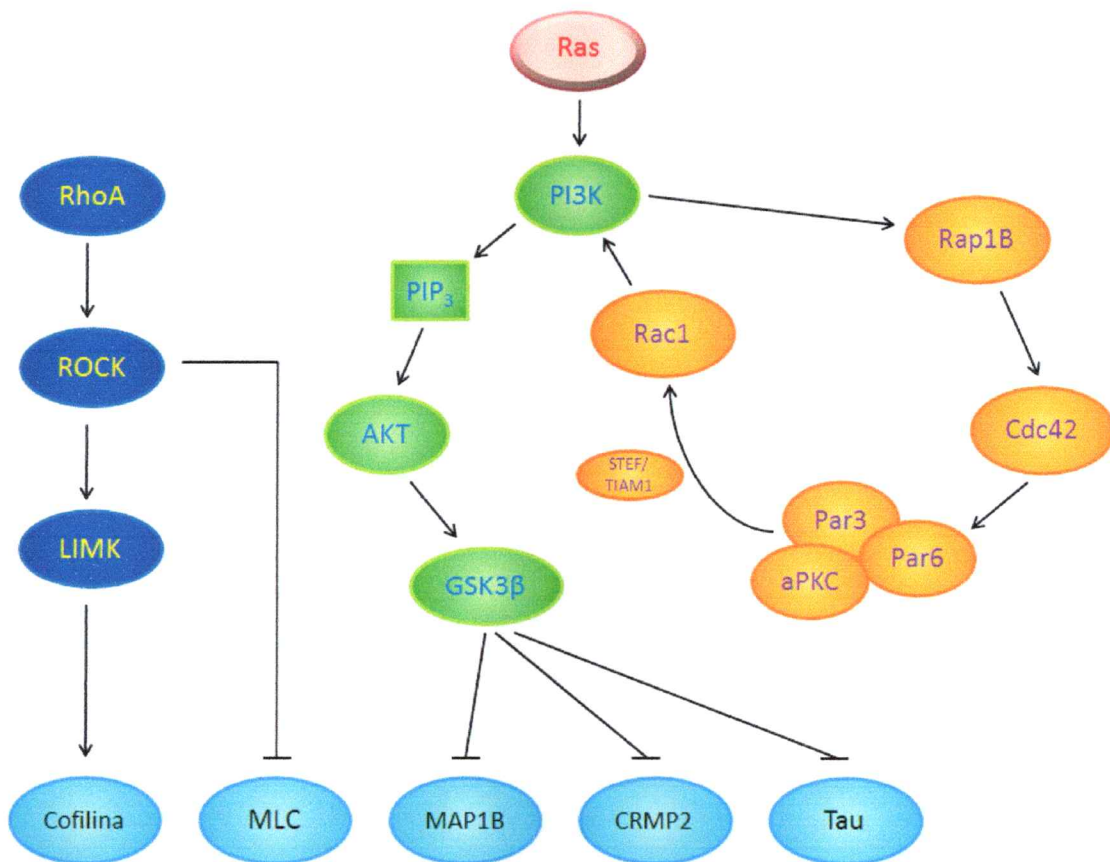
como estadio 1. Pocas horas después emergen desde el cuerpo celular varias extensiones citoplasmáticas, los llamados procesos menores, que son similares entre sí, elongándose y retrayéndose constantemente, sin presentar crecimiento neto; en el estadio 2. Varias horas más tarde, uno de los procesos menores comienza a crecer a una velocidad mayor que el resto, convirtiéndose en el axón, este es el estadio 3 y es cuando la neurona adquiere su morfología polarizada. El resto de los procesos menores formarán las dendritas, entre dos a tres días después de la formación del axón (estadio 4) y finalmente se formarán las espinas dendríticas, en el estadio 5, o de maduración dendrítica (Dotti y col, 1988).

Todas estas modificaciones morfológicas están gobernadas por cambios en cascadas de señalización intrínsecas bien caracterizadas durante las últimas dos décadas y que se resumen en el esquema 1. Estas incluyen la vía de señalización dependiente de Ras, una GTPasa monomérica que regula la polaridad neuronal a través de su efector fosfatidylinositol-3 kinasa (PI3K) (Yoshimura y col, 2006), genera cambios locales de fosfatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP₃) a nivel de la membrana plasmática; esto provoca la translocación de Akt/PKB (protein kinase B) a la membrana, donde es fosforilada. La vía continúa con la fosforilación inhibitoria de Akt sobre glycogen synthase kinase 3β (GSK3β); (Jiang y col, 2005), esta inhibición favorece la actividad de sus sustratos, entre ellos la proteína collapsin response mediator protein (CRMP2), (Yoshimura y col, 2005; Inagaki y col, 2001), que se une a heterodímeros de tubulina, favoreciendo el ensamblaje de microtúbulos y por extensión, la elongación del axón.

PI3K también fosforila a la GTPasa Ras-related protein 1B, conocida como Rap1B (Lova y col, 2003), que a su vez activa a Cdc42 (cell division cycle 42), una GTPasa de la familia de las Rho GTPasas (Schwamborn y Püschel, 2004) y ésta al complejo de polaridad, formado por las proteínas partitioning defect 3, partitioning defect 6 y atypical protein kinase C, abreviado PAR3 – PAR6 – aPKC (Shi y col, 2003). Existe evidencia de que el complejo de polaridad activa a la proteína Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1) dependiente de Cdc42 a través de la acción de las GEFs de Rac1: SIF and Tiam 1-like exchange factor (STEF) o T-cell lymphoma invasion and metastasis 1 (TIAM1); (Nishimura y col, 2005), generando de esta forma un ciclo de retroalimentación positiva que estimula la elongación del axón por sobre las demás neuritas, ya que Rac1 es capaz de activar a PI3 kinasa (Tolias y col, 1995). Además de Cdc42 y Rac1 existe otra GTPasa de la misma familia, que está involucrada en el desarrollo y elongación del axón. Se trata de Ras homolog gene family, member A (RhoA), que en contraposición a Rac1 y Cdc42, posee un efecto inhibitorio sobre el desarrollo del axón (Luo, 2000) al afectar la dinámica del citoesqueleto de actina a través de la vía de Rho kinasa (ROCK), LIM domain kinase 1 (LIMK1) y cofilina (Maekawa y col, 1999).

En el proceso de generación de la polaridad neuronal queda de manifiesto la importancia del citoesqueleto, ya que varios efectores de las cascadas de señalización involucradas tienen como blanco proteínas que afectan la dinámica del citoesqueleto, como CRMP2, Tau, microtubule-associated protein 1B (MAP1B), la cadena liviana de la miosina (MLC) y cofilina (Arimura y Kaibuchi, 2007). Algo similar ocurre en el proceso de elongación del axón, donde la presencia de microtúbulos estables o dinámicos conforman uno de los determinantes de la especificación del axón (Conde y

Cáceres, 2009). Además, durante la elongación del axón, existe un dominio estructural en su extremo, denominado cono de crecimiento. En este lugar los manojos de microtúbulos dinámicos constantemente deben superar la resistencia que interpone el arco de actina ubicado en el lamelipodio del cono, para lograr extenderse (Lowery y Van Vactor, 2009).



Esquema 1. Resumen gráfico de las vías de señalización mencionadas en la descripción de los mecanismos moleculares de generación de polaridad neuronal y elongación del axón.

En el contexto anterior, cabe destacar a MAP1B, una proteína de unión a microtúbulos que participa en la estabilización de éstos (Halpain y Dehmelt, 2006). MAP1B presenta altos niveles de expresión durante el desarrollo neuronal temprano, los que disminuyen gradualmente una vez alcanzada la adultez (Tucker y Matus, 1987) y exhiben un enriquecimiento en axones en desarrollo (Denny, 1991). El ratón hipomorfo para MAP1B presenta un retraso en la elongación del axón y una disminución de la formación de microtúbulos en la parte distal del axón, así como una formación aberrante del cono de crecimiento (González-Billault y col, 2001). Estudios recientes indican que la pérdida de expresión de MAP1B es acompañada por una disminución en la actividad de Rac1 y Cdc42, así como sus efectores río abajo, LIMK y Cofilina, lo que define a MAP1B como un punto de integración entre las dinámicas del citoesqueleto de actina y los microtúbulos (Montenegro – Venegas y col, 2010).

MAP1B es sintetizada como una poliproteína que luego es procesada proteolíticamente cerca del extremo C terminal, generando una cadena pesada (Hc) de aproximadamente 300 kDa y una cadena liviana (Lc1) de 32 kDa (Hammarback y col, 1991). Existen controversias respecto de la ubicación de la zona estabilizadora de los microtúbulos, y de la zona de unión a filamentos de actina, ya que tanto la cadena pesada como liviana presentan ambas regiones (Zauner y col, 1992; Tögel y col, 1998).

Con el objetivo de encontrar nuevas posibles funciones o proteínas que interaccionen con MAP1B nuestro laboratorio realizó ensayos de doble híbrido, utilizando la Lc1 como cebo (datos no publicados) buscando interactores presentes en una genoteca de ratón embrionaria. Uno de interactores encontrado corresponde a la

proteína kinasa relacionada con p53, PRPK de *Mus musculus* (número de acceso a Genbank AK167662.1).

PRPK, también conocida como TP53RK, es una kinasa que fue clonada e identificada desde una librería proveniente de linfocitos T citotóxicos en presencia de IL-2 (Abe y col, 2001). Su sustrato es el factor de transcripción p53, que participa en varios procesos, entre los cuales se puede mencionar el control del ciclo celular, apoptosis, diferenciación, estabilidad genómica y reparación del DNA (Levine, 1997). Este factor de transcripción ha sido extensamente estudiado, entre otras razones porque se encuentra mutado en cerca de la mitad de los tumores (Harris y Hollstein, 1993). La fosforilación de p53 mediada por PRPK ocurre en el residuo Ser 15, sin embargo para que la kinasa tenga actividad, debe ser previamente fosforilada por Akt en el residuo Ser 250 (Facchin y col, 2007). La caracterización de la expresión de PRPK fue realizada por Abe y colaboradores, y muestra que presenta altos niveles de expresión en testículos, y una expresión débil en tejido de corazón, riñón y bazo. En células HeLa, la PRPK endógena es citosólica, sin embargo su sobreexpresión induce la formación de agregados en el núcleo, esto dado que tiene una señal de localización nuclear bipartita (Abe y col, 2006).

Es interesante que el sustrato PRPK sea p53, ya que evidencias recientes vinculan a esta última proteína con la elongación del axón. Se ha observado que la inhibición de la actividad de p53, tanto a nivel transcripcional como en su rol apoptótico, produce un colapso del cono de crecimiento del axón (Qin y col, 2009). Además, el efecto inhibitorio de la elongación del axón producido por Semaphorin 3A sería producto de la proteólisis de p53 por calpaínas (Qin y col, 2010a). Esta nueva actividad no transcripcional de p53 se debe a que la forma fosforilada en el residuo Ser

15 de p53 (P-p53) interacciona e inhibe a ROCK, además de inhibir la síntesis de RhoA, manteniendo la dinámica del citoesqueleto de actina (Qin y col, 2010b). Sin embargo, no existe evidencia que PRPK esté involucrada en el proceso de elongación del axón.

Ante la falta de evidencia que vincule a PRPK con la determinación de polaridad neuronal o con el favorecimiento de la elongación del axón por parte de P-p53, se ha decidido investigar el efecto de PRPK sobre la elongación del axón. La hipótesis consiste en que **"PRPK favorece la elongación del axón, por lo tanto, la sobreexpresión de PRPK generaría un aumento en la longitud axonal"**.

El objetivo general es averiguar si PRPK tiene un rol en el establecimiento o mantención de la polaridad neuronal, en el modelo de neuronas hipocampales de embriones de rata en cultivo. Para ello se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- 1- Corroborar la interacción de Lc1 y PRPK por otra técnica adicional al ensayo de doble híbrido.
- 2- Determinar los niveles de expresión y localización subcelular de PRPK durante el desarrollo de neuronas en cultivo.
- 3- Sobreexpresar PRPK en neuronas en cultivo y describir el efecto en el fenotipo, centrado en la elongación del axón.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pull down de Lc1 – GST y PRPK

La proteína de fusión a GST y GST control se obtuvieron transformando mediante shock térmico clones de *E. coli* BL21 DE3 competentes, con el vector pGEX-6p-1 de Promega (Smith y Johnson, 1988), que codifica para GST y en que se puede clonar una proteína y fusionarla a ésta. Una de las colonias transformadas se dejó creciendo toda la noche a 37°C en medio LB ampicilina y luego se inocularon 250 µl del cultivo en 25 ml de LB, los que se dejaron incubando hasta que alcanzaron una densidad óptica entre 0,8 y 0,9. Posteriormente se indujo la expresión de las proteínas adicionando IPTG (1 mM concentración final) y se incubó 3 hrs a 37°C. Las células se colectaron centrifugando a 6000 rpm por 10 min, se solubilizaron en buffer de lisis con inhibidores de proteasas (8ml) y se dieron 4 pulsos de 15 seg en un sonicador. El sonificado se centrifugó a 10.000 rpm por 30 min y el sobrenadante se incubó en agitación y a temperatura ambiente durante 4 hrs con 300 µl de resina de Sepharosa – glutatión (GE Healthcare Bioscience) en buffer de lisis. Se centrifugó a 1000 g y se descartó el sobrenadante, lavando con 4 ml de buffer de lisis en agitación, 6 veces, así se obtuvo la proteína de fusión o GST control adherido a la resina a través del glutatión. Todo esto se realizó en hielo a menos que se indique lo contrario.

El ensayo de Pull down se realizó incubando entre 50 y 100 µg de resina unida a la proteína de fusión, con 2 mg de extracto de cerebro embrionario de rata; durante toda la noche a 4°C y en agitación. Luego se centrifugó la resina a 2000 rpm por 4 min y se eliminó el sobrenadante, lavando con 400 µl de buffer de lisis en agitación durante

10 min a 4°C; los lavados se repitieron 5 veces. Las proteínas se eluyeron en buffer de solubilización, añadiendo buffer de carga de proteínas (a una concentración final 2X) y denaturando a 95°C por 5 min, agitando brevemente y denaturando 2 min más.

Cultivo de neuronas de hipocampo de embriones de rata

Se utilizaron ratas Sprague Dawley (*Rattus norvegicus*) preñadas de 18 días de gestación. Se extrajo el hipocampo de los embriones (Kaech y Banker, 2007) y se incubó con tripsina a una concentración final de 0,25% a 37 °C por 20 min. Se hicieron 2 lavados con HBSS (Invitrogen) y luego se disgregó el tejido con una serie de 3 pipetas pasteur de diámetro reducido. Las células fueron teñidas con azul de tripan (Sigma), contadas en una cámara de Neubauer, (Sigma) y sembradas en placas con polilisina y medio Neurobasal con suero de caballo (10%). Luego de dos horas se cambió el medio por Neurobasal sin suero suplementando con B27 y N2 (Invitrogen).

En caso de que las neuronas fueran ocupadas para hacer extracto de proteínas, se sembraron $2,5 \cdot 10^6$ de células en una placa Petri de 60 mm de diámetro. Para realizar estudios de localización subcelular o morfología por inmunofluorescencia, se sembraron $2 \cdot 10^4$ por cover y para llevar a cabo estudios de transfección se sembraron $1 \cdot 10^5$ células por cover.

Western blot de PRPK

Para analizar los cambios en la cantidad de PRPK se realizaron extractos de proteínas según la condición de desarrollo de polaridad a estudiar, usando buffer RIPA con inhibidores de proteasa (Roche) y caliculina (Cell Signaling) como inhibidor de fosfatasas. El extracto se cuantificó usando el método de Bradford (Bradford, 1976), se desnaturó calentándolo a 95°C por 5 min y se cargó en un gel de poliacrilamida al 12%. El gel se corrió a 80 V por media hora y luego a 110 V hasta que el frente de migración cayera del gel. La transferencia se realizó a 250 mA por 60 min y 4°C usando membranas de nitrocelulosa. El bloqueo se realizó con BSA 5% en TBS; el anticuerpo primario contra PRPK (conejo, Abcam) se incubó a una dilución de 1:300 toda la noche a 4°C en agitación, el secundario (Sigma) se incubó por una hora a temperatura ambiente en agitación, diluido 1:5000. El revelado de la membrana se hizo usando el kit de ECL (Pierce Thermo Scientific) y films radiográficos (Fujifilm).

Inmunofluorescencia (IF) y análisis cuantitativo de la fluorescencia

Las células sembradas en cubreobjetos fueron fijadas con una solución de paraformaldehído y sacarosa al 4%, permeabilizadas con tritón 0,1% en PBS, bloqueadas con BSA 5% en PBS por una hora y tratadas con los anticuerpos primarios. Para PRPK (Abcam) se usó diluido 1:50, el de P-p53 y de p53 (ambos Cell Signaling) se usaron 1:100; la faloidina se ocupó 1:50. El anticuerpo primario se dejó incubando tres horas a temperatura ambiente en cámara húmeda, o toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Se lavó cuatro veces con PBS y se aplicó el anticuerpo secundario (AlexaFluor 488, 546 y 643; Molecular Probes) incubando una hora en

cámara húmeda. Finalmente, se lavó tres veces con PBS y una con agua, para luego montar los covers sobre portaobjetos usando Fluor Save (Calbiochem).

Las imágenes fueron adquiridas usando un microscopio confocal Carl Zeiss LSM 510 Meta. La magnificación de cada imagen se indica en cada figura. La cuantificación de la fluorescencia, y la medición de la longitud axonal desde las imágenes se hizo usando el software del microscopio, LSM Image Browser. Para la cuantificación de la fluorescencia en el extremo del axón, se tomaron los últimos 100 μm de los axones. En las mediciones corregidas por el área, se midió la fluorescencia en un segmento del eje del axón y en el cono de crecimiento del axón, para luego calcular la razón entre la fluorescencia promedio y el área seleccionada en cada caso.

Clonamiento de PRPK de *D. melanogaster*

El vector pQE trisystem (con el gen de PRPK de mosca), fue digerido con las enzimas de restricción BamHI y XhoI en Buffer 4 (New England BioLabs). Se digirieron 8 μg usando 1 μl de enzima directamente desde el stock, para un volumen final de 50 μl , que incluyen BSA 1X (0,5 μl). El producto de digestión se cargó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y corrió a 85 V durante 45 min, luego se cortó la banda liberada del plasmidio y purificó con el kit Wizard SV gel and PCR clean up system (Promega). El vector pTag2 se digirió con las mismas enzimas, y con un protocolo similar. La ligación del gen de PRPK en el vector se realizó usando 2 μl del vector pTag2 digerido y purificado, 1 μl de ligasa del virus T4 (New England Biolabs) y 2 μl del fragmento liberado y purificado. Se realizó la reacción toda la noche a 18°C. Luego se transformó el producto de ligación en *E. coli* mediante shock térmico.

Se picaron 12 clones, los cuales fueron chequeados por PCR para verificar si tenían o no el inserto correspondiente al gen de PRPK. Los partidores usados fueron F 5' ATGTCCCTAGAAATCCTGAAACAAGG y R 5' TTAACCAATCATGGTTCTTTTGCG; se ocupó una Tm de 61°C y 30 ciclos de 94°C, 61°C y 72°C cada uno de un minuto y medio. Las colonias que dieron positivo para el amplificado se volvieron a verificar por digestión, como se describió antes en este apartado. La prueba final del clonamiento fue revisar si las células transfectadas con este nuevo vector expresaban o no la proteína.

Transfección de pTag2 – PRPK

El vector se transfectó en líneas celulares y neuronas hipocampales de embriones de rata usando lipofectamina 2000 (Invitrogen). En líneas celulares se mezclaron 2 µg de DNA y 4 µl de lipofectamina en medio Optimem (Invitrogen), 5 min por separado y luego 15 min en un solo tubo. Posteriormente se lavaron las células con PBS y se cambió el medio de cultivo por Optimem. Se agregaron los complejos de DNA con lipofectamina e incubó por 6 hrs a 37°C. Luego de eso se cambió de medio, agregando DMEM 10% FBS (Invitrogen). En el caso de neuronas en cultivo primario, luego de que se adhirieran a la placa se cambió el medio por Neurobasal sin suero y se agregaron los complejos previamente formados, se incubó por 2 hrs a 37°C y luego se hizo el cambio de medio por Neurobasal con suplementos.

Análisis estadístico

Se compararon promedios usando el t-test no pareado, añadiendo la corrección de Welch cuando las varianzas fueran significativamente diferentes.

RESULTADOS

Pull down de Lc1 – GST y PRPK

Para corroborar la interacción de la kinasa PRPK con la proteína Lc1 por una técnica diferente al doble híbrido, se realizó un *Pull down* utilizando la proteína de fusión Lc1 – GST (con la GST en el extremo N terminal de la Lc1). En esta técnica, la proteína de fusión se incuba junto a un extracto de proteínas, en contacto con una resina de Sepharosa – glutatión. La GST se une al glutatión y queda adherido el otro componente de la proteína de fusión, además de las proteínas que interaccionen con ella. Finalmente se eluyen y se comprueba la identidad del interactor mediante un Western blot.

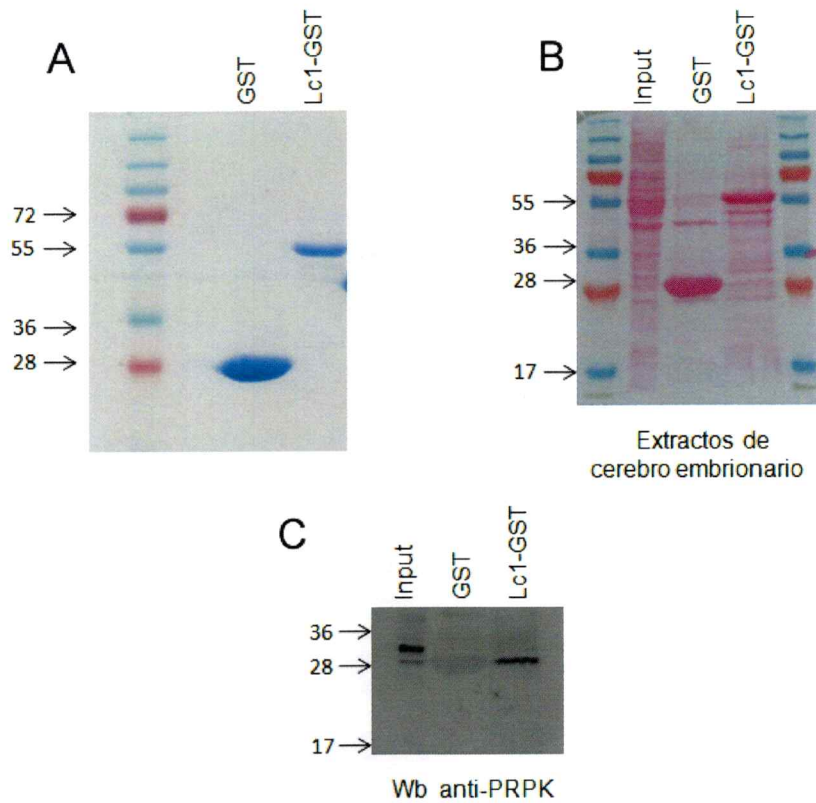
En la Figura 1A se observa un gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie, en el que se han cargado extractos de proteínas provenientes de las purificaciones de la proteína de fusión y de GST control. En el primer carril se puede ver que la inducción de la expresión de GST produce la aparición de una sola banda en el peso esperado, mientras que la inducción de la proteína de fusión genera una banda más pesada, ya que Lc1 tiene una masa molecular de 34 kDa (Kuznetsov y col, 1986), lo que la hace migrar más lento que GST sola. Esto indica que la inducción de las proteínas de fusión y control fue efectiva.

En la Figura 1B se observa una membrana de nitrocelulosa teñida con Rojo Ponceau, donde el primer carril corresponde a la carga del extracto de proteínas de cerebro embrionario de rata que se usó en el *Pull down* (input). En el segundo carril se cargó la elución del *Pull down* con GST control y en el tercer carril, la elución con Lc1 –

GST. En los carriles 2 y 3 se ven las bandas producto de la sobreexpresión de las proteínas de fusión y GST control, similar a lo que se aprecia en la Figura 1A, indicando que estas proteínas no se perdieron durante la incubación y posteriores lavados. En el input aparecen varias bandas más delgadas, distribuidas en todo el espectro de peso molecular.

En la Figura 1C se presenta el Western blot contra PRPK sobre la misma membrana mostrada en 1B. En el primer carril, correspondiente al input, se ven dos bandas, de las cuales la de 28 kDa corresponde a PRPK pues coincide con el peso molecular. En el segundo carril, no se encuentran bandas y en el último carril aparece sólo la banda de PRPK. Lo anterior indica que en el extracto de cerebro embrionario está presente PRPK y su interacción con la proteína de fusión la mantuvo en la elución del Pull down con Lc1 – GST (carril 3). Como no es posible encontrar a PRPK en la elución del Pull down incubado sólo con GST, se confirma que la interacción es específica para Lc1.

Figura 1. Pull down de Lc1 – GST y PRPK

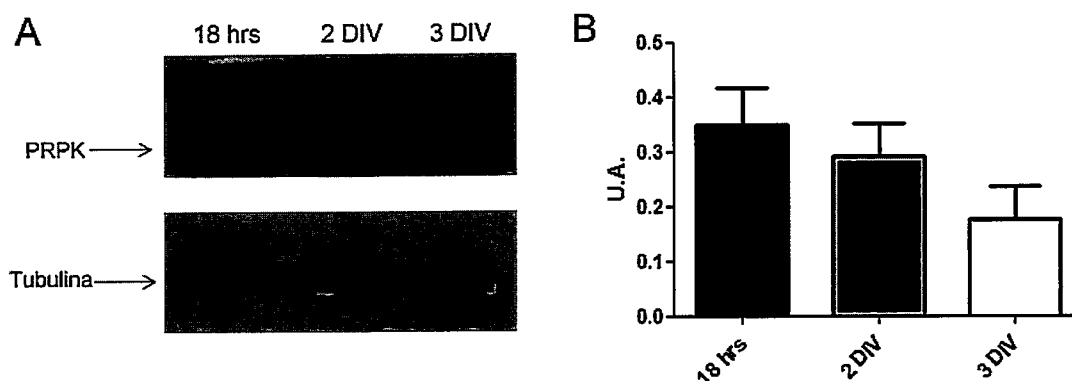


En el panel A se observa un gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie donde se cargaron las proteínas de fusión y GST control purificadas. En el panel B se muestra una membrana teñida con Rojo Ponceau, que corresponde a la carga de las eluciones del Pull down (input corresponde a extracto de cerebro embrionario de rata). En el panel C se presenta el Western blot contra PRPK de la misma membrana. El significado de cada carril se indica sobre cada uno de éstos. Imagen representativa del Pull down hecho en triplicado.

Expresión de PRPK en cerebro embrionario de rata.

Una vez comprobada la interacción entre LC1 y PRPK en extractos de proteínas derivados de cerebro de rata, decidimos estudiar cómo varía la expresión de PRPK durante el desarrollo de polaridad de neuronas hipocampales, durante los estadios neuronales en que se determina y comienza a elongar el axón. Esto se realizó mediante Western blot usando extractos de proteína de neuronas hipocampales de embriones de rata en cultivo a las 18 hrs, 2 DIV y 3 DIV. La Figura 2A muestra un Western blot de PRPK en los estadios mencionados, además de la tubulina como control de carga. La Figura 2B corresponde a la cuantificación de las bandas de PRPK corregidas por las correspondientes bandas de tubulina. Si bien se observa una disminución gradual de la masa de PRPK al avanzar los estadios, esta diferencia no resultó estadísticamente significativa.

Figura 2. Expresión de PRPK en los estadios iniciales de polarización neuronal.



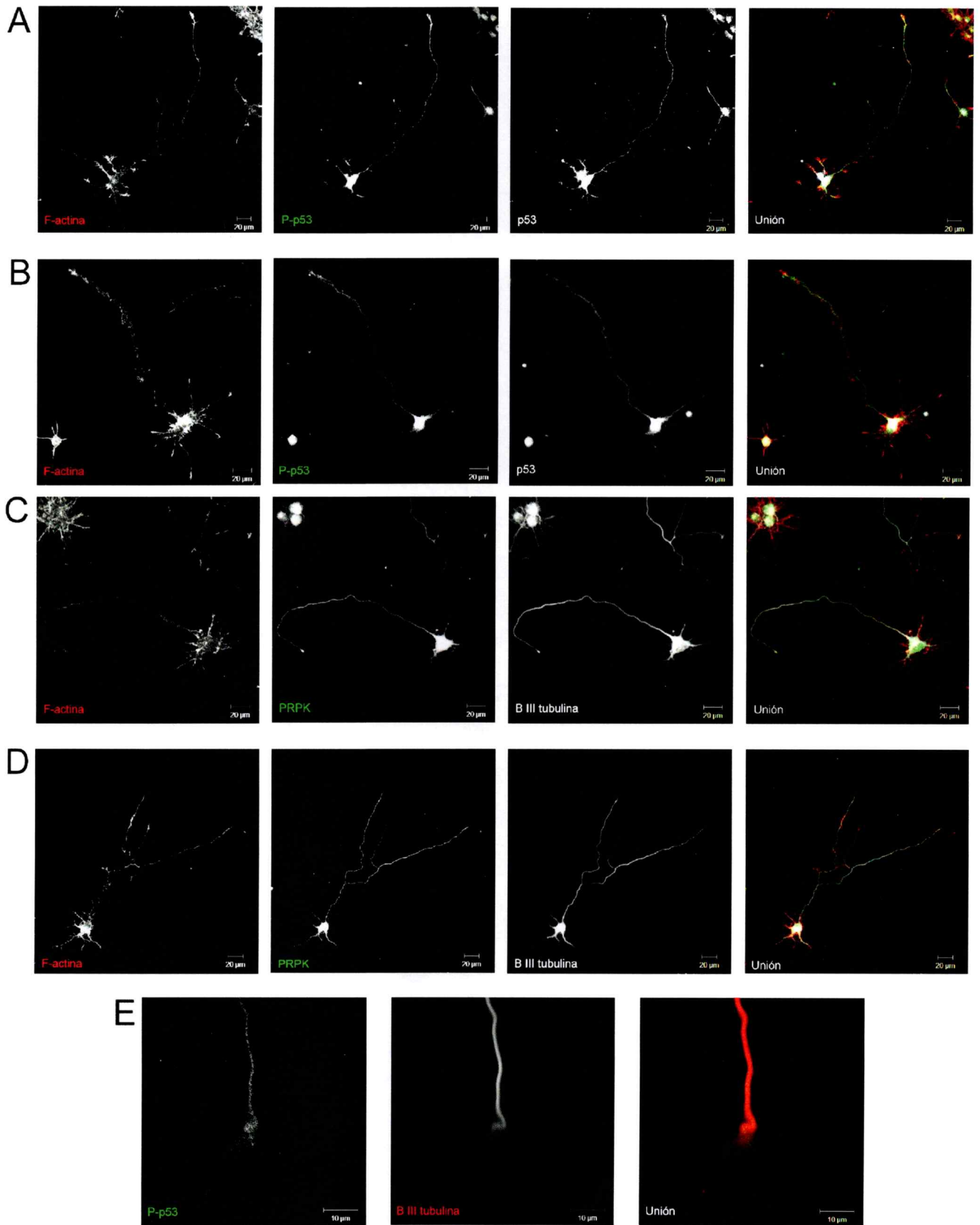
La Figura 2A corresponde a un Western blot contra PRPK usando extractos de neuronas de hipocampo de rata, cultivadas por los periodos indicados sobre cada carril; la banda inferior corresponde a PRPK. Se muestra además tubulina como control de carga. En 2B se presenta la cuantificación de las bandas corregidas por tubulina (en U.A.; unidades arbitrarias). Imágenes representativas de experimento realizado en triplicado, las barras representan error estándar.

Localización subcelular de PRPK, p53 y P-p53.

Luego de determinar que la cantidad de PRPK no experimenta variaciones significativas durante la adquisición de polaridad neuronal, decidimos determinar si existía un posible cambio en la localización de la proteína durante el proceso, o alguna distribución particular además de su ubicación citoplasmática o nuclear, cuando es sobreexpresada (Abe y col, 2006). También analizamos la distribución subcelular de p53 y de P-p53, ya que es el sustrato de PRPK y recientemente se ha vinculado con el proceso de elongación de neuritas (Qin y col, 2009). Esto se realizó mediante inmunofluorescencia (IF) en neuronas de hipocampo de embriones de rata en cultivo a los 2 y 3 DIV, para estudiar la transición del estadio 2 al 3 y el estadio 3 consolidado.

En la Figura 3 se presentan imágenes de IF; en donde A y B corresponden al marcaje de P-p53 en 2 y 3 DIV respectivamente; mientras que C y D muestran el marcaje para PRPK también en 2 y 3 DIV. Se observa que la marca de P-p53 está presente en el soma neuronal y en el axón en las neuronas en ambos estadios. En el axón, la marca se debilita en el segmento inicial, fortaleciéndose hacia el eje y la parte distal, sugiriendo la existencia de un gradiente próximo – distal. La marca de p53 es mayormente somática, sin embargo también presenta una marca más débil en el axón, la que se aprecia con más intensidad en la Figura 3B, y que parece permanecer sin cambios perceptibles a lo largo del axón. Con respecto a PRPK se puede encontrar tanto en el núcleo como en el axón, distribuida de manera uniforme en ambos estadios. En la Figura E se presenta una ampliación del cono de crecimiento de una neurona marcada contra P-p53 y β III tubulina.

Figura 3. Localización subcelular de PRPK, p53 Y P-p53.



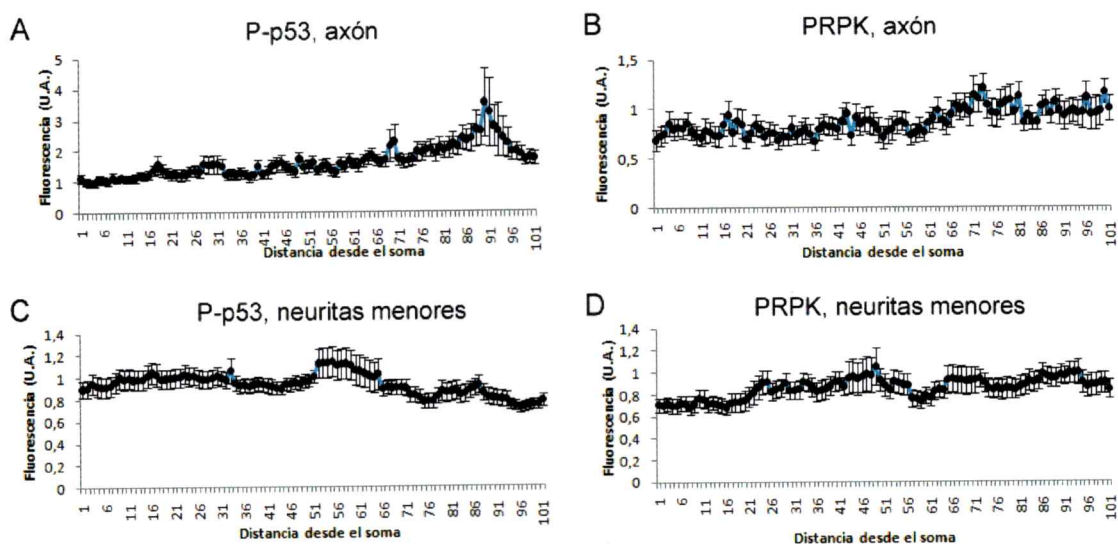
En A y B se presentan neuronas de 2 DIV y 3 DIV, respectivamente, marcadas contra P-p53, p53 y actina polimerizada (F-actina); mientras que en C y D se presentan neuronas de 2 y 3 DIV respectivamente marcadas contra PRPK, β III tubulina como marcador de volumen y F-actina. En E se muestra el cono de crecimiento de una neurona de 3 DIV marcada contra P-p53 y β III tubulina. Imágenes tomadas con aumento de 40x y representativas de 3 IF realizadas a neuronas desde 3 cultivos diferentes.

A partir de las imágenes obtenidas en el experimento de localización subcelular, se realizó un análisis semi-cuantitativo de la intensidad de fluorescencia asociada a cada proteína a lo largo del axón. Para ello graficamos la fluorescencia en los últimos 100 μ m de cada axón corregido por p53 en el caso de P-p53 y por un marcador de volumen (β III tubulina) en el caso de PRPK a los 3 DIV, ya que en ese estadio las neuronas cuentan con un axón ya establecido. Como control evaluamos la fluorescencia de las proteínas en las neuritas menores. En la Figura 4 se presentan los gráficos correspondientes a la fluorescencia de P-p53 y PRPK en el axón (4A y 4B respectivamente) y en las neuritas menores (4C y 4D respectivamente). La fluorescencia de P-p53 presenta un aumento constante hacia la parte distal del axón, cerca del final de éste, alcanza un máximo de fluorescencia y luego decae. El caso de PRPK es diferente, porque el aumento en la fluorescencia es mucho más moderado y no parece alcanzar un máximo ni decaer. En el caso de las neuritas menores, para ambas proteínas, la fluorescencia se mantiene constante a lo largo de la neurita.

Un problema de este análisis semi-cuantitativo es la gran dispersión de las mediciones. Para eliminar ese problema se cuantificó la fluorescencia de P-p53 y PRPK en el cono de crecimiento del axón de neuronas en cultivo a 3 DIV, y en el eje del axón, corrigiendo por el área seleccionada para la medición. Además se comparó con la fluorescencia de p53. En la Figura 5 se muestra un gráfico que representa esas comparaciones; y como se aprecia, la fluorescencia absoluta de P-p53 no cambia

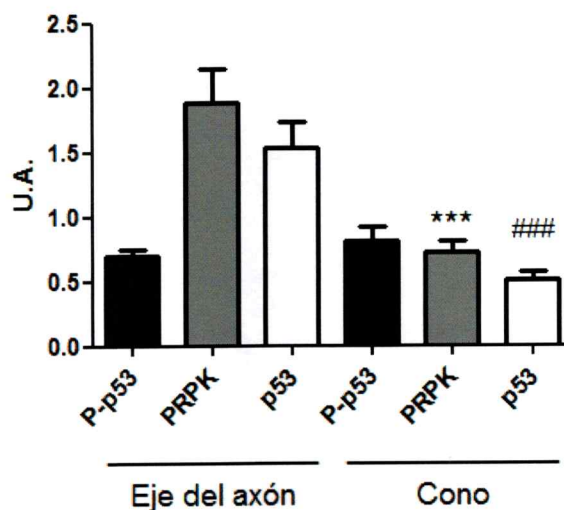
significativamente entre el eje del axón y el cono de crecimiento. Sin embargo, hay una disminución de la fluorescencia de PRPK y p53 en el cono de crecimiento con respecto al eje del axón. Que el denominador del cociente se haga más pequeño, podría explicar, en parte, el aparente enriquecimiento de P-p53 hacia las zonas más distales del axón

Figura 4. Cuantificación de la fluorescencia de P-p53 y PRPK



En A se muestra el gráfico de la cuantificación de la fluorescencia de P-p53 corregida por p53, en los últimos 100 μm del axón, donde el cero representa la parte proximal. En B se presenta lo mismo pero para PRPK corregida por el marcador de volumen. En C y D se presentan los gráficos de la cuantificación de la fluorescencia para P-p53 y PRPK respectivamente, en las neuritas menores, aquí el cero también representa la zona más cercana al soma. Cada punto representa el promedio de 20 neuronas de tres cultivos diferentes. Las barras representan el error estándar; U.A. representa unidades arbitrarias.

Figura 5. Comparación de la fluorescencia entre el eje del axón y el cono de crecimiento.



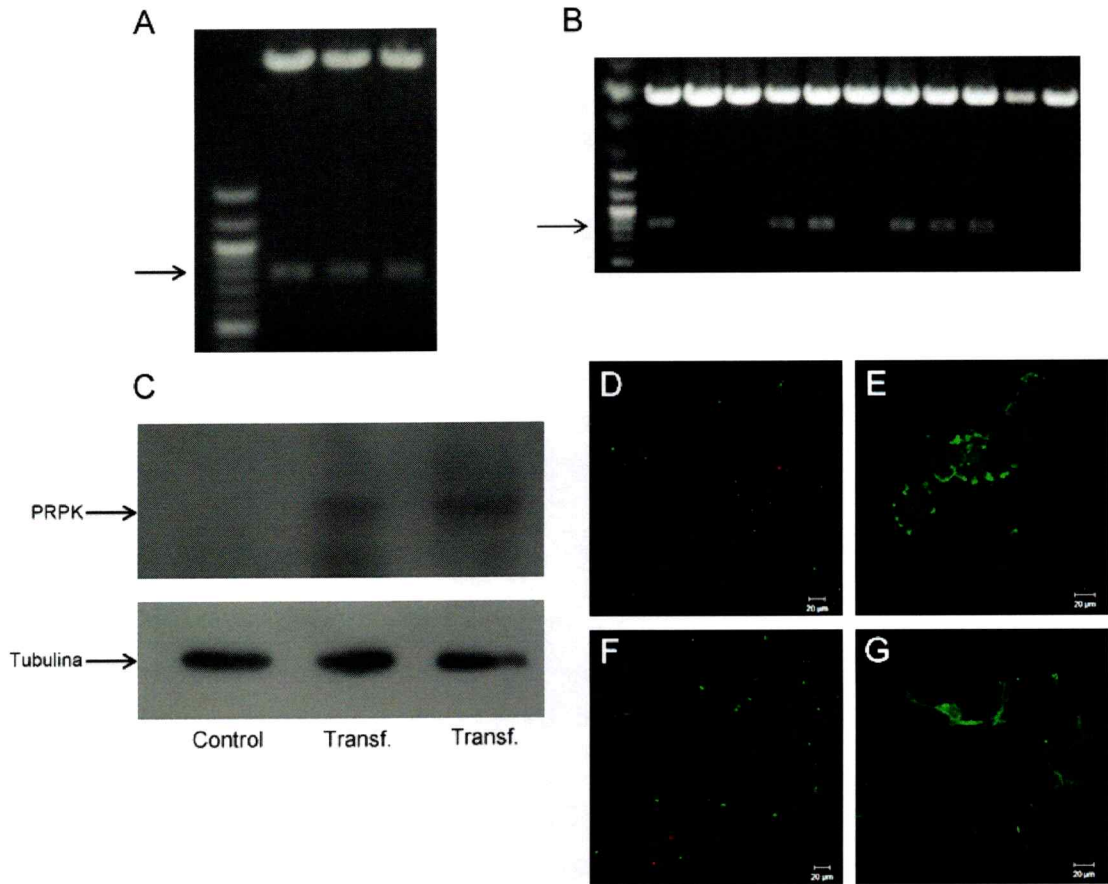
Las primeras tres columnas representan la cuantificación de la fluorescencia en el eje del axón corregido por el área, en unidades absolutas (U.A.), las últimas tres columnas representan la misma medición, pero realizada en el cono de crecimiento del axón. Cada medición representa un promedio de 20 neuronas de tres cultivos independientes, las barras representan el error estándar. *** $p < 0,001$ y ### $p < 0,001$ con respecto a la fluorescencia de la misma proteína en el eje del axón.

Clonamiento de PRPK WT

Una vez establecido que existe un enriquecimiento significativo de P-p53 con respecto a la forma no fosforilada de la proteína (lo que se deriva de la Figura 5) y que este aumento no se relaciona con cambios en los niveles ni distribución de PRPK en las neuronas en cultivo, decidimos analizar el efecto funcional de la sobreexpresión de PRPK en neuronas. Para ello clonamos el cDNA de PRPK de *Drosophila melanogaster* amablemente cedida por el Dr. Álvaro Glavic, en un vector de expresión para mamíferos (pTag2) bajo el control del promotor CMV y con un tag FLAG en el N-

terminal. El gen de PRPK de *D. melanogaster* originalmente estaba clonado en el vector de expresión de mosca pUAST (Brand y Perrimon, 1993), luego se clonó en el vector de expresión en mamíferos pQE Trisystem y desde ese plasmidio se clonó en el vector pTag2. La Figura 6A muestra que la digestión del vector pQE con BamHI y XhoI libera un inserto de aproximadamente 700 pb, que es el tamaño esperado para el gen de PRPK. En la Figura 6B se muestra que la digestión del vector pTag2 con el gen ya ligado usando las mismas enzimas de restricción, también libera el inserto del peso esperado en al menos 6 clones, indicando que la ligación fue efectiva. La Figura 6C presenta un Western blot contra PRPK desde extractos de proteínas de células N1E-115 transfectadas con el vector; el primer carril corresponde al control de transfección y los otros dos corresponden a extractos de células transfectadas. Esto indica que se logró sobreexpresar PRPK en esta línea celular. Finalmente, también se chequeó la expresión de PRPK mediante IF, usando un anticuerpo contra el tag FLAG que posee la proteína. En las Figuras 6D y 6E se muestra una imagen de células COS7 control y transfectadas, respectivamente. Aparte del background en el control, no se aprecia marca del anticuerpo contra FLAG, mientras que las células transfectadas sí presentan la marca anti FLAG. En 6F y 6G se muestran imágenes equivalentes, pero de transfecciones de células N1E – 115. De lo anterior se deduce que la proteína sí se expresa en líneas celulares.

Figura 6. Clonamiento y verificación de la expresión de PRPK

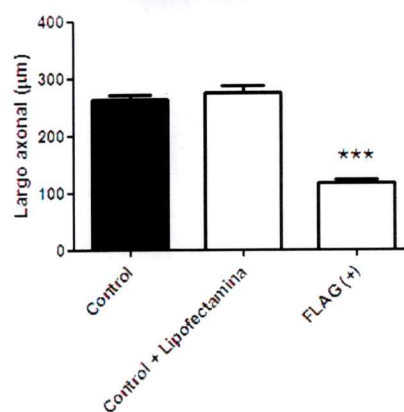
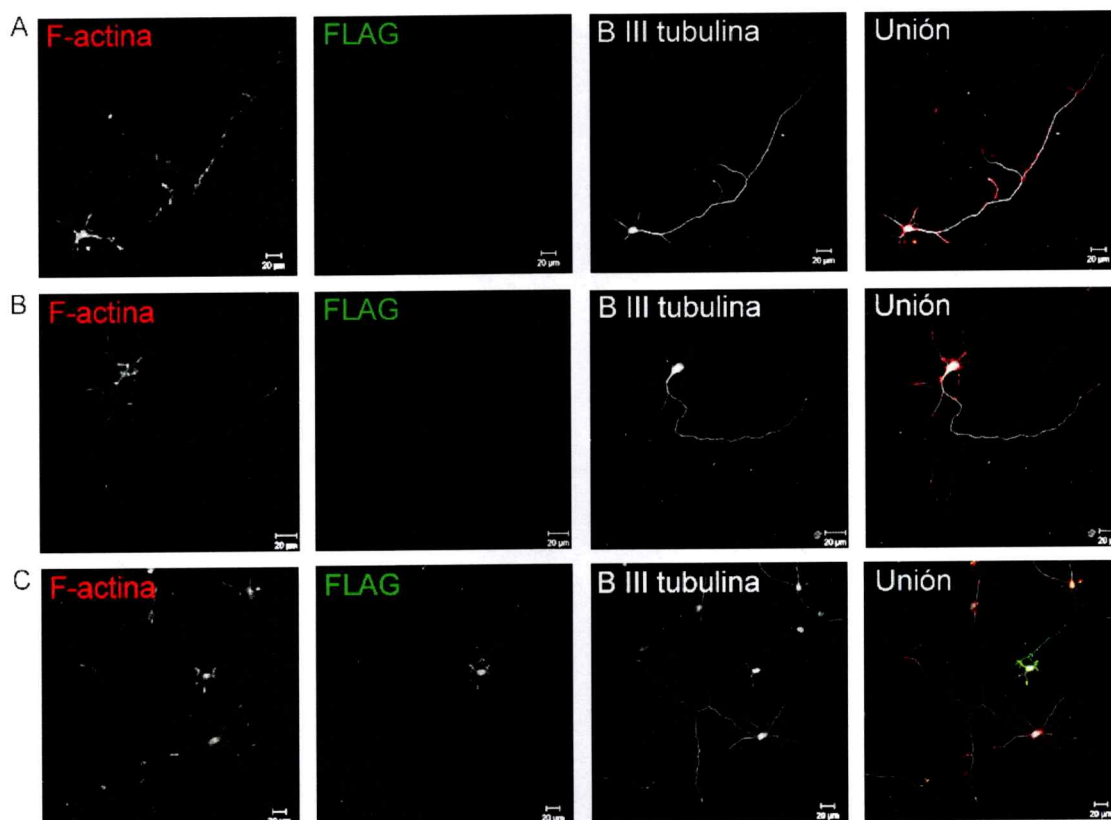


En A se muestra un gel de agarosa cargado con la digestión del vector pQE, la flecha indica el fragmento de aproximadamente 700 pb que se libera. En B se observa otro gel de agarosa cargado con digestiones del vector pTag2 con el gen de PRPK ya ligado; la flecha indica la liberación del fragmento esperado en 6 clones. En C se presenta un Western blot contra PRPK; en la parte inferior de cada carril se indica a qué corresponde (control o células transfectadas). Se muestra además el control de carga. En D y E se observan IF de células COS7 control y transfectadas con el vector respectivamente; mientras que en F y G se muestran células N1E-115 control y transfectadas respectivamente. Imágenes tomadas con un aumento de 40x, FLAG en verde, F-actina en rojo.

Sobreexpresión de PRPK en neuronas en cultivo

Luego de verificar en un sistema celular, que la construcción para PRPK producía un aumento en la expresión de la proteína, decidimos analizar el efecto funcional de PRPK sobre la determinación y elongación del axón. Para ello transfectamos neuronas hipocampales de embriones de rata en cultivo con el vector descrito en la sección anterior y observamos el fenotipo de las neuronas. En la Figura 7 se observan 3 imágenes representativas de neuronas a 3 DIV. La imagen A corresponde a una neurona control, la B a una neurona tratada con lipofectamina y la imagen C a una que además de la lipofectamina, incorporó el vector y expresa la proteína. Inesperadamente, observamos que aquellas neuronas que mostraban una marca positiva para FLAG tenían un axón más corto, al compararlas con los controles sin transfectar e incubados con lipofectamina, como se puede en la imagen 7C. Estas diferencias morfológicas fueron cuantificadas y se graficaron los cambios de longitud axonal para cada condición, encontrándose que la sobreexpresión de PRPK en neuronas de rata indujo una disminución de la longitud axonal media.

Figura 7. Sobreexpresión de PRPK en neuronas en cultivo.



En A se muestra una imagen de una neurona control, en B una tratada sólo con lipofectamina y en C una transflectada con el vector. Se presentan los tres canales de fluorescencia por separado (F-actina, FLAG y β III tubulina, esta última para diferenciar neuronas de otros tipos celulares) así como la imagen compuesta. La cuantificación se realizó contando 50 neuronas de tres experimentos independientes. Imágenes con aumento de 40x, IF representativas de tres cultivos diferentes; *** $p < 0,001$.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo corroboramos que en neuronas hipocampales de rata existe una interacción entre Lc1 y PRPK (descrita por primera vez en un experimento de doble híbrido realizado previo al desarrollo de este seminario de título). En primer lugar, se llevó a cabo un ensayo de *Pull down* entre Lc1 – GST y PRPK, lo que verificó la interacción de estas dos proteínas. El hecho de que se pudiera encontrar PRPK en el incubado con Lc1 – GST y no en el con GST solo confirma que la interacción con la proteína de fusión es a través de Lc1. Un abordaje complementario que está actualmente en fase de implementación es la verificación de la interacción usando co-immunoprecipitación. Para el desarrollo de este seminario de título decidimos empezar por el *Pull down* ya que es una técnica que involucra aspectos moleculares y bioquímicos. Los experimentos se realizaron utilizando extractos de proteínas de cerebro embrionario de rata, ya que se ha descrito en la literatura que no existen niveles de expresión detectable de PRPK en el cerebro de adulto (Abe y col, 2001). Adicionalmente, la genoteca de ratón usada en el experimento de doble híbrido correspondía a una librería de cDNAs embrionarios.

El siguiente paso consistió en estudiar los cambios en los niveles de expresión de PRPK durante el desarrollo de neuronas en cultivo. Se observó que los niveles de expresión presentan una disminución a medida que se avanza en el desarrollo, sin embargo esta diferencia no resultó estadísticamente significativa en el intervalo de tiempo estudiado. Una posible explicación a esta aparente ausencia de variación podría ser que el intervalo de tiempo estudiado sea muy corto. Una alternativa sería

analizar los niveles de expresión de PRPK mediante Western blot, en estadíos más avanzados del desarrollo neuronal, por ejemplo 5 DIV o más. El período de tiempo elegido se debe a que originalmente se planeó estudiar la expresión de PRPK mientras se determina el axón, y en estadíos más tardíos esto ya ha sucedido.

El resultado que obtuvimos no fue el esperado, ya que de acuerdo a la hipótesis, si PRPK favorece la elongación del axón, pensamos que debería estar presente en las neuronas los primeros días de cultivo y reducir sus niveles de expresión una vez que el axón ya estuviera formado, en un patrón de expresión similar al de MAP1B (Tucker y Matus, 1987). Sin embargo, experimentos con neuronas en estadíos de desarrollo más avanzados permitirían establecer si esa idea es correcta.

Como no observamos un cambio significativo en los niveles de expresión de PRPK, pensamos que los cambios en actividad de esta kinasa podrían explicarse por modificaciones de su localización subcelular. Para estudiar esta posibilidad se llevaron a cabo experimentos de IF en neuronas en cultivo durante el período de determinación y elongación del axón, analizando además la distribución de p53 y su forma fosforilada en la Ser 15. Si bien la presencia de P-p53 en el cono de crecimiento del axón de neuronas en cultivo había sido descrita (Qin y col, 2009), el análisis realizado muestra que además, la forma fosforilada de la proteína en ese residuo se enriquece con respecto a la proteína no fosforilada, hacia la parte distal del axón. El análisis de la fluorescencia corregida por el área de medición indica que en las regiones más alejadas del soma neuronal, la fluorescencia de p53 y PRPK se hace menos intensa, lo mismo pasa con β III tubulina (dato no mostrado), sin embargo la fluorescencia de P-p53 se mantiene inalterada. Esto se interpreta como un aumento en el valor del cociente P-p53/p53 debido a una disminución del término en el denominador, es

decir, un enriquecimiento de la proteína fosforilada con respecto a p53 total, en forma de gradiente próximo-distal.

La imagen 3E muestra que la marca de P-p53 se superpone con la zona del cono de crecimiento conformada por filamentos de actina; sin embargo para observar mejor su localización en esta estructura, sería útil realizar la IF permeabilizando con glutaraldehído y Tritón-X 100, además de paraformaldehído (Witte y col, 2008), para poder analizar el cono de crecimiento sin los elementos solubles del citoesqueleto. Aun así, era esperable que P-p53 estuviera presente en las zonas formadas por los filamentos de actina del cono de crecimiento, ya que la vía de señalización en que participa como inhibidor de ROCK, afecta la dinámica de este componente del citoesqueleto.

No fue posible detectar una distribución particular de PRPK con este método. Algunas posibles explicaciones para ello, incluyen por ejemplo, que el anticuerpo usado no haya sido el más apto para el estudio; ya que era comercial y en Western blot si se usa muy concentrado, arroja algunas bandas inespecíficas. Otra explicación es que esa sea efectivamente la distribución de PRPK; y como sucede con p53, la forma fosforilada tenga una ubicación particular y relacionada con su actividad. Cabe recordar que la forma activa de PRPK requiere la fosforilación del residuo Ser 250 por parte de Akt. En la literatura, los autores han ocupado anticuerpos hechos en sus propios laboratorios, o se ha expresado una PRPK fusionada con GST, GFP o algún tag, como una cola de Histidina (Abe y col, 2001; Facchin y col, 2007) ya que la oferta de anticuerpos comerciales es escasa, tal vez porque es una proteína que se ha descrito hace relativamente poco tiempo.

Para verificar si la forma activa de PRPK posee una distribución particular, es necesario utilizar un anticuerpo contra la forma fosforilada, como se hizo con P-p53.

Todos los análisis anteriores son descriptivos, y apuntaban a que la abundancia relativa de P-p53 hacia el segmento distal del axón y el cono de crecimiento, podría relacionarse con los mecanismos de elongación axonal. Por lo tanto, para tener un ensayo funcional se sobreexpresó la PRPK de *D. melanogaster*. Si bien la proteína de mosca podría no tener actividad en el modelo neuronal murino, existe evidencia de que al menos el homólogo de PRPK en levadura es capaz de fosforilar a p53 de humano, incluso cuando las levaduras no tienen un homólogo de p53 (Facchin y col, 2003). Dado que PRPK es una kinasa filogenéticamente conservada (se muestra un alineamiento de las secuencias aminoacídicas de PRPK de humano, ratón, rata y mosca, realizado con la herramienta ClustalW, en la figura anexa 3), se esperaba que la PRPK de mosca tenga actividad en neuronas y líneas celulares de mamíferos, algo que se pudo comprobar sobreexpresando la kinasa en células N1E-115 y observando que existe un aumento en la fosforilación de p53 con respecto al control no transfectado (figura anexa 2). El aumento de los niveles de P-p53 fue acompañado con un aumento de la masa de p53, esto se explica porque la fosforilación en la Ser 15 impide la ubiquitinación de la proteína, lo que estabiliza a este factor de transcripción (Moll y Petrenko, 2003).

La expresión de PRPK en las células COS7 presenta una marca de FLAG ubicada en un patrón en forma de parches en la periferia de la célula. Resultaría interesante realizar un análisis de colocalización con elementos de citoesqueleto, como la actina polimerizada, que permita explicar el fenotipo. En contraposición, las células N1E – 115 no reprodujeron este patrón.

Finalmente, se sobreexpresó PRPK en neuronas en cultivo. El resultado esperado era que si esta kinasa afecta el desarrollo de polaridad, hubiese habido un aumento en el largo axonal o incluso la aparición de axones supernumerarios, sin embargo, el resultado fue el opuesto. Existe una disminución en el largo axonal de las neuronas transfectadas con respecto a las controles y a las tratadas sólo con lipofectamina. No se observaron cambios en la localización de PRPK al ser sobreexpresada. Algunas posibles explicaciones que podrían estar tras este resultado son: la PRPK sobreexpresada carece de actividad, lo que se descartó al transfectar células N1E-115 con el vector pTag2-PRPK y verificando por Western blot un aumento en los niveles de fosforilación de p53 (figura anexa 2). Con ese experimento también se descartó la posibilidad de que la sobreexpresión de PRPK no aumente los niveles de la kinasa activa, debido a que la actividad de Akt no ha cambiado y pudiera ser que la PRPK sobreexpresada no presente la fosforilación activatoria. Para confirmar que el fenotipo observado al sobreexpresar PRPK es dependiente de actividad, actualmente estamos trabajando en el clonamiento de la PRPK de ratón, la que posteriormente será mutada para generar la forma mimética de la fosforilación activatoria, y que se comporte como una forma constitutivamente activa de la kinasa.

Una explicación alternativa al fenotipo observado es que las neuronas que sobreexpresan PRPK maduran más lento y por lo tanto, en el cultivo de neuronas en estadio 3, éstas estarían en un estadio de crecimiento previo al del resto del cultivo. Con respecto a lo anterior, es bastante claro que el proceso más largo que muestran las neuronas FLAG (+) es un axón, por su longitud, delgadez y porque no presenta un ensanchamiento cónico en el lugar que lo une al soma neuronal, como sucede con los procesos menores y las dendritas. Sin embargo para asegurar este punto se podría

ocupar un marcador axonal en las IF, como los anticuerpos tau-1 o SMI-31. Por lo tanto, estas neuronas tienen un axón definido, aunque más corto, lo que las ubica en el estadio 3 de desarrollo. En conclusión, el fenotipo corresponde a axones más cortos y no a neuronas que aún no han desarrollado un axón.

Para investigar cómo la sobreexpresión de la PRPK, y el incremento en su actividad generan axones más cortos en este modelo, hay que identificar qué vía de señalización está involucrada, ya que la regulación propuesta de PRPK sobre p53 y a su vez de ésta sobre ROCK, no sustenta la evidencia. En este contexto, se ha descrito que Lc1 interactúa con p53 e inhibe su actividad transcripcional, así como la apoptosis inducida por doxorubicina (Lee y col, 2008). Si esta interacción es capaz de inhibir la actividad transcripcional de p53, podría ser extensiva a su actividad no transcripcional; entonces la sobreexpresión de PRPK además de fosforilar a p53, podría ser capaz de fomentar la interacción de esta última con Lc1, generando una regulación negativa sobre p53.

No se puede descartar que el efecto observado en este trabajo sea independiente de p53. PRPK es una kinasa descrita hace relativamente poco tiempo y pueden existir sustratos o interactores aún desconocidos, que den cuenta de este fenotipo; en ese sentido no se puede descartar una fosforilación de PRPK sobre Lc1 o sobre otra molécula aún no descrita. Sólo se puede afirmar que PRPK tiene un rol en la elongación del axón. La única evidencia que vincula a PRPK con la elongación de las neuritas, consiste en un screening usando RNA de interferencia dirigido contra todas las kinasas descritas en el humano. Este estudio señala a PRPK como una proteína inhibitoria del proceso de elongación (Loh y col, 2008), y según eso, el resultado del trabajo confirma lo descrito en la literatura.

Las proyecciones de este trabajo comprenden el diseño de mutantes de PRPK y p53 de ratón que emulen la forma constitutivamente activa y la dominante negativa de esta kinasa, para ser clonadas y transfectadas como ya se describió, para luego observar el fenotipo de las neuronas durante la elongación del axón. Además se puede estudiar su efecto en la vía de señalización de RhoA/ROCK y la dinámica de los filamentos de actina a través de LIMK y cofilina. Por último, sería interesante averiguar cómo afecta a la elongación del axón la sobreexpresión de PRPK en un fondo genético que carezca de MAP1B, ya que tanto la sobreexpresión de la primera como la ausencia de la segunda producen axones más cortos en neuronas hipocampales en cultivo.

CONCLUSIONES

1.- La interacción entre Lc1 y PRPK fue verificada en extractos derivados de cerebro embrionario de rata.

2.- Los niveles de expresión de PRPK durante el desarrollo de neuronas en cultivo no presentan diferencias significativas entre 18 hrs *in vitro* y 3 DIV. Por lo tanto, cambios en la masa de PRPK no son importantes para la determinación del axón. Esto no permite descartar que cambios en los niveles de fosforilación participen del proceso.

3.- Con respecto a la localización subcelular de PRPK y su sustrato, fue posible identificar un patrón de gradiente próximo-distal de P-p53 con respecto a p53 total, en el axón, lo que no se cumple para PRPK con respecto al marcador de volumen. Esto indica que no se necesitan cambios en la localización de PRPK para la aparición y elongación del axón, en este modelo.

4.- La sobreexpresión de PRPK en neuronas hipocampales de embriones de rata en cultivo indujo una disminución en el largo axonal. Lo anterior vincula a esta kinasa con el proceso de elongación axonal más que con el desarrollo de polaridad neuronal, y permite descartar a PRPK como la kinasa que fosforila y estabiliza a p53 en su rol inhibitorio de ROCK. Además, no se descarta que el rol de PRPK en elongación del axón sea por un mecanismo diferente al de p53.

BIBLIOGRAFÍA

Abe, Y., Matsumoto, S., Wei, S., Nezu, K., Miyoshi, A., Kito, K., Ueda, N., Shigemoto, K., Hitsumoto, Y., Nikawa, J. y Enomoto, Y. 2001. Cloning and Characterization of a p53-related Protein Kinase Expressed in Interleukin-2-activated Cytotoxic T-cells, Epithelial Tumor Cell Lines, and the Testes. *J. Biol. Chem.* **276(47)**: 44003-44011.

Abe, Y., Takeuchi, T., Imai, Y., Murase, R., Kamei, Y., Fujibuchi, T., Matsumoto, S., Ueda, N., Ogasawara, M., Shigemoto, K. y Kito, K. 2006. A small Ras-like protein Ray/Rab1c modulates the p53-regulating activity of PRPK. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **344**: 377-385.

Arimura, N. y Kaibuchi, K. 2007. Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**: 194-205.

Banker, G.A. y Cowan, W.M. 1979. Further observations on hippocampal neurons in dispersed cell culture. *J. Comp. Neurol.* **187**: 469-493.

Barnes, A. y Polleux, F. 2009. Establishment of axon-dendrite polarity in developing neurons. *Annu. Rev. Neurosci.* **32**: 347-381.

Bartlett, W. y Banker, G. 1984. An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture I. Cells Which Develop Without Intercellular Contacts. *J. Neurosci.* **4(8)**: 1944-1953.

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

Brand, A.H. y Perrimon, N. 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development.* **118**: 401-415.

Conde, C. y Cáceres, A. 2009. Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat. Rev. Neurosci.* **10**: 319-332.

Denny, J.B. 1991. MAP5 in cultured hippocampal neurons: expression diminishes with time and growth cones are not immunostained. *J. Neurocyt.* **20**: 627-636.

Dotti, C.G., Sullivan, C.A. y Banker, G.A. 1988. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* **8(4)**: 1454-1468.

Facchin, S., Lopreiato, R., Ruzzene, M., Marin, O., Sartori, G., Götz, C., Montenarh, M., Carignani, G. y Pinna, L. 2003. Functional homology between yeast piD261/Bud32 and human PRPK: both phosphorylate p53 and PRPK partially complements piD261/Bud32 deficiency. *FEBS Letters.* **549**: 63-66.

Facchin, S., Ruzzene, M., Peggion, C., Sartori, G., Carignani, G., Marin, O., Brustolon, F., Lopreiato, R. y Pinna, L. 2007. Phosphorylation and activation of the atypical kinase p53-related protein kinase (PRPK) by Akt/PKB. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**: 2680-2689.

- González-Billault, C., Avila, J. y Cáceres, A. 2001. Evidence for the role of MAP1B in axon formation. *Mol. Biol. Cell.* **12**: 2087-2098.
- Guerrier, S. y Polleux, F. 2007. The ups and downs of neural progenitors: Cep120 and TACCs control interkinetic nuclear migration. *Neuron.* **56**: 1-3.
- Halpain, S. y Dehmelt, L. 2006. The MAP1 family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol.* **7**: 224.
- Hammarback, J.A., Obar, R.A., Hughes, S.M. y Vallee, R.B. 1991. MAP1B is encoded as a polyprotein that is processed to form a complex N-terminal microtubule-binding domain. *Neuron.* **7**: 129-139.
- Harris, C. y Hollstein, M. 1993. Clinical implication of the p53 tumor-suppressor gene. *New Engl. J. Med.* **329**: 1318-1327.
- Inagaki, N., Chihara, K., Arimura, N., Ménager, C., Kawano, Y., Matsuo, N., Nishimura, T., Amano, M. y Kaibuchi, K. 2001. CRMP-2 induces axons in cultured hippocampal neurons. *Nature Neurosci.* **4(8)**: 781-782.
- Jiang, H., Guo, W., Liang, X. y Rao, Y. 2005. Both the establishment and the maintenance of neuronal polarity require active mechanisms: critical roles of GSK-3 β and its upstream regulators. *Cell.* **120**: 123-135.
- Kaech, S. y Banker, G. 2007. Culturing hippocampal neurons. *Nature Protoc.* **1(5)**: 2406-2415.
- Kuznetsov, S., Rodionov, V., Nadezhdina, E., Murphy, D. y Gelfand, V. 1986. Identification of a 34-kD polypeptide as a light chain of Microtubule-associated Protein-1 (MAP-1) and its association with a MAP-1 peptide that binds to microtubules. *J. Cell. Biol.* **102**: 1060-1066.
- Lee, S., Kim, J., Jeong, M., An, J., Jang, S., Song, K. y Choi, K. 2008. Microtubule-associated Protein 1B Light Chain (MAP1B-LC1) negatively regulates the activity of tumor suppressor p53 in neuroblastoma cells. *FEBS Letters.* **582**: 2826-2832.
- Levine, A.J. 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* **88**: 323-331.
- Loh, S., Francescut, L., Lingor, P., Bähr, M. y Nicotera, P. 2008. Identification of new kinase clusters required for neurite outgrowth and retraction by a loss-of-function RNA interference screen. *Cell Death Diff.* **15**: 283-298.
- Lova, P., Paganini, S., Hirsch, E., Barberis, L., Wymann, M., Sinigaglia, F., Balduini, C. y Torti, M. 2003. A selective role for phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in the G α i-dependent activation of platelet Rap1B. *J. Biol. Chem.* **278(1)**: 131-138.
- Lowery, L. y Van Vactor, D. 2009. The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **10**: 332-343.
- Luo, L. 2000. Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat. Rev. Neurosci.* **1**: 173-180.

Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K. y Narumiya, S. 1999. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science*. **285**: 895-898.

Moll, U. y Petrenko, O. 2003. The Mdm2-p53 interaction. *Mol. Cancer Res.* **1**: 1001-1008.

Montenegro-Venegas, C., Tortosa, E., Rosso, S., Peretti, D., Bollati, F., Bisbal, M., Jausoro, I., Avila, J., Cáceres, A. y Gonzalez-Billault, C. 2010. MAP1B regulates axonal development by modulating Rho-GTPase Rac1 activity. *Mol. Biol. Cell.* **21**: 3518-3528.

Nishimura, T., Yamaguchi, T., Kato, K., Yoshizawa, M., Nabeshima, Y., Ohno, S., Hoshino, M. Y Kaibuchi, K. 2005. PAR-6-PAR-3 mediates Cdc42-induced Rac activation through the Rac GEFs STEF/Tiam1. *Nat. Cell Biol.* **7(3)**: 270-277.

Qin, Q., Baudry, M., Liao, G., Noniyev, A., Galeano, J. y Bi, X. 2009. A novel function for p53: regulation of growth cone motility through interaction with Rho Kinase. *J. Neurosci.* **29(16)**: 5183-5192.

Qin, Q., Liao, G., Baudry, M. y Bi, X. 2010a. Role of calpain-mediated p53 truncation in semaphorin 3A-induced axonal growth regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107(31)**: 13883-13887.

Qin, Q., Liao, G., Baudry, M. y Bi, X. 2010b. Cholesterol perturbation in mice results in p53 degradation and axonal pathology through p38 MAPK and Mdm2 activation. *PLoS ONE.* **5(4)**: e9999.

Shi, S., Jan, L. y Jan, Y. 2003. Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-Kinase activity. *Cell.* **112**: 63-75.

Smith, D. y Johnson, K. 1988. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene.* **67**: 31-40.

Schwamborn, J. y Püschel, A. 2004. The sequential activity of the GTPases Rap1B and Cdc42 determines neuronal polarity. *Nat. Neurosci.* **7(9)**: 923-929.

Tögel, M., Wiche, G. y Propst, F. 1998. Novel features of the Light Chain of Microtubule-associated Protein MAP1B: microtubule stabilization, self interaction, actin filament binding, and regulation by the Heavy Chain. *J. Cell Biol.* **143(3)**: 695-707.

Tolias, K., Cantley, L. y Carpenter, C. 1995. Rho family GTPases bind to phosphoinositide kinases. *J. Biol. Chem.* **270(30)**: 17656-17659.

Tucker, R.P. y Matus, A.I. 1987. Developmental regulation of two microtubule-associated proteins (MAP2 and MAP5) in the embryonic avian retina. *Development.* **101**: 535-546.

Witte, H., Neukirchen, D. y Bradke, F. 2008. Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. *J. Cell Biol.* **180(3)**: 619-632.

Yoshimura, T., Kawano, Y., Arimura, N., Kawabata, S., Kikuchi, A. y Kaibuchi, K. 2005. GSK-3 β regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity. *Cell*. **120**: 137-149.

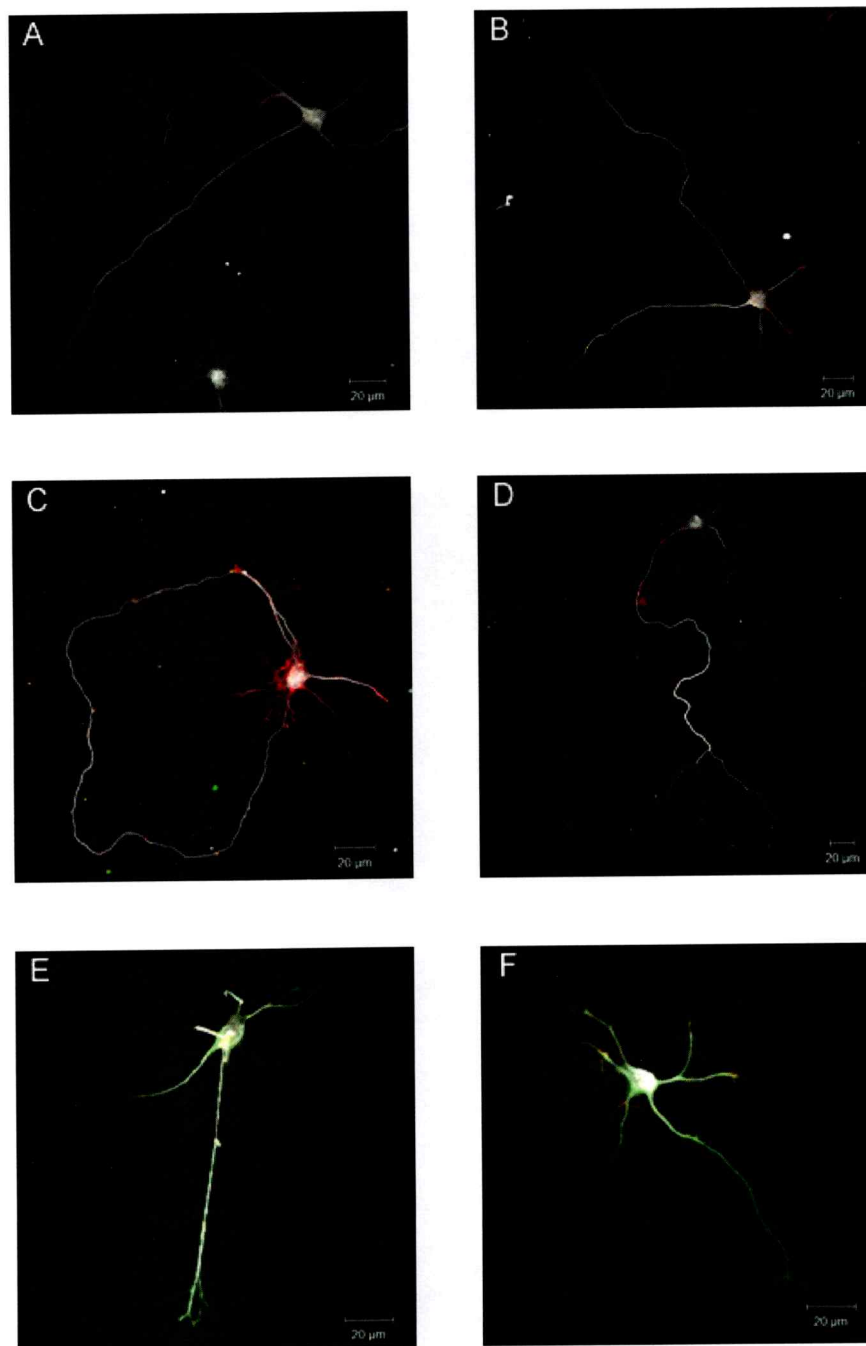
Yoshimura, T., Arimura, N., Kawano, Y., Kawabata, S., Wang, S. y Kaibuchi, K. 2006. Ras regulates neuronal polarity via the PI3-kinase/Akt/GSK-3 β /CRMP-2 pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **340**: 62-68.

Zauner, W., Kratz, J., Staunton, J., Feick, P. y Wiche, G. 1992. Identification of two distinct microtubule binding domains on recombinant rat MAP 1B. *Eur. J. Cell Biol.* **57**: 66-74.

ANEXO

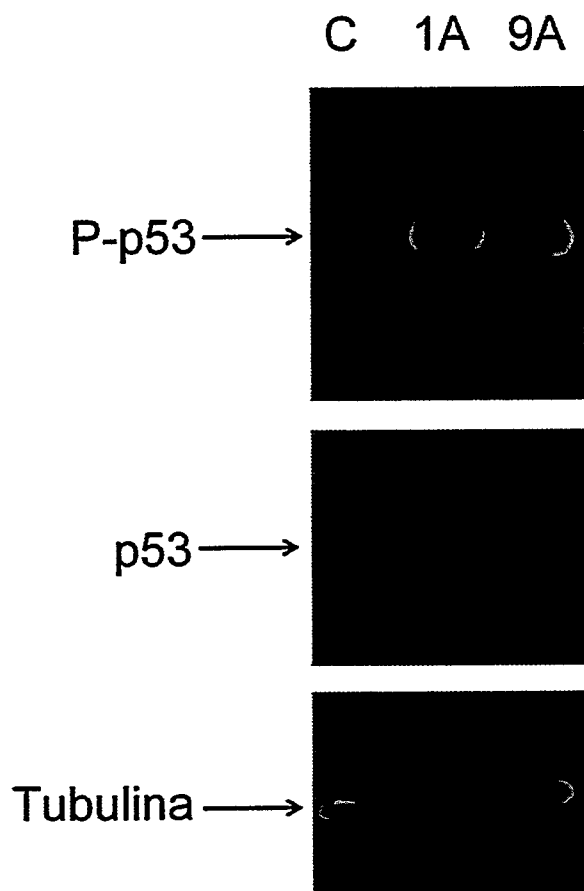
Anexo1. A continuación se presentan algunas imágenes adicionales que complementan la figura 7. Se muestran 2 imágenes de neuronas control (A y B), 2 de neuronas tratadas con lipofectamina (C y D) y 2 de neuronas transfectadas, que tienen una marca positiva para FLAG (E y F). Todas las imágenes corresponden a la unión de los tres canales de fluorescencia (FLAG en verde, actina polimerizada visualizada con faloidina, en rojo y β III tubulina en blanco) y fueron obtenidas desde IF realizadas a neuronas hipocampales de embriones de rata en cultivo a los 3 DIV, provenientes de 3 cultivos diferentes transfectados con el vector pTag2-PRPK. Tal como en la figura 7 ubicada en resultados, se observa que las neuronas FLAG (+) poseen un axón, sin embargo éste es más corto que el de las neuronas controles y de las controles en presencia de lipofectamina.

Figura anexa 1.



En A y B se presentan neuronas controles, en C y D, neuronas tratadas con lipofectamina; en E y F neuronas transfectadas y positivas para FLAG. Magnificación de 40X. Las marcas de los anticuerpos corresponden a las mismas de la figura 7.

Anexo 2. Se muestra un Western blot realizado desde extractos de células N1E-115 transfectadas con el vector construido y descrito en la Figura 6C. El carril denotado como C corresponde al control de transfección y los carriles 1A y 9A a transfecciones usando vectores pTag2-PRPK purificados desde dos clones diferentes. Además se presenta tubulina, como control de carga.



Anexo 3. Se presenta un alineamiento de las secuencias aminoacídicas de PRPK de ratón, rata, humano y mosca; realizado usando la herramienta informática online ClustalW. Las posiciones marcadas con un asterisco (*) corresponden a aminoácidos conservados en todas las secuencias. Los aminoácidos marcados con dos puntos (:) muestran mutaciones por aminoácidos similares. Un solo punto (.) indica que la mutación incorpora un aminoácido de naturaleza diferente al predominante en el resto de las secuencias. Además se resalta con letras negras el sitio catalítico y en verde un residuo de ácido aspártico (D), cuya mutación genera la forma dominante negativa de PRPK. En celeste se resalta otro residuo aspartato, ubicado en el loop de activación de la kinasa. Su mutación también genera una forma dominante negativa de PRPK. En rojo se resalta el residuo que es fosforilado por Akt.

```

Mus_musculus          MAGVSS-----EAEAEALAAARERSRLFLSGLELVQQGAEARVERG 41
Rattus_norvegicus    MAGASS-----EAEAEALAAARERSRLFLSGLELVQQGAEARVERG 41
Homo_sapiens         MAAARATT PADGEEPAPAEAEALAAARERSRFLSGLELVKQGAEARVERG 50
Drosophila_melanogaster -----MS-LEILKQGAEGRLYLG 17
                        :* *:::****.*::: *

Mus_musculus          RFQGRAAVVKHRFPKSYRHPLEEARLGRRTVQEARALLRCRRAGIAAPV 91
Rattus_norvegicus    RFQGRAAVVKHRFPKGYRHPLEEARLGRRTVQEARALLRCRRAGIAAPV 91
Homo_sapiens         RFQGRAAVIKHRFPKGYRHPLEEARLGRRTVQEARALLRCRRAGISAPV 100
Drosophila_melanogaster DFKGEACL IKERFVKYRHPLELNTQITRQRMKAEKASGRCLAAGILAPK 67
                        *.*.*:::.* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Mus_musculus          VFFVDYASNCLYMEETEDSVTVRDYIQSTMETE---KDPQCLLDLARRMG 138
Rattus_norvegicus    VFFVDYASNCLYMEETEDSVTVRDYIQSTMETK---QDPQCLLDLARKIG 138
Homo_sapiens         VFFVDYASNCLYMEETEGSVTVRDYIQSTMETE---KTFQGLSNLAKETIG 147
Drosophila_melanogaster ILHSDLNTHKLYMEYFDAAKTAKQFIQETVSTQTEDEAKKCLEFCTRIG 117
                        ::. *  : : ****  : : *:::***.*:::  : : *  ::.  :*

Mus_musculus          QVLAGMHDQDLIHGDLTTSNMLLRPLAQLHIVLIDFGLSFVSGLPEDKG 188
Rattus_norvegicus    QVLARLHDEDLIHGDLTTSNMLLRPLEQLHIVLIDFGLSFVSGLPEDKG 188
Homo_sapiens         QVLARMHDEDLIHGDLTTSNMLKPLEQLNIVLIDFGLSFISALPEDKG 197
Drosophila_melanogaster EIIGKMHSNHIHGDLTTSNILINPKGGDYDVILIDFGLSHYNQATEDKG 167
                        ::. . *:::*****:*:  : :*****. . .****

Mus_musculus          VDLYVLEKAFLLSTHPHTETAFAEFLKSYGASS-KKSSPVLKKLDEVRLRG 237
Rattus_norvegicus    VDLYVLEKAFLLSTHPHTETVFEAFLKSYGASS-KKSDPVLKKLDEVRLRG 237
Homo_sapiens         VDLYVLEKAFLLSTHPNTETVFEAFLKSYSTSS-KKARPVLKKLDEVRLRG 246
Drosophila_melanogaster VDLYVLERALLSTHSEQPYIFEHVLAAYRTACGKDEQAVLTKFEEVRARG 217
                        *****:*:*****.  ** .* * : : . * . **.*:::*** **

Mus_musculus          RKRSMVG 244
Rattus_norvegicus    RKRSMVG 244
Homo_sapiens         RKRSMVG 253
Drosophila_melanogaster RKRTMIG 224
                        ***:*:*

```