

UCH-FC
Biotecnología
D278
C.I.

ESCUELA DE PREGRADO - FACULTAD DE CIENCIAS - UNIVERSIDAD DE CHILE



“CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MORFOLÓGICA DE LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL EN CÉLULAS NIE-115”

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

CRISTIAN ALEJANDRO DE GREGORIO CONCHA

Dr. Christian González-Billault
Director Seminario de Título

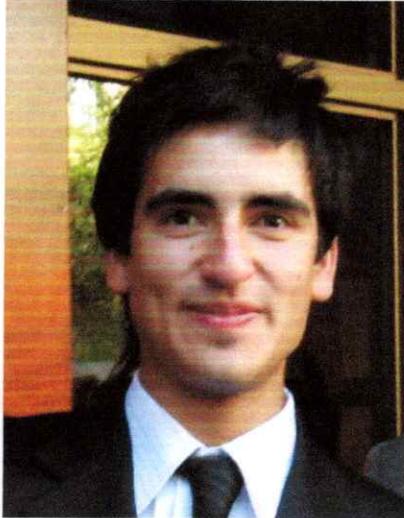


Comisión de Evaluación Seminario de Título

Dr. Juan Fernández Hidalgo
Presidente Comisión

Dr. Alejandro Roth Metcalfe
Corrector

Santiago de Chile, julio 2008



Cristian Alejandro De Gregorio Concha



Nació el 12 de diciembre de 1984 en la ciudad de Curicó. En esta ciudad realizó sus estudios primarios en la escuela Grecia, desde kinder hasta cuarto básico.

Posteriormente, continuó sus estudios en el Instituto San Martín, hasta egresar de

cuarto medio en el año 2002.

El año 2003 ingresó a la carrera profesional de ingeniería en biotecnología molecular, impartida por la Universidad de Chile en Santiago. El año 2007 obtuvo el grado de licenciado en biotecnología, y a partir de este año empezó a desarrollar su seminario de título en el laboratorio de dinámica celular y neuronal, bajo la dirección del doctor Christian González Billault.

Destacado desde pequeño por sus dotes artísticas, poco a poco comenzó a interesarse por la ciencia, optando por ejercer esta disciplina durante el resto de su vida. Entre otras aficiones, gusta de practicar regularmente varios deportes, como el atletismo y el ciclismo, y de conocer otros lugares y culturas.



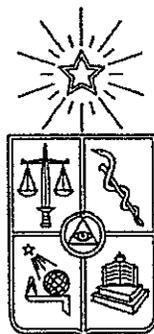
Agradecimientos

Primero que nada, me gustaría agradecer profundamente a mis padres, que desde pequeño me motivaron para sacar adelante una carrera profesional, y se esforzaron durante años para poder darme la mejor educación posible, lo que me significó tener que alejarme del hogar a los 17 años. De la misma forma, agradecer a mis hermanos Fernando, Juan Pablo e Isabel, a mi Weli, a mi tía Ana María Concha, y el resto de mi numerosa familia, por todo su apoyo incondicional cuando lo necesité.

También quiero agradecer a Christian, el director de mi tesis, y a mis compañeros de laboratorio, Carolina, Cristina, Erick, Sebastián, Vicente y Daniel, por creer en mí, por apoyarme y criticar mi trabajo cuando fue requerido. Sin ellos, esta memoria no podría haberse realizado.

Siempre recuerdo también mis primeros educadores y mi paso por la Escuela Grecia, donde la tía Rosita y la tía Yolanda fueron grandes profesoras encargadas de enseñarme los primeros pasos en la educación.

Y para concluir, quisiera agradecer a mis amigos, el gran apoyo que tuve para reemplazar la ausencia de mis padres, y que siempre estuvieron allí cuando las cosas no salieron como uno quería, o simplemente, dijeron presente para conversar, carretear o vacacionar conmigo. Por ello dedico esta memoria a mis mejores amigos, pero especialmente y en forma muy particular, a mi polola Javiera, por todo su amor incondicional y su generosa compañía.



CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MORFOLÓGICA DE LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL EN CÉLULAS NIE-115

CRISTIAN ALEJANDRO DE GREGORIO CONCHA

Director de Seminario de Título: Dr. Christian González-Billault.

Seminario de Título

**Para optar al título de
Ingeniero en biotecnología**

2008

I.- ÍNDICE.....	ii
II.- ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
III.- ABREVIATURAS.....	iv
1.- RESUMEN.....	1
2.- ABSTRACT.....	2
3.- INTRODUCCIÓN.....	3
4.- HIPÓTESIS.....	13
5.- OBJETIVO GENERAL.....	13
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
6.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
6.1 MATERIALES.....	16
6.1.1 Líneas celulares.....	16
6.1.2 Reactivos químicos y de cultivo celular.....	16
6.1.3 Anticuerpos.....	17
6.2 MÉTODOS.....	18
6.2.1 Cultivo celular.....	18
6.2.2 Inducción de diferenciación neuronal.....	19
6.2.3 Análisis bioquímico.....	20
6.2.4 Inmunofluorescencia.....	20
6.2.5 Análisis morfométrico.....	20
7.- RESULTADOS.....	22
7.1 Establecimiento de un protocolo para la diferenciación de la línea celular murina N1E 115.....	22
7.2 Cambios producidos en el citoesqueleto durante el proceso de diferenciación.....	28
7.3 Caracterización fenotípica de la línea N1E 115 y cambios en la cantidad de proteínas producto de la diferenciación.....	31
7.3.1 Proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs).....	32
7.3.2 Otras proteínas que se asocian a microtúbulos.....	36
7.3.3 Proteínas de señalización involucradas en la diferenciación neuronal.....	39
7.4 Estudio de las modificaciones post traduccionales y cambios en la localización Subcelular de proteínas durante la diferenciación neuronal.....	42
7.4.1 Proteínas de señalización y efectoras que modulan el citoesqueleto de actina.....	42
8.- DISCUSIÓN.....	46
8.1 Establecimiento de un método efectivo para la diferenciación de la línea celular N1E 115.....	46
8.2 Cambios producidos en el citoesqueleto durante el proceso de diferenciación.....	48
8.3 Caracterización fenotípica de la línea N1E 115 y cambios en la cantidad de proteínas producto de la diferenciación.....	49
8.3.1 Proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs).....	49
8.3.2 Otras proteínas no convencionales que se asocian a microtúbulos.....	50
8.3.3 Proteínas de señalización involucradas en diferenciación neuronal.....	52
8.4 Proteínas de señalización involucradas en diferenciación neuronal.....	54
9.- CONCLUSIONES.....	55
10.- BIBLIOGRAFÍA.....	57

II.-ÍNDICE DE FIGURAS

1.- Figura 1: Etapas del desarrollo neuronal.....	4
2.- Figura 2: Proteínas involucradas en la vía de señalización que regula la unión de cofilina a actina.....	11
3. Figura 3: Prueba de diferenciación de cultivo de células N1E 115 con 3 métodos diferentes.....	23
4.- Figura 4: Nivel de inducción del crecimiento de neuritas luego de aplicar tratamientos de diferenciación.....	26
5. Figura 5: Cuantificación de la diferenciación obtenida con los tratamientos aplicados.....	27
6.- Figura 6: Variaciones en el citoesqueleto celular producto de la diferenciación.....	30
7. Figura 7: Niveles de expresión para las proteínas MAPs al inducir diferenciación celular.....	35
8.- Figura 8: Niveles de expresión para proteínas de unión a microtúbulos no convencionales durante la diferenciación.....	38
9. Figura 9: Cambios en la abundancia de tres proteínas señalizadoras del proceso de diferenciación neuronal durante el desarrollo de neuritas en N1E 115.....	41
10.- Figura 10: Niveles de expresión y cambios en los patrones de fosforilación para las proteínas LIMK y cofilina durante el proceso de diferenciación.....	45



III.-ABREVIACIONES

ABP	Proteína de unión a actina
ADF	Factor despolimerizante de actina
AMP	Adenosín monofosfato
AR	Ácido retinoico
BSA	Suero albúmina de bovino
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
CDK5	Quinasa dependiente de ciclina 5
CRMP-2	Proteína mediadora de la respuesta de colapsina-2
DBcAMP	Dibutiril Adenosín monofosfato cíclico
DMEM	Medio modificado Eagle de Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
ECL	Reactivo quimiolumincente para <i>western blot</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
F-actina	Filamentos de actina
FBS	Suero fetal de bovino
GSK3 β	Glicógeno sintasa quinasa 3 beta
HRP	Peroxidasa de rábano
Ig	Inmunoglobulina
KO	<i>Knock out</i>
MAP	Proteína asociada a microtúbulos

NGF	Factor de crecimiento neural
P35	Proteína activadora de CDK5
P39	Proteína neuroespecífica activadora de CDK5
PBS	Solución tampón fosfato salino
PBST	PBS-Tween 0,05%
PMSF	Fluoruro de fenilmetanosulfonil
SDS-PAGE	Electroforesis denaturante en gel de poliacrilamida
siRNA	Ácido ribonucleico interferente pequeño
RNA	Ácido ribonucleico
TBS	Solución tampón Tris-NaCl
Tris	Solución tampón de tris (hidroximetil) aminometano

1.-RESUMEN

La línea celular N1E 115 (neuroblastoma de cerebro de ratón) ha sido ampliamente utilizada en diversos estudios relacionados con fisiología y diferenciación neuronal. Existe evidencia que da cuenta de cambios morfológicos y fisiológicos importantes que se producen durante el proceso de diferenciación hacia una célula de tipo neuronal. Parte de estos cambios han sido extensivamente estudiados en otras líneas celulares, como las células PC12 de rata, y entre ellos se cuentan los cambios en la activación e inhibición de cascadas de señales relacionadas con la síntesis y transporte polarizado de proteínas y lípidos, que finalmente llevan a alterar los patrones establecidos para el citoesqueleto de microtúbulos y actina.

La línea celular N115 resulta ventajosa para el estudio de marcadores moleculares de diferenciación neuronal, ya que se consigue una buena diferenciación con la mera privación de nutrientes en conjunto con la adición de pequeños porcentajes de compuestos que promueven la diferenciación neuronal al medio de crecimiento. Sin embargo, la línea N115 aún no ha sido caracterizada fenotípicamente, por lo tanto, no se conoce a cabalidad la totalidad de proteínas que expresan en sus estados no diferenciado y diferenciado. Por ello, esta línea celular puede resultar útil como modelo para el estudio de proteínas involucradas en el desarrollo de polaridad, y para la búsqueda de nuevos marcadores moleculares de diferenciación neuronal.

2.-ABSTRACT

The N1E 115 neuroblastoma cell line (mouse brain) has been widely used in various studies related to neuronal physiology and differentiation. There is evidence of significant physiological and morphological changes during the differentiation process towards a neuron-like cell. Some of these changes have been extensively studied in other cell lines, such as rat PC12 cells. Among them, changes in the activation and inhibition of signal cascades associated to the synthesis and polarized transport of proteins and lipids, which finally lead to the establishment of altered patterns for both microtubule and actin cytoskeleton.

Additionally, the N115 cell line is very appropriate for studying molecular markers of neuronal differentiation because the mere deprivation of nutrients along with the addition of small quantities of compounds to the growth medium allows a high efficiency of neuronal differentiation. However, this cell line has not been phenotypically characterized and the detailed description of expressed proteins in the differentiated and undifferentiated states is unknown. Therefore, cells N1E115 can be useful as models for the study of the proteins involved in neuronal polarity, and for the study of molecular markers for neuronal differentiation.

3.-INTRODUCCIÓN

Las neuronas son células altamente diferenciadas y especializadas para realizar sus funciones celulares. A través del axón y de las elaboradas ramificaciones dendríticas, las neuronas son capaces de establecer circuitos que detectan señales, almacenan y transmiten información esencial para las funciones de los organismos vivos (Horton y Ehlers, 2003). Además, a pesar de que las neuronas exhiben diversas formas y tamaños, se encuentran divididas en dominios funcionales discretos, diferentes a nivel estructural, funcional y bioquímico, los que alcanzan su máxima expresión entre el axón y el compartimiento somadendrítico (Craig y Banker, 1994).

El desarrollo de la polaridad neuronal es un proceso que ha sido muy estudiado, principalmente en modelos murinos y de rata. Banker y colaboradores (1988) fueron los primeros en describir los acontecimientos ocurridos al visualizar neuronas hipocampales cultivadas *in vitro*. De ahí en adelante, el proceso de desarrollo de la polaridad neuronal se dividió en 5 etapas, que abarcan desde la adhesión de la neurona a la placa de cultivo y la formación de lamelipodios durante la etapa 1, hasta alcanzar su desarrollo completo, con un axón muy elongado y muchas dendritas ramificadas, provistas de espinas dendríticas, durante la etapa 5 (figura 1). Sin embargo, los estudios de polaridad neuronal se han enfocado principalmente en la transición de la etapa 2 a la 3 (que las neuronas alcanzan alrededor de 2 a 3 días *in vitro*), porque es en ese momento cuando una de las neuritas

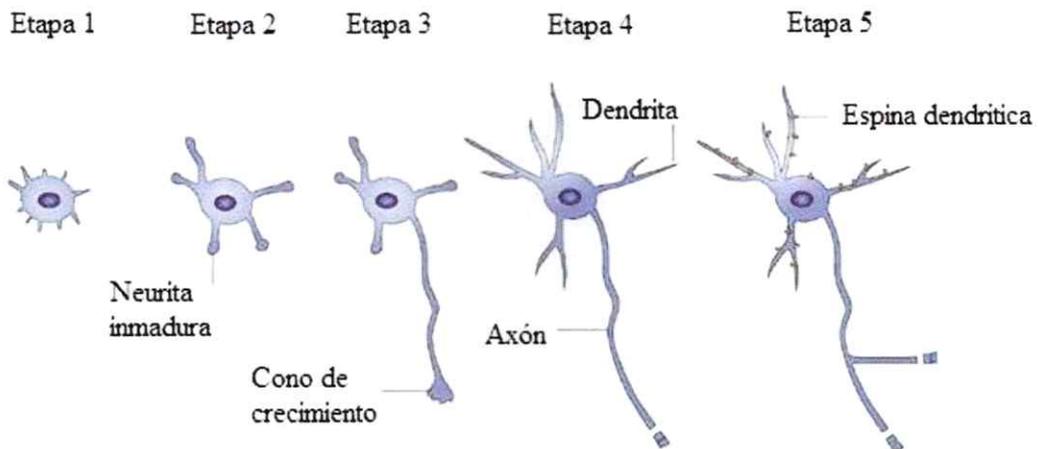


Figura 1: Etapas del desarrollo neuronal. Este esquema muestra las 5 etapas del desarrollo de polaridad neuronal. Durante la etapa 1, la célula se adhiere a la placa de cultivo y comienza la formación de lamelipodios. En la etapa 2, comienza a extender prolongaciones, que en la etapa 3 se diferenciarán hasta convertirse en axón o dendritas. Durante la etapa 4 se produce una elongación rápida del axón, que finalmente hacia la etapa 5 madurará completamente, así como las dendritas se verán provistas de abundantes ramificaciones y espinas dendríticas (Adaptado de Arimura y Kaibuchi, 2007).

comienza a elongarse más velozmente que el resto, para posteriormente convertirse en axón, mientras que las demás neuritas serán destinadas a convertirse en dendritas.

El desarrollo del proceso de diferenciación neuronal involucra moléculas estructurales y proteínas que participan de cascadas de señalización que contribuyen a la

correcta formación de la morfología de la célula (Nakata e Hirokawa, 2007). Este nivel de especificación, que se determina durante el desarrollo del sistema nervioso, debe mantenerse constante durante toda la vida de un organismo para permitir mantener la funcionalidad del sistema nervioso. De esta forma, resulta clave una fina modulación del citoesqueleto y de la maquinaria encargada del tráfico de membranas (Foletti *et al.*, 1999).

Sin embargo, no todos los estudios de polaridad neuronal se han llevado a cabo en cultivos primarios. La línea celular PC12, proveniente de un feocromocitoma (tumor de la médula suprarrenal) de rata, es un valioso modelo para la diferenciación neuronal. En presencia del factor de crecimiento neural (NGF), las células PC12 modifican drásticamente su morfología, desde células esféricas a células que extienden neuritas y adquieren propiedades de neuronas simpáticas (Kobayashi, 1997).

El determinar cómo las neuronas adquieren polaridad, un cierto tamaño y forma durante el desarrollo, y además resolver cómo el aprendizaje y la experiencia influyen en los cambios morfológicos que alteran la conectividad funcional entre neuronas pre y post-sinápticas, se ha convertido en un difícil desafío durante los últimos años. Muchos de los procesos que controlan el cambio morfológico hacia neuronas se han estudiado en líneas celulares, como los cambios en la activación e inhibición de rutas metabólicas relacionadas con la síntesis de proteínas y lípidos, y cambios en importantes vías de señalización celular (tal como se ha demostrado que ocurre con las cascadas de señalización asociadas a Ras-MAPK, fosfolipasa C y fosfatidilinositol), y que finalmente llevan a cambiar los patrones establecidos para el citoesqueleto de microtúbulos y actina (Satoh *et al.*, 1988).

Entre las principales ventajas que permite el trabajo con líneas celulares se cuenta la rapidez con la que éstas se dividen. Esto permite contar con un amplio stock de células que permite desarrollar estudios en lapsos más cortos de tiempo, y contar con la cantidad necesaria de proteínas para realizar experimentos como western blots, inmunoprecipitaciones o electroforesis en geles de 2 dimensiones. Además, la línea celular N1E 115 posee la ventaja de expresar proteínas que son tejido-específicas para el cerebro, mientras que estas moléculas se podrían estudiar en otras líneas celulares no neuronales (o que no derivan del sistema nervioso central) sólo por medio de aproximaciones, como las transfecciones.

La línea celular N1E 115, derivada de un neuroblastoma de cerebro de ratón, ha sido ampliamente utilizada en la investigación del rol de neurotransmisores y sus respectivos receptores, y muchos estudios de polaridad (Samer *et al.*, 2000; Jenkins *et al.*, 1996). La principal ventaja que conlleva el uso de las N115 es la amplia evidencia que da cuenta de cambios morfológicos y fisiológicos importantes que se producen durante el proceso de diferenciación hacia una célula de tipo neurona (Kruman *et al.*, 1993). Estos cambios se obtienen con la simple privación de nutrientes (ausencia de suero fetal), en conjunto con la adición de pequeños porcentajes de compuestos determinados al medio de crecimiento, como lo es el DMSO (Clejan *et al.*, 1996). Por esta razón, esta línea celular puede ser un modelo muy atractivo para el estudio de marcadores moleculares que juegan papeles importantes para determinar la diferenciación neuronal. Sin embargo, como la línea celular N115 aún no ha sido caracterizada fenotípicamente, no se conoce a cabalidad la totalidad de proteínas que expresan en sus estados diferenciado y no diferenciado.

Entre las principales proteínas que se estudiarán durante el desarrollo de este trabajo, se encuentran las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs). La organización de los microtúbulos en las neuronas depende de gran manera de los procesos de ensamblaje y estabilización de éstos (Mitchison y Kirschner, 1988), regulado por el balance entre proteínas estabilizadoras y desestabilizadoras de microtúbulos (Andersen, 2000), donde las MAPs son las principales encargadas de llevar a cabo la primera función. Éstas proteínas poseen cuatro familias principales: proteínas MAP1, proteínas MAP2, proteínas MAP3/MAP4, y la proteína tau (Vallee, 1990; Murphy *et al.*, 1977; Olmsted, 1991 y Cleveland *et al.*, 1977), todas ellas, excepto MAP3/MAP4, se encuentran en el cerebro y son capaces de controlar la dinámica de los microtúbulos *in vivo* (Ávila *et al.*, 1994). Las MAPs fueron descubiertas y caracterizadas debido a su habilidad de unirse a los microtúbulos (Sato-Yoshitake *et al.*, 1989). Además, su función se encuentra asociada no sólo a su disponibilidad y localización en la célula, sino también a la regulación de su actividad por medio de fosforilaciones, que pueden permitir su activación, la disminución de su actividad o su inactividad (Arimura y Kaibuchi, 2007).

Otra proteína que tiene un importante papel en la nucleación de los microtúbulos y la formación de las prolongaciones neuronales, y que es activamente sintetizada durante el desarrollo del sistema nervioso, es la CRMP-2 (*collapsin response mediator protein-2*) (Fukata *et al.*, 2002). Su función se basa en la unión a heterodímeros de tubulina, promoviendo la estabilización de los microtúbulos *in vitro*. Esta proteína se encuentra enriquecida en las puntas de los axones de las neuronas diferenciadas, y se ha determinado que posee un rol importante en el desarrollo de polaridad. La sobreexpresión de esta

proteína conduce al crecimiento de neuronas con múltiples axones o con axones más elongados, mientras que el uso de un siRNA específico para el RNA codificante para esta proteína genera neuronas sin desarrollo de polaridad o con axones más cortos (Arimura y Kaibuchi, 2007).

En cambio, otras familias de proteínas, como las *stathminas*, tienen un rol relacionado a la desestabilización de microtúbulos, por lo que también tiene un papel importante en el control del citoesqueleto. El miembro de la familia de las *stathminas* cuya expresión resulta más abundante en el sistema nervioso central durante el desarrollo es la proteína SCG10 (Morii *et al.*, 2006). Esta proteína, que posee un dominio de unión a membrana y es específica de cerebro, desempeña un rol antagónico a las proteínas MAPs convencionales. Su función es finamente modulada por dos serina/treonina quinasas, MAPK y PKA, las cuales regulan su actividad por medio de fosforilaciones en 4 residuos específicos (Antonsson *et al.*, 1998). Por lo tanto, es un buen candidato para entender como se regula el balance entre los factores que promueven el ensamblaje y desensamblaje de los microtúbulos, comportamiento conocido como inestabilidad dinámica (Tataruk *et al.*, 2006).

Sin embargo, los microtúbulos y sus proteínas asociadas no son los únicos responsables de ejercer una acción asociada a la polarización celular, ya que también se ha atribuido un rol importante a las GTPasas de la familia Rho, consideradas como las proteínas maestras que controlan la polimerización y despolimerización de actina en todos los sistemas vivos hasta ahora descritos, y se ha demostrado que son esenciales para los

arreglos del citoesqueleto de actina en el citoplasma (Etienne-Manneville y Hall, 2002). Estas proteínas son muy abundantes y se han descrito más de 20 en mamíferos, siendo las más caracterizadas RhoA, Rac1 y Cdc42 (Arimura, 2003). Las cascadas de señalización dependientes de las GTPasas pequeñas, controlan la activación y/o inactivación de numerosas proteínas quinasas, que modifican la actividad de las proteínas de unión a actina (ABPs). Se ha descrito que en cultivos neuronales la activación de Rac1 induce la formación de lamelipodios, la activación de cdc42 la formación de filopodios, y la de Rho induce el colapso de las neuritas (Arber *et al.*, 1998; Luo, 2000 y Yang *et al.*, 1998).

Las ABPs controlan la estabilización, entrecruzamiento y empaquetado de los filamentos de actina (Van Troys *et al.*, 2008). Una de las principales integrantes de este tipo de moléculas es la cofilina. Esta proteína, que depende de la vía de señalización de Rac1, tiene actividad dinamizante de los microfilamentos de actina. Esta proteína se encuentra en estado activo cuando está desfosforilada, y se ha determinado que su función es vital para la formación de estructuras características compuestas por filamentos de actina en los conos de crecimiento, en la parte distal de los procesos de las neuronas (Tomoyuki *et al.*, 1999). Esta proteína es modulada por la acción de LIMK1, la cual es capaz de fosforilarla en la serina en la posición 3, lo que desencadena la disminución de su afinidad por los microfilamentos de actina, permitiendo la reorganización del citoesqueleto de actina y la formación de lamelipodios (Yang *et al.*, 1998). A su vez, LIMK se encuentra río abajo de la cascada de señalización de CDK5, donde ésta última es capaz de inactivar a PAK por medio de su hiperfosforilación, lo que desencadena que LIMK permanezca inactiva

(Nikolic *et al.*, 1998). La figura 2 presenta un esquema de esta vía de modulación del citoesqueleto de actina.

De esta forma, resulta de fundamental importancia en la dinámica del citoesqueleto de actina la razón entre la cofilina activa / inactiva, así como la capacidad de LIMK para fosforilar a cofilina. En células PC12, se ha determinado que tanto cofilina como una proteína cercanamente relacionada, el ADF (factor despolimerizante de actina), pierden afinidad por actina en presencia de un agente inductor de la formación de neuritas, como el NGF (Mitsuharu *et al.*, 2007). De esta forma, resulta interesante estudiar el efecto que tendrá la diferenciación de las células N1E115 sobre la cantidad total y la razón de proteína fosforilada / desfosforilada encontrada para las proteínas cofilina y LIMK.

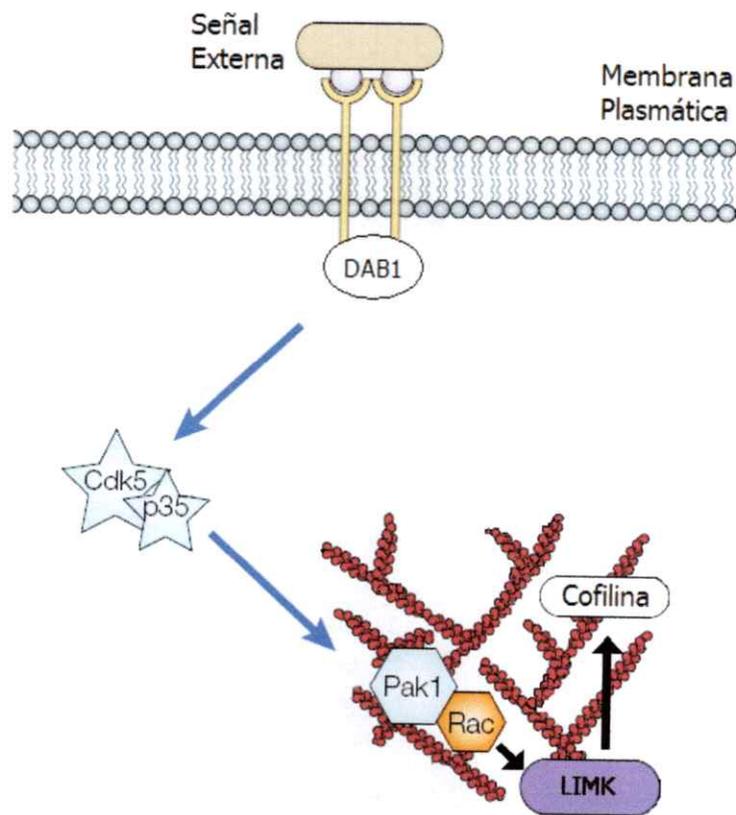


Figura 2: Proteínas involucradas en la vía de señalización que regula la unión de cofilina a actina. La activación de CDK5 por la proteína p35 es capaz de incidir finalmente sobre la actividad de cofilina, proteína de unión a actina que es capaz de aumentar su estabilidad por medio de su fosforilación por LIMK1 (Adaptado de Gupta *et al.*, 2002).

Finalmente, otra proteína a estudiar, que ha resultado de especial interés durante los últimos años, es la proteína LIS1. Inicialmente, fue descubierta por causar una severa enfermedad al cerebro, la lisencefalia, debido a una mutación puntual en el genoma. Sin embargo, hoy en día se sabe que participa en varios procesos de fundamental importancia

para la célula. El primero, se relaciona con el transporte de vesículas a través de la célula, ya que su función se encuentra asociada a la regulación de la proteína dineína, el motor molecular de los microtúbulos. Sin embargo, también se ha clasificado como una MAP no convencional, ya que se ha descrito que tiene la capacidad de promover la polimerización de microtúbulos (Bielas *et al.* 2004). Además, se encuentra participando de manera clave en otros eventos del ciclo celular, como lo son la morfogénesis, la división y la migración celular; de ahí surge su importancia y las consecuencias que se han observado cuando su función se encuentra alterada.

En vista de los antecedentes presentados referentes a la importancia del citoesqueleto en los cambios de morfología observados durante el desarrollo de polaridad neuronal, y la relevancia que ejercen durante este proceso las proteínas que modulan la estabilidad, la elongación y la dinámica de microtúbulos y filamentos de actina, nos planteamos a continuación la hipótesis para este trabajo.

4.-HIPÓTESIS

Los cambios morfológicos desarrollados durante la diferenciación neuronal de las células N1E115 podrían ser inducidos por cambios en la expresión y la fosforilación/defosforilación de proteínas moduladoras del citoesqueleto de microtúbulos y actina.

5.- OBJETIVO GENERAL

Caracterizar fenotípicamente la línea celular N1E 115, analizando por medio de técnicas inmunológicas la expresión de algunos grupos de proteínas que hemos considerado importantes para la modulación del citoesqueleto de microtúbulos y los filamentos de actina, entre las que se encuentran las proteínas asociadas a microtúbulos MAP1A, MAP1B, MAP2, tau y LIS1; la *stathmina* SCG10 y la proteína CRMP2; las proteínas de unión a actina (LIMK1 y cofilina), y algunas de las enzimas que se encuentran río arriba de ambas vías de señalización mencionadas anteriormente (DAB1, CDK5 y p35). Al mismo tiempo, se analizará si las proteínas a estudiar sufren cambios de expresión durante el desarrollo de polaridad, con el fin de encontrar nuevos marcadores de diferenciación neuronal.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

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

Para ello, se eligieron 3 métodos (descritos en la literatura) que se han utilizado efectivamente para la diferenciación de líneas celulares, que podrían determinar el crecimiento de neuritas y el desarrollo de polaridad neuronal en células N1E 115. Estos métodos incluyen el uso de suero suplementado con DMSO, ácido retinoico o dibutilil cAMP. Para determinar el compuesto capaz de generar patrones de diferenciación más notorios, se realizaron mediciones morfométricas para cada uno de los métodos de diferenciación, y se comparó respecto a las células cultivadas en condiciones de crecimiento normal.

5.1.2 Analizar los cambios morfológicos durante el proceso de diferenciación neuronal de células N115 por inmunofluorescencia. Se utilizó inmunofluorescencia para la visualización del citoesqueleto de actina y de microtúbulos en células diferenciadas e indiferenciadas, por medio de faloidina conjugada a un fluoróforo y el anticuerpo monoclonal contra α -tubulina, respectivamente. Se estudió los cambios morfológicos ocurridos durante la diferenciación celular, la aparición de nuevas estructuras características de neuronas, y los cambios más notables ocurridos a nivel de microtúbulos y filamentos de actina.

5.1.3 Obtener marcadores moleculares que puedan dar cuenta de la diferenciación neuronal, por medio de la caracterización de la expresión diferencial entre ambos estados de desarrollo. Para ello, se obtuvo extractos proteicos desde placas de cultivo con células diferenciadas e indiferenciadas. Desde éstos, se analizó la expresión mediante western blot de proteínas de unión a microtúbulos, involucradas en la modulación del citoesqueleto de actina, y proteínas presentes en vías de señalización que se piensa juegan un rol en la diferenciación neuronal. En cada caso, se utilizó experimentos en triplicado para los análisis estadísticos de las densitometrías, y se normalizó contra la proteína constitutiva α -tubulina como control de carga.

5.1.4 Determinar cambios en los patrones de fosforilación en proteínas que controlan la dinámica del citoesqueleto de actina durante la diferenciación neuronal. Para ello, se analizó la expresión de proteínas moduladoras del citoesqueleto de actina cuya actividad se encuentra sujeta a su estado de fosforilación, como lo son cofilina y la proteína quinasa LIMK1. Al igual que en el objetivo anterior, se analizó mediante densitometría la razón de proteínas en estado fosforilado/proteína total, para ver cómo la diferenciación es capaz de afectar la actividad dependiente de fosforilación de dichas proteínas.

6.- MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 MATERIALES

6.1.1 Líneas celulares

Se utilizó la línea celular N1E115, derivada de neuroblastos (cerebro) de ratón (American Type Culture Collection: CRL-2263).

6.1.2 Reactivos químicos y de cultivo celular

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

Otros reactivos y productos químicos de uso general utilizados durante el desarrollo de este trabajo fueron provistos por TCL, Sigma, Calbiochem, Winkler y Sudelab. Las películas autorradiográficas fueron provistas por FujiFilm (HR-U30) y el reactivo de ECL fue provisto por Perkin Elmer.

6.1.3 Anticuerpos

Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: HM2 anti MAP2 monoclonal y anti α -tubulina total monoclonal (Sigma); anti SCG10-BR (provisto por Dr. Gabriela Grenningloh, Universidad de Lausanne) (Antonsson *et al.*, 1998); anti CRMP2 (provisto por Ph.D. Kozo Kaibuchi) (Arimura *et al.*, 2004); N-19 anti MAP1B, N-18 Anti MAP1A, H-300 anti LIS1 , C-17 anti Tau, C-19 anti p35, H-103 anti DAB1 y C-18 anti LIMK1 (Santa Cruz Biotechnology), anti cofilina y anti cofilina fosforilada (provisto por Dr. James Bamberg) y anti LIMK fosforilado (Cell Signaling).

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

6.2 MÉTODOS

6.2.1. Cultivo Celular

La línea celular murina N1E115 fue crecida en medio DMEM suplementado con 10% FBS, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de penicilina y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomycin, y cultivadas en placas de cultivo de 100 mm a 37°C, en un incubador con 5% de CO_2 y humedad controlada al 95%.

6.2.2. Inducción de diferenciación neuronal

Células N1E115 indiferenciadas fueron crecidas a una densidad de 8000 células/ cm^2 en medio DMEM suplementado con 10% FBS durante 24 horas, y para inducir la diferenciación a un estado de tipo neurona, se cambió a medio de diferenciación, constituido por DMEM suplementado con 0,5% (v/v) de FBS y 10 μM de ácido retinoico, 3 mM de DBcAMP o 1,5% DMSO (v/v). Las células se dejaron crecer durante 5 días, cambiando cada 3 días a medio fresco de diferenciación.

6.2.3. Análisis Bioquímico

Para el análisis de proteínas totales de las células en sus estados diferenciados e indiferenciados, se realizó extractos de proteínas desde placas de cultivo de 100 mm. Para ello, las células fueron lisadas durante 15 minutos en solución tampón de extracción de proteínas (Tris 20 mM pH 7,4; NaCl 100 mM; EDTA 1 mM; tritón X-100 1% e inhibidores de proteasas PMSF 0,2 mM; Aprotinina 1 mM; Leupeptina 1 mM y Pepstatina 0,2 mM). Luego de centrifugar los extractos obtenidos a 14.000 RPM durante 15 minutos, se recolectaron y se almacenaron con solución de carga 1X, dejando una alícuota para la medición de la concentración de proteínas por el método descrito por Bradford (1976). Si bien en este ensayo se recomienda no utilizar detergentes, como el tritón X-100, no se observó problemas con la cuantificación de proteínas a la dilución utilizada, utilizando los controles necesarios.

Los extractos proteicos fueron cargados en geles de poliacrilamida, a concentraciones adecuadas para los pesos moleculares de las proteínas a estudiar. Una vez lograda la separación de proteínas, éstas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa. A continuación, las membranas fueron bloqueadas en solución de 5% de leche y PBS-tween y posteriormente se incubaron por 1 hora o toda la noche con anticuerpo primario (específico para la proteína a analizar) y 1 hora con anticuerpo secundario (conjugado con HRP). Las membranas fueron incubadas con un sustrato para la peroxidasa que genera una reacción de quimioluminiscencia (reactivo ECL). Las placas fueron reveladas usando filmes de autoradiografía. Para los análisis densitométricos, se normalizaron las señales

obtenidas contra la proteína de expresión constitutiva α -tubulina, como control de carga. Para ver resultados estadísticamente significativos, se utilizó el test de student con $p < 0,05$.

6.2.4 Inmunofluorescencia

Los ensayos de inmunofluorescencia fueron realizados según protocolos descritos por González-Billault (2004). En resumen, los cubreobjetos que contienen las células fueron fijados con una solución de sacarosa 4% y paraformaldehído 4%, y luego las células fueron permeabilizadas con solución de tritón X-100 0,1% en PBS durante 5 minutos. Posteriormente, se incubaron con PBS-BSA 5% (solución de bloqueo) durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4° C. Luego se procedió a incubar los cubreobjetos con los anticuerpos primarios en solución de PBS-BSA 1% durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4° C, y luego de 3 lavados con PBS se incubaron de la misma forma con los anticuerpos secundarios y tinción de Faloidina, cuando fuese requerido. Después de 3 lavados con PBS se montaron en portaobjetos utilizando el reactivo FluorSave (Calbiochem). Finalmente, las células fueron visualizadas en el microscopio de fluorescencia Zeiss Axiovert 200M, provisto de una cámara AxioCam HRn Zeiss.

6.2.5 Análisis Morfométrico

Para el procesamiento de las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia y la realización del análisis morfométrico, que incluyen la medición del cuerpo celular y la

longitud de las prolongaciones neuríticas, se utilizaron los programas Axiovision Viewer 3.0 y el Zeiss LSM Image Browser. Las células utilizadas para realizar las mediciones fueron escogidas al azar desde campos visuales en objetivo 40x, entre aquellas poblaciones que se encontraran en menores densidades, para que se pudiera ver en forma clara los límites celulares (sobre todo en lo referido a la sobreposición de las neuritas).

7.- RESULTADOS

7.1 Establecimiento de protocolo para la diferenciación de la línea celular murina N1E 115.

Como la línea murina N1E 115 es uno de los modelos frecuentemente usados para los estudios de la diferenciación neuronal, existe un protocolo descrito que permite inducir su diferenciación hacia un fenotipo celular tipo neurona (Clejan *et al.*, 1996). En este trabajo se probó otros métodos, los cuales varían tanto en su efectividad en cuanto a los cambios morfológicos, así como en su incidencia en la sobrevivencia de la célula, ya que algunos de estos métodos resultan demasiado dañinos y pueden originar la activación de rutas apoptóticas (Kruman *et al.*, 1993). Debido a ello, se eligieron 3 métodos de diferenciación distintos, descritos en la literatura para esta línea celular o para otras líneas celulares (Kruman *et al.*, 1993; Mao *et al.*, 2000; Muñoz *et al.*, 2000), y se evaluó entre aquellos que permitieran obtener los mejores patrones de diferenciación, además de que aseguren la supervivencia de los cultivos durante el mayor tiempo posible

La figura 3 muestra el nivel de diferenciación obtenido con cada uno de los métodos ensayados, por medio de imágenes de inmunofluorescencia. En el cultivo control, mantenido en condiciones óptimas de crecimiento, las células crecen en forma rápida, alcanzando la confluencia de la placa de cultivo. Entre los compuestos utilizados para la diferenciación, el DMSO y el DBcAMP generaron una aparente baja en la división celular, la que se correlaciona con una tardanza para llegar a la confluencia en las placas de cultivo.

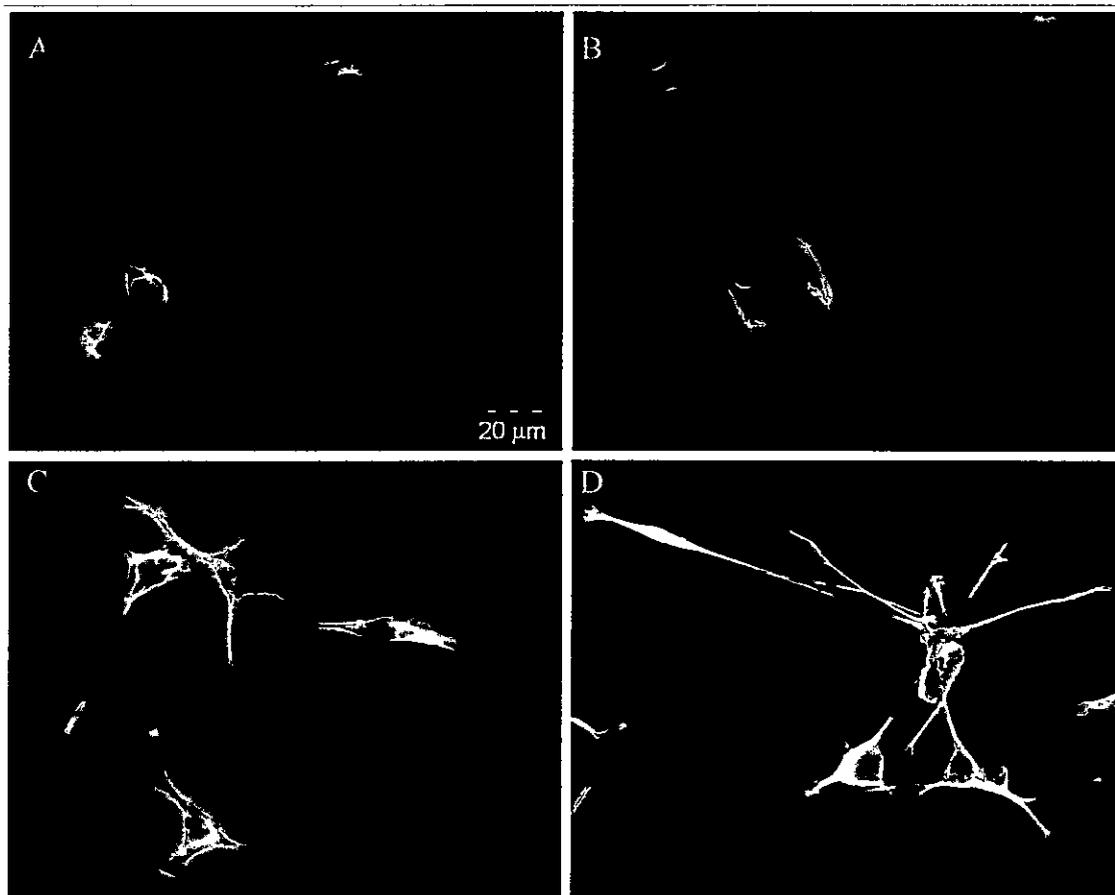


Figura 3: Prueba de diferenciación de cultivo de células N1E 115 con 3 métodos diferentes. Para visualizar la morfología celular, se tomaron imágenes de microscopía de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo contra α -tubulina. A, cultivo de células en condiciones de crecimiento normales (medio de cultivo DMEM con 10% FBS). B, células crecidas en medio DMEM 0,5% FBS con 10 μ M de ácido retinoico durante 5 días. C, células crecidas en DMEM 0,5% FBS con 1,5% de DMSO durante 5 días. D, células crecidas en DMEM 0,5% FBS con 3 mM de DBcAMP durante 5 días. La barra blanca equivale a 20 μ m, y las imágenes fueron tomadas en el objetivo 63x.

Sin embargo, si bien el ácido retinoico es capaz de aumentar la cantidad de neuritas en las células luego de 5 días de cultivo, este aumento no resulta estadísticamente significativo (figura 4A), y no se observaron los patrones característicos asociados al desarrollo de polaridad en los cultivos tratados.

Por otro lado, los tratamientos con DMSO y con DBcAMP fueron capaces de generar patrones de diferenciación, ya que un alto porcentaje de las células fueron capaces de desarrollar neuritas en una cantidad muy superior a la observada en la condición control y las células tratadas con ácido retinoico (resultados estadísticamente significativos, figura 4A). Sin embargo, el DMSO presentó la desventaja de no generar un desarrollo parejo para todas las células, es decir, se observó poblaciones de células que extendían neuritas y presentaban polaridad, mientras que otras poblaciones se vieron mucho menos desarrolladas (diferenciación incompleta), donde incluso muchas siguieron dividiéndose en forma activa. Tal como se observa en la figura 3, en la placa de cultivo tratada con DMSO se observan células diferenciadas e indiferenciadas en el mismo campo visual, dando cuenta que células que se encuentran en condiciones de cultivo equivalentes no reaccionan de la misma forma ante este tratamiento.

Para definir un parámetro de diferenciación de las células, se adoptó como criterio la elongación de neuritas con una longitud mayor a dos diámetros de la célula (Oh *et al.*, 2006), el cual tiene una longitud de aproximadamente 15 μm . En base a esto, se realizaron mediciones para establecer qué porcentaje de las poblaciones de neuroblastos efectivamente

se diferenció (figura 5). Los cultivos tratados con DMSO y DBcAMP fueron capaces de inducir a las células a diferenciarse en forma efectiva respecto al control, sin embargo, el DBcAMP resultó ser el agente capaz de generar células con neuritas más largas, mayor número de neuritas por célula (prácticamente todas las células extienden neuritas de variados tamaños) y un porcentaje de la población diferenciada muy superior al observado en las otras condiciones. En base a esto, para diferenciar los cultivos celulares se optó por utilizar el DBcAMP.

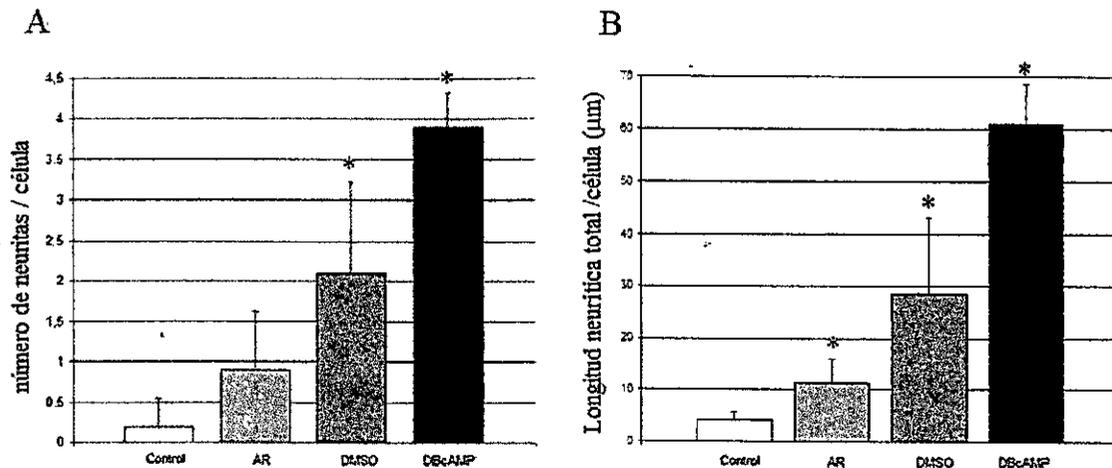


Figura 4: Nivel de inducción del crecimiento de neuritas luego de aplicar tratamientos de diferenciación. Al comparar los tres tratamientos aplicados a los cultivos en relación a las células crecidas en forma normal, se ve un aumento en la cantidad de prolongaciones neuríticas con los tres tratamientos, donde resaltan los resultados observados para los tratamientos con DMSO y DBcAMP, que fueron capaces de aumentar en forma significativa la cantidad de neuritas observadas en relación a la condición de cultivo control (A), así como también aumentó en forma considerable la longitud total de las neuritas (B). Además, estos dos tratamientos resultaron. Para las mediciones, se tomó un número de 70 células para cada caso. El asterisco indica que el tratamiento resultó estadísticamente significativo (prueba test de student, con $p < 0,05$).

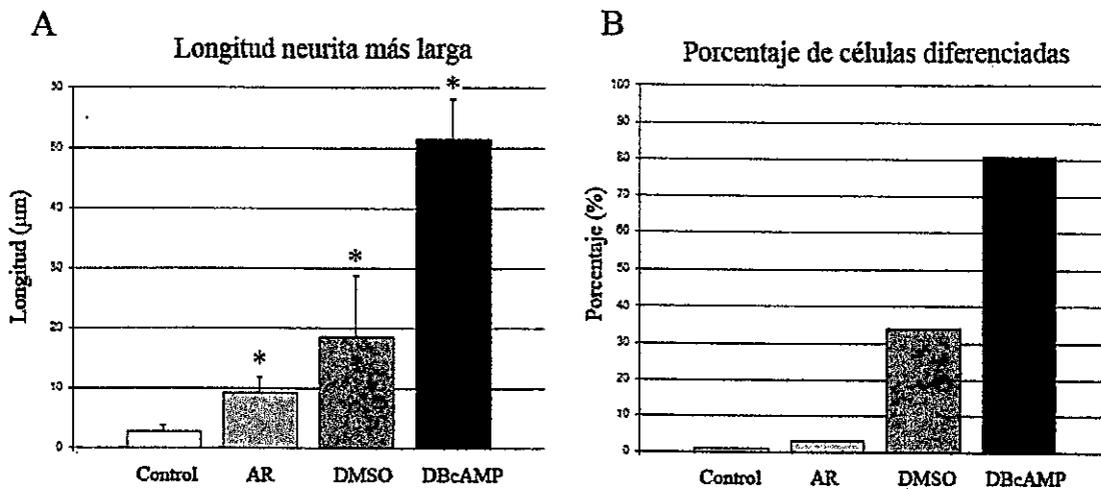


Figura 5: Cuantificación de la diferenciación obtenida con los tratamientos aplicados. Para ver cual de los compuestos actúa como mejor agente diferenciador, se procedió a medir la longitud de la neurita más larga para 80 células para cada caso (A). En base a estos datos, se calculó el porcentaje de células cuyas neuritas se extendían más allá de 2 diámetros celulares (B). Los compuestos capaces de diferenciar a las células resultaron ser el DMSO y el DBcAMP, siendo éste último capaz de diferenciar a la gran mayoría de la población celular. Para las mediciones, se tomó un número de 70 células para cada caso. El asterisco indica un resultado estadísticamente significativo (prueba test de student, con $p < 0,05$).

7.2 Cambios producidos en el citoesqueleto durante el proceso de diferenciación.

Por medio de inmunocitoquímica, se observó los cambios observados durante la diferenciación en células colocadas en placas con cubreobjetos crecidas durante 5 días. Para ello, se utilizó un anticuerpo contra α -tubulina para ver los cambios en los microtúbulos. La figura 6D muestra en escala de grises cómo se despliegan las redes de microtúbulos alrededor del cuerpo celular, y se extienden hasta el extremo de las prolongaciones neuríticas, formando parte también de las ramificaciones secundarias encontradas en las neuritas. Comparativamente, los haces de microtúbulos observados en la figura 6A son reducidos y se hayan distribuido equivalentemente a través de toda la célula, en las cuales no se aprecian prolongaciones neuríticas.

Por otro lado, gracias a la tinción con faloidina marcada específica para filamentos de actina (F-actina), se pudo observar una gran cantidad de manojos de filamentos a través de toda la célula diferenciada (6E), incluido en las ramificaciones neuríticas primarias y secundarias. Sin embargo, la máxima concentración de F- actina se encuentra en la parte distal de los procesos neuríticos, en una estructura característica observada en neuronas hipocampales diferenciadas, que componen los conos de crecimiento (figura 6E, marcado con flechas blancas). Además, también se encuentra una localización prominente de actina en el citoplasma periférico del cuerpo celular, tanto en células diferenciadas como indiferenciadas (puntas de flechas blancas). Éstos corresponden a lamelipodios,

conformados por fibras de actina entrecruzada, y filopodios, formados por manojos de fibras de actina (Luo, 2002).

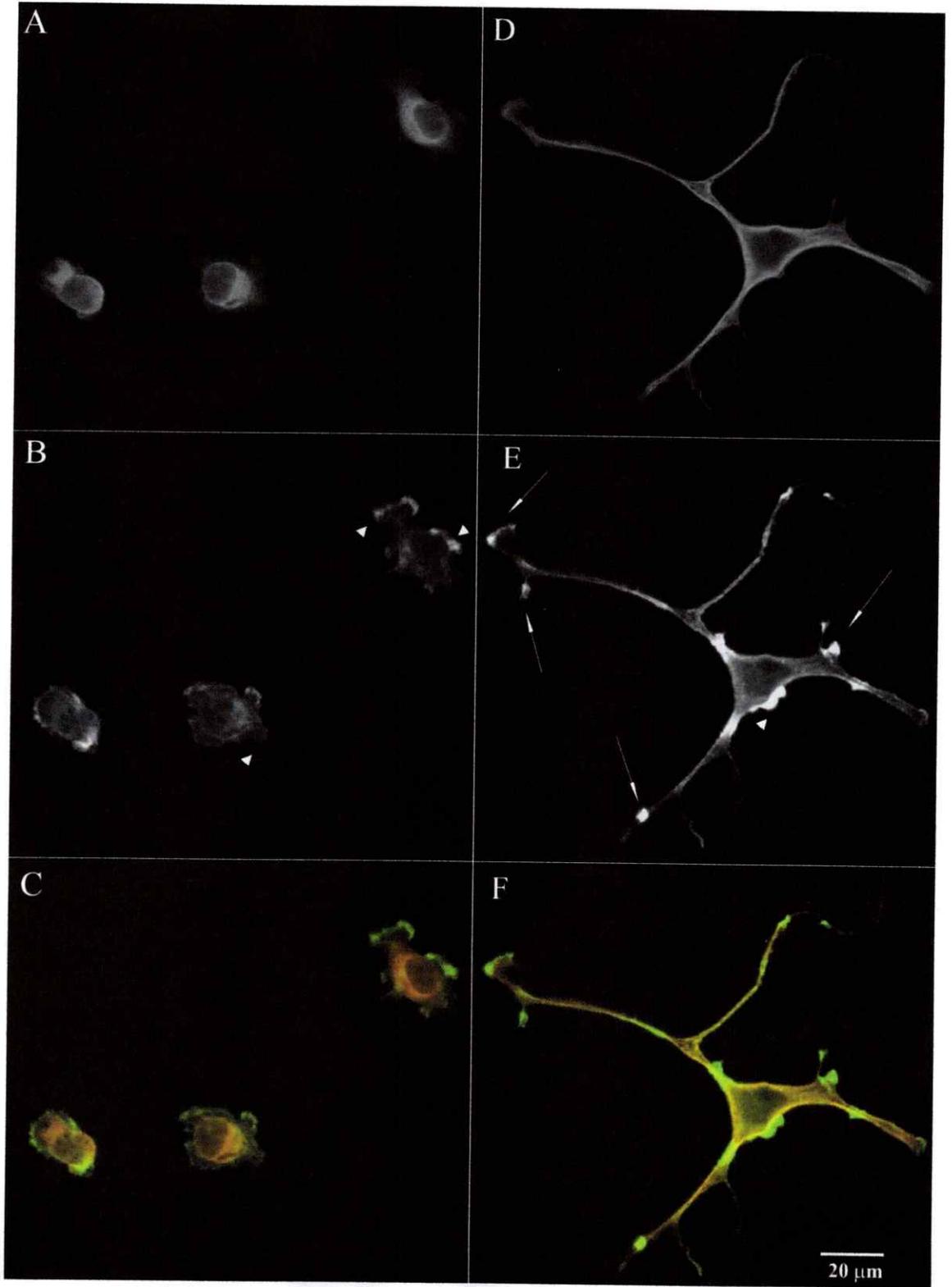


Figura 6: Variaciones en el citoesqueleto celular producto de la diferenciación. Inmunocitoquímica contra el citoesqueleto de microtúbulos (A y D) y actina (B y E) para células indiferenciadas (A, B y C) y células diferenciadas (D, E y F). Las flechas blancas indican una concentración de filamentos de actina localizados en los conos de crecimiento de las neuritas en células diferenciadas, y las puntas de flechas blancas corresponden a lamelipodios, que se encuentran en células diferenciadas y no diferenciadas. C y F, Sobreposiciones de A con B y D con E, respectivamente (α -tubulina en rojo, F-actina en verde). La barra indica una longitud de 20 μ m. Imagen tomada en el microscopio de fluorescencia Zeiss Axiovert 200M, con el objetivo 63X.

7.3 Caracterización fenotípica de la línea N1E 115 y cambios en la cantidad de proteínas producto de la diferenciación.

A pesar de que la línea celular N1E 115 es interesante y muy utilizada en materia de polaridad neuronal, aún no se ha descrito en forma minuciosa que proteínas relacionadas a la diferenciación neuronal son expresadas en esta línea celular. De esta forma, se ha tomado como uno de los objetivos de este trabajo explorar qué proteínas pueden expresarse en condiciones de cultivo normal, y estudiar si existen diferencias significativas cuando son inducidas a diferenciarse, para de esta manera dar cuenta de marcadores moleculares de diferenciación neuronal.

Debido a que los cambios morfológicos desarrollados durante la diferenciación neuronal son en gran parte responsabilidad del citoesqueleto celular, nos enfocaremos en este trabajo a estudiar los grupos de proteínas que consideramos más importantes en relación a la modulación de los microtúbulos y los filamentos de actina.

7.3.1 Proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs).

Hemos considerado en este trabajo el estudio de esta familia de proteínas, por ser la principal reguladora del citoesqueleto de microtúbulos, fundamentándonos en la amplia evidencia de que este tipo de proteínas son claves para los procesos de migración y desarrollo de polaridad (Vallee, 1990). Las importantes funciones relacionadas a este grupo de proteínas se asocian a la modulación de la estabilidad dinámica de los microtúbulos, para de esta forma, permitir los movimientos de expansión y retracción que naturalmente se llevan a cabo en la célula neuronal, como parte de su proceso de maduración (Tanaka y Sabry, 1995). Dicha modulación va asociada a cambios en la formación y estabilidad de los microtúbulos, y también incluye a los filamentos de actina (Rivas *et al.*, 1995). Es por ello que se quiso estudiar si los cambios morfológicos y fisiológicos producto de la diferenciación celular son capaces de alterar la cantidad de proteínas asociadas a microtúbulos. Estos análisis se hicieron por medio de western blot de extractos de células diferenciadas e indiferenciadas (figura 7), y posteriormente se hizo una densitometría a las bandas resultantes para evaluar si el cambio observado resulta significativo (experimentos en triplicado, con prueba de significancia test de student, con $p < 0,05$).

La figura 7A muestra un aumento significativo para la proteína MAP1B, proteína que ha sido identificada como la primera en expresarse durante el desarrollo del cerebro, a la cual se le atribuye un rol fundamental en el proceso de establecimiento de la polaridad neuronal (González-Billault *et al.*, 2004). En su densitometría respectiva (figura 7B), se puede apreciar un aumento cercano al doble de la cantidad total respecto a la condición indiferenciada, lo que evidencia que podría existir un aumento de la expresión asociada directamente al proceso de diferenciación.

La proteína MAP2 posee un comportamiento similar al observado para MAP1B (figura 7C), cuya expresión aumenta producto de la diferenciación neuronal. Sin embargo, la densitometría da cuenta de que este cambio no es tan drástico como el observado para MAP1B (figura 7D).

Otra proteína MAP que está muy relacionada estructural y funcionalmente a MAP1B, es la proteína MAP1A. Ésta también posee la capacidad de estabilizar los microtúbulos, pero se expresa en forma más activa en neuronas maduras y se localiza preferentemente en dendritas (Halpain y Dehmelt, 2006). En la figura 7E se muestra un aumento de la expresión de esta proteína durante la diferenciación, mientras que en la densitometría de la figura 7F, se observa un aumento de cerca del 50% respecto a la cantidad encontrada en células indiferenciadas.

La proteína tau también pertenece a la familia de las MAPs, pero posee un tamaño notablemente inferior al de las proteínas revisadas anteriormente, y se han descrito 6

isoformas originadas por *splicing* alternativo (Smith, *et al.*, 1995). Sin embargo, el anticuerpo utilizado reconoce sólo 1 isoforma de la proteína total en extractos de ratón. En la figura 7G se observa como la proteína tau también aumenta en cantidad respecto a la diferenciación neuronal, al igual que todas las MAPs objeto de este estudio, en un porcentaje cercano al 50% (figura 7H).

De esta manera, se evidencia un rol de importancia de las proteínas MAPs convencionales durante la diferenciación neuronal de la línea N1E 115, ya que todas experimentaron aumentos entre el 50 al 100% durante el proceso de diferenciación en la línea celular N1E 115. Todos los ensayos de western blot se hicieron en triplicado.

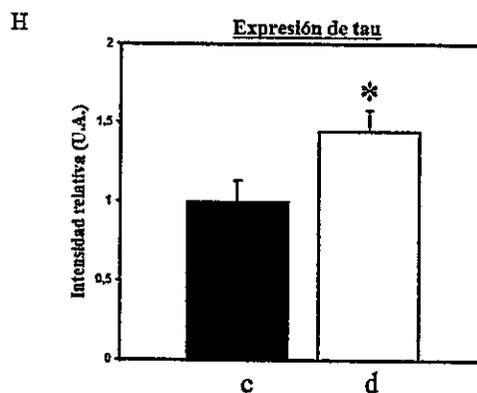
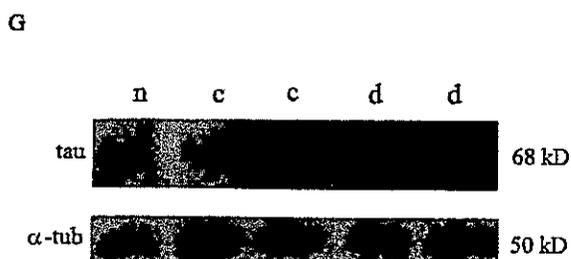
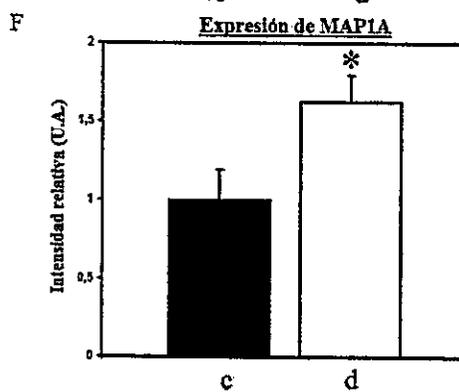
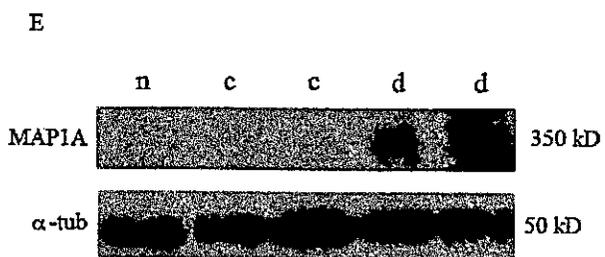
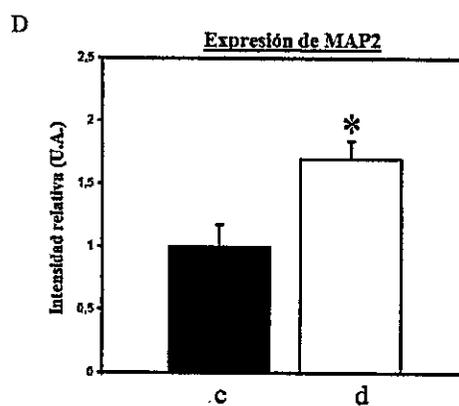
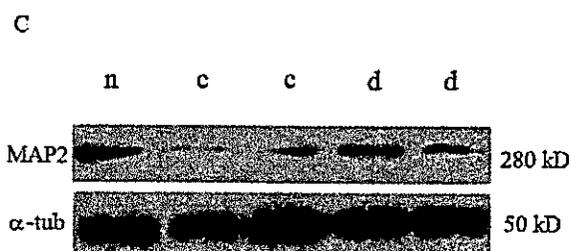
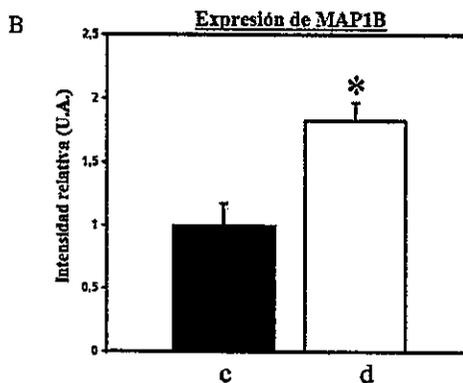
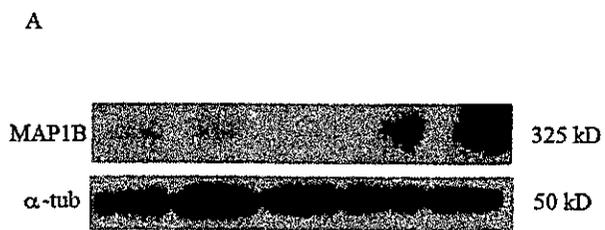


Figura 7: Niveles de expresión para las proteínas MAPs al inducir diferenciación celular. En el panel se muestran los western blots para las proteínas MAP1B (A), MAP2 (C), MAP1A (E) y tau (G), con sus respectivas densitometrías (B, D, F y H). El carril marcado con la letra n corresponde a extracto de cerebro de ratón (control positivo), los carriles marcados con la letra c son extractos de células control (indiferenciadas) y los carriles con la letra d corresponden a extractos de células diferenciadas. El (*) indica cambios significativos para experimento en triplicado (test de student, $p < 0,05$).

7.3.2 Otras proteínas que se asocian a microtúbulos:

Si bien se sabe que las proteínas MAPs son de importancia clave para el desarrollo del cerebro, no son las únicas proteínas que son capaces de unirse y modular al citoesqueleto. Últimamente, se ha obtenido evidencia suficiente para confirmar la presencia de varias otras proteínas capaces de unirse a microtúbulos. Entre las proteínas MAPs no convencionales, encontramos a LIS1, que tiene importantes funciones asociadas con el correcto desarrollo del cerebro, y la proteína doblecortina.

La proteína LIS1 participa en varios procesos celulares. Adicionalmente a su papel como proteína asociada a microtúbulos, participa en el transporte de vesículas, por medio de su interacción con dineína. Durante la diferenciación neuronal de la línea N1E 115, se observó una leve disminución en su abundancia total en la célula (figura 8A), que si bien no resultó ser significativa, tuvo una disminución de cerca del 20% (figura 8B). Resulta

interesante que mientras todas las proteínas MAP aumentan su expresión durante la diferenciación, la de LIS1 parece mantenerse constante o reducir levemente su expresión.

La función de la proteína CRMP2, que no se ha definido como parte de la familia de las MAPs, también resulta importante de estudiar, ya que a diferencia de las proteínas MAPs convencionales, esta posee un motivo de unión a heterodímeros de tubulina. En la figura 8C se observa como esta proteína experimenta una leve alza en la cantidad neta en células diferenciadas, que podría indicar que existe un aumento de la síntesis dependiente del desarrollo de polaridad. Este aumento de expresión resulta ser significativo para un experimento en triplicado (figura 8D).

Finalmente, se estudió una proteína que se asocia a microtúbulos, pero que posee una actividad opuesta a la de las proteínas MAPs. Las *stathminas* son una pequeña familia de proteínas, donde SCG10 es la de mayor expresión en las etapas iniciales del desarrollo del cerebro. En la figura 8E se aprecia que esta proteína disminuye su expresión durante el proceso de diferenciación neuronal a casi la mitad de la cantidad relativa a las células indiferenciadas. Es por ello que se podría inferir que esta proteína podría perder importancia una vez que la polaridad ya se ha establecido en la célula, donde podrían jugar mayor importancia las proteínas estabilizadoras de microtúbulos sobre las desestabilizadoras.

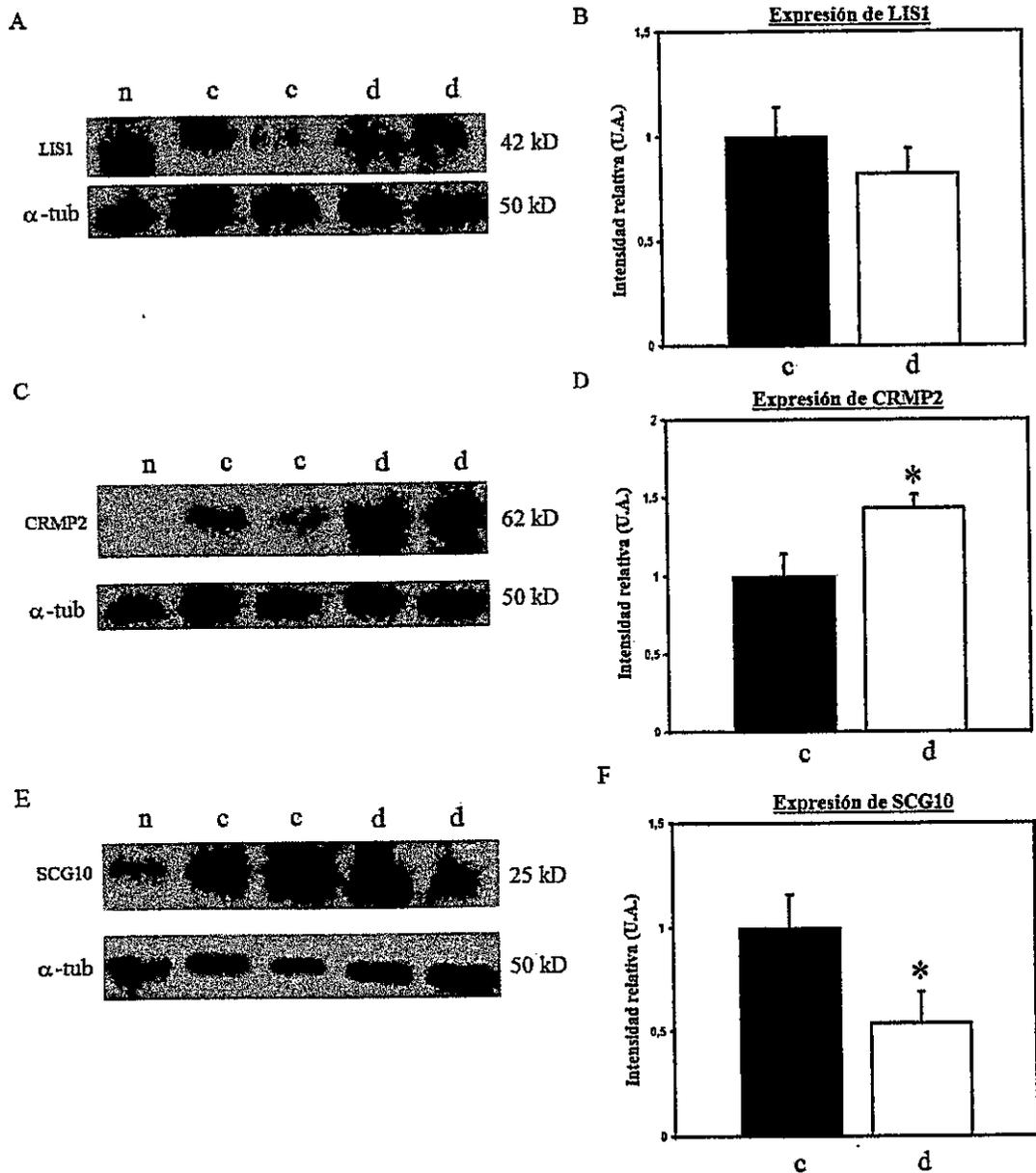


Figura 8: Niveles de expresión para proteínas de unión a microtúbulos durante la diferenciación. A, western blot contra la proteína LIS1, y en B se grafica la densitometría para el experimento en triplicado. C, western blot contra la proteína CRMP2, y en D, la respectiva densitometría para el experimento en triplicado. El carril marcado con la letra n corresponde a extracto de cerebro de ratón (control positivo), los carriles marcados con la letra c son extractos de

células control (indiferenciadas) y los carriles con la letra d corresponden a extractos de células diferenciadas. A los resultados de las densitometrías (figura 8 B, D y F) se les realizó el test de student, para determinar cambios significativos para la expresión de las proteínas en estados diferenciado y no diferenciado ($p < 0,05$). El (*) indica cambios estadísticamente significativos.

7.3.3 Proteínas de señalización involucradas en diferenciación neuronal

Una vez realizado el estudio de proteínas efectoras que modulan la estabilidad y la dinamicidad de los microtúbulos, durante este objetivo nos centraremos en el análisis de proteínas de vías de transducción de señales descritas con papeles importantes en la polaridad neuronal.

Una de las enzimas más versátiles que se ha asociado a varias funciones celulares y de desarrollo de polaridad en neuronas, es la proteína quinasa dirigida por prolina, CDK5. Se ha descrito que tiene un rol importante en la fosforilación de moléculas asociadas al citoesqueleto de microtúbulos, principalmente (Ohshima *et al*, 1996). Es por ello que resulta interesante ver si existe un cambio en la abundancia de esta proteína asociado al proceso de diferenciación y al aumento de expresión de las proteínas MAP.

La figura 9A da cuenta de que la cantidad de CDK5 no varía durante la diferenciación neuronal, para un experimento en triplicado. Si bien por densitometría se aprecia un leve aumento, no resulta estadísticamente significativo (figura 9B). La actividad

de la proteína CDK5 está muy asociada a la abundancia de sus proteínas activadoras, p35 y p39. Es por este hecho que también se quiso estudiar si la abundancia de una de estas moléculas activadoras se ve alterada durante la diferenciación neuronal. En la figura 9C, se estudió si existe una variación en la cantidad de p35, que no resulta ser significativo para un experimento en triplicado. Las explicaciones para este par de resultados pueden ser muy amplias.

Otra molécula señalizadora importante es la proteína adaptadora DAB1. Se ha determinado que es una proteína citoplasmática que se expresa en muchos tipos de neuronas, y se ha postulado que participa directamente en la vía canónica de reelina, un factor extracelular relacionado principalmente con la migración celular (Howell *et al*, 1999). Se ha descrito como un factor río arriba de la vía de señalización moduladora del citoesqueleto de actina.

En respuesta a la diferenciación inducida por DBcAMP, resulta dramático el cambio observado en la abundancia de la proteína DAB1, cuyo aumento es de aproximadamente 5 veces mayor respecto al control durante el desarrollo de polaridad (figura 9F), resultado que podría ir asociado al comportamiento del citoesqueleto de actina observado durante el proceso de diferenciación neuronal.

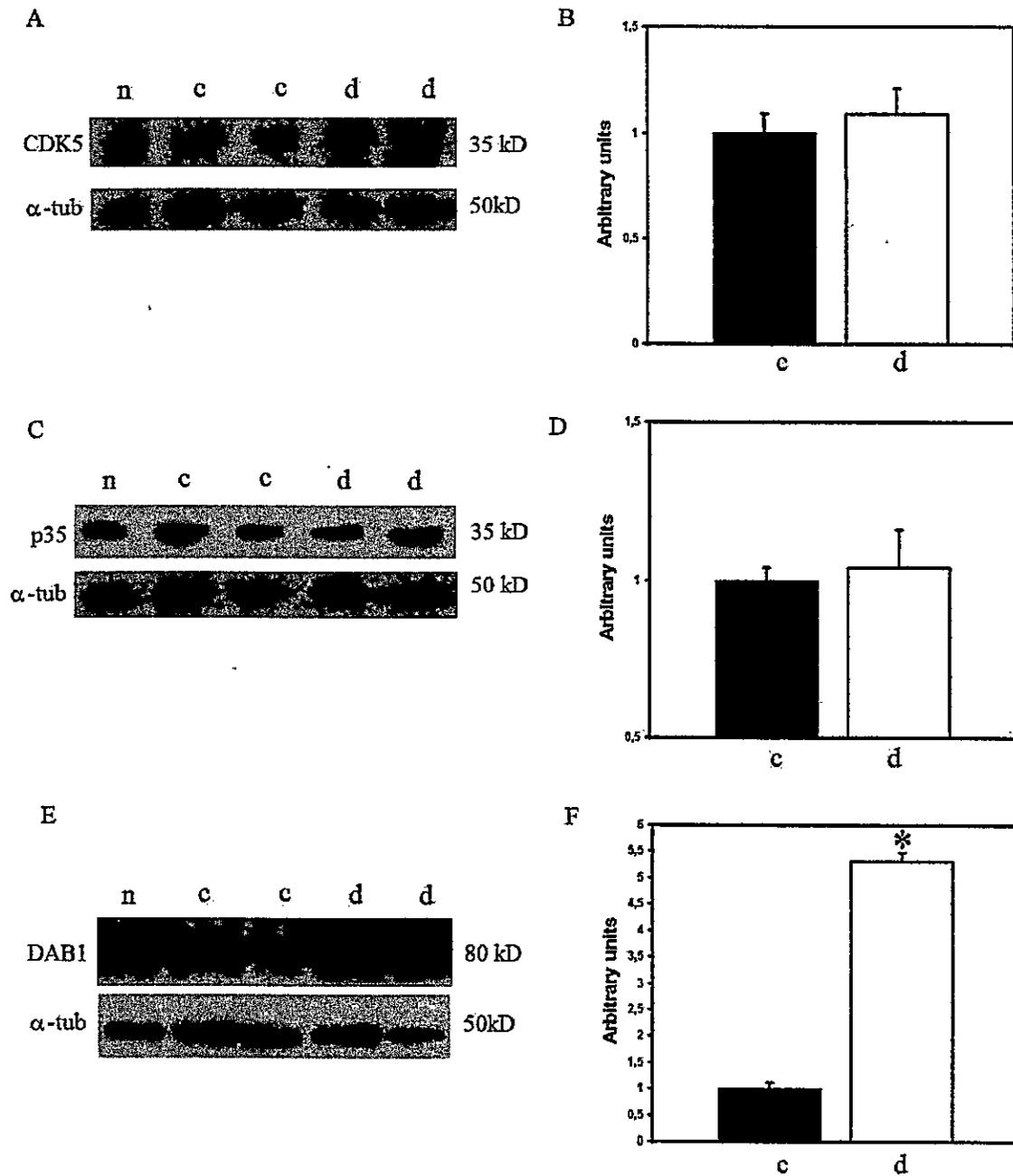


Figura 9: Cambios en la abundancia de tres proteínas señalizadoras del proceso de diferenciación neuronal durante el desarrollo de neuritas en N1E 115. A y C, niveles de expresión de las proteínas CDK5 y su activador p35, antes y después del proceso de diferenciación celular, con sus respectivas densitometrías (B y D). En E, se muestra el aumento en la expresión de

la proteína adaptadora DAB1 en respuesta a la diferenciación neuronal. Su densitometría en F da cuenta de un aumento significativo cercano al 500 %. El carril marcado con la letra n corresponde a extracto de cerebro de ratón (control positivo), los carriles marcados con la letra c son extractos de células control (indiferenciadas) y los carriles con la letra d corresponden a extractos de células diferenciadas. A los resultados de las densitometrias se les realizó el test de student ($p < 0,05$), para determinar cambios significativos, donde el asterisco representa un cambio significativo referente al proceso de diferenciación neuronal.

7.4 Estudio de las modificaciones post traduccionales y cambios en la localización subcelular de proteínas durante la diferenciación neuronal.

Si bien durante los experimentos anteriores los objetivos se enfocaron al estudio de la variación neta de las proteínas totales durante la diferenciación neuronal, es importante recalcar que, si bien la abundancia de una proteína es importante, también hay otros factores que resultan clave para su funcionamiento, como la actividad que presentan luego de modificaciones post traduccionales, así como también la localización subcelular específica donde ejercerán su función. En base a esto, los siguientes objetivos se enfocarán en determinar cambios en el primero de estos puntos.

7.4.1 Proteínas de señalización y efectoras que modulan el citoesqueleto de actina:

En este objetivo se pretende analizar los cambios de actividad que experimentan las proteínas cofilina y LIMK1, que son las moléculas que se encuentran río abajo en la vía de

señalización que modula el citoesqueleto de actina. Para ello, se analizó los niveles de expresión de cada una de estas proteínas en respuesta a la diferenciación neuronal.

Adicionalmente, como su actividad depende del nivel de fosforilación que experimenten, también se analizó el cambio en los patrones de fosforilación de estas proteínas, por medio de anticuerpos que reconocen epítomos fosforilados, para de esta forma, ver cambios de actividad al realizar los análisis de proteína fosforilada/proteína total. Este estudio se representa en la figura 10A, donde se muestra la abundancia de LIMK1 fosforilado y LIMK1 total durante el proceso de desarrollo de diferenciación. En la figura 10B, se muestra la densitometría que de cuenta de que no existen cambios significativos para ambos casos, aunque da cuenta de que existe una leve disminución de la actividad de LIMK durante la diferenciación.

La otra proteína en estudio, de bajo peso molecular y con capacidad de unirse a actina, es la cofilina. En el desarrollo de este trabajo, notamos que durante el proceso de diferenciación se observa una notable disminución de la abundancia relativa para su forma fosforilada, así como también disminuye la cantidad de proteína total en la célula (figura 10C). La densitometría respectiva indica que la actividad de cofilina disminuye drásticamente en las células diferenciadas, cambio que resulta significativo para ambos estados para experimentos en triplicado (figura 10D).

Estos resultados indican que si bien las variaciones en la abundancia neta de las proteínas suele ser importante, la medición de los cambios de actividad por fosforilación muestra de forma más cercana el comportamiento real de las proteínas, cuya función se puede encontrar fuertemente modificada por cualquier tipo de modificación post traduccional.

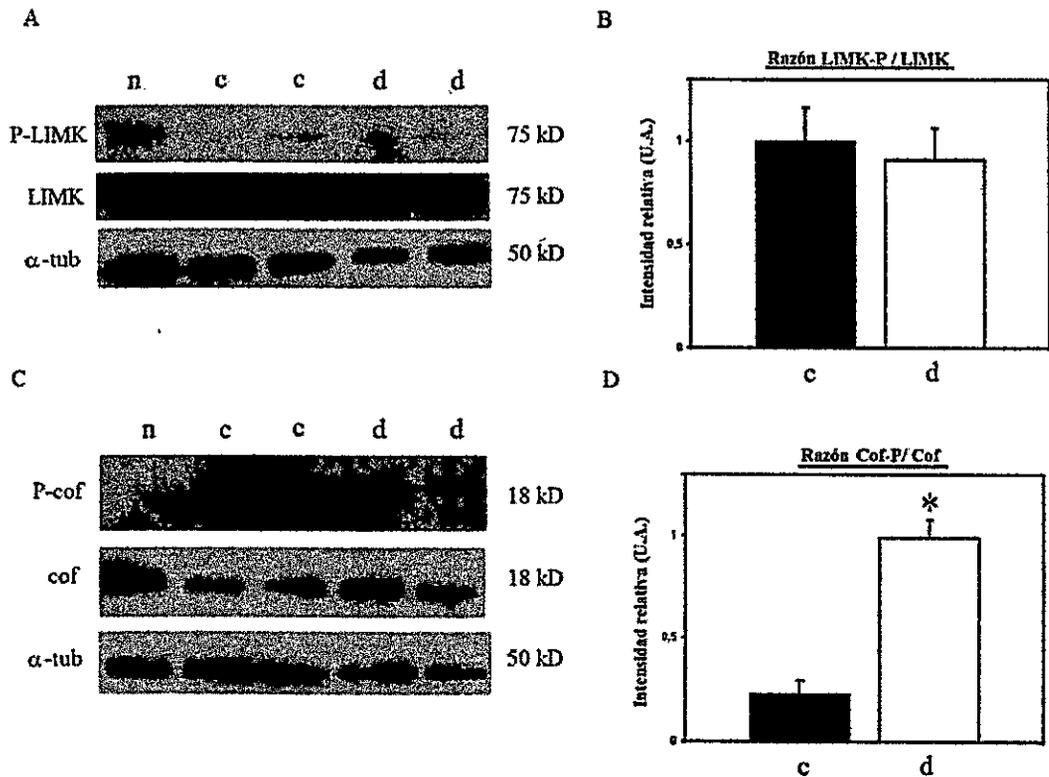


Figura 10: Niveles de expresión y cambios en los patrones de fosforilación para las proteínas LIMK y cofilina durante el proceso de diferenciación. A, western blot para la proteína LIMK fosforilada y LIMK. En B, se muestra la densitometría referente a la razón entre la proteína LIMK fosforilada y LIMK total, para un experimento en triplicado. C, Western blot contra la proteína cofilina fosforilada y cofilina total. D, gráfico definido a partir de la densitometría del experimento C en triplicado, que da cuenta de la razón entre la proteína cofilina fosforilada y la cofilina total. El carril marcado con la letras n corresponde a extracto de cerebro de ratón, los carriles marcados con la letra c son extractos de células control (indiferenciadas) y los carriles con la letra d corresponden a extractos de células diferenciadas. Los resultados de las densitometrías fueron analizados mediante el test de student ($p < 0,05$), para determinar cambios significativos, donde el asterisco representa un cambio significativo referente al proceso de diferenciación neuronal.

8.- DISCUSIÓN

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

Debido a que todos los objetivos propuestos en esta memoria se basan en la efectividad de este primer objetivo propuesto, se puso particular énfasis en la validación de este punto, que hace referencia a que la línea N1E 115 es un tipo celular que se diferencia en forma efectiva y que experimenta cambios morfológicos severos con un tratamiento simple que toma alrededor de 5 días.

Sin embargo, no resultó sencillo establecer dicho método de diferenciación. El activo proceso mitótico (las células se dividen cada 12 horas aproximadamente) y la gran capacidad de soportar condiciones de estrés observado para esta línea celular (capaz de sobrevivir varios días en un medio carente de suero), hicieron que algunos de los métodos tradicionales usados para diferenciar neuroblastos no funcionaran efectivamente, como lo son la privación de suero y el tratamiento con ácido retinoico.

Según los resultados obtenidos en este trabajo, se puede afirmar que los cultivos celulares de N1E 115 fueron capaces de diferenciarse en 2 de los tratamientos usados. La diferenciación inducida por DMSO se debe a una respuesta inducida por una condición de estrés, donde se ha observado que una concentración del 2% de este compuesto en el medio

de cultivo es capaz de generar el desarrollo de neuritas en células N1E 115 (Kruman *et al.*, 1993), mientras que el uso de concentraciones superiores de DMSO desembocan en la muerte de gran parte de la población celular.

Por otro lado, el dibutilil cAMP (análogo de AMP cíclico), es una molécula capaz de ingresar a la célula a través de la membrana plasmática, y activar las vías dependientes de cAMP. Esta puede ser la razón que convierte al DBcAMP en un mejor compuesto diferenciador, ya que se observó que es capaz de permitir que la mayor parte de las células se diferencien en forma equivalente (cerca del 80% elongó neuritas mayores a dos diámetros celulares, figura 5) al interior de la placa de cultivo, a diferencia del DMSO, que sólo es capaz de diferenciar a ciertas poblaciones celulares que podrían estar más susceptibles que otras frente a señales externas (como células en baja densidad local). Este punto implica una gran importancia sobre los resultados del trabajo desarrollado, ya que los estudios realizados incluyen la detección inmunológica de proteínas desde poblaciones totales de células, y por lo tanto, para ser capaces de detectar diferencias entre los estados diferenciados y no diferenciados se requiere que altos porcentajes de las células hayan desarrollado polaridad. Adicionalmente, la diferenciación con DMSO no ocurre antes de 5 ó 6 días en presencia del compuesto, mientras que el DBcAMP es capaz de inducir neuritas desde el segundo día, y se pueden ver células diferenciadas desde el tercer día. Una explicación para este hecho, puede ser que el DBcAMP, al ser un análogo de cAMP, ingresa a la célula y puede activar las rutas asociadas a la diferenciación celular en forma instantánea. Un aumento de cAMP ha sido descrito para diferenciación de varias líneas durante el proceso de diferenciación celular, a la cual se asocia la activación de varias vías

dependientes de cAMP, entre las que se destaca la vía de la MAPK. (Deng *et al.*, 2001; Bang *et al.*, 1994, Thomas *et al.*, 2000).

8.2 Cambios producidos en el citoesqueleto durante el proceso de diferenciación.

Durante este trabajo se demostró que la línea murina N1E 115 es capaz de desarrollar un mecanismo de polarización muy similar al descrito en neuronas. Al segundo día en presencia de un agente diferenciador, se observa una inducción del crecimiento de neuritas, que al cabo de 5 días son capaces de elongarse varias veces por sobre el diámetro celular.

Por otro lado, por medio de inmunocitoquímica se observó la formación de drásticos cambios morfológicos a nivel del citoesqueleto, donde se tejen verdaderas redes de microtúbulos a través de todo el cuerpo celular y hacia la punta de las neuritas. Adicionalmente, la tinción de faloidina permitió observar los microfilamentos de actina, distribuidos a través de toda la célula, dejando ver en la parte distal de las neuritas una particular concentración de F-actina, en estructuras llamadas conos de crecimiento, muy particulares de neuronas con desarrollo de polaridad.

Todas estas similitudes a nivel estructural, permiten comparar estas células diferenciadas con neuronas jóvenes en etapa 3 (o 3 tardía), porque si bien poseen el potencial de inducir el proceso de diferenciación neuronal y poseer neuritas de tamaños

considerables, son incapaces de emular la complejidad de los axones y dendritas ni obtener el grado de maduración que se ha observado en neuronas durante la etapa 5.

8.3 Caracterización fenotípica de la línea N1E 115 y cambios en la cantidad de proteínas producto de la diferenciación

8.3.1 Proteínas asociadas a Microtúbulos (MAPs):

Al analizar los resultados obtenidos en este objetivo, es coherente asociar el aumento de las proteínas asociadas a microtúbulos tanto a la abundante literatura existente (Brugg y Matus, 1988), como también a lo esperado morfológica y funcionalmente, pues las MAPs se encuentran entre los factores moleculares claves para los cambios en la estructura del citoesqueleto durante el desarrollo de polaridad, en lo referido a la estabilización de los microtúbulos que nacen desde el cuerpo celular y culminan en la punta de las neuritas, y en asociación a la dinamicidad que se requiere para los cambios de forma y el desarrollo de nuevas prolongaciones celulares. Algunas de las MAPs presentan semejanzas a nivel estructural, como también algunas de sus funciones celulares pueden ser redundantes (Di Tella *et al*, 1996). Sin embargo, otros estudios apuntan al estudio de la ausencia de un par de estas proteínas para ver los efectos en conjunto que pueden acarrear. Es así como en ratones knock out para MAP1B, se ha estudiado el efecto de la transfección de RNAs antisentido contra las proteínas tau o MAP2, dando cuenta de que los defectos morfológicos tienen distinta severidad, lo que puede dar cuenta de que algunas proteínas pueden tener funciones redundantes (González-Billault *et al*, 2002b). Por medio de estas

aproximaciones, se puede dar cuenta también de funciones sinérgicas en el desarrollo de polaridad y elongación axonal *in vitro*.

Las MAPs también difieren temporalmente, en sus niveles de expresión, así como también en su localización. Es así como MAP1B es la primera MAP en expresarse durante el desarrollo del sistema nervioso, mientras que MAP2 lo hace posteriormente. Y mientras la primera se localiza a lo largo de toda la célula, MAP2 lo hace preferentemente en las dendritas. De esta forma, si bien se pueden asociar funciones en común, también existe una tendencia a la complementación entre las diferentes proteínas (Goold y Gordon-Weeks, 2001). Esto puede dar cuenta que mientras algunas posean un rol importante para el desarrollo de polaridad, otras puedan ver una función más asociada a la mantención de la polaridad que a la iniciación misma del proceso.

8.3.2 Otras proteínas que se asocian a microtúbulos:

En este trabajo resulta interesante analizar a la proteína LIS1, que se ha descrito como una proteína capaz de unirse a microtúbulos, entre varias otras funciones que se le han asociado (Bielas *et al.* 2004). Sin embargo, a diferencia de las otras MAPs, se encontró una disminución en su expresión durante el proceso de diferenciación. Este hecho ya fue descrito en el neuroblasto humano SH-SY5Y, donde se reportó una disminución en su expresión al ser tratadas con ácido retinoico, trabajo donde además se postuló que su función no se relacionaba directamente con la diferenciación neuronal, sino más bien con la

migración celular, a través de una interacción con otra proteína MAP, la doblecortina (Messi *et al.*, 2008).

La CRMP2, proteína que tiene un dominio de unión a heterodímeros de tubulina, también ha sido descrita como una proteína con un rol importante en polaridad, ya que su sobreexpresión es capaz de generar neuronas con múltiples axones (Inagaki *et al.*, 2001), y su transfección en neuroblastos es capaz de inducir el crecimiento de neuritas (Arimura *et al.*, 2005). El rol de esta proteína tiene que ver con el transporte de dímeros de tubulina hacia el extremo distal del axón, por medio de su interacción con la proteína kinesina-1 (Kimura *et al.*, 2005). De esta forma, su aumento va relacionado a un mayor desplazamiento de materia prima para el crecimiento de los microtúbulos, desde el cuerpo celular hacia los conos de crecimiento de las neuritas.

Finalmente, la última proteína asociada a microtúbulos estudiada en este trabajo fue la SCG10. Perteneciente a la familia de las *stathminas*, posee una función asociada al aumento de la dinamicidad de los microtúbulos, y su actividad se haya determinada por la fosforilación en 4 residuos de aminoácidos bien descritos (Antonsson *et al.*, 1998). Si bien su participación durante la diferenciación neuronal está bien descrita (Morii *et al.*, 2006), ésta aún no es completamente clara. Se ha estudiado esta proteína en células PC12, donde la diferenciación inducida por NGF fue capaz de aumentar su expresión, mientras que la diferenciación dependiente de DBcAMP no lo hizo (Stein *et al.*, 1988), lo que indica que el proceso de diferenciación por si mismo no es capaz de inducir su expresión. A pesar que su rol fisiológico ha sido bastante estudiado en neuronas hipocampales, los mecanismos que

regulan su expresión resultan complejos e involucran mecanismos de control post-transcripcionales, que pueden ir asociados también a su correcta localización (Hannan *et al.*, 1996).

8.3.3 Proteínas de señalización involucradas en diferenciación neuronal

Entre las proteínas señalizadoras involucradas en diferenciación, el complejo CDK5/p35 posee un rol esencial para el crecimiento de neuritas y diferenciación neuronal. Su rol se basa principalmente en la modulación de proteínas del citoesqueleto específicas de neuronas, lo que podría indicar que la expresión de estas proteínas puede estar siendo regulada durante la diferenciación neuronal (Ohshima *et al.*, 1996). Sin embargo, entre los resultados obtenidos no se logra observar un cambio significativo en la expresión de CDK5 ni su activador p35. En literatura, se ha descrito que CDK5 no presenta cambios significativos en su expresión durante la diferenciación neuronal (Yan y Ziff, 1995), pero sí se han detectado cambios en su actividad durante la diferenciación dependiente de NGF en células PC12 (fosforilación de CDK5). Esto demuestra que los cambios post-traduccionales de proteínas pueden resultar tan importantes como los cambios de expresión (Yan y Ziff, 1995; Harada *et al.*, 2001).

Por otro lado, se esperaba que la expresión de p35 aumentara frente a la activación de CDK5, y de esta forma, pudiera dar cuenta de la activación de la proteína CDK5. Se ha descrito que p35 aumenta rápidamente su expresión durante las primeras 48 horas después

de la diferenciación, y posteriormente se reduce drásticamente a niveles basales en PC12 (Harada *et al.*, 2001). De esta forma, p35 podría ser una señal de diferenciación temprana, y cuando las células se inducen hacia un estado diferenciado, ésta podría ser encontrada ya en niveles normales. Adicionalmente, CDK5 también puede ser activado por la proteína p39, lo que puede dar cuenta de una suerte de redundancia entre las funciones de p35 y p39 (Ko *et al.*, 2001). Otra explicación para este hecho podría ser que el uso de neuroblastos no es un modelo completamente equivalente a las neuronas, puesto que son células modificadas y con un ciclo celular acelerado.

Otra proteína señalizadora importante es DAB1. Ha sido ampliamente estudiada por su rol asociado a la vía canónica comandada por la señal extracelular reelina, y se ha estudiado el efecto de la ausencia de DAB1 en neuronas, fenómeno que genera un fenotipo similar al descrito para mutantes para reelina (Howell *et al.*, 1998). El notable aumento de la proteína adaptadora DAB1 durante la diferenciación neuronal en N1E 115, es concordante con resultados descritos en la línea celular P19, donde se obtienen un aumento significativo de la expresión y tirosinación de esta proteína luego de 5 días de diferenciación con ácido retinoico, donde además se determinó que DAB1 es importante para el crecimiento de neuritas (Howell *et al.*, 1997), por lo que se sugiere que corresponde a una molécula transdutora de señales clave para el proceso de diferenciación neuronal.

8.4.1 Proteínas de señalización y efectoras que modulan el citoesqueleto de actina.

Durante el proceso de diferenciación neuronal, se ha descrito un aumento de la dinámica de actina, que permite rearrreglos en el citoesqueleto que resultan fundamentales para la elongación de las neuritas y la formación de lamelipodios (Yang *et al.*, 1998). Esta dinámica se encuentra principalmente bajo el mando de 2 proteínas de unión a microtúbulos: cofilina y ADP, que al ser fosforiladas permiten el aumento de dinamicidad de actina (Sarmiere y Bamberg, 2004). Por medio del uso de anticuerpos capaces de reconocer cofilina fosforilada y total, se pudo establecer una razón de fosforilación de cofilina respecto al total, durante la diferenciación neuronal de la línea N1E 115. El aumento en la fosforilación de cofilina fue notablemente significativo, corroborando que esta vía es muy importante para los cambios de morfología del citoesqueleto de actina que ocurren durante la diferenciación neuronal. A través de este resultado, podemos inferir que la mantención de la estabilidad de actina adquiere mayor relevancia en células ya diferenciadas, mientras que se espera una mayor dinámica localizada hacia la punta de las prolongaciones celulares, donde se requiere la formación de nuevos filamentos de actina para inducir el crecimiento de las neuritas.

9.- CONCLUSIONES

1. El DBcAMP es el método más efectivo para diferenciar la línea N1E 115 hacia una morfología de tipo neurona. Estas células desarrollaron neuritas con variadas longitudes respecto al diámetro celular, y se estima que cerca del 80% de las células en cultivo se diferenció.
2. Por medio de Inmunocitoquímica, se analizó los cambios producidos durante la diferenciación neuronal mediante DBcAMP modifica el citoesqueleto de tubulina y actina. Se aprecian estructuras características de cultivos neuronales diferenciados, como prolongaciones neuríticas primarias y secundarias, la formación de conos de crecimiento y polaridad celular.
3. Se pudo obtener evidencia que da cuenta de proteínas que pueden ser utilizadas como marcadores neuronales de diferenciación. Entre estas proteínas, se puede sugerir proteínas como las MAPs, CRMP2, SCG10 y la proteína adaptadora DAB1.

4. Se estudió las modificaciones post-traduccionales que ocurren en proteínas que regulan el citoesqueleto de actina, por medio del uso de anticuerpos capaces de reconocer epítomos fosforilados y proteínas totales. A partir de ambos resultados, se hizo una relación de proteína fosforilada/proteína total, para determinar estadísticamente cambios de expresión, así como también los cambios de actividad atribuidos a la fosforilación para las proteínas en estudio, durante el proceso de diferenciación neuronal.

10.- BIBLIOGRAFÍA

- Andersen S. (2000). Spindle assembly and the art of regulating microtubule dynamics by MAPs and stathmin/ Op18. *Trends Cell Biol.* 10:261-267.
- Antonsson B., Kassel D., Di Paolo G., Lutjens R., Riederer B. y Grenningloh G. (1998) Identification of in Vitro Phosphorylation Sites in the Growth Cone Protein SCG10. *J. Bio. Chem.* 273:8439-8446.
- Arber S., Barbayannis F., Hanser H., Schneider C., Stanyon C., Bernard O. y Caroni, P. (1998) Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* 393: 805-809.
- Arimura N., Ménager C., Fukata Y., Kaibuchi K. (2004) Role of CRMP-2 in Neuronal Polarity. *J. Neurobiol.* 58: 34-47.
- Arimura N., Ménager C., Kawano Y., Yoshimura T., Kawabata S., Hattori A., Fukata Y., Amano M., Goshima Y., Inagaki M., Morone N., Usukura J. y Kaibuchi K. (2005). Phosphorylation by Rho kinase regulates CRMP-2 activity in growth cones. *Mol. Cell Biol.* 25:9973-9984.
- Arimura, N., Kaibuchi K. (2007). Molecular mechanisms regulating neuronal polarity via phosphorylation signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* 3:194-205
- Ávila J., Domínguez J. y Díaz-Nido J. (1994) Regulation of microtubule dynamics by microtubule-associated protein expression and phosphorylation during neuronal development. *Int. J. Dev. Biol.* 38:13-25.

- Bang Y., Pirnia F., Fang W., Kang W., Sartor O., Whitesell L., Ha M., Tsokos M., Sheahan M., Nguyen P., Niklinski W., Myers C. y Trepel J. (1994). Terminal neuroendocrine differentiation of human prostate carcinoma cells in response to increased intracellular cyclic AMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 5330-5334.
- Banker, G. y Cowan, W. (1977) Rat hippocampal neurons in dispersed cell cultura. *Brain Res.* 126: 397-442.
- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Brugg B. y Matus A. (1988). PC12 cells express juvenile microtubule-associated proteins during nerve growth factor-induced neurite outgrowth. *J. Cell Biol.* 107: 643-650.
- Clejan S., Dotson R., Wolf E. y Corb M. (1996). Morphological differentiation of N1E-115 neuroblastoma cells by dimethyl sulfoxide activation of lipid second messengers. *Experimental Cell Research* 1:16-27.
- Cleveland D., Hwo S., and Kirschner M. (1977). Purification of tau, a microtubule associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J. Mol. Biol.* 116: 207-225.
- Craig A. y Banker G. (1994). Neuronal Polarity. *Annual Review of Neuroscience* 17: 267-310.
- Craig, A., Wyborski, R. y Banker, G. (1995). Preferential addition of newly synthesized membrane protein at axonal growth cones. *Nature* 375: 592-594.

Deng W., Obrocka M., Fischer I. y Prockop, D. (2001). In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Bioch. and Biophys. Res. Comm.* 282: 148–152.

Etienne-Manneville S. y Hall A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420: 629-635.

Di Tella M., Feiguin F., Carri N., Kosik K. y Cáceres A. (1996). MAP-1B/TAU functional redundancy during laminin-enhanced axonal growth. *J. Cell Sci.* 109:467-477.

Foletti D., Prekeris R. y Scheller, R. (1999). Generation maintenance of neuronal polarity: mechanisms of transport and targeting. *Neuron* 23: 641–644.

Fukata Y., Itoh T., Kimura T., Ménager C., Nishimura T., Shiromizu T., Watanabe H., Inagaki N., Iwamatsu A., Hotani H., Kaibuchi K. (2002) CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nature Cell Biology* 4:108-115.

Goold R. y Gordon-Weeks P. (2001). Microtubule-associated protein 1B phosphorylation by glycogen synthase kinase 3 β is induced during PC12 cell differentiation. *J. Cell Sci.* 114: 4273-4284.

González-Billault, C., Ávila, J. y Cáceres A. (2001) Evidence for the role of MAP1B in axon formation. *Mol. Biol. Cell* 12: 2087-2098.

González-Billault C., Owen R., Gordon-Weeks P. y Ávila, J. (2002) Microtubule-associated protein 1B is involved in the initial stages of axonogenesis in peripheral nervous system cultured neurons. *Brain Res.* 943: 56-67.

- González-Billault C., Engelke M., Jiménez-Mateos E., Wandosell F., Cáceres A. y Ávila J. (2002) Participation of structural microtubule-associated proteins (MAPs) in the development of neuronal polarity. *J. of Neurosci. Res.* 67:713-719.
- González-Billault C., Jiménez-Mateos E., Cáceres A., Díaz-Nido J., Wandosell F. y Ávila J. (2004). Microtubule-Associated Protein 1B Function during Normal Development, Regeneration, and Pathological Conditions in the Nervous System. *J. Neurobiol.* 58:48-59.
- Gupta A., Tsai L. y Wynshaw-Boris A. (2002) Life is a journey: a genetic look at neocortical development. *Nature* 3: 342-355.
- Gupta A., Sanada K., Miyamoto D., Rovelstad S., Nadarajah B., Pearlman, A., Brunstrom J. y Tsai L. (2003) Layering defect in p35 deficiency is linked to improper neuronal-glia interaction in radial migration. *Nature Neuroscience* 6: 1284-1291.
- Hannan A., Henke R., Weinberger R., Sentry J. y Jeffrey P. (1996). Differential induction and intracellular localization of SCG10 messenger RNA is associated with neuronal differentiation. *Neuroscience* 72:889-900.
- Halpain S. y Dehmelt L. (2006). The MAP1 family of microtubule-associated proteins. *Genome Biology* 7:224-232.
- Hiroshi M., Tomiko Y., Itsuko N., Coulson M y Nozomu M. (2006). Site-specific phosphorylation of SCG10 in neuronal plasticity: Role of Ser73 phosphorylation by N-methyl d-aspartic acid receptor activation in rat hippocampus. *Neuroscience* 396: 241-246.
- Horton A. y Ehlers M. (2003). Neuronal Polarity and Trafficking. *Neuron* 40: 277-295.
- Howell B., Gertler F. y Cooper J. (1997). Mouse disabled (mDab1): a Src binding protein implicated in neuronal development. *The EMBO Journal* 16:121-132.

- Howell B., Herrick T. y Cooper J. (1999). Reelin-induced tyrosine phosphorylation of disabled1 during neuronal positioning. *Genes & Development* 13: 643-648.
- Inagaki N., Chihara K., Arimura N., Ménager C., Kawano Y., Matsuo N., Nishimura T., Amano M. y Kaibuchi K. (2001). CRMP-2 induces axons in cultured hippocampal neurons. *Nature Neuroscience* 4:781-782.
- Jenkins A., Franks P. y Lieb W. (1996). Actions of general anaesthetics on 5-HT₃ receptors in N1E-115 neuroblastoma cells. *J. Pharmacol.* 117: 1507-1515.
- Kimura T., Watanabe H., Iwamatsu A. y Kaibuchi K. (2005). Tubulin and CRMP-2 complex is transported via Kinesin-1. *J. Neurochem.* 93:1371-1382.
- Ko J., Humbert S., Bronson R., Takahashi S., Kulkarni A., Li E. y Tsai L. (2001). p35 and p39 are essential for cyclin-dependent kinase 5 function during neurodevelopment. *J. Neurosci.* 21: 6758-6771.
- Kobayashi M., Nagata S., Kita Y., Nakatsu N., Ihara S., Kaibuchi K., Kuroda S., Ui M., Iba H., Konishi H., Kikkawa U., Saitoh I. y Fukui Y. (2007). Expression of a constitutively active phosphatidylinositol 3-kinase induces process formation in rat PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 272:16089-16092.
- Kruman I., Kostenko M., Gordon R., Popov V. y Umansky R. (1993) Differentiation and apoptosis of murine neuroblastoma cells N1E 115. *Biochem. and Biophys. Res.* 191: 1309-1318.
- Luo L. (2002). Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18:601-635.

- Mao A., Bechberger J., Lidington D., Galipeau J., Laird D. y Naus C. (2000). Neuronal differentiation and growth control of neuro-2a cells after retroviral gene delivery of connexin43. *J. Biol. Chem.* 275:34407-34414.
- Messi E., Florian M., Caccia C., Zanisi M. y Maggi R. (2008) Retinoic acid reduces human neuroblastoma cell migration and invasiveness: effects on DCX, LIS1, neurofilaments-68 and vimentin expression. *Biomed Central Cancer* 8: 30-42.
- Mitchison T., Kirschner M. (1988). Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* 1:761-772.
- Mitsuharu E., Kazumasa O. y Kensaku M. (2007). LIM Kinase and Slingshot Are Critical for Neurite Extension. *J. Biol. Chem.* 282: 13692–13702.
- Morii H., Shiraishi-Yamaguchi Y. y Mori N. (2006). SCG10, a microtubule destabilizing factor, stimulates the neurite outgrowth by modulating microtubule dynamics in rat hippocampal primary cultured neurons. *J. Neurobiol.* 66: 1101–1114.
- Muñoz J., Álvarez A. y Maccioni R. (2000). Increase in the expression of the neuronal cyclin-dependent protein kinase cdk-5 during differentiation of N2A neuroblastoma cells. *Neuroreport* 11:2733-2738.
- Murphy D., Vallee R. y Murphy D. (1977). Identity and polymerization-stimulatory activity of the non-tubulin proteins associated with microtubules. *Biochem.* 16: 2598-2605
- Nakata T. y Hirokawa N. (2007) Neuronal Polarity and the Kinesin Superfamily Proteins. *Science* 372: 6-12.
- Nikolic M., Chou M., Lu W., Mayer B. y Tsai L. (1998). The p35/Cdk5 kinase is a neuron specific Rac effector that inhibits Pak1 activity. *Nature* 395: 194-198.

- Oh J., Karlmark Raja K., Shin J., Pollak A., Hengstscla M y Lubeç G. (2006) Cytoskeleton changes following differentiation of N1E-115 neuroblastoma cell line. *Aminoacids* 31: 289-298
- Ohshima T., Ward J., Huh C., Longenecker G., Veeranna, Pant H., Brady R., Martio L. y Kulkarni A. (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.
- Olmsted J. (1991). Non motor microtubule associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3: 52-58.
- Rivas R. y Hatten M. (1995). Motility and cytoskeletal organization of migrating cerebellar granule neurons. *J. Neurosci.* 15:981-989.
- Sarniere P. y Bamburg R. (2004). Regulation of the neuronal actin cytoskeleton by ADF/cofilin. *J. Neurobiol.* 58: 103-117, 2004
- Sarner S., Kozma R., Ahmed S. y Lim L. (2000). Phosphatidylinositol 3-kinase, cdc42, and rac1 act downstream of ras in integrin-dependent neurite outgrowth in N1E-115 neuroblastoma cell. *Mol. Cell Biol.* 20:158-172.
- Sato-Yoshitake R., Shiomura Y., Miyasaka H. y Hirokawa N. (1989). Microtubule-associated protein 1B: molecular structure, localization, and phosphorylation-dependent expression in developing neurons. *Neuron* 3:229-238.
- Satoh T., Nakamura S., Taga T., Matsuda T., Hirano T., Kishimoto T. Y Kaziro Y. (1988) Induction of Neuronal Differentiation in PC12 Cells by B-Cell Stimulatory Factor 2/Interleukin 6. *Mol. Cell Biol.* 8: 3546-3549.

- Smith C., Anderton B., Davis R. y Gallob J. (1995). Tau isoform expression and phosphorylation state during differentiation of cultured neuronal cells. *Fed. Europ. Biochem. Soc. Letters* 375: 243-248
- Stein R., Orit S., Anderson D. (1988). The induction of a neural-specific gene, SCG10, by nerve growth factor in PC12 cells is transcriptional, protein synthesis dependent, and glucocorticoid inhibitable. *Dev. Biol.* 127: 316-325.
- Sumi T., Matsumoto K., Takai Y. y Nakamura T. (1999) Cofilin Phosphorylation and Actin Cytoskeletal Dynamics Regulated by Rho- and Cdc42-activated LIM-kinase 2. *J. Cell Biol.* 147:1519-1532.
- Tararuk T. (2006). JNK1 phosphorylation of SCG10 determines microtubule dynamics and axodendritic length. *J. Cell Biol.* 173: 265-277
- Tanaka E. y Sabry J. (1995) Making the Connection: Cytoskeletal Rearrangements during Growth Cone Guidance. *Cell* 83: 171-176.
- Togel 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.* 143:695-707
- Thomas H., Rehfeld J. Y Nielsen F. (2000). Cyclic AMP-Induced neuronal differentiation via activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Neurochem.* 75: 1870-1877.
- Vallee R. (1990). Molecular characterization of high molecular weight microtubule associated proteins: some answers, many questions. *Cell Motil. Cytoskeleton* 15: 204-209.
- Van Troys M., Huyck L, Leyman S., Dhaese S, b, Vandekerkhove J. y Ampe C (2008). Ins and outs of ADF/cofilin activity and regulation. *Eur. J. Cell Biol.* (article in press).