

UCH-FC
Biotecnología
C 213
C. 1



FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE PREGRADO

“Estudio de los efectos que la actividad de la quinasa Cdk5 ejerce sobre la actividad y localización sub-celular de la GTPasa Rac1 en células neuronales embrionarias en el contexto de la neuritogénesis”

Entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al título de **Ingeniero en Biotecnología Molecular**.

MAURO JESÚS CANAVAL ALFARO

Noviembre – 2014

Director del Seminario de Título: **Dr. Christian González Billault**



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

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. Mauro Canaval Alfaro, “**Estudio de los efectos que la actividad de la quinasa Cdk5 ejerce sobre la actividad y localización sub-celular de la GTPasa Rac1 en células neuronales embrionarias en el contexto de la neuritogénesis**”, 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

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.



Comisión de Evaluación

Dr. Alejandro Roth

Presidente de Comisión

Una firma manuscrita en tinta negra sobre una línea horizontal.

Dra. Magdalena Sanhueza

Evaluadora

Una firma manuscrita en tinta negra sobre una línea horizontal.

Santiago, Noviembre de 2014

Agradecimientos

Agradezco a todos quienes formaron parte del Laboratorio de Dinámica Celular y Neuronal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, a cargo del Doctor Christian González Billault, durante el período comprendido entre 2011 y 2013. Me brindaron un espacio incomparable para el desarrollo de este trabajo. En particular, quiero expresar mi gratitud hacia mi amigo Felipe Bodaleo por su férrea ética profesional y gran pasión por la ciencia; a Cristina Olmos, cuya presencia fue indispensable para el normal desarrollo de mis experimentos; y a David Villarroel por su desinteresado soporte teórico.

También agradezco a mis padres, Paola y José; a mi hermana, Catalina; y a mi polola, Carolina, porque llenan de alegría cada día de mi vida y por el incesante respaldo que me han brindado en éste y de todos los desafíos que emprendo.

Índice de Contenidos

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
<u>2.1 Rac1 y Tiam1</u>	3
2.1.1 Caracterización de Rac1 y Tiam1	3
2.1.2 Tiam1 regula espacial y temporalmente la activación de Rac1	6
2.1.3 Tiam1/Rac1 regulan la polimerización de actina	7
<u>2.2 Cdk5 y p35</u>	10
2.2.1 Caracterización de la quinasa Cdk5 y sus activadores, p35 y p39	10
2.2.2 Regulación de la actividad de Cdk5	11
<u>2.3 ¿Podría Cdk5/p35 actuar como un regulador río arriba de Rac1?</u>	13
3. HIPÓTESIS	16
4. OBJETIVOS	16
<u>4.1 Objetivo General</u>	16
<u>4.2 Objetivos Específicos</u>	16
5. DISEÑO EXPERIMENTAL	17
<u>5.1 Diferenciación de células N1E-115</u>	17
<u>5.2 Análisis de la fosforilación de Tiam1 en células COS-7</u>	19
<u>5.3 Análisis de la activación de Rac1 en células COS-7</u>	21
<u>5.4 Análisis de FRET en neuronas que expresan la sonda Raichu-Rac</u>	23
6.- MATERIALES Y MÉTODOS	26
<u>6.1 Materiales</u>	26
6.1.1 Animales de experimentación	26

6.1.2 Material biológico	26
6.1.3 Reactivos	26
<u>6.2 Cultivos Celulares</u>	29
6.2.1 Líneas celulares	29
6.2.2 Cultivos primarios de neuronas hipocampales	31
<u>6.3 Biología Molecular</u>	33
6.3.1 Purificación de proteína de fusión GEX-GST-CRIB desde bacterias	33
6.3.2 Genotipificación de ratones mediante PCR.	35
<u>6.4 Bioquímica</u>	36
6.4.1 Lisis Celular y Extracción de Proteínas	36
6.4.2 Cuantificación de proteínas (método de Bradford)	37
6.4.3 Inmunoprecipitación de HA-Tiam1 (C1199) o Cdk5	37
6.4.4 Ensayo de fosforilación in vitro de histona H1 por Cdk5	38
6.4.5 Pulldown de GST-CRIB	38
6.4.6 Western Blot	39
<u>6.5 Inmunofluorescencia en microscopio confocal</u>	41
7. RESULTADOS	44
<u>7.1 La inhibición de Cdk5/p35 perjudica la extensión de neuritas</u>	44
<u>7.2 La abundancia de Tiam1, p35 y Cdk5 aumenta durante la diferenciación</u>	47
<u>7.3 La sobre-expresión de p35 promueve la fosforilación de Tiam1</u>	50
<u>7.4 La sobre-expresión de p35 promueve la actividad de Rac1</u>	52
<u>7.5 Efecto de la presencia de Cdk5 en la activación local de Rac1.</u>	54
8. DISCUSIÓN	56
<u>8.1 La abundancia de Cdk5, p35 y Tiam1 aumenta durante la diferenciación</u>	56

<u>8.2 Cdk5/p35 promueve la fosforilación de Tiam1 y la activación de Rac1</u>	57
<u>8.3 El paradigma tradicional de Cdk5/p35 como efector de Rac1 debe ser revisado</u>	57
<u>8.4 Modelo: Cdk5 promueve la activación de Rac1 a través de la fosforilación de Tiam1</u>	59
<u>8.5 Proyecciones</u>	61
9. CONCLUSIONES	64
10. REFERENCIAS	65

Índice de Figuras

Figura 1 – La RhoGTPasa Rac 1 y su GEF específico, Tiam1

Figura 2 – La activación de Tiam1/Rac1 regula las dinámicas de polimerización de actina

Figura 3 – Tiam1 contiene residuos que podrían ser fosforilados por Cdk5/p35

Figura 4 – Diseño Experimental I y II

Figura 5 – Diseño Experimental I y II

Figura 6 – Diseño experimental III

Figura 7 – Diseño experimental IV

Figura 8 – El tratamiento con dibutilil-cAMP indujo exitosamente la diferenciación

Figura 9 – La inhibición de Cdk5/p35 afecta la extensión de neuritas en células tratadas con dibutilil-cAMP.

Figura 10 – Durante la diferenciación aumenta la abundancia de Cdk5 y p35

Figura 11 – Durante la diferenciación aumenta la abundancia de Tiam1

Figura 12 – La sobre-expresión de p35 promueve la fosforilación de Tiam1

Figura 13 – La sobre-expresión de p35 promueve la actividad de Rac1

Figura 14 – Mapas de FRET en neuronas hipocampales wt y Cdk5 KO

Figura 15 – Modelo propuesto

Lista de Abreviaturas

BDNF: Factor neurotrófico derivado de cerebro.

BSA: Albúmina de suero bovino.

cAMP: adenosín monofosfato cíclico.

cDNA: DNA complementario.

CFP: Proteína fluorescente cian.

CMV: Promotor de citomegalovirus.

CRIB: Dominio de interacción con Cdc42 y Rac.

DH: Homología a Dbl (un oncogen).

DIV: Días in vitro.

DMEM: Medio Esencial Modificado por Dulbecco.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

DNA: ácido desoxirribonucleico.

dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfato.

DTT: Ditioneitol.

E18: 18 días de desarrollo embrionario.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

EGTA: Ácido etilenglicoltetraacético.

FBS: Suero fetal bovino.

FRET: Transferencia de energía de resonancia de Förster.

GAP: Proteína activadora de GTPasas

GDI: Inhibidor de la disociación de GDP.

GDP: guanosín bifosfato.

GEF: Factor intercambiador de nucleótidos de guanina.

GFP: Proteína fluorescente verde

GST: dominio de unión a glutatión de la enzima glutatión-S-transferasa.

GTP: guanosín trifosfato.

GTPasa: hidrolasa de GTP.

HA: hemaglutinina de influenza.

HBSS: Solución salina de Hank balanceada.

HRP: Peroxidasa de rábano.

IF: Inmunofluorescencia.

IgG: Inmunoglobulina G.

IP: Inmunoprecipitación.

K_m : Constante de Michaelis.

LB: Caldo lisogénico (*Lysogeny broth*).

MEM: Medio Esencial Mínimo Eagle.

M_r : Migración electroforética relativa.

mRNA: RNA mensajero.

NGF: Factor de crecimiento neurotrófico.

PBS: Tampón fosfato salino.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PFA: Paraformaldehído.

PH: Homología a pleckstrina.

PIC: Cóctel inhibitorio de proteasas.

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

RNA: Ácido ribonucleico.

RT-PCR: PCR acoplado a Transcripción reversa.

SDS-PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil-sulfato de sodio.

TAE: Tris-Acetato-EDTA.

TBS: Tampón Tris Salino.

Temed: Tetrametiletilenediamina.

T_m : Temperatura de denaturación.

WB: Western blot.

wt: Silvestre (*wild type*).

YFP: Proteína fluorescente amarilla.

Convención de Unidades y Símbolos

<u>Concentración</u>	Moles/Litro	M, mM, μ M,
	Peso/Volumen	%(p/v)
	Peso/Peso	%(p/p)
<u>Frecuencia</u>	Revoluciones/Minuto	rpm
<u>Intensidad de corriente</u>	Amperio	A (mA)
<u>Longitud</u>	Metro	m (mm, μ m, nm)
<u>Masa</u>	Kilogramo	kg (g, mg, μ g)
<u>Masa molecular</u>	Daltons	Da (kDa)
<u>Potencial eléctrico</u>	Volt	V (mV)
<u>Temperatura</u>	Grados Celsius	$^{\circ}$ C
<u>Tiempo</u>	Hora, Minuto y Segundo	h, min, s
<u>Volumen</u>	Litro	L (mL, μ L)

1. RESUMEN

Rac1 es una pequeña proteína monomérica con actividad GTPasa que fluctúa entre una conformación activa (unida a GTP) y una inactiva (unida a GDP). Rac1-GTP se asocia directamente a proteínas que regulan la polimerización y la ramificación de los filamentos de actina, modulando la actividad de éstas. Tiam1 es una proteína que al unirse a Rac1 favorece su unión a GTP y la acción moduladora sobre sus efectores. Distintas señales extracelulares confluyen en la activación localizada de Rac1 mediada por Tiam1 y, subsecuentemente, en la regulación de la dinámica del citoesqueleto de actina.

Cdk5 es una proteína citoplasmática que al unirse a uno de sus cofactores proteicos p35 o p39, conforma una holo-quinasa que cataliza la fosforilación de residuos Ser/Thr (S/T)PX(K/H/R), cuya actividad está asociada a membranas. La expresión de Cdk5 es ubicua, pero su actividad está prácticamente restringida a neuronas, pues la expresión de p35 y p39 es fundamentalmente neuronal.

La holo-quinasa Cdk5/p35 co-localiza con Tiam1 y Rac1 durante la extensión de neuritas, elongación axonal, modelamiento dendrítico y formación de espinas dendríticas, y se han descrito diversos mecanismos en los cuales Cdk5/p35 regula la actividad de elementos reguladores de Rac1 y de sus efectores relacionados con la dinámica del citoesqueleto de actina; incluso, algunas investigaciones sugieren que Cdk5 actúa como un efector de Rac1. La comprensión de la regulación fina de la relación entre Cdk5 y Rac1 requiere mayor investigación.

El objetivo de este Seminario de Título fue determinar si la actividad quinasa de Cdk5 afecta los niveles de expresión y fosforilación de Tiam1 y la actividad de Rac1 durante la neuritogénesis. En primer lugar, se demostró que durante la extensión de neuritas en

células N1E-115 tratadas con dibutilil-cAMP, molécula que induce la diferenciación, se produce un aumento en la abundancia de Cdk5, p35 y Tiam1, y que tanto el aumento en la abundancia de Tiam1 como la extensión de neuritas se ven comprometidas si se trata simultáneamente a las células con dibutilil-cAMP y roscovitina, inhibidor farmacológico de Cdk5. A continuación, se expresó transitoriamente Tiam1 (C1199) y p35 en células COS-7, y se determinó que la activación de Cdk5 a través de la expresión de p35 produce un gran aumento en los niveles de fosforilación de Tiam1 (C1199) y un aumento leve en la actividad de Rac1. Para analizar si este mecanismo se replica durante la polarización *in vitro* de neuronas primarias hipocámpales, se diseñaron mapas de FRET para comparar la activación local de Rac1 en neuronas hipocámpales primarias de ratones *wt* y Cdk5 KO. El análisis preliminar sugiere que en las neuronas carentes de Cdk5 el nivel global de activación de Rac1 disminuye y hay una modificación en el patrón de distribución de las áreas donde Rac1 está más activa. Tomados en su conjunto, los resultados sugieren que Cdk5 podría regular la actividad de Rac1 a través de la fosforilación, directa o mediada por otra quinasa, de Tiam1.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Rac1 y Tiam1

2.1.1 Caracterización de Rac1 y Tiam1

La proteína Rac1 (acrónimo en inglés de "sustrato 1 para toxina botulínica C3 relacionada con ras") es una proteína de pequeño peso molecular (~19 kDa) que pertenece a la familia de las Rho GTPasas, proteínas con alta homología estructural con Ras (Polakis, Weber y cols., 1989) y que actúan como GTP hidrolasas, es decir, que catalizan la hidrólisis de GTP a concentraciones pequeñas de Mg^{2+} (Ménard, Tomhave y cols., 1992). La expresión de Rac1 es ubicua y los embriones de ratón Rac1 KO sufre serias anomalías en el establecimiento de las capas germinales durante la gastrulación y manifiestan deficiencias en la formación de lamelipodios, así como en la adhesión y migración celular, que conducen a la muerte en E9,5 (Sugihara, Nakatsuji y cols., 1998).

Cuando está unida a GTP, Rac1 adopta una conformación biológicamente activa que es reconocida por sus efectores, desencadenando procesos celulares que no ocurren cuando Rac1 está unida a GDP. La unión de Rac1 a GTP o GDP es regulada mediante su asociación en las proximidades de la membrana con proteínas GAP, que promueven la actividad GTP hidrolasa de Rac1 sobre GTP; y con proteínas GEF, que favorecen la disociación de GDP y la unión de GTP (Bustelo, Sauzeau y Berenjano, 2007).

La asociación de Rac1 a la membrana celular es promovida por sucesivas modificaciones post-traduccionales que afectan a un tetrámero CAAX (cisteína / dos residuos alifáticos / Met, Ser, Ala o Gln) ubicado en el extremo carboxilo-terminal. En primer lugar, se incorpora un grupo geranylgeranilo al residuo cisteína; luego, se

escinde el tripéptido AAX, dejando al residuo cisteína como nuevo extremo carboxilo-terminal; y, finalmente, se produce la metilesterificación de la cisteína. Rac1, cuando está unida a GDP, adopta una conformación que es reconocida por las proteínas GDI, que se unen a ella e impiden tanto la disociación de GDP y la interacción del residuo cisteína modificado con la membrana, secuestrando a Rac1 en el citoplasma e impidiendo su activación (Bustelo, Sauzeau y Berenjeno, 2007).

Tiam1, acrónimo en inglés de “proteína 1 inductora de invasión y metástasis de linfoma T”, es una proteína que se expresa abundantemente en el cerebro durante el desarrollo (Ehler, van Leeuwen y cols., 1997; Yoo, Kim y cols., 2012). Tiam1 es capaz de unirse específicamente a Rac1 y actuar como GEF específica de ésta, es decir, favorece la disociación de GDP y la unión de GTP. La estructura de Tiam1 posee un dominio de homología a Dbl, DH, que establece numerosas interacciones no covalentes con los segmentos $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$ y los *switchs* 1 y 2 de Rac1, provocando un cambio conformacional en la estructura de la GTPasa que expone su bolsillo de unión a GTP, sin que la GEF imponga aminoácidos al interior de éste. Tiam1 posee además dos dominios PH, que estabilizan la estructura del dominio DH (Worthylake, Rossman y cols., 2000) y que establecen uniones de baja afinidad con fosfoinosítidos (Boissier, Huynh-Do y cols., 2013), favoreciendo su actividad GEF en las proximidades de la membrana. La consecuencia más evidente de la activación de Rac1 es el incremento en las dinámicas de polimerización de filamentos de actina (Ridley, Paterson y cols., 1992; Qiu, Chen y cols., 1995) (Figura 1).

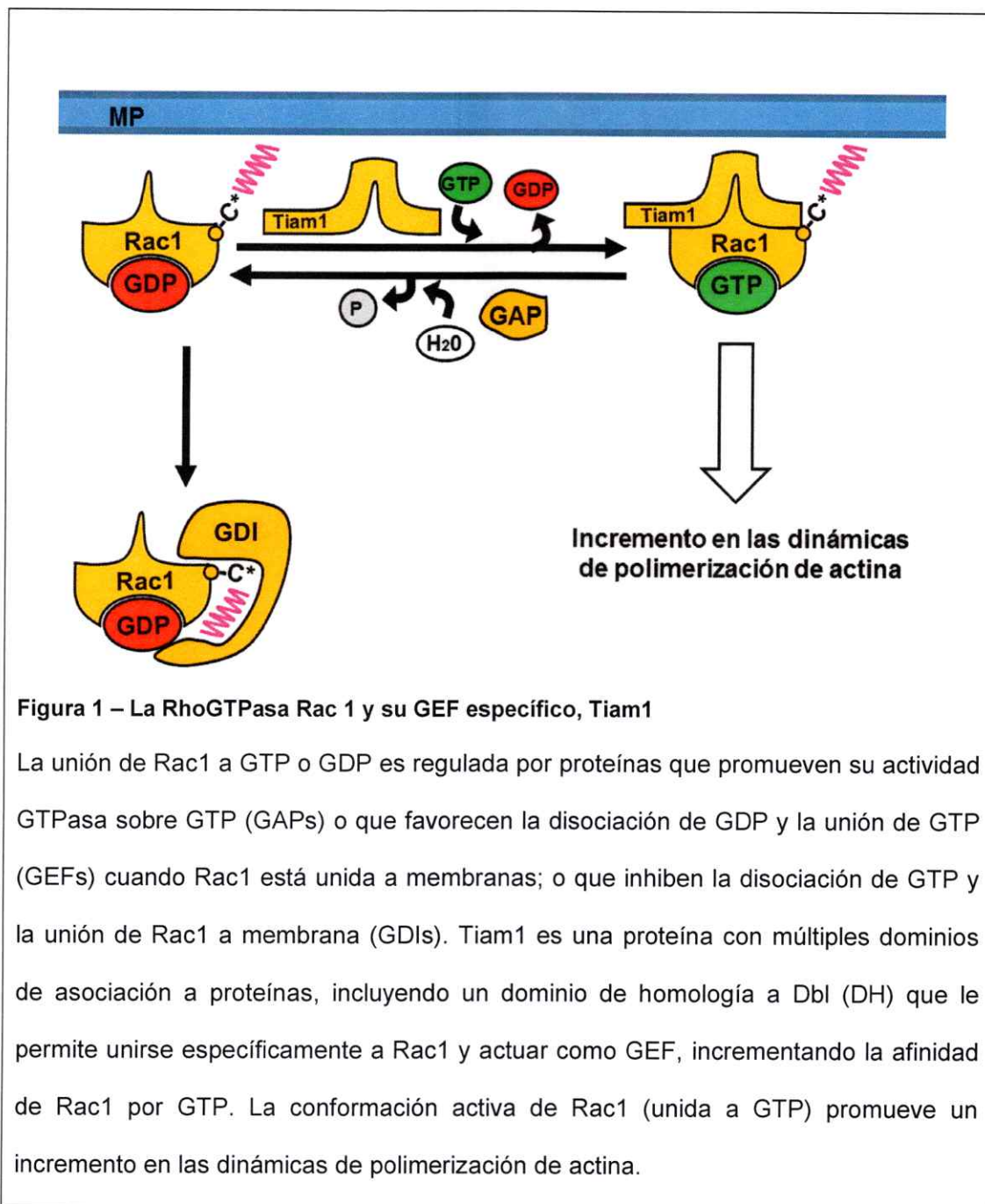


Figura 1 – La RhoGTPasa Rac 1 y su GEF específico, Tiam1

La unión de Rac1 a GTP o GDP es regulada por proteínas que promueven su actividad GTPasa sobre GTP (GAPs) o que favorecen la disociación de GDP y la unión de GTP (GEFs) cuando Rac1 está unida a membranas; o que inhiben la disociación de GTP y la unión de Rac1 a membrana (GDIs). Tiam1 es una proteína con múltiples dominios de asociación a proteínas, incluyendo un dominio de homología a Dbl (DH) que le permite unirse específicamente a Rac1 y actuar como GEF, incrementando la afinidad de Rac1 por GTP. La conformación activa de Rac1 (unida a GTP) promueve un incremento en las dinámicas de polimerización de actina.

2.1.2 Tiam1 regula espacial y temporalmente la activación de Rac1

Rac1 tiene un rol crítico durante la adquisición de la morfología polarizada en neuronas, pues su activación es requerida durante la migración neuronal, la extensión de neuritas, la especificación axonal, la elongación axonal, la arborización dendrítica y la morfogénesis de espinas dendríticas (Threadgill, Bobb y cols., 1997; Nakayama, Harms y cols., 2000; Kunda, Paglini y cols., 2001; Matsuo, Terao y cols., 2003; Zhang y Macara, 2006; Tahirovic, Hellal y cols., 2010; Lai, Wong y cols., 2012). En todos esos procesos, la interacción entre Tiam1 y otras proteínas favorece su translocación a membrana y su actividad GEF sobre Rac1. De este modo, Tiam1 regula espacial y temporalmente la activación de Rac1 (Fig. 2).

Se ha demostrado que la interacción entre el dominio RBD de Tiam1 y la GTPasa Ras activa en las proximidades de la membrana, favorece la activación de Rac1 (Michiels, Stam y cols., 1997; van Leeuwen, van der Kammen y cols., 1995; Lambert, Lambert y cols., 2002).

Tiam1, a través de su dominio PH amino-terminal, se asocia con Par3, que forma parte del complejo de polaridad junto a PAR6 y aPKC. Esta interacción, que es promovida por Cdc42, también induce la activación de Rac1 (Nishimura, Yamaguchi y cols., 2005).

La proteína asociada a microtúbulos 1B, MAP1B, que tiene un rol esencial en la formación del axón y en la morfogénesis de espinas dendríticas en neuronas hipocampales primarias (González-Billault, Ávila y cols., 2001; Montenegro-Venegas, Tortosa y cols., 2010; Tortosa, Montenegro-Venegas y cols., 2011), establece una interacción con ambos dominios PH de Tiam1 que promueve la actividad GEF sobre Rac1 (Henríquez, Bodaleo y cols., 2012).

La activación de Rac1 también es promovida por los receptores TrkA y TrkB, que adquieren actividad tirosina quinasa al unirse a sus respectivos ligandos extracelulares, las neurotrofinas NGF y BDNF. En el primer caso, TrkA activo promueve la activación de Ras y su interacción con Tiam1, que induce la activación de Rac1 (Fard, Kele y cols., 2010). Por su lado, TrkB activo interactúa directamente con Tiam1 y cataliza la fosforilación del residuo Tyr829 de ésta, que favorece su actividad GEF sobre Rac1 (Miyamoto, Yamauchi y cols., 2006).

2.1.3 Tiam1/Rac1 regulan la polimerización de actina

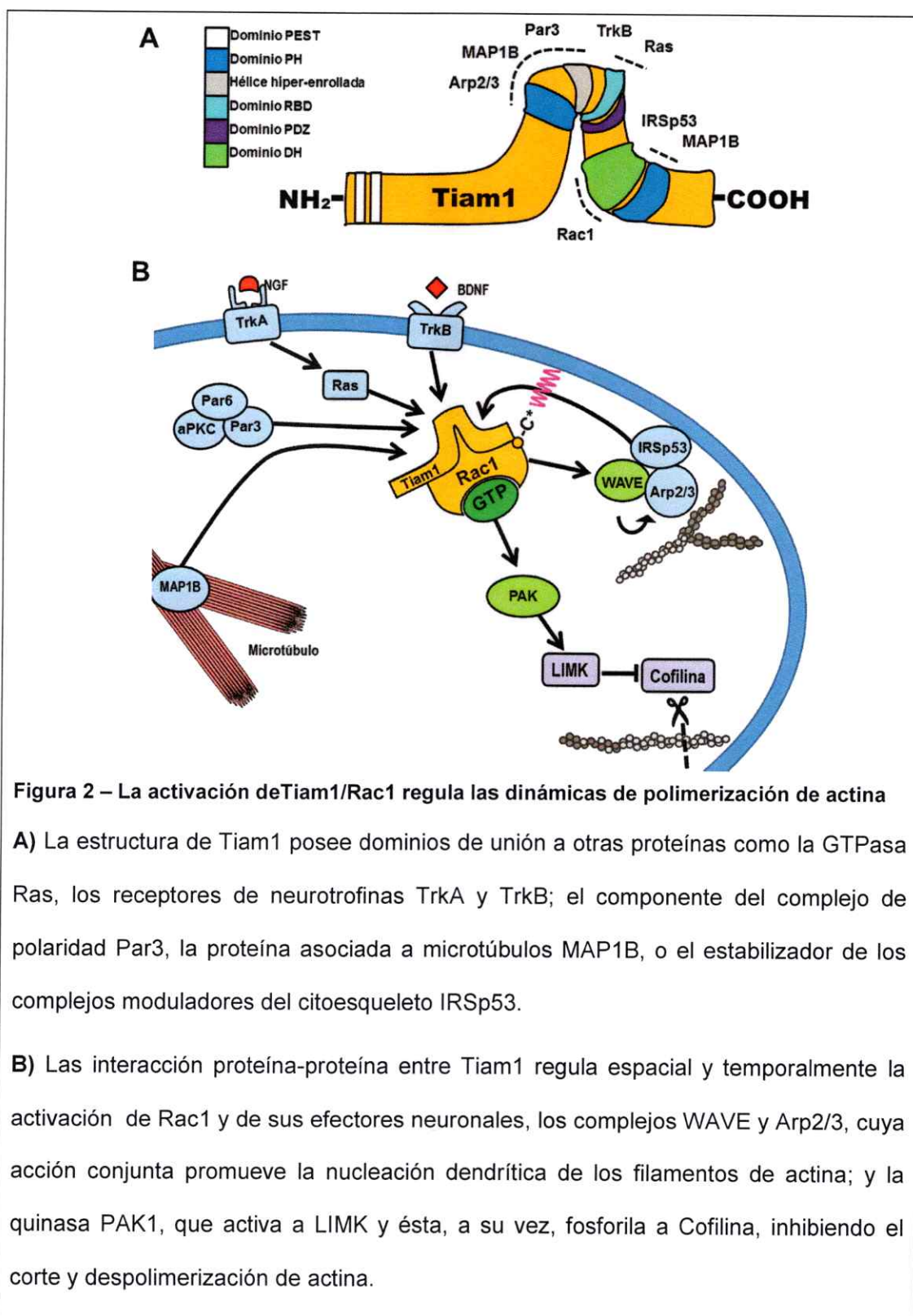
La conformación activa de Rac1 (unida a GTP), promueve la actividad de efectores que regulan directamente las dinámicas de polarización/despolarización de los filamentos de actina (Fig. 2).

Rac1-GTP interactúa con el complejo WAVE y lo activa, en un mecanismo que requiere el establecimiento de un complejo ternario con IRSp53. Subsecuentemente, WAVE induce la activación de Arp2/3, un complejo proteico que promueve la nucleación dendrítica de filamentos de actina (Miki, Yamaguchi y cols., 2000; Suetsugu, Kurisu y cols., 2006; Mullins, Heuser y cols., 1998). Tiam1 se une directamente a IRSp53, favoreciendo la asociación de ésta con Rac1-GTP y WAVE (Connolly, Rice y cols., 2005). Asimismo, la interacción entre Tiam1 y el dominio p21-Arc del complejo Arp2/3 posibilita tanto la translocación de Tiam1 a la membrana –y la presencia allí de Rac1 activo– como la asociación entre Arp2/3 y componentes de citoesqueleto (Ten Klooster, Evers y cols., 2006), siendo éste el mecanismo principal mediante el cual Rac1 regula la extensión de neuritas (Tahirovic, Hellal y cols., 2010).

La proteína PAK1, que se expresa abundantemente en cerebro, es una serina/treonina quinasa cuya estructura contiene un dominio polibásico (PBD) en el extremo N-terminal



adyacente a un dominio de auto-inhibición (ID) y un dominio quinasa (KD) en el extremo C-terminal. PAK1 suele estar en una configuración cerrada y desfosforilada, favorecida por la interacción entre ID y KD, con actividad quinasa débil. La unión de Rac1-GTP al dominio PBD de PAK1 (Knaus, Wang y cols., 1998) provoca la disrupción de la interacción ID-KD, induciendo la conformación abierta de PAK1, que expone al residuo Thr423 a la auto-fosforilación mediada por KD, que incrementa notoriamente la actividad quinasa de PAK1 (Manser, Leung y cols., 1994; Zenke, King y cols., 1999), y a fosforilación en otros sitios bloqueados por la auto-inhibición. PAK1, en su conformación abierta y fosforilada, es capaz de fosforilar directamente al residuo treonina 508 de la proteína quinasa LIM-K (en el *loop* de activación de la quinasa), activándola, en un proceso dependiente de la actividad de Tiam1/Rac1 (Edwards, Sanders y cols., 1999). Tras ser fosforilada por PAK1, LIM-K es capaz de fosforilar a ADF/cofilina, inhibiendo su actividad de corte y despolimerización de F-actina (Sarmiere y Bamberg 2004). Esta vía de señalización es crucial para el reordenamiento del citoesqueleto y el aumento neto en la polimerización de actina durante la formación de lamelipodios y ondulaciones en la membrana (Vidal, Geny y cols., 2002). La activación de PAK1 mediada por Rac1 es requerida durante la formación de dendritas en neuronas corticales (Hayashi 2002) y durante la especificación axonal en neuronas hipocampales, que requiere la activación polarizada de PAK1, es decir, la presencia de PAK1 fosforilada exclusivamente en el axón inmaduro a pesar de su expresión uniforme en todas las neuritas (Jacobs, Causeret y cols., 2007).



2.2 Cdk5 y p35

2.2.1 Caracterización de la quinasa Cdk5 y sus activadores, p35 y p39

La quinasa dependiente de ciclina 5, Cdk5, es una apo-quinasa de 33 kDa que puede unirse sus cofactores proteicos p35 o p39, formando heterodímeros con actividad quinasa que catalizan la transferencia de un grupo fosforilo desde una molécula de ATP hacia residuos Serina o Treonina, en una reacción dirigida por una Prolina en la posición +1 respecto al residuo aceptor, y favorecida por la presencia de un residuo con carga positiva en la posición +3 (Lew, Huang y cols., 1994; Tsai, Delalle y cols., 1994; Humbert, Dhavan y cols., 2000). Por esta característica, se incluye a Cdk5 en la categoría funcional de las proteínas quinasas dependientes de prolina (PDPKs), junto a gsk3b, JNK, ERK y p38, entre otras (Lu, Liou y cols., 2002).

La familia de las quinasas dependientes de ciclinas, Cdks, está constituida por pequeñas apo-enzimas (~30-40 kDa) con actividad serina/treonina quinasa y alta homología estructural con la proteína Cdc2 de *Saccharomyces pombe*, ortólogo de Cdk1 en mamíferos que regula la transición G2/M del ciclo celular (Lew, Beaudette y cols., 1992; Meyerson, Enders y cols., 1992). Todas las Cdks son reguladores clave del ciclo celular, con excepción de Cdk5, cuya actividad biológica es especialmente alta en neuronas hipocampales piramidales, en neuronas corticales, en células cerebelares de Purkinje, en médula espinal y en ganglios periféricos, células terminalmente diferenciadas e incapaces de dividirse. La actividad otras quinasas, tales como Cdk1 (Cdc2), Cdk2 y Cdk4 disminuye drásticamente al inicio de la diferenciación neuronal (Kranenburg, Scharnhorst y cols., 1995).

La expresión del mRNA de Cdk5 es ubicua (Ino, Ishizuka y cols., 1994), pero los genes que codifican para p35 y p39 tienen patrones de expresión confinados a células post-

mitóticas (Ohshima, Kozak y cols., 1996; Zheng, Leung y cols., 1998). Los miembros de la familia de las Cdk5 sólo son biológicamente activas si establecen un dímero con una ciclina y si está fosforilado su *loop* de activación (Meyerson, Enders y cols., 1992). El mecanismo de activación de Cdk5 es atípico, pues no es necesaria la fosforilación en su *loop* de activación (Tarricone, Dhavan y cols., 2001) y sólo es requerida la asociación con p35 o p39 (Humbert, Dhavan y cols., 2000), cuyas estructuras son muy diferentes la de una ciclina (Tang, Yeung y cols., 1995).

Los ratones Cdk5 KO y los ratones doble KO p39-p35 desarrollan un fenotipo esencialmente idéntico en el cual la estructura de la corteza cerebral es aberrante y la formación de hipocampo y cerebelo es anormal, derivando en una grave patología neurológica que provoca muerte perinatal (Ohshima, Ward y cols., 1996; Ko, Humbert y cols., 2001). Los ratones p35 KO evidencian anormalidades en la morfología de la corteza y de la pared cerebral (Chae, Kwon y cols., 1997; Young y Tsai 1998). Como los ratones p39 KO alcanzan la adultez sin que se observen anormalidades evidentes (Ko, Humbert y cols., 2001), se ha asumido sistemáticamente que la actividad de Cdk5/p35 enmascararía la ausencia de p39 en la célula. Tomados en su conjunto, estos antecedentes demuestran que la actividad de la holo-quinasa Cdk5/p35 es importante para la correcta migración neuronal.

2.2.2 Regulación de la actividad de Cdk5

La interacción entre p35 y la hélice $\alpha 1$ de Cdk5 (PSSALRE) produce un cambio conformacional en Cdk5 que expone el bolsillo de unión a ATP y permite su activación. La asociación entre el *loop* de activación de Cdk5 y el *loop* $\alpha 3$ - $\alpha 4$ de p35 confiere especificidad a la unión entre quinasa-cofactor, y favorece la acción enzimática sobre sustratos que contengan residuos con carga positiva en la posición +3 (Tarricone,

Dhavan y cols., 2001). Aún no se ha obtenido la estructura cristalizada del heterodímero Cdk5/p39, pero se ha determinado que la unión quinasa-cofactor es más lábil que en Cdk5/p39 (Yamada, Saito y cols., 2007), con una especificidad de sustrato idéntica (Humbert, Dhavan y cols., 2000)

El segmento de 10 kDa constituido por los 90 aminoácidos ubicados en el extremo N-terminal de p35 y p39, denominado p10, no participa en la estabilización de la unión a Cdk5 ni en la estructura del sitio activo de la holo-quinasa (Poon, Lew y cols., 1997), pero sí participa en la regulación de la degradación y la localización de ambos activadores de Cdk5 y, consecuentemente, del heterodímero. El residuo Gly2 es un motivo cuya miristoilación promueve la asociación de p10 con componentes de la membrana plasmática (Asada, Yamamoto y cols., 2008) y se ha demostrado que la asociación a membrana favorece la degradación de p35 y p39 mediada por el sistema ubiquitina/proteosoma (Patrick, Zhou y cols., 1998; Minegishi, Asada y cols., 2010). Además, se ha reportado que la unión de p35 y p39 a los fosfolípidos es asistida por un *cluster* de lisina, también en el segmento p10 (Asada, Yamamoto y cols., 2008).

Una vez que Cdk5 se une a p35 o p39, su actividad quinasa cataliza la fosforilación del residuo Ser8 de p35 y p39, que favorece la asociación del dímero a membrana, y del residuo Thr84 de p39, que inhibe la acumulación nuclear de Cdk5/p39 (Asada, Saito y cols., 2012).

En contextos de neurotoxicidad, tales como la isquemia cerebral o el estrés inducido con Ca^{2+} , se produce el clivaje proteolítico de p35 y p39 por calpaína (Hisanaga and Saito 2003), que se traduce en la escisión de p10 y la aparición de fragmentos de 25 y 29 kDa, p25 y p29, ambos capaces de unirse a Cdk5 y formar un complejo con actividad quinasa (Lew, Huang y cols., 1994; Patzke y Tsai 2002). El clivaje es

suprimido por la fosforilación mediada por Cdk5 en el residuo Ser8 de p35 y p39 (Patrick, Zhou y cols., 1998). La fosforilación *in vitro* de tau o histona H1 es cinéticamente idéntica cuando es catalizada por las holo-quinasa Cdk5/p35 y Cdk5/p25 (Peterson, Ando y cols., 2010) y presumiblemente pasa lo mismo al comparar Cdk5/p39 con Cdk5/p29. Sin embargo, debido a la ausencia del fragmento p10, la vida media de p25 y p29 supera con creces la de p35 y p39 y la distribución sub-celular de las holo-quinasa Cdk5/p25 y Cdk5/p29 es caótica, derivando en una hiper-activación de Cdk5 que conduce a hiper-fosforilación de tau y de neurofilamento, disrupciones de citoesqueleto, y neurodegeneración severa (Patrick, Zukerberg y cols., 1999; Ahljianian, Barrezueta y cols., 2000).

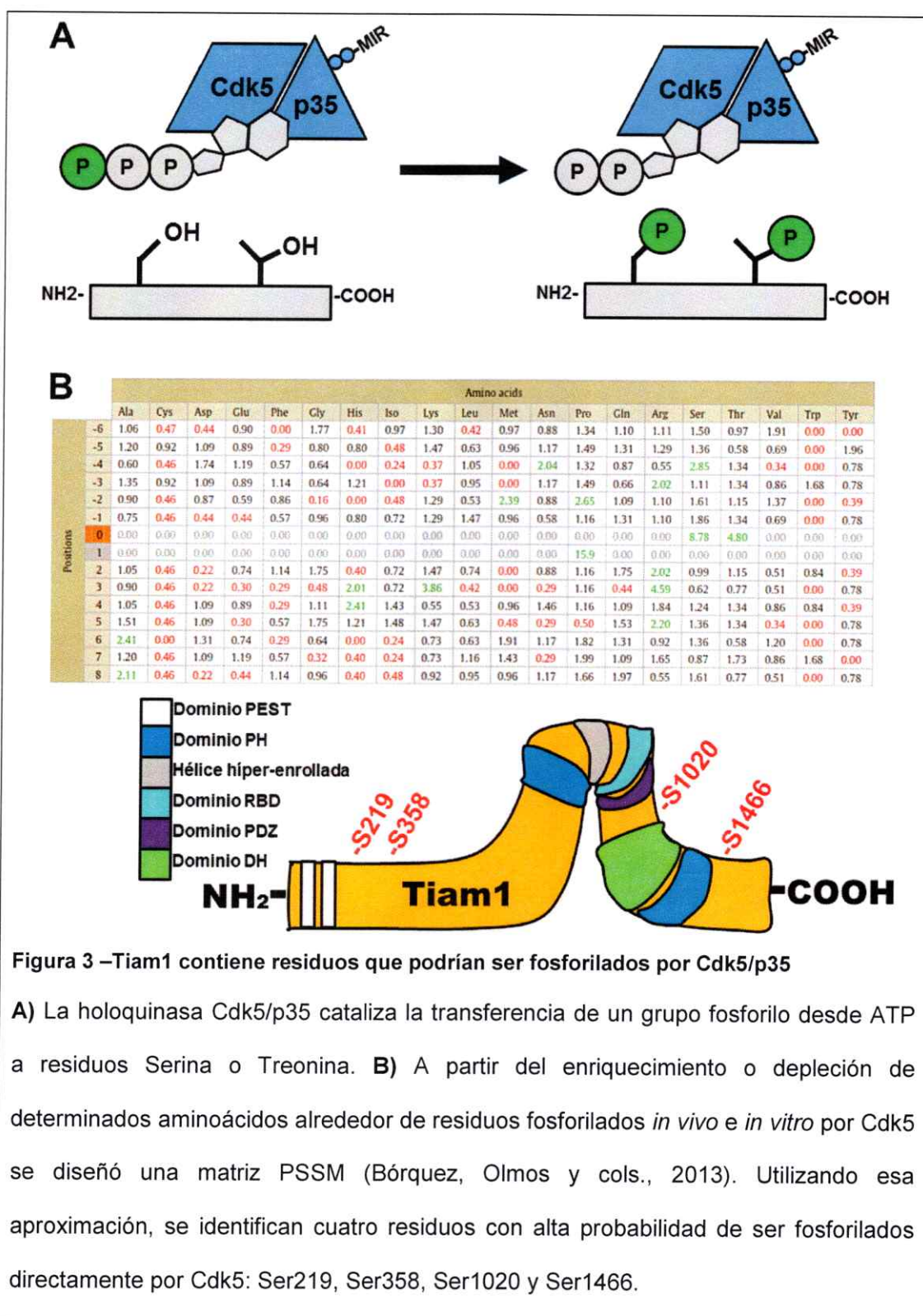
2.3 ¿Podría Cdk5/p35 actuar como un regulador río arriba de Rac1?

En páginas anteriores se explicó que la señalización Tiam1/Rac1 modula la dinámica del citoesqueleto de actina a través de los efectores de Rac1, la quinasa PAK1 y el complejo WAVE, desempeñando un rol esencial en la migración neuronal en células granulares cerebelares y durante la diferenciación morfológica y funcional de las neuronas corticales e hipocampales.

Se ha demostrado que la actividad de Cdk5/p35 también es requerida durante la extensión de neuritas y la elongación axonal *in vitro* en neuronas corticales de ratón (Nikolic, Dudek y cols., 1996; Ohshima, Ward y cols., 1996) y durante la formación de dendritas en células de Purkinje (Kumazawa, Miya y cols., 2013). Se ha sugerido que la actividad de Cdk5 podría regular la formación de vesículas de membrana en el aparato de Golgi, un proceso clave para el tráfico de membrana requerido durante la extensión de procesos neuronales que no es regulado por Rac1 (Paglini, Peris y cols., 2001). Sin embargo, también se ha planteado que el efecto negativo que la inhibición de o

supresión de Cdk5 produce en la extensión de neuritas en neuronas hipocampales podría deberse a la acción de Cdk5 sobre las Rho GTPasas y sus GEFS (Jessberger, Gage y cols., 2009).

En nuestro laboratorio, se diseñó una matriz de asignación de puntaje por posiciones específicas (PSSM, acrónimo de '*position specific scoring matrix*') a partir del análisis del enriquecimiento o depleción de aminoácidos alrededor de residuos fosforilados por Cdk5 en proteínas que han sido descritas como blancos *in vivo* e *in vitro* (Bórquez, Olmos y cols., 2013). Incorporando esta matriz y la secuencia de Tiam1 a la herramienta Scansite 2.0 (Obenauer, Cantley y cols., 2003), se analizó la probabilidad que tienen los residuos Serina y Treonina de ser fosforilados directamente por Cdk5 y se pudo constatar que en la secuencia de Tiam1 hay cuatro residuos Serina con alta probabilidad de ser fosforilados directamente por Cdk5, a saber: Ser219, Ser358, Ser1020 y Ser1466 (Figura 3).



3. HIPÓTESIS

La actividad quinasa de Cdk5 regula la actividad de Tiam1 y, subsecuentemente, promueve una acción activadora sobre la Rho GTPasa Rac1.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Determinar si la actividad quinasa de Cdk5 afecta los niveles de expresión y fosforilación de la proteína Tiam1 y la actividad de la GTPasa monomérica Rac1 durante la neuritogénesis.

4.2 Objetivos Específicos

- 1) Determinar si la actividad quinasa del complejo Cdk5/p35 regula los niveles de proteína Tiam1 durante la diferenciación neuronal.
- 2) Analizar si la actividad del complejo Cdk5/p35 está involucrada en la regulación de la fosforilación de Tiam1 y los niveles de actividad de Rac1.
- 3) Evaluar la activación local de Rac1 y su dependencia respecto a la actividad de Cdk5.

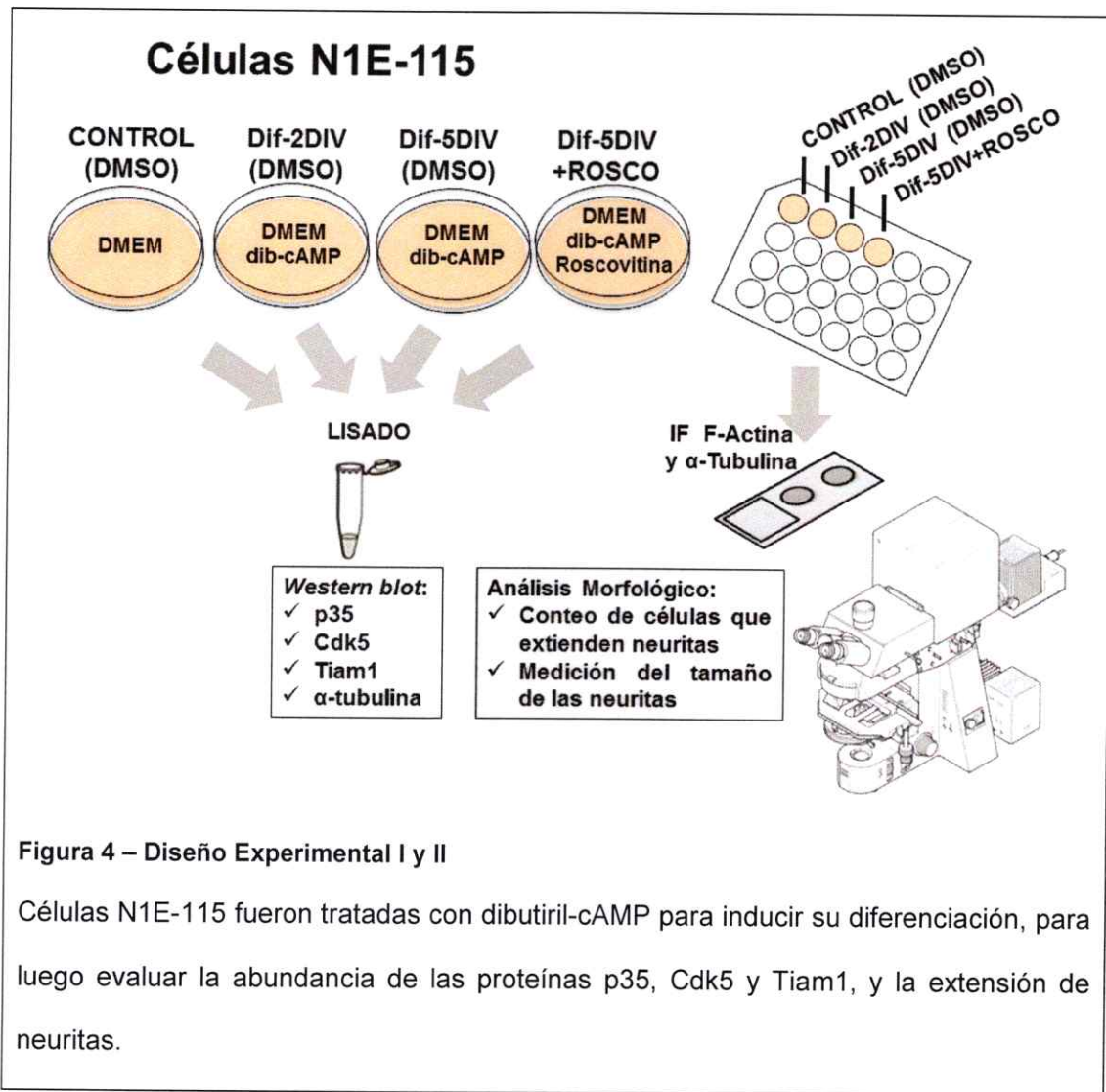
5. DISEÑO EXPERIMENTAL

5.1 Diferenciación de células N1E-115

Las células N1E-115, un clon adrenérgico del neuroblastoma cerebral de ratón C-1300 (Amano, Richelson y cols., 1972) son células esféricas y activamente mitóticas (Prasad y Sheppard 1972), pero al ser tratadas con dibutilil-cAMP experimentan irreversiblemente diferenciación bioquímica (aumento en la actividad de las enzimas tirosina hidroxilasa y acetilcolinesterasa), fisiológica (la membrana se vuelve capaz de generar potenciales de acción) y morfológica (extensión de neuritas y complejización del citoplasma), constituyendo un modelo de estudio muy similar al cultivo neuronal (Furmanski, Silverman y cols., 1971; Prasad 1991).

Se establecieron cuatro grupos experimentales de células N1E-115 en placas de 100 mm, y se replicaron sobre cubreobjetos de vidrio de 12 mm. En el primer grupo (**CONTROL**), las células fueron mantenidas en medio de crecimiento durante 5 DIV. En el segundo grupo, las células fueron mantenidas en medio de diferenciación durante dos (**Dif-2DIV**). En el tercer grupo (**Dif-5DIV+ROSCO**) se mantuvieron las células en medio de diferenciación durante cinco días, renovando el medio al tercer día; y en el cuarto grupo (**Dif-5DIV+ROSCO**), se hizo exactamente lo mismo, pero agregando al tercer día roscovitina 15 μ M, que inhibe completamente la actividad quinasa de Cdk5/p35, pues impide su unión a ATP (Meijer, Borgne y cols., 1997). Como roscovitina está disuelta en DMSO, se agregó un volumen equivalente de ese solvente a los tres primeros grupos.

Transcurridos los plazos de incubación, las células en cubreobjetos fueron fijadas y las células en placas, lisadas.



5.2 Análisis de la fosforilación de Tiam1 en células COS-7

Para los experimentos bioquímicos escogimos como modelo las células COS-7, células renales de *Cercopithecus aethiops* transformadas con SV-40, debido a su breve tiempo generacional (36 h) y su alta eficiencia de transfección con lipofectamina (superior al 80%), que permiten maximizar la masa de proteína total obtenida desde el lisado. En COS-7 la expresión de Cdk5 es abundante pero la de p35 es nula, por lo que decidimos expresar exógenamente p35 para incrementar la actividad de Cdk5. Asimismo, decidimos sobre-expresar C1199, un fragmento de Tiam1 carente de los primeros 392 aminoácidos del extremo N-terminal, que tiene mayor actividad biológica y estabilidad que la proteína completa (Mertens, Roovers y cols., 2003). Para analizar el efecto de la actividad de Cdk5 en la fosforilación de Tiam1, se establecieron tres grupos experimentales: el primer grupo, **CONTROL**, fue mantenido con medio de crecimiento; en el segundo grupo, **p35[ON]**, se co-transfectó HA-C1199, CMV-tTA y pBI-p35; al igual que en el tercero, **p35[OFF]**, pero en éste las células fueron tratadas con tetraciclina 1 µg/mL para inhibir alostéricamente la unión de tTA al promotor de p35. Transcurridas 36 h post-transfección se lisaron las placas para purificar la proteína total. Se realizó WB a partir de los de los lisados para determinar la abundancia de HA-Tiam1 (C1199). Simultáneamente, se inmunoprecipitó HA-Tiam1 (C1199) y se realizó WB a partir de los inmunoprecipitados obtenidos para determinar la abundancia de Serina fosforilada y compararla entre las tres condiciones (Figura 5).

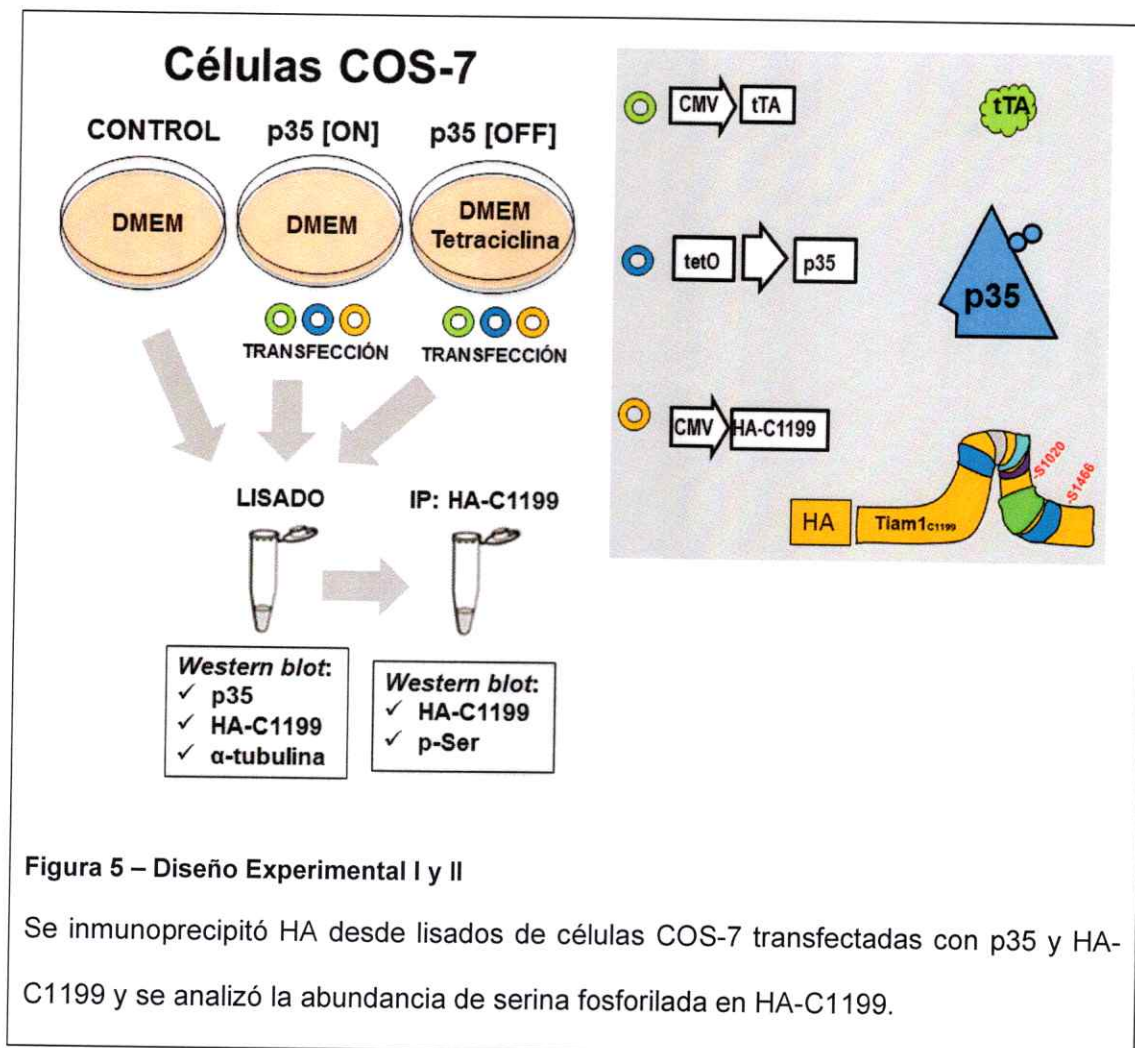


Figura 5 – Diseño Experimental I y II

Se inmunoprecipitó HA desde lisados de células COS-7 transfectadas con p35 y HA-C1199 y se analizó la abundancia de serina fosforilada en HA-C1199.

5.3 Análisis de la activación de Rac1 en células COS-7 transfectadas

Para analizar el efecto de la actividad de Cdk5 en la actividad de Rac1, también se utilizaron células COS-7. Se prepararon 3 grupos experimentales: en el primer grupo se transfectó HA-C1199 y en los dos restantes se co-transfectó HA-C1199 y p35. Los dos primeros grupos fueron tratados DMSO 0,1%, mientras que el tercer grupo fue tratado roscovitina 20 μ M (disuelta en DMSO). A las 36 h post-transfección, se lisaron las células y se realizaron extracciones de proteína total. Simultáneamente, se purificó la proteína de fusión GST-CRIB, una GST de 26 kDa unida a la secuencia del dominio CRIB de PAK1, con alta afinidad por la conformación activa de Rac1, unida a GTP. Los extractos de COS-7 se incubaron con la proteína GST-CRIB inmovilizada en perlas de sefarosa-glutatión, para luego precipitar la proteína de fusión y arrastrar junto a ella a la proteína Rac1-GTP. Finalmente, se determinó mediante *western blot* la cantidad de Rac1 unida a CRIB y la cantidad de Rac1 presente en el lisado. (Figura 6).

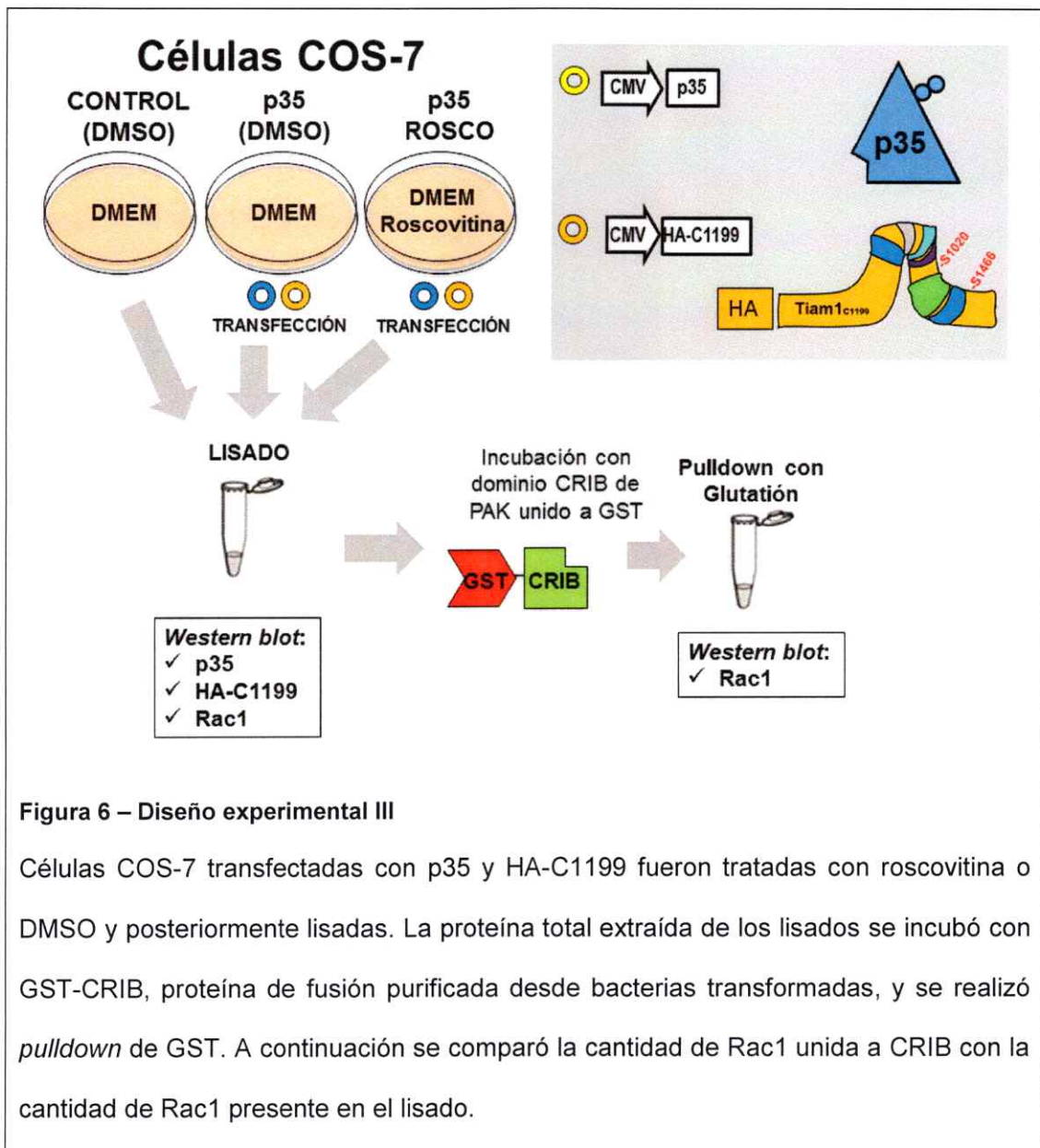


Figura 6 – Diseño experimental III

Células COS-7 transfectadas con p35 y HA-C1199 fueron tratadas con roscovitina o DMSO y posteriormente lisadas. La proteína total extraída de los lisados se incubó con GST-CRIB, proteína de fusión purificada desde bacterias transformadas, y se realizó *pull-down* de GST. A continuación se comparó la cantidad de Rac1 unida a CRIB con la cantidad de Rac1 presente en el lisado.

5.4 Análisis de FRET en neuronas que expresan la sonda Raichu-Rac

Una herramienta muy vigente en la actualidad para determinar el efecto que la inhibición, la estimulación, o la manipulación genética de sus reguladores río arriba ejercen en la distribución espacial y temporal de la actividad subcelular de proteínas es el análisis de FRET.

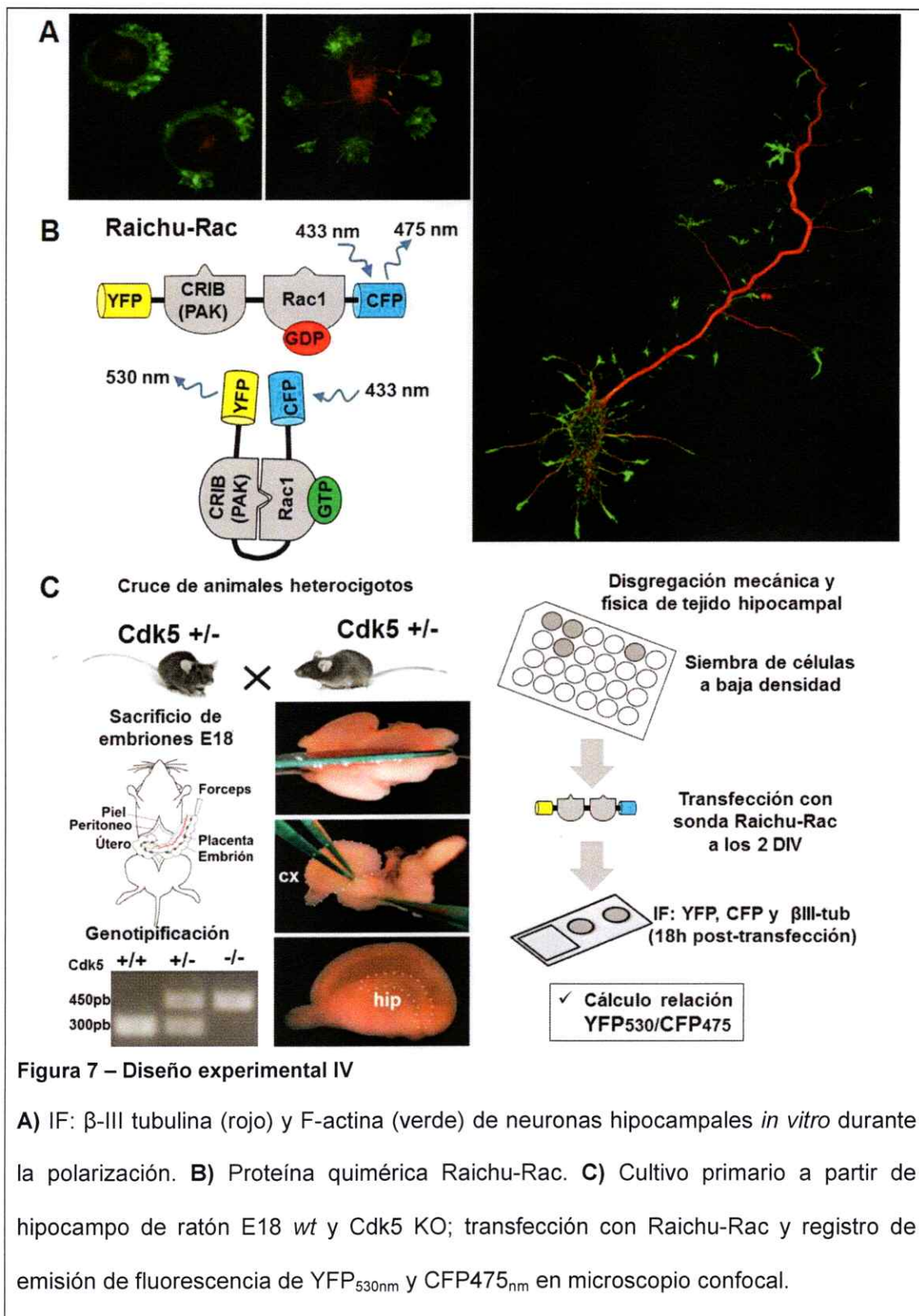
Para analizar si Cdk5 tiene un rol en la regulación de la actividad local de Rac1 durante la adquisición de la morfología polarizada en neuronas, se establecieron cultivos primarios de neuronas hipocampales de ratón *wt* y Cdk5 KO y luego fueron transfectados con la sonda Raichu-Rac, una molécula quimérica que contiene a Rac1, el dominio CRIB de PAK1 y el par YFP / CFP. Cuando Rac1 está unido a GDP y se excita la muestra a 433 nm, CFP emite fluorescencia a 475 nm. Cuando Rac1 se une a GTP, adquiere su conformación activa, y ésta favorece la unión intramolecular de Rac1-GTP con CRIB, que produce la aproximación entre CFP y YFP y la transferencia de energía tipo FRET desde CFP a YFP. En consecuencia, YFP emite fluorescencia a 527 nm. De este modo, el análisis de las intensidades de emisión de CFP a 475 nm y de YFP a 527 nm y la relación YFP/CFP resultante, cuando se excita la muestra a 433 nm, dan cuenta de la activación local de Rac1 en las células que expresan la sonda (Itoh, Kurokawa y cols., 2002) (Figura 7 B).

El proceso de polarización *in vitro* en neuronas hipocampales transcurre a través de 5 estadios estereotipados en relación a la longitud, variedad y complejidad de los procesos que se extienden radialmente desde el soma (Dotti, Sullivan y cols., 1988; Arimura y Kaibuchi 2007; Cheng y Poo 2012). En nuestro laboratorio, la polarización en neuronas hipocampales de rata y ratón sigue una marcada temporalidad: antes de las 18 h *in vitro*, la población neuronal se encuentra mayoritariamente en estadio 1; entre

las 18 y 36 h *in vitro*, la mayoría de las neuronas está en estadio 2; y entre las 36 h *in vitro* y los 5 DIV todas están en estadio 3 (Figura 7 A).

Se ha observado empíricamente que las neuronas hipocampales provenientes del ratón C57BL/6J *knockout* para Cdk5 en cultivo son más sensibles que las provenientes de animales *wt* al estrés producido por la disgregación mecánica y la transfección con lipofectamina (datos del laboratorio, sin publicar). Además, se ha determinado empíricamente que a las 18 h post-transfección los niveles de expresión de la sonda Raichu-Rac en neuronas hipocampales son adecuados para el análisis de FRET.

Tomando en cuenta los antecedentes anteriores, se decidió transfectar las neuronas hipocampales primarias cuando éstas alcanzaron 2 DIV y fijarlas 18 h después. Así, las neuronas tendrían tiempo suficiente para reponerse del estrés antes de ser transfectadas y la gran mayoría de las neuronas se encontraría en estadio 3 al momento de la fijación. Una vez fijadas las células, se prepararon muestras de inmunocitoquímica utilizando un anticuerpo contra β III-tubulina, una proteína expresada específicamente por neuronas y ausente en las células gliales (Figura 7 C).



6.- MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales

6.1.1 Animales de experimentación

Se utilizaron ratones C57BL/6J (provenientes del bioterio del NICDR, NIH. Bethesda, EE. UU.), heterocigotos para Cdk5. Durante la mantención, cruce y sacrificio de los animales se siguieron los protocolos de manipulación establecidos por la Comisión de Ética del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, siguiendo las recomendaciones de los protocolos aprobados por el NIH (EE. UU.).

6.1.2 Material biológico

Durante el desarrollo de este seminario se utilizaron células N1E-115 (*American Type Culture Collection*: CRL-2263) y COS-7 (*American Type Culture Collection*: CRL-1651).

Además, se utilizaron bacterias *Escherichia coli* de las cepas DH5 α y BL21 (DE3).

6.1.3 Reactivos

a) Anticuerpos primarios

Se utilizaron anticuerpos IgG monoclonales producidos en ratón contra: Rac1 clon 23A8 (Millipore®, 05-389), HA clon F-7 (Santa Cruz®, sc-7392), α -tubulina clon DM1A (Sigma-Aldrich®, T6199), β III-tubulina clon 5G8 (Promega®, G7121) y serina fosforilada clon PSR-45 (Sigma-Aldrich®, P3430); y policlonales producidos en conejo contra: Tiam1 C-16 (Santa Cruz®, sc-872), Cdk5 C-8 (Santa Cruz®, sc-173), p35 C-19 (Santa Cruz®, sc-820) e histona H1 fosforilada (Millipore®, 06-597).

b) Anticuerpos secundarios

Para el desarrollo de los inmunoblots, se utilizaron anticuerpos policlonales IgG (H+L) producidos en burro acoplados a HRP contra ratón (Jackson ImmunoResearch®, 715-035-150) y contra conejo (Jackson ImmunoResearch®, 711-035-152). En el caso de las inmunocitoquímicas, se utilizaron dos anticuerpos fluorescentes IgG producidos en burro: Alexa Fluor® 488 contra ratón (Invitrogen®, A21202) y Alexa Fluor® 647 contra ratón (Invitrogen®, A31571).

c) Vectores plasmidiales

Se utilizó el plásmido pcDNA-HA-C1199 (facilitado amablemente por J. Collard), para expresar la proteína HA-Tiam1 (C1199) en COS-7 y N1E-115. Para expresar la proteína p35 en tales líneas celulares se utilizó el vector pCMV-p35, amablemente facilitado por A. Kulkarni, o el vector bi-cistrónico pBI-p35 (Utreras, Maccioni y cols., 2009) junto al trans-activador de tetraciclina pCMV-tTA (Tet-OFF, Clontech®). Para expresar la sonda fluorescente Raichu-Rac en neuronas se utilizó el vector pRaichu1011x (Itoh, Kurokawa y cols., 2002), amablemente facilitado por A. Cáceres. Para expresar la proteína de fusión entre GST-CRIB en bacterias se utilizó el vector pGEX-CRIB. Los DNA plasmidiales se purificaron usando el kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific®), siguiendo el instructivo del fabricante.

d) Reactivos comerciales (excluidos los kits)

Durante los procedimientos de Biología Molecular se utilizó agarosa (Lonza®), bromuro de etidio (Sigma-Aldrich®), tampón de carga de DNA 6X, estándares de DNA de 100 pb y 1kb (Thermo Scientific®), proteinasa K (Merck®) y Trizol (Invitrogen®). En los cultivos bacterianos se utilizó triptona, extracto de levadura (Becton, Dickinson & Co.), ampicilina y kanamicina (US Biological). Adicionalmente, se utilizaron las siguientes

enzimas recombinantes: Taq DNA polimerasa (Fermentas), Transcriptasa reversa Superscript III (Invitrogen®), T4 DNA ligasa y endonucleasas Sall y XhoI (New England). En los experimentos bioquímicos se utilizó poliacrilamida, Temed (Merck®); estándar de proteínas, membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm y reactivos de quimioluminiscencia ECL (Thermo Scientific®); filmes radiográficos (Fujifilm®); revelador y fijador gráfico (AGFA®); proteína A/G-agarosa (Santa Cruz®); sefarosa-glutatin (GE Healthcare); e histona purificada de timo de ternera tipo III-S (Sigma-Aldrich®). Para los procedimientos de microscopía, se utilizó PFA (Sigma-Aldrich®), sacarosa (Merck®) y faloidina Acti-stain 555 (Cytoskeleton®). En la preparación de los medios para Cultivo Celular se utilizó Neurobasal, Optimem, DMEM, MEM, B27, GlutaMAX, Piruvato de Sodio, tripsina-EDTA, lipofectamina 'Lipofectamine 2000', antibiótico antimicótico 100X (penicilina, estreptomicina y anfotericina B, 100 µg/mL) HBSS 10X y Hepes 100X (Invitrogen®); FBS, HS (Becton, Dickinson & Co®); tetraciclina (US Biological®); roscovitina (Cayman®); dibutilil-cAMP, poli-L-lisina (Sigma-Aldrich®); y DMSO (Merck®).

Se utilizaron ácidos, bases, sales y alcoholes de calidad analítica adquiridos en Merck® o Sigma-Aldrich® y detergentes de Applichem® para preparar las siguientes soluciones:

- Tampón de Carga de Proteínas 5X: Tris-HCl 60 mM; glicerol 25%(v/v); SDS 2%(p/v); β-mercaptoetanol 14,4 mM y azul de bromofenol pH 6,8 0,1%(p/v).
- Tampón de Electroforesis (SDS-PAGE): Tris-HCl 25 mM; glicina 200 mM y SDS 0,1% (p/V).
- Tampón de Digestión de Colas: Tris pH 8.3 50 mM; NaCl 100 mM; EDTA 5 mM; SDS 0,8%(v/v) y proteinasa K 200 µg/mL.

- Tampón de Fishing: 10% glicerol; Triton x100 1%; Tris-HCl pH 7,5 50mM; NaCl 200mM; MgCl₂ 10 mM; NaF 25 mM y una pastilla de PIC por cada 10 mL de volumen final.
- Tampón de Gel de Apilamiento (SDS-PAGE): Tris HCl pH 6,8 125 mM; SDS 0,001% (p/v); APS 0,0005% (v/v) y TEMED 0,001% (v/v).
- Tampón de Gel de Resolución (SDS-PAGE): Tris HCl pH 8,8 375 mM; SDS 0,001% (p/v); APS 0,0005% (v/v) y TEMED 0,0007% (v/v).
- Tampón de IP 2X: NaCl 300 mM; Tris HCl pH 7,5 20 mM; EDTA 2 mM; EGTA 2 mM; NP40 1%(v/v); Triton X100 2%(v/v) y DTT 10 mM.
- Tampón de Lavado: Tris-HCl pH 7,5 25mM; NaCl 40mM; MgCl₂ 30 mM.
- Tampón de Lisis: Tris HCl pH 8,0 50 mM; Tritón X-100 1%; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM; NaF 25 mM y una pastilla PIC por cada 10 mL.
- Tampón de Transferencia (SDS-PAGE): Tris-HCl 25 mM; glicina 200 mM; SDS 0 - 0,1% (p/v) y metanol 20% (v/v).
- Tampón PBS 1X: NaCl 1,37 M; KCl 27 mM; Na₂HPO₄ 100 mM y KH₂PO₄ 18 mM.
- Tampón Quinasa: NaCl 50 mM; MgCl₂ 10 mM; Tris HCl pH 7,5 20 mM; Na₃VO₄ 100 μM; NaF 1 mM; caliculina 0,2%(v/v) y DTT 1 mM.
- Tampón RIPA 1X: Tris 50 mM pH7,5; NaCl 150 mM; NP40 1%(v/v); EDTA 1mM pH7,5; EGTA 1mM; SDS 0,1%(p/v) y deoxicolato de sodio 0,5%(v/v).
- Tampón TBS-T: Mezcla de TBS (Tris-HCl pH 7.5 50 mM; 150 mM NaCl) con Tween 20 0,05%.

6.2 Cultivos Celulares

6.2.1 Líneas celulares

a) Cultivo de células N1E-115 y COS-7

Las células N1E-115 y COS-7 se preservan en nitrógeno líquido. Para descongelar un vial, se tomó un criotubo y se temperó en baño con temperatura de 37°C, para luego verter la suspensión celular sobre una placa de 100mm con 8 mL de medio de crecimiento (DMEM / antibiótico antimicótico 1X / FBS 5%(v/v)) e incubarla a 37°C, con 5% de CO₂ y humedad controlada de 95%. Transcurridas 4 a 6 h, se renueva el medio de crecimiento. Las células adherentes fueron propagadas cuando su confluencia superó el 80%, procediendo como sigue: las células fueron lavadas con PBS 1X y luego se agregó a la placa 500 µL de PBS 1X / 0,05% Tripsina-EDTA y se incubaron durante 5 min a 37°C. A continuación, se transfirió la suspensión de células a un tubo cónico de 15 mL estéril, se agregaron 3 mL de PBS 1X temperado y se centrifugó a 2.000 rpm durante 3-5 min a temperatura ambiente (en centrífuga clínica). Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió completamente mediante pipeteo en 1 mL de DMEM / antibiótico antimicótico 1X / FBS 5%(v/v). Se inocularon alícuotas en placas con el mismo medio para sub-cultivar. Para congelar nuevos viales, se "tripsinizan" las células y justo después de la centrifugación se resuspende el pellet mediante pipeteo en 1 mL de medio de congelación (FBS / 10% DMSO). Finalmente, se mantienen a -80°C durante un día y luego se almacenan en nitrógeno líquido.

b) Diferenciación de células N1E-115

Se sembraron 1×10^6 células sobre placas de 100 mm con 8 mL de medio de crecimiento (DMEM / antibiótico antimicótico 1X / FBS 5%(v/v)) o 1×10^4 células sobre 500 µL de medio en los pocillos de la placa 24-well. Cuando éstas alcanzaron una confluencia aproximada del 40%, se retiró el medio y se reemplazó por medio de

diferenciación (DMEM / FBS 0,5% / dibutilil-cAMP 1 mM); las células se incubaron a 37°C durante 5 días, refrescando el medio de diferenciación al tercer día.

c) Transfección de N1E-115 y COS-7 con DNA plasmidial

Las células se crecen en placas de 100mm hasta alcanzar un 80% de confluencia, y se utilizó lipofectamina de acuerdo al protocolo suministrado por el fabricante (Invitrogen®). Brevemente, por cada placa se agregó 2-5 µg de DNA a un tubo de 1,5 mL estéril con 500 µL de Optimem y 2 µl de lipofectamina por cada µg de DNA en otro tubo con 500 µL de Optimem. Tras 5 min de incubación a temperatura ambiente, se mezcló ambas soluciones y el complejo DNA / lipofectamina se dejó incubar a temperatura ambiente durante 20 min. Inmediatamente, se lavaron las células con PBS 1X y se cambió el medio de cultivo por DMEM. Se vertió el complejo DNA / lipofectamina sobre la placa y se incubó durante 4 a 6 h a 37°C con 5% de CO₂ y humedad controlada de 95%. A continuación, se reemplazó el medio por DMEM / antibiótico antimicótico 1X / FBS 5%(v/v) y se dejó incubando entre 18 y 48 h, dependiendo exclusivamente de las características de cada sistema de expresión.

6.2.2 Cultivos primarios de neuronas hipocampales

En nuestro laboratorio, el cultivo primario de neuronas hipocampales de ratón se establece de acuerdo a un procedimiento basado en un trabajo del equipo de Gary Banker publicado en 1988 (Dotti, Sullivan y cols., 1988) y algunas modificaciones presentes en trabajos posteriores (Kaeck y Banker 2006; Fath, Ke y cols., 2009), que se describe brevemente a continuación.

a) Sacrificio de animales y disección

Las hembras fueron anestesiadas y sacrificadas mediante dislocación cervical, para luego extraer los embriones y mantenerlos en una solución HBSS 1X / Hepes 1X. Se descartaron los anexos embrionarios y los embriones fueron decapitados para proseguir con la disección bajo lupa. A continuación, se extrajo el cerebro de cada embrión, se descartó el rombencéfalo (*hindbrain*) y las meninges, y luego se hizo un corte sagital para separar los hemisferios. Finalmente, se extrajo el hipocampo desde el prosencéfalo (*forebrain*) de cada hemisferio.

b) Disgregación de los hipocampos y conteo de células

En primer lugar, se efectuó disgregación química con tripsina en una placa de 24 pocillos, depositando los hipocampos provenientes de un animal en un pocillo independiente con 450 μ L de solución HBSS 1X / Hepes 1X a 4°C y agregando tripsina-EDTA a una concentración final de 0,25% (v/v). Se dejó incubar la mezcla durante 25 min a 37°C y luego se transfirieron los hipocampos desde cada pocillo a un tubo cónico de 15 mL. A continuación, se realizaron tres lavados con HBSS 1X / Hepes 1X, dejando sedimentar el tejido cada vez. Posteriormente, ese realizó disgregación mecánica en MEM / HS 10%, mediante pipeteo suave a través de capilares de diferente calibre (30 pasadas a través de pipetas Pasteur de 2 mm, 1 mm y 0,5 mm, en estricto orden).

El conteo de células en suspensión se determinó mediante tinción con azul de tripán 0,2% en una cámara de Neubauer. Se utilizaron cubreobjetos redondos de 12 mm de diámetro en placas de 24 pocillos y se sembraron 30.000 células hipocampales por pocillo. Los cubreobjetos fueron tratados previamente con 300 μ L de poli-L-lisina 1 mg/mL durante 8 h (antes del cultivo, a cada pocillo se le dio tres lavados de 30 min

con 500 μ L de agua destilada autoclavada). Las células se incubaron durante 2 h en MEM / HS 10% período suficiente para la adhesión de las neuronas, y luego se reemplazó dicho medio por Medio de Mantenición (Neurobasal , B27 1X, Glutamax 1X, piruvato de sodio 1mM, antibiótico antimicótico 1X).

c) Transfección de neuronas hipocampales con Raichu-Rac

Se modifica levemente el método de transfección con lipofectamina descrito para líneas celulares. Brevemente, para cada pocillo de placa 24-well, se agregó 0,5 μ g de DNA a un volumen de 50 μ L de Optimem y 0,75 μ l de lipofectamina en otro tubo con 50 μ L de Optimem. Tras 5 min de incubación a temperatura ambiente, se mezclaron ambas soluciones y el complejo DNA / lipofectamina se incubó a temperatura ambiente durante 20 min. Inmediatamente, se extrajo el Medio de Mantenición para conservarlo a 37°C, se lavaron las células con PBS 1X, y se agregó 400 μ L de Neurobasal. Se vertió el complejo DNA / lipofectamina (100 μ L sobre el pocillo) y se incubó durante 2 h a 37°C con 5% de CO₂ y humedad controlada de 95%. Posteriormente, se reemplazó el Neurobasal por Medio de Mantenición y se dejó incubando durante 18 h.

6.3 Biología Molecular

6.3.1 Purificación de proteína de fusión GEX-GST-CRIB desde bacterias

a) Transformación de bacterias E. coli BL21(DE3) mediante shock térmico

En un tubo de microcentrífuga 1,5 mL se mezcló 100-500 ng de DNA plasmidial con una alícuota de 50 μ L de bacterias *E. coli* quimio-competentes de la cepa DH5 α o BL21(DE3), se incubó la mezcla en hielo durante 30 min, luego a 42°C durante 90 s y nuevamente en hielo durante 2 min. A continuación, se agregó 600 μ L de medio LB, se introdujo el tubo en un matraz Erlenmeyer y se dejó incubando en agitación a 37°C durante 60 min. Finalmente, se sembró 100 μ L de cultivo bacteriano sobre una placa

de agar 2% en LB-amp (LB / ampicilina 100 µg/mL), se dejó la placa reposando en la zona estéril durante 10 min y luego se incubó, invertida, a 37°C *toda la noche*.

Se inoculó una colonia resistente a ampicilina en 5 mL de LB-amp y se incubó a 37°C en agitación vigorosa (200-300 rpm) hasta alcanzar una OD₆₀₀ 0,8-0,9 (12-15 h). Se diluyó 1 mL de cultivo saturado en 100 mL de LB-amp y se incubó a 37°C hasta alcanzar una OD₆₀₀ 0,4-0,6 (aproximadamente 2 h). Se tomó una alícuota de 1 mL, y se incubó en simultáneo al proceso de inducción.

b) Inducción de la transcripción de GST-CRIB con IPTG.

Al cultivo bacteriano diluido se agregó IPTG a una concentración final de 2mM y se incubó a 37°C en agitación vigorosa (200-300 rpm) hasta alcanzar una OD₆₀₀ 0,8-0,9 (3 h, aprox.). Se tomó una alícuota de 1 mL y junto a la alícuota colectada antes de inducir se prepararon muestras para SDS-PAGE.

c) Lisis celular y purificación de proteína de fusión GEX-GST-CRIB

Los cultivos saturados tratados con IPTG fueron centrifugados a 6.000 rpm durante 10 min. El *pellet*, que contenía las bacterias, se solubilizó en 10 mL de tampón de lisis, se sometió la solución a 4 pulsos de sonicación de 15 s con una potencia de 30%. La solución sonicada se centrifugó a 10.000 rpm (15.000 g, aprox.) durante 30 min; se conservó el sobrenadante, que contiene las proteínas solubles, y se descartó el *pellet*, formado por los restos celulares insolubles. Se tomaron alícuotas de 100 µL del sonicado antes y después de centrifugar para preparar muestras para SDS-PAGE.

d) Verificación de la inducción y purificación de GEX-GST-CRIB

Las alícuotas de cultivo bacteriano tomadas antes y después de la inducción, y las alícuotas de lisado colectadas antes y después de centrifugar se cargaron junto a un

estándar de peso molecular en un gel de poliacrilamida 12%, el cual fue sometido a una SDS-PAGE a 110 V durante 2,5 h. Para verificar la presencia y estimar la abundancia de la proteína de fusión en cada etapa, se tiñó el gel con azul de Coomassie.

6.3.2 Genotipificación de ratones mediante PCR.

Al momento de decapitar a los embriones de ratón se tomó una biopsia de la cola de cada embrión y se depositó en un tubo de microcentrifuga de 1,5 mL. A cada tubo independiente se agregó 500 µl de tampón de digestión de colas y se incubó durante 3 h a 55°C en agitación a 1.000 rpm. A continuación, se centrifugó durante 10 min a 13.000 rpm a temperatura ambiente y se transfirió el sobrenadante a tubos nuevos, descartándose el pellet. Luego, se agregó 800 µL de iso-propanol, se incubó 2 min a temperatura ambiente y se mezcló por inversión hasta constatar la formación de un ovillo. Utilizando una punta de micropipeta de 200 µL, se transfirió cada ovillo a un tubo nuevo, se dejó evaporar el iso-propanol al aire y se agregó 50 µL de agua libre de DNasa, obteniéndose el DNA genómico en solución acuosa de cada embrión.

Para determinar el genotipo de cada embrión, se utilizó un protocolo de PCR validado por el laboratorio de Ashok Kulkarni (NICDR, NIH, Bethesda, EE. UU.), quienes generaron el animal Cdk5 KO, procediendo como se describe a continuación.

En un tubo de microcentrifuga de 200 µL estéril, se agregó 31,5 µL de agua libre de DNasa; 5 µL de tampón Taq 10X con KCl; 4 µL de MgCl₂ 25mM; 2 µL de partidor Cdk5 sentido 10 µM; 2 µL de partidor Cdk5 anti-sentido 10 µM; 2 µL de partidor Pgk1 10 µM; 1 µL de dNTPs 2,5 mM; 2 µL de DNA genómico fetal; y 2 µL de Taq DNA polimerasa 1U/µL. La secuencia de los oligonucleótidos de DNA utilizados es ATT GTG GCT CTG AAG CGT GTC (Partidor Cdk5 sentido), CTT GTC ACT ATG CAG GAC ATC (Partidor

Cdk5 anti-sentido) y TCC ATC TGC ACG AGA CTA GT (Partidor pgk1). Se programó el termociclador para efectuar una fase de denaturación inicial a 94°C durante 3 min; treinta ciclos de denaturación a 94°C (30"), apareamiento a 60°C (1 min) y elongación a 72°C (1 min); y una fase de elongación final a 72°C durante 10 min.

Se mezcló una alícuota de 10 µL de cada producto de PCR con 2 µL de tampón de carga de DNA 6X y se cargó gel de agarosa 1% en TAE 1X con bromuro de etidio 1 µg/mL. El gel fue sometido a una electroforesis a 100 V durante 30 min y colocado sobre un trans-iluminador ultravioleta. En los animales *wt*, aparece una banda de 300 pb; por su parte, en los animales heterocigotos aparece ésta y otra banda de 450 pb; mientras que en los animales KO (Cdk5 *-/-*) sólo aparece la banda de 450 pb.

6.4 Bioquímica

6.4.1 Lisis Celular y Extracción de Proteínas

a) Lisis celular con tampón RIPA 1X y extracción de proteínas para Western Blot.

A cada placa de cultivo se le extrajo el medio con una pipeta Pasteur conectada a una bomba de vacío y se lavó el medio residual (y las células no adheridas) con PBS 1X a 37°C. Para lisar las células adheridas, se adicionó a las placas tampón RIPA 1X distribuyéndolo sobre la placa y se raspó con *scraper*. Para impedir la degradación enzimática de las proteínas, se agregó fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1mM y una pastilla PIC por cada 10 mL. Para evitar la desfosforilación de proteínas, se agregó Na₃VO₄ 1mM (inhibidor de fosfatasas de fosfo-tirosina), NaF 10Mm (inhibidor general de las fosfatasas de proteínas) y caliculina 0,2% (v/v) (inhibidor de serina-treonina fosfatasas PP2A y PP1). Una vez obtenido todo el raspado, se transfirió la suspensión a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, se dio un pulso de agitación en vórtex, se incubó en hielo durante 10 min y se centrifugó a 14.000 rpm durante 15 min a 4°C.

b) Lisis con tampón de Fishing y extracción de proteínas para Pulldown

Se retiró el medio de cultivo de las placas, se lavó con PBS 1X y se agregó 450 μL de tampón de Fishing previamente filtrado. A continuación, se removieron las células mediante raspado con *scraper* y se transfirió la suspensión a un tubo de 1,5 mL; se incubó durante 5 min en hielo y se centrifugó los a 12.000 rpm durante 10 min.

Los sobrenadantes obtenidos en a) y b), que contienen las proteínas presentes en el lisado, fueron congelados rápidamente en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C hasta su utilización, extrayendo una alícuota de 5 μL antes de congelar para la cuantificación de proteína total.

6.4.2 Cuantificación de proteínas (método de Bradford)

Se preparó una curva de calibración diluyendo cantidades crecientes de BSA (1-16 μg) en 800 μL de agua destilada, agregando luego 200 μL de reactivo de Bradford. Simultáneamente, se prepararon las muestras de lectura tomando 1 μL de cada extracto proteico, y agregando 200 μL de Bradford y 799 μL de agua destilada. Se vertió una alícuota de 200 μL de cada punto de la curva y de cada muestra de lectura en una placa de 96 pocillos, para luego medir la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro Magellan®. Se graficó absorbancia versus concentración con los datos leídos la curva de calibración (restando a cada punto la lectura del punto 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se determinó la pendiente de la curva. Al valor de absorbancia leído para cada muestra se restó la lectura del punto 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se determinó el valor de la concentración dividiendo el valor obtenido por la pendiente de la curva.

6.4.3 Inmunoprecipitación de HA-Tiam1 (C1199) o Cdk5

Cada reacción de inmunoprecipitación se preparó mezclando 500 μg de extracto de proteína total con 1 μg de anticuerpo IgG contra el clon F-7 de HA o 2 μg de anticuerpo

IgG contra el epítipo C-8 de Cdk5. A continuación, se completó un volumen de 500 μ L con tampón de IP 1X, inhibidores de proteasas e inhibidores de fosfatasa. La mezcla se incubó en agitación a 4°C toda la noche. Al día siguiente, se adicionó 40 μ L de proteína A/G-agarosa a cada tubo, se incubó en agitación a 4°C durante 4 h y luego se centrifugó a 3.000 rpm (aproximadamente 1.000 g) durante 5 min a 4°C, descartándose el sobrenadante. El pellet se lavó 5 veces suspendiéndolo en 500 μ L de tampón de IP 1X, centrifugando a 3.000 rpm durante 2 min y descartando el sobrenadante, manteniéndolo en hielo o a 4°C.

6.4.4 Ensayo de fosforilación *in vitro* de histona H1 por Cdk5

Para preparar cada reacción de fosforilación se tomó un pellet de inmunoprecipitado de Cdk5 (aproximadamente 40 μ L) y se resuspendió en 110 μ L de tampón quinasa. A continuación, se agregó ATP 0,5 mM (10 μ L de un stock 10 mM) e histona purificada de timo de ternera 9,5 μ M (40 μ L de un stock 1 mg/mL). La reacción se dividió en 4 alícuotas de 50 μ L y luego éstas se incubaron a 37°C. Se detuvo la reacción de una alícuota a la vez tras completarse 0, 20, 40 y 60 min; para esto, se agregaron 12 μ L de tampón de carga de proteínas 5X y se prepararon las muestras para SDS-PAGE.

6.4.5 Pulldown de GST-CRIB

a) Inmovilización de GST-CRIB con sefarosa-glutación

En un tubo cónico de 15 mL, se mezclan 10 mL de proteína soluble GST-CRIB con 1 mL de sefarosa-glutación previamente lavada (2 lavados consistentes en 5 min de agitación orbital con 5 mL de tampón de lisis seguida de 3 min de centrifugación a 1.000 g y eliminación del sobrenadante). La mezcla se incubó en agitación orbital a 4°C toda la noche. Al día siguiente, se centrifugó a 1.000 g durante 3 min y se descartó el sobrenadante, conservándose la resina precipitada; se efectuaron 6 lavados (5 min de

agitación orbital con 5 mL de tampón de lisis seguida de 3 min de centrifugación a 1.000 g y descarte del sobrenadante). Tras el último lavado, a la resina obtenida se le agregó un volumen equivalente de tampón de lisis. Se tomó una alícuota de 40 μ L de resina 1:1 tampón de lisis para preparar muestras para SDS-PAGE.

f) Formación de complejo entre GST-CRIB y la proteína endógena

Se tomaron 80 μ L de resina sefarosa-glutación / GST-CRIB solubilizada 1 : 1 en tampón de lisis y se centrifugó durante 5 min a 1.000 g; se descartó el sobrenadante y se reemplazó por 500 μ L de tampón de Fishing; luego, se repitió la centrifugación y se descartó el sobrenadante, para luego agregar 40 μ L de tampón de Fishing y así equilibrar la resina. A continuación, se mezcló la resina equilibrada con 800 μ g de extracto de proteínas para *pulldown* en un tubo cónico de 15 mL y se aforó hasta 1 mL con tampón de Fishing. Se dejó incubando a 4°C durante 70 min en agitación orbital; y a continuación se centrifugó durante 2 min a 3.000 rpm. Para lavar la resina y descartar las proteínas que no se adhirieron a ella, se removió el sobrenadante y se agregó 1 mL de tampón de Lavado. Luego, se homogenizó mediante pipeteo suave (utilizando una punta de micropipeta de 1 mL con el extremo angosto truncado) y se centrifugó durante 2 min a 3.000 rpm. Se repitió el lavado 3 veces y finalmente se prepararon muestras para SDS-PAGE.

6.4.6 Western Blot

a) Preparación de muestras

A partir de los extractos proteicos, se tomó un volumen que contuviera 400 μ g de proteína total, se agregaron 40 μ L de tampón de carga de proteínas 5X y se completó un volumen de 200 μ L con tampón RIPA 1X, obteniéndose una concentración de 2 μ g/ μ L. Los *pellet* lavados obtenidos de los protocolos de inmunoprecipitación y

pulldown se solubilizaron en 20 μ L de tampón RIPA 1X y 20 μ L de tampón de carga de proteínas 5X. A las alícuotas de 1 mL de cultivo bacteriano en LB se les dio un pulso de centrifugación a 8.000 rpm, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 100 μ L de tampón de carga de proteínas 2,5X. Tanto a las alícuotas de sonicado y proteína soluble bacteriano solubilizadas en tampón de lisis, como a las de resina sefarosa-glutación / GST-CRIB y de ensayos de fosforilación *in vitro* se les agregó $\frac{1}{4}$ volumen de tampón de carga de proteínas 5X. En todos los casos, la mezcla se agitó vigorosamente en vórtex, se incubó a 95°C durante 5 min (para denaturar las proteínas) y se dio un pulso breve de centrifugación a 8.000 rpm. Las muestras se conservaron congeladas a -20°C hasta su utilización.

b) SDS-PAGE

Se prepararon geles de concentración con poliacrilamida al 4,5% y geles de resolución con un porcentaje de poliacrilamida variable en función del tamaño de las proteínas en estudio (15% para resolver entre 10 – 40 kDa; 12% para 30 – 60 kDa; 10% para 50 – 100 kDa; 7,5% para 80 – 200 kDa). Los geles se sumergieron en Tampón de Electroforesis, se cargó 10-50 μ L de muestra en cada pocillo y se efectuó la electroforesis manteniendo un voltaje de 80-110 V.

c) Immunoblotting

Se transfirieron las proteínas desde los geles de agarosa hacia membranas de nitrocelulosa aplicando una corriente constante de 250 mA durante 50 min para visualizar Rac1, p35 y Cdk5, y 300 mA durante 75 min para visualizar Tiam1 y HA-Tiam1 (C1199). A continuación, se bloquearon las membranas sumergiéndolas en una solución de leche descremada 5% en TBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente, en agitación. Posteriormente, se cubrió cada membrana con una solución de

anticuerpo primario en leche descremada 1% en TBS-T y se incubó toda la noche a 4°C, en agitación. Al día siguiente, se sumergió la membrana en TBS-T y se lavó en agitación horizontal (la cantidad de lavados y la duración de éstos depende de la calidad del marcaje del anticuerpo). Luego, se cubrió cada membrana con una solución de anticuerpo secundario en leche descremada 1% en TBS-T y se incubó durante 90 min a temperatura ambiente en agitación. Transcurrido ese plazo, se lavaron 4 veces las membranas durante 10 min en TBS-T y luego se revelaron en sala oscura utilizando reactivos quimio-luminiscentes ECL y filmes radiográficos. Una vez digitalizados los filmes con un escáner, la cuantificación densitométrica se realizó con la distribución FIJI del software ImageJ.

6.5 Inmunofluorescencia en microscopio confocal

Para preparar las muestras de inmunocitoquímica, se extrajo el medio a las placas y se lavó tres veces cada pocillo con PBS 1X a temperatura ambiente, 5 min cada vez. Las células fueron fijadas incubándolas durante 30 min a 37°C con 500 µL de una solución PBS 1X / PFA 4%(v/v) / sacarosa 4%(p/v), para luego dar tres lavados sucesivos con PBS 1X. A continuación, se permeabilizó cada preparación fijada con una solución Triton 0,2%(v/v) en PBS 1X durante 5 min a temperatura ambiente y se efectuaron tres lavados sucesivos con PBS 1X. Después, se bloqueó con una solución PBS 1X / BSA 5%(p/v) durante 60 min a temperatura ambiente y a continuación se incubó con anticuerpo primario disuelto en PBS 1X / BSA 1%(p/v) a 4°C (en cámara húmeda) toda la noche, para luego efectuar tres lavados sucesivos con PBS 1X. Finalmente, se incubó con anticuerpo secundario fluorescente disuelto en PBS 1X / BSA 1%(p/v) durante 60 min a temperatura ambiente (en cámara húmeda y oscura) y se efectuaron tres lavados sucesivos con PBS 1X. Para montar las muestras de microscopía, se

lavaron los cubreobjetos con agua destilada, se secaron por escurrimiento sobre papel y se adhirieron con fluorsave a portaobjetos de vidrio de 1 x 3 pulgadas.

Se utilizó el microscopio Zeiss LSM 510, provisto de los láseres Argón/2 [458, 477, 488, 514 nm], HeNe1 [543 nm] y HeNe2 [633 nm].

Los registros de emisión se realizaron con el *software* LSM 510 META, utilizando las siguientes configuraciones:

Para visualizar faloidina, con fluorescencia roja, se excitó a 543 nm y se utilizó un filtro pasa-bajos 560, mientras que para visualizar el anticuerpo fluorescente verde unido al anticuerpo contra α -tubulina se excitó a 488 nm y se usó un filtro pasa-banda 505-530.

Para registrar la fluorescencia de de YFP_{530 nm} y CFP_{475 nm}, se excitó con una longitud de onda de 458 nm, usando un filtro pasa-banda de 530-600 nm para detectar la fluorescencia de YFP y un filtro pasa-banda de 475-525 nm para detectar la fluorescencia de CFP. Los registros se almacenaron en *hyperstacks* (archivos de extensión LSM que contienen ambos registros como imágenes de 1024 x 1024 píxeles). Para generar los mapas de FRET a partir de los *hyperstacks*, se utilizó el software FIJI-ImageJ. Para comenzar, se aplicó al *hyperstack* un filtro Mediana (radio 1,2 píxeles), se sustrajo el *background* y se alinearon las imágenes de ambos canales respecto al plano XY con el *pluggin* 'Registration'→'StackReg'→'Translation'. A continuación, se separaron los canales YFP y CFP en dos imágenes independientes con el comando 'Stack'→'Stack to Images' y se utilizó el comando 'Process'→'Image Calculator' para dividir la imagen YFP por la imagen CFP, determinando la relación YFP : CFP en una imagen de 32 bits. Adicionalmente, se duplicó la imagen del canal YFP y se utilizó el comando 'Adjust'→'Threshold' para ajustar el umbral de una de las imágenes hasta mostrar la neurona y sus procesos; se descartó el ruido de fondo con

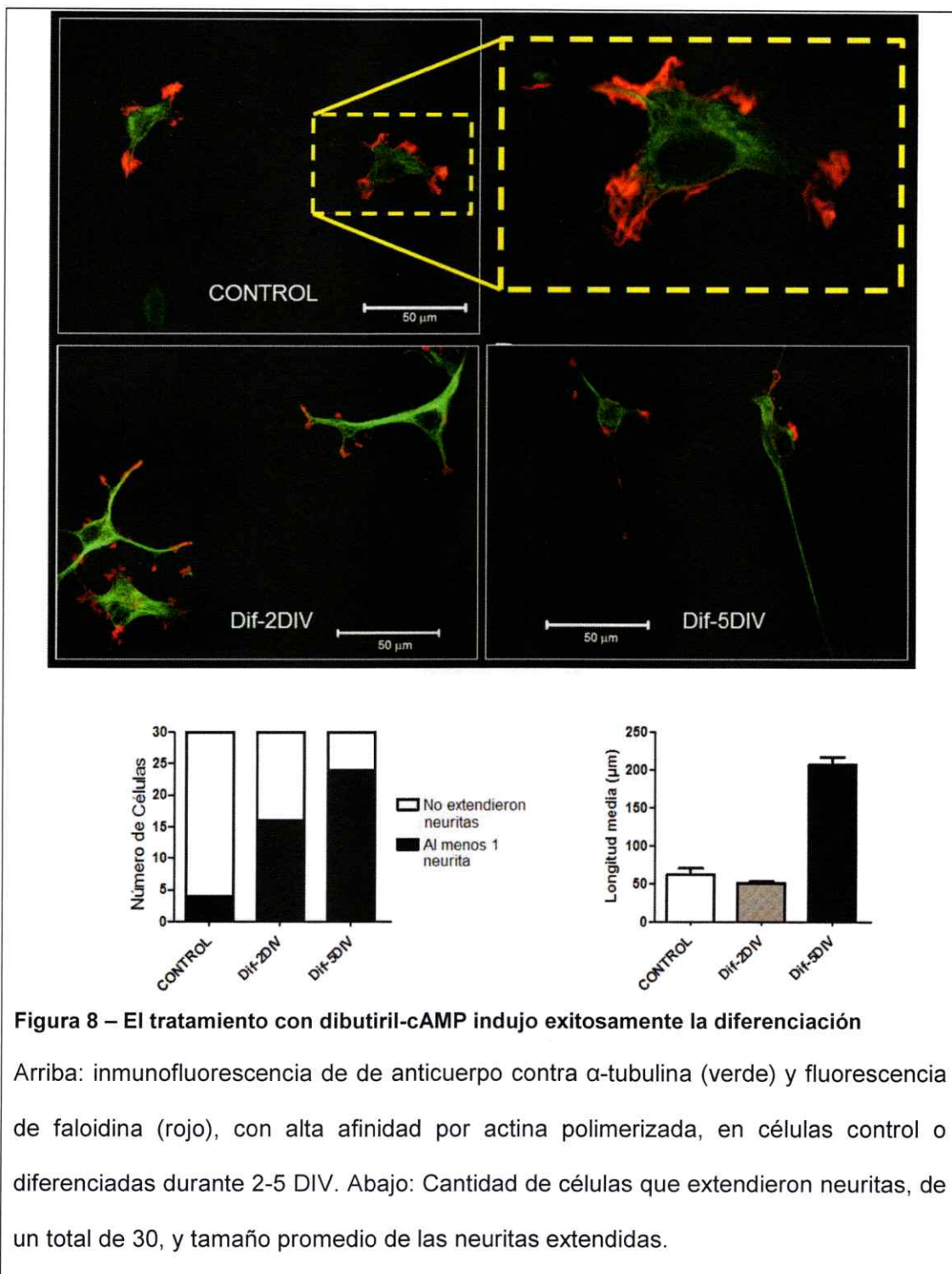
el comando 'Analyze particles', obteniendo una imagen de 8 bits con valores de 0 ó 255 para cada píxel, la cual fue dividida por 255 para obtener la máscara binaria del registro de YFP. Finalmente, la relación YFP / CFP se multiplicó por la máscara binaria para normalizar los valores respecto a los píxeles donde la emisión de YFP supera el umbral establecido y se obtuvo una imagen de 32 bits con los valores de FRET píxel a píxel.

7. RESULTADOS

7.1 La inhibición de Cdk5/p35 perjudica la extensión de neuritas

Para verificar si el tratamiento con dibutilil-cAMP indujo exitosamente la diferenciación, se marcaron las células fijadas con un anticuerpo contra α -tubulina y con faloidina, un marcador de actina-polimerizada, y se visualizaron las células con el microscopio confocal LSM 510 (Zeiss). Utilizando el *software* LSM Image Browser (Zeiss) y se determinó el porcentaje de células que presentan neuritas –prolongaciones con extensión superior al diámetro celular, 40 μm – y la longitud promedio de las neuritas. El porcentaje de la población de células que ha extendido al menos una neurita en las condiciones CONTROL, Dif-2DIV y Dif-5DIV correspondió al 13,3%, 46,7% y 80%, respectivamente, y la longitud promedio de las neuritas extendidas correspondió a $62,2 \pm 6,1 \mu\text{m}$, $51,4 \pm 2,3 \mu\text{m}$ y $207 \pm 10,3 \mu\text{m}$, respectivamente (Figura 8). Estos valores permiten establecer que el tratamiento con dibutilil-cAMP durante 5 días *in vitro* indujo con éxito la diferenciación, pues son consistentes con valores reportados previamente para N1E-115 (Furmanski, Silverman y cols., 1971; Prasad 1991). Al hacer una comparación entre células diferenciadas durante 5 DIV que fueron tratadas con DMSO (Dif-5DIV) o con roscovitina 15 μM (Dif-5DIV+ROSCO) el porcentaje de células que extendió al menos una neuritas desciende de un 80% a un 36,7%, respectivamente, mientras que la longitud media de las neuritas extendidas desciende desde $207 \pm 10,3 \mu\text{m}$ hasta $121 \pm 40,9 \mu\text{m}$. Una comparación cualitativa entre la estructura del citoesqueleto de las células de ambas condiciones experimentales muestra que las células tratadas con roscovitina poseen un patrón de marcaje de actina polimerizada mucho más difuso que las células tratadas con DMSO (Figura 9).





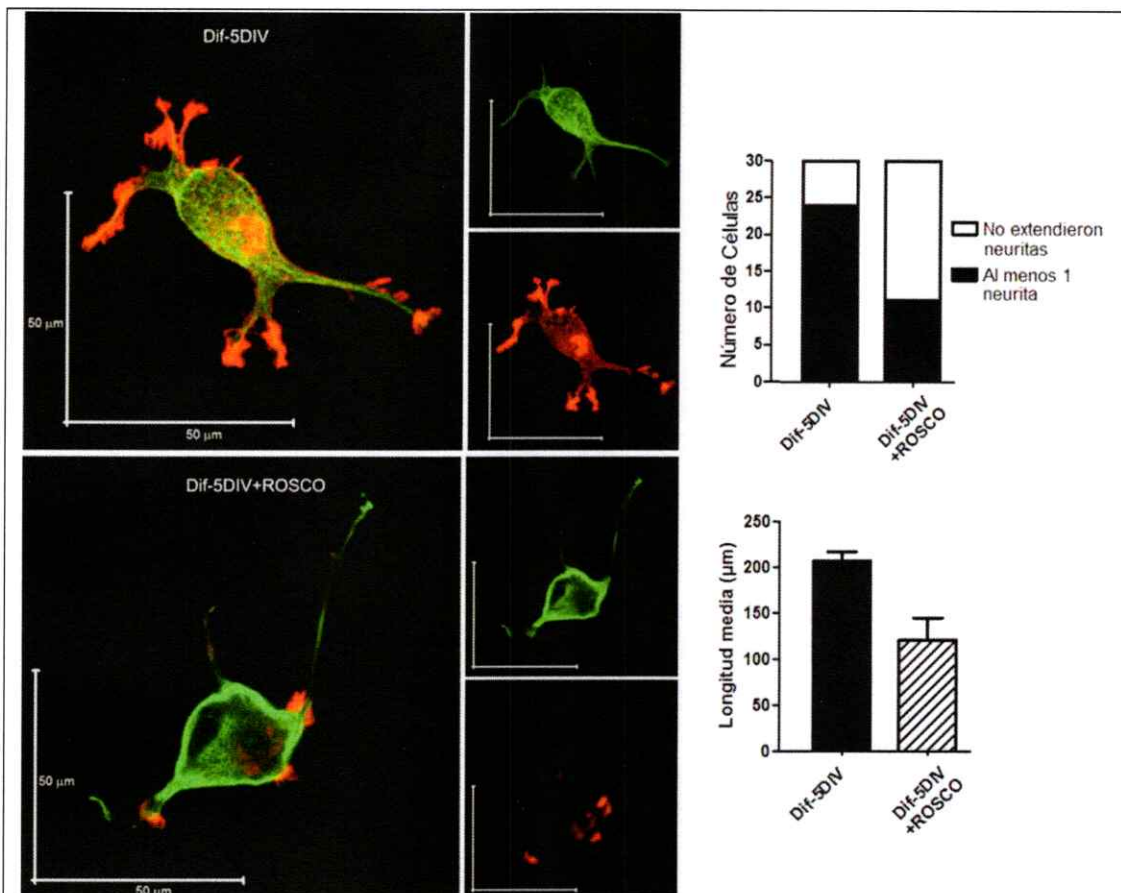


Figura 9 – La inhibición de Cdk5/p35 afecta la extensión de neuritas en células tratadas con dibutiril-cAMP.

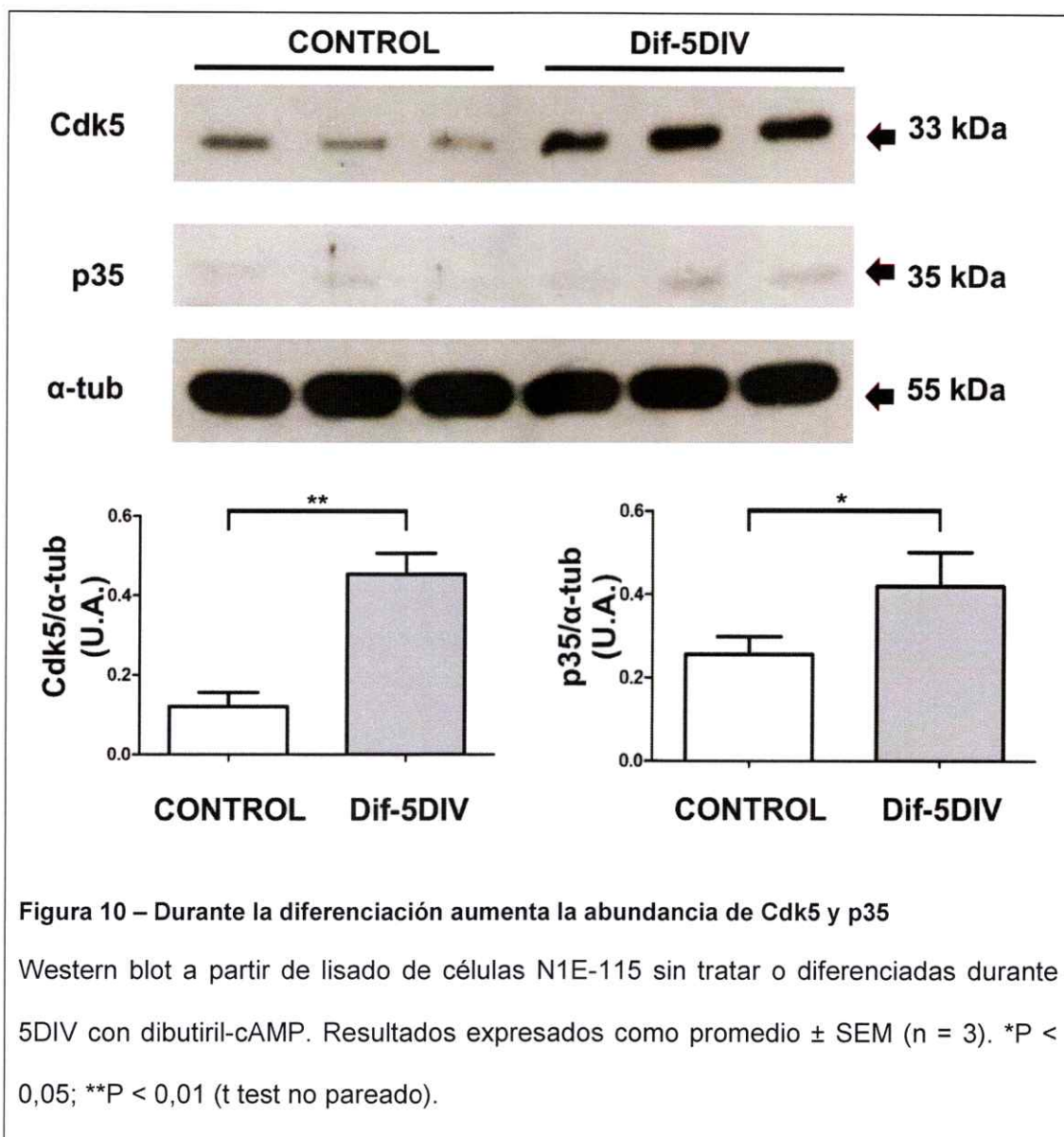
Izquierda: inmunofluorescencia de anticuerpo contra α -tubulina (verde) y fluorescencia de faloidina (rojo), que tiene alta afinidad por actina polimerizada, en células mantenidas en medio de diferenciación durante 5 DIV y tratadas con DMSO 0,1% (arriba) o con roscovitina 15 μ M (abajo) durante las últimas 48 h.

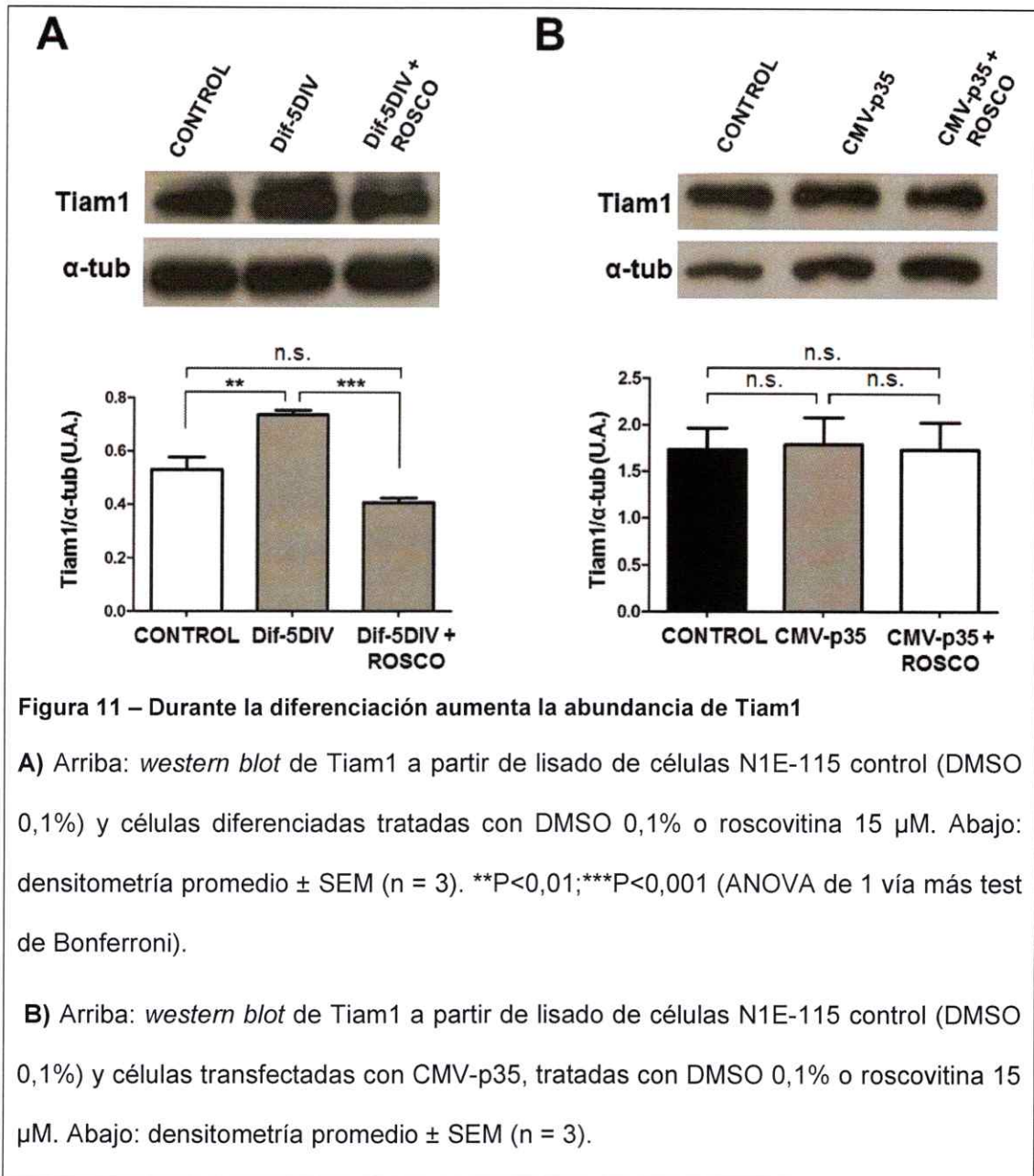
Derecha: el tratamiento con roscovitina provoca una disminución en la cantidad de células que extienden neuritas y en la longitud de las neuritas extendidas.

7.2 La abundancia de Tiam1, p35 y Cdk5 aumenta durante la diferenciación

Se analizó mediante WB la abundancia de las proteínas Cdk5 (Mr=33 kDa) y p35 (Mr=35 kDa) en las condiciones CONTROL y Dif-5DIV (véase 5.1) y se normalizaron los valores con respecto a la abundancia de α -tubulina. De este modo, se determinó que en las células diferenciadas durante 5 DIV la cantidad de Cdk5 se triplica y la abundancia de p35 aumenta levemente respecto a las células sin diferenciar (Figura 10).

A continuación, se midió la abundancia de Tiam1 mediante WB en las condiciones CONTROL, Dif-5DIV y Dif-5DIV+ROSCO. Tiam1 aumenta un 40% en las células diferenciadas respecto a la condición control, pero este aumento no tiene lugar si se trata a las células con roscovitina a los 3 DIV (Figura 11 A). Para evaluar si la actividad Cdk5/p35 es suficiente para producir un aumento en la abundancia de Tiam1, se realizó un experimento adicional: se transfectó pCMV-p35 en células N1E-115 sin diferenciar, comprobándose que ni la sobre-expresión de p35 ni la inhibición de la actividad quinasa de Cdk5 son suficientes para producir un aumento en la abundancia de Tiam1 (Figura 11 B).

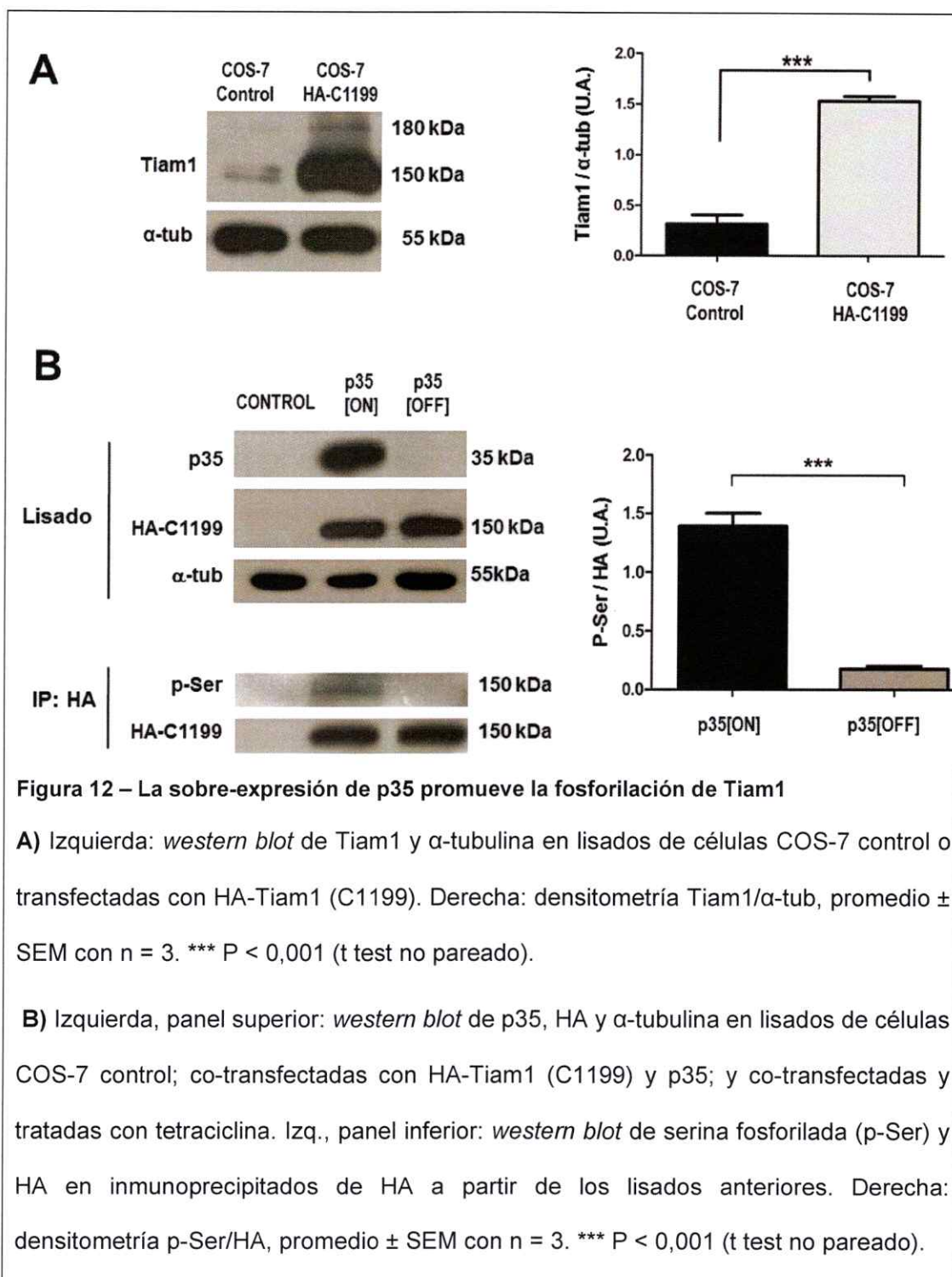




7.3 La sobre-expresión de p35 promueve la fosforilación de Tiam1

La proteína p35, que no se expresa endógenamente en COS-7, no aparece en la condición CONTROL y es prácticamente inexistente en las células p35 [OFF]; mientras que en las células p35 su observa abundantemente (Figura 12 B). Por su parte, la proteína HA-Tiam1 (C1199) se expresó exitosamente en las condiciones p35 [ON] y p35[OFF]. Al utilizar un anticuerpo contra Tiam1, se detecta marcaje en Mr=180 y Mr=150 tanto en las células sin transfectar como en las transfectadas, y un gran aumento en Mr=150 en estas últimas (Figura 12 A); si se utiliza un anticuerpo contra HA, sólo hay marcaje en las células transfectadas, exclusivamente en Mr=150.

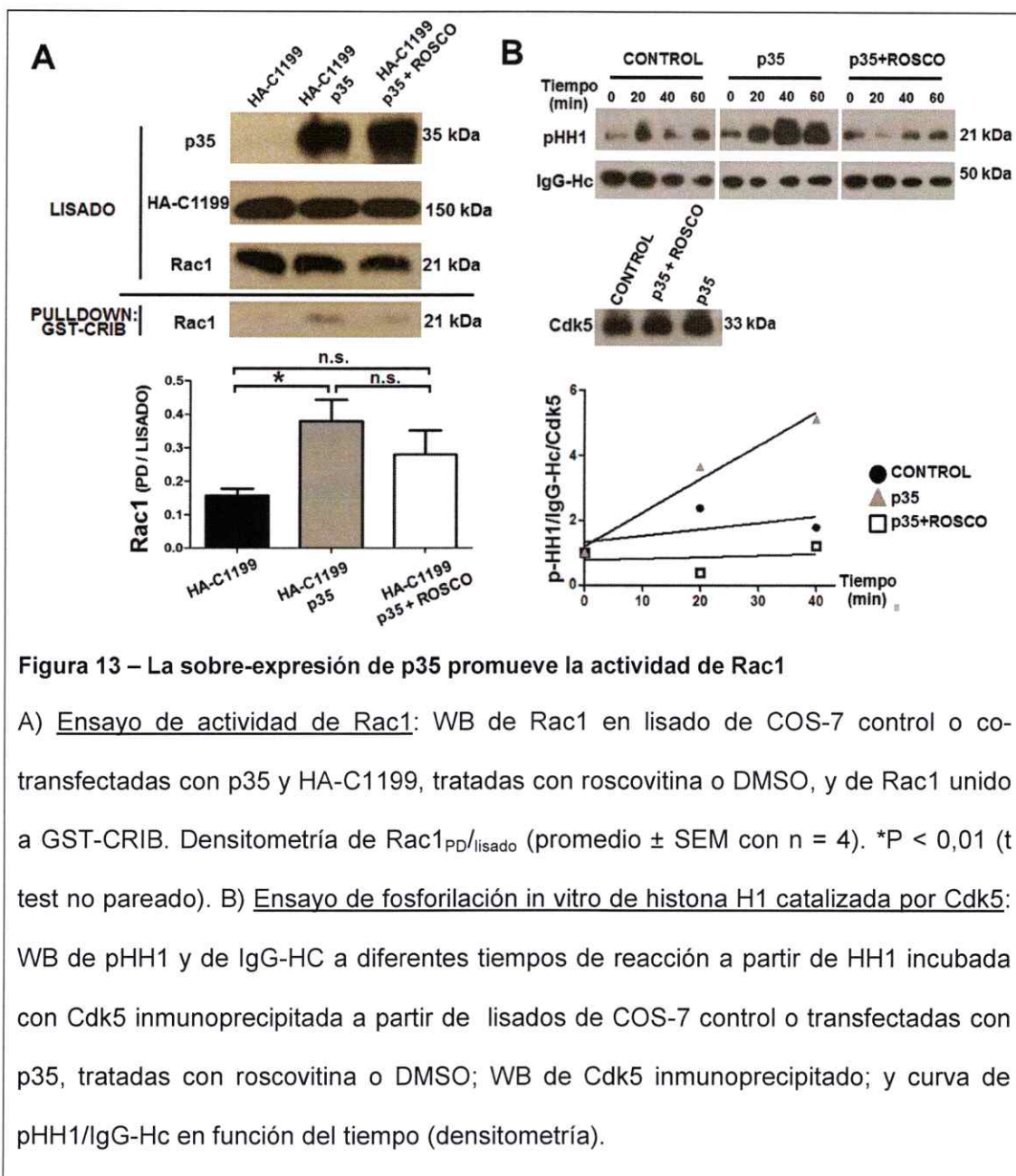
Al inmunoprecipitar HA-Tiam1 (C1199) usando un anticuerpo contra HA y comparar mediante *western blot* los niveles de serina fosforilada presente en los inmunoprecipitados obtenidos de las condiciones p35 [ON] y p35 [OFF], relativizados respecto a HA-Tiam1 (C1199), se observa que la fosforilación de HA-Tiam1 (C1199) es 7 veces mayor en la primera condición, es decir, cuando se expresa la proteína p35 (Figura 12 B, IP).



7.4 La sobre-expresión de p35 promueve la actividad de Rac1

En las células tratadas con DMSO que expresan simultáneamente p35 y Tiam1 (C1199), la relación entre la cantidad de Rac1 unida a CRIB (activa) y la cantidad de Rac1 presente en el lisado (total) duplica al valor determinado para las células tratadas con DMSO que sólo expresan Tiam1 (C1199). En las células tratadas con roscovitina y co-transfectadas con p35 y C1999[Tiam1] el valor es similar al de las células que sólo expresan Tiam1 (C1199) (Figura 13 A).

Para verificar que la sobreexpresión de p35 aumentó la actividad quinasa de Cdk5, se efectuó un experimento adicional: células COS-7 fueron separadas en tres grupos experimentales: el primer grupo, **CONTROL**, fue mantenido con medio de crecimiento y DMSO 0,1%; en el segundo grupo, **p35 + ROSCO**, se transfectó CMV-p35 y las células fueron tratadas con roscovitina 20 μ M; y en el tercer grupo, **p35**, se transfectó con CMV-p35 y las células fueron tratadas con DMSO 0,1%. A las 36 h post-transfección se lisaron las placas. Se inmunoprecipitó Cdk5 a partir de cada lisado y luego se efectuó un ensayo *in vitro* de fosforilación de histona H1 (HH1). Los resultados confirmaron que la velocidad media de aparición de pHH1 en las células que sobre-expresan p35 es mayor que en la condición **CONTROL**, y que la fosforilación es inhibida por roscovitina (Figura 13 B). Como se obtuvo un nivel de sobre-expresión de p35 similar en las células COS-7 co-transfectadas con pBI-p35 y tTA (Figura 12 B) y transfectadas con pCMV-p35 (Figura 13 A), es válido extender las conclusiones de éste ensayo para ambas estrategias de sobre-expresión.



7.5 Efecto de la presencia de Cdk5 en la activación local de Rac1.

Las células positivas para β III-tubulina presentes en los cultivos primarios de células hipocámpales *wt* y Cdk5 KO correspondieron mayoritariamente a neuronas con morfología piramidal, mientras que la población glial no mostró marcaje. Se registró la emisión de YFP en un rango cercano a 530 nm y de CFP alrededor de 475 nm (véase 6.5) en las neuronas que expresan la sonda Raichu-Rac. Las imágenes correspondían a campos de 200 x 200 μ m. Como el tamaño de las neuronas en estadio 3 supera dicha área, fue necesario tomar más de una captura para abarcar los segmentos somato-dendrítico y axonal, y luego solaparlas.

Para visualizar los niveles de activación local de Rac1 en cada neurona, se representaron los valores de FRET en una escala de colores. Para efectuar el análisis cuantitativo, se recopilaron los valores de FRET de toda la neurona y se representaron en un histograma de frecuencia. En un análisis preliminar de cuatro mapas, dos provenientes de neuronas de ratón *wt* y las dos restantes de un ratón Cdk5 KO (ambos de la misma camada), los datos sugieren que en el ratón *wt* el FRET promedio es más alto que en el ratón Cdk5 KO; y que en el primero hay mayor FRET en la porción somato-dendrítica que en el segmento axonal, mientras que en el segundo el FRET tiene esencialmente el mismo valor en toda la célula (Figura 14).

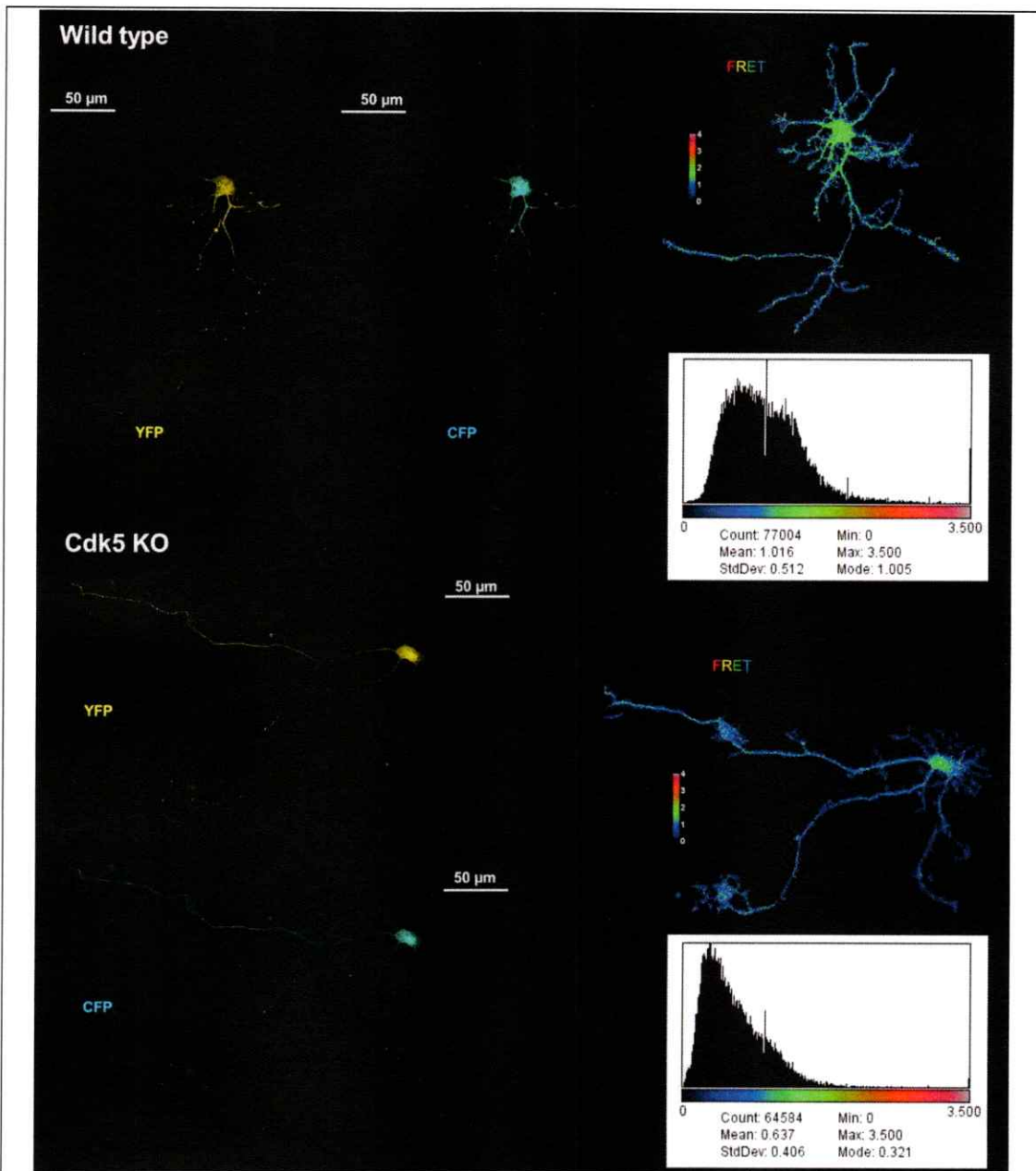


Figura 14 – Mapas de FRET en neuronas hipocampales wt y Cdk5 KO

A partir de las emisiones de YFP_{530 nm} y CFP_{475 nm}, se generó una imagen con los valores de FRET para cada píxel. Se utiliza la interfaz RainbowRGB de FIJI-ImageJ para mostrar un mapa en colores y se representan los valores cuantitativos como histograma.

8. DISCUSIÓN

8.1 La abundancia de Cdk5, p35 y Tiam1 aumenta durante la diferenciación

Durante la diferenciación *in vitro* inducida con dibutilil-cAMP en células N1E-115 se produjo un incremento en la abundancia de las proteínas Cdk5, p35 y Tiam1, un resultado esperable de acuerdo a los antecedentes que señalan que la actividad de Cdk5/p35 es necesaria para la extensión de neuritas y elongación axonal (Nikolic, Dudek y cols., 1996; Ohshima, Ward y cols., 1996) y consistente con el rol crítico descrito para Tiam1 en la extensión de neuritas dependiente de Rac1, tanto en células N1E-115 como en neuronas (van Leeuwen, Kain y cols., 1997; Ehler, van Leeuwen y cols., 1997; Fard, Kele, y cols., 2010).

En células diferenciadas durante 5 DIV y tratadas con roscovitina para inhibir la actividad quinasa de Cdk5/p35, disminuyó la cantidad de células que extendió neuritas y se redujo la longitud de las neuritas extendidas. Este resultado es coherente, pues se ha demostrado que la inhibición de la actividad de Cdk5/p35 en células post-mitóticas induce la reentrada al ciclo celular (Modi, Komaravelli y cols., 2012).

La abundancia de Tiam1 en el lisado también es menor en células tratadas con roscovitina en comparación a células diferenciadas y tratadas con DMSO. Esto no puede interpretarse como una disminución en la síntesis *de novo* o un aumento en la degradación de Tiam1 asociada a la inhibición de Cdk5; es más probable que la disminución de Tiam1 en el lisado se deba a la disminución en la proporción de células diferenciadas desde un 80% a un 37%. Además, nada permite suponer que el rol de Tiam1 es más tardío que el de Cdk5 en la diferenciación.

8.2 Cdk5/p35 promueve la fosforilación de Tiam1 y la activación de Rac1

El análisis de los niveles de fosforilación de serina en Tiam1 (C1199) demostró que el aumento en la actividad quinasa de Cdk5/p35 promueve la fosforilación de Tiam1. De acuerdo al análisis bioinformático que señala la presencia de cuatro residuos serina en la secuencia de Tiam1 que podrían ser fosforilados por Cdk5, y a que Tiam1 (C1199) carece de los 392 aminoácidos del extremo amino-terminal de Tiam1, donde se encuentran los residuos Ser219 y Ser358, es muy probable que la fosforilación ocurra al menos en uno de los residuos Ser1010 y Ser1466. Ambos han sido descritos como fosforilados en tejido cerebral, y sus puntajes calculados con la matriz PSSM son 0,6079 y 0,8598, que se pueden considerar altos (Bórquez, Olmos y cols., 2013).

Además, se demostró mediante *pulldown* que un aumento en la actividad de Cdk5/p35 promueve un aumento en la cantidad de Rac1 unido a CRIB en células que sobreexpresan HA-Tiam1 (C1199), el cual no tiene lugar si se inhibe la actividad quinasa de Cdk5 utilizando roscovitina.

El estudio preliminar de los mapas de FRET en neuronas transfectadas con Raichu-Rac sugiere que la ausencia de Cdk5 resulta en una disminución en la relación Rac1 activo / Rac1 inactivo. Como la abundancia total de Rac1 no varía en el ratón Cdk5 KO respecto al ratón silvestre (datos del laboratorio, sin publicar), la actividad global de Rac1 podría estar reducida en las neuronas del ratón carente de Cdk5.

8.3 El paradigma tradicional de Cdk5/p35 como efector de Rac1 debe ser revisado

Tradicionalmente se ha descrito a Cdk5 como un efector río abajo de Rac1 (Arimura y Kaibuchi, 2007), a partir de un trabajo de dos trabajos que demostraron que Cdk5/p25



cataliza la fosforilación del residuo Thr212 de PAKR299 (forma mutante inactiva de PAK1), que la interacción entre Cdk5 con el dominio quinasa de PAK1 inhibe la actividad quinasa de ésta sobre histona H4 y que tanto la asociación de Cdk5 con PAK1 como la fosforilación de la segunda, requieren la presencia de RacL61, una forma constitutivamente activa de Rac1, usando como modelo células COS-7. Paradójicamente, una mutante dominante negativa de Cdk5, Cdk5N144, también es capaz de asociarse a PAK1 e inhibirla, evidenciando que los eventos de asociación y fosforilación son independientes (Nikolic, Chou y cols., 1998; Rashid, Banerjee y cols., 2001). Sin embargo, investigaciones contemporáneas la unión de proteínas activadoras al dominio PBD favorecen la conformación abierta de PAK1, exponiendo el dominio KD a la interacción con otras proteínas, incluida Cdk5, y a la autofosforilación (Knaus, Wang y cols., 1998; Zenke, King y cols., 1999); por lo tanto, otros activadores de PAK1 –como Cdc42 o esfingosina– también podrían favorecer su interacción con Cdk5. Aún se requiere investigar en profundidad el efecto biológico de la interacción entre Cdk5 y PAK1, pues se ha propuesto que éstas y Rac1 están implicadas en funciones cognitivas, como la respuesta al miedo contextual en ratones (Sananbenesi, Fischer y cols., 2007).

Cdk5/p35 cataliza la fosforilación del residuo Ser478 en la región yuxtamembrana intracelular de TrkB, fundamental para que se produzca la interacción entre TrkB y Tiam1 tras el estímulo con BDNF y, consecuentemente, la fosforilación de Tiam1 que favorece su actividad GEF sobre Rac1, promoviendo la activación de ésta. Este mecanismo promueve la formación de dendritas (Cheung, Chin y cols., 2007) e induce la remodelación de espinas dendríticas (Lai, Wong y cols., 2012). También se ha reportado que Cdk5 fosforila a la proteína WAVE1 en los residuos Ser 310, Ser397 y

Ser441, y que esta fosforilación inhibe la polimerización de actina mediada por el complejo Arp2/3 (efector de la señalización Rac1 → WAVE1), promoviendo una disminución en la densidad de espinas dendríticas (Kim, Sung y cols., 2006).

También se sugirió que Cdk5 podría fosforilar a MAP1B e inhibir su actividad, pues la supresión de Cdk5 provoca una menor fosforilación de MAP1B en macroneuronas cerebelares (Pigino, Paglini y cols., 1997; Paglini, Pigino y cols., 1998). Sin embargo, se ha demostrado que la fosforilación en modo I de MAP1B es mediada por JNK y no por Cdk5/p35 durante el desarrollo cortical y que Cdk5/p25 puede fosforilar a MAP1B sólo en cerebros patogénicos (Kawauchi, Chihama y cols, 2005).

8.4 Modelo: Cdk5 promueve la activación de Rac1 a través de la fosforilación de su GEF específico, Tiam1

Los resultados mostrados en este Seminario de Título sugieren que la fosforilación de Tiam1 mediada por Cdk5/p35 (o una quinasa efectora) podría incrementar la actividad GEF de Tiam1 y, consecuentemente, promover la activación de Rac1 (Figura 15).

Ya se ha reportado que la fosforilación de Tiam1 en residuos serina, treonina y tirosina es un mecanismo que puede promover tanto su activación como su degradación en respuesta a diversos estímulos extracelulares (Boissier, Huynh-Do y cols., 2013). También existen antecedentes de mecanismos que promueven la actividad de Rac1 a través de la fosforilación directa de sus GEF mediada por Cdk5, como la fosforilación Kalirina-7 en el residuo Thr1590, que tiene lugar durante la remodelación de espinas dendríticas en neuronas corticales (Xin, Wang y cols., 2008).

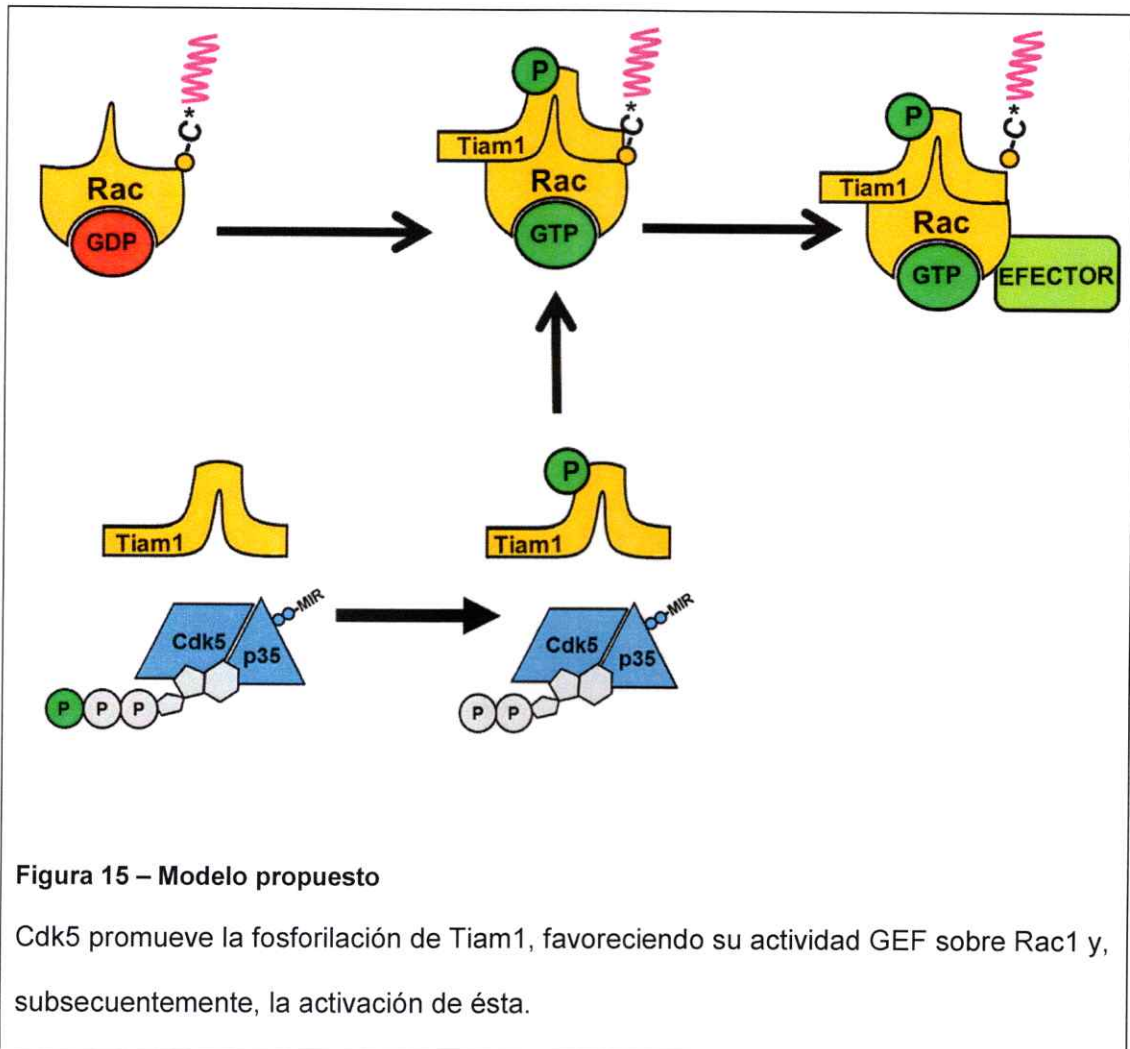


Figura 15 – Modelo propuesto

Cdk5 promueve la fosforilación de Tiam1, favoreciendo su actividad GEF sobre Rac1 y, subsecuentemente, la activación de ésta.

8.5 Proyecciones

Para ahondar en la comprensión de los mecanismos subyacentes a los eventos biológicos descritos, a futuro deberían considerarse los siguientes estudios:

- 1) Analizar si la pérdida o ganancia de función de Cdk5 afecta la avidéz o estabilidad de la asociación entre Tiam1 y Rac1; para ello, podrían replicarse las condiciones experimentales y efectuar un ensayo de *pulldown*, utilizando como "carnada" la proteína de fusión GST-RacG15A, forma mutante de Rac1 con afinidad elevada por sus GEFs habituales (García-Mata, Wennerberg y cols., 2006), y determinar la relación entre la cantidad de Tiam1 unida a RacG15A y la que está presente en el lisado.
- 2) Determinar si Cdk5/p35 cataliza directamente la fosforilación de Tiam1. El diseño experimental más eficiente es disponer de Tiam1 y Cdk5 purificadas y efectuar un ensayo enzimático en el que se mida la producción de Tiam1 fosforilada o la incorporación de ATP, si se dispone de ATP marcado con P^{32} . Si la fosforilación de Tiam1 es catalizada por Cdk5, será necesario establecer la posición exacta del residuo fosforilado. En nuestro laboratorio fueron diseñados cinco fragmentos de Tiam1, T1-5, que en conjunto abarcan la proteína completa. Dos de ellos, los fragmentos T4 (residuos 1000 a 1263) y T5 (residuos 1263 a 1591), contienen a Ser1020 y Ser1466, respectivamente (Henríquez, Bodaleo y cols., 2012). Si se analizan los niveles de fosforilación de cada fragmento en condiciones de pérdida y ganancia de función de Cdk5, usando un anticuerpo que reconozca serina fosforilada en un motivo consenso para Cdk's, podría determinarse la ubicación del residuo aceptor de la fosforilación.
- 3) Una vez determinada la posición de la fosforilación, corresponderá establecer si el reemplazo del residuo aceptor de la fosforilación por un aminoácido que no pueda ser

fosforilado afecta el metabolismo de Tiam1, su ubicación subcelular, su interacción con otras proteínas, su actividad GEF sobre Rac1, etc.

4) Finalmente, será necesario caracterizar espacial y temporalmente los roles biológicos de este mecanismo *in vivo* durante la diferenciación neuronal y su vinculación con señalizaciones extracelulares.

Un aspecto que podría mejorar ostensiblemente el análisis es la incorporación de un mejor modelo de pérdida de función de Cdk5 en neuronas. Roscovitina, a una concentración de 10-20 μM inhibe levemente la actividad de las quinasas de respuesta extracelular, Erk1-2 ($\text{IC}_{50} = 34 \mu\text{M}$) (Meijer, Borgne y cols., 1997), que en algunos contextos regulan la degradación de Tiam1 (Woodcock, Rooney y cols., 2009). Para evitar este efecto co-lateral, sería adecuado introducir en la neurona un vector que contenga DNA codificante para un interferente de RNA o una forma mutante dominante negativa de Cdk5. Este abordaje fue considerado en este Seminario, pero la baja eficiencia de transfección resta efectividad a este tipo de moléculas. La posibilidad de transducir vectores virales mejoraría bastante este parámetro. Otro aspecto a considerar es que la información relativa a los mecanismos de regulación post-traducciona l de la actividad de Cdk5 se va complejizando permanentemente y, junto con ella, la interpretación biológica de sus actividades neuronales. Por ejemplo, la fosforilación del residuo Tirosina 15 de Cdk5, que no es necesaria ni suficiente para la actividad quinasa de Cdk5/p35, sí es requerida para la participación de la holoquinasa en la regulación de la extensión de neuritas (Zukerberg, Patrick y cols., 2000); la extensión y retracción de espinas dendríticas (Lai, Wong y cols., 2012; Fu, Chen y cols., 2007); y la correcta formación y orientación de las dendritas (Cheung, Chin y cols., 2007; Sasaki, Cheng y cols., 2002). Otros

antecedentes recientes sugieren que la secuencia del *cluster* de lisina en el segmento p10, variable entre p35 y p39, podría restringir espacialmente la accesibilidad de Cdk5 a sus sustratos dependiendo del activador al que está unido (Asada, Saito y cols., 2012). Por lo tanto, será muy importante que futuras investigaciones esclarezcan si la fosforilación de Cdk5 o su unión a p39 (en lugar de p35) afecta su capacidad para promover la fosforilación de Tiam1.

9. CONCLUSIONES

- i) La abundancia de Cdk5, p35 y Tiam1 aumenta durante la diferenciación neuronal en neuroblastoma N1E-115.
- ii) La inhibición de la actividad de Cdk5 afecta la extensión de neuritas en neuroblastomas N1E-115 diferenciados
- iii) El incremento de la actividad quinasa de Cdk5/p35 promueve la fosforilación de Tiam1 en células COS-7.
- iv) El incremento de la actividad quinasa de Cdk5/p35 induce un aumento en la actividad de Rac1 en células COS-7 y, análogamente, se observa una disminución en la actividad local de Rac1 en neuronas de ratones Cdk5 KO en comparación a animales *wild type*.

10. REFERENCIAS

- Ahlijanian, M., Barrezueta, N. y colaboradores (2000). "Hyperphosphorylated tau and neurofilament and cytoskeletal disruptions in mice overexpressing human p25, an activator of cdk5." Proc Natl Acad Sci USA. 97(6): 2910-2915.
- Amano, T., Richelson, E. y colaboradores (1972). "Neurotransmitter synthesis by neuroblastoma clones (neuroblast differentiation-cell culture-choline acetyltransferase-acetylcholinesterase-tyrosine hydroxylase-axons-dendrites)." Proc Natl Acad Sci USA. 69(1): 258-263.
- Arimura, N. y Kaibuchi, K. (2007). "Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms." Nat Rev Neurosci. 8(3): 194-205.
- Asada, A., Saito, T. y colaboradores (2012). "Phosphorylation of p35 and p39 by Cdk5 determines the subcellular location of the holokinase in a phosphorylation-site-specific manner." J Cell Sci 125(Pt 14): 3421-3429.
- Asada, A., Yamamoto, N. y colaboradores (2008). "Myristoylation of p39 and p35 is a determinant of cytoplasmic or nuclear localization of active cyclin-dependent kinase 5 complexes." J Neurochem. 106(3): 1325-1336.
- Boissier, P., Huynh-Do, U. (2014). "The guanine nucleotide exchange factor Tiam1: a Janus-faced molecule in cellular signaling." J Cell Signal. 26(3):483-91.
- Bórquez, D., Olmos, C. y colaboradores (2013). "Bioinformatic survey for new physiological substrates of Cyclin-dependent kinase 5." Genomics 101(4): 221-228.
- Bustelo, X.R., Sauzeau, V. y Berenjano, I.M. (2007). "GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo." Bioessays 29(4):356-70.
- Chae, T., Kwon, Y. y colaboradores (1997). "Mice lacking p35, a neuronal specific activator of Cdk5, display cortical lamination defects, seizures, and adult lethality." Neuron.
- Cheng, P. -i. y Poo, M. -m. (2012). "Early events in axon/dendrite polarization." Annu Rev Neurosci. 35: 181-201.

- Cheung, Z., W. Chin, y colaboradores (2007). "Cdk5 is involved in BDNF-stimulated dendritic growth in hippocampal neurons." PLoS Biol. 5(4).
- Connolly, B., Rice, J. y colaboradores (2005). "Tiam1-IRSp53 complex formation directs specificity of rac-mediated actin cytoskeleton regulation." Mol Cell Biol. 25(11): 4602-4614.
- Dotti, C., Sullivan, C. y colaboradores (1988). "The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture." J Neurosci. 8(4): 1454-1468.
- Edwards, D., Sanders, L. y colaboradores (1999). "Activation of LIM-kinase by PAK1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics." Nat Cell Biol. 1(5): 253-259.
- Ehler, E., van Leeuwen, F. y colaboradores (1997). "Expression of Tiam-1 in the developing brain suggests a role for the Tiam-1-Rac signaling pathway in cell migration and neurite outgrowth." Mol Cell Neurosci. 9(1): 1-12.
- Fard, S. S., Kele, J. y colaboradores (2010). "Tiam1 as a signaling mediator of nerve growth factor-dependent neurite outgrowth." PloS One. 5(3): e9647.
- Fath, T., Ke, Y. y colaboradores (2009). "Primary support cultures of hippocampal and substantia nigra neurons." Nat Protoc. 4(1): 78-85.
- Fu, W. -Y., Chen, Y. y colaboradores (2007). "Cdk5 regulates EphA4-mediated dendritic spine retraction through an ephexin1-dependent mechanism." Nat Neurosci. 10(1): 67-76.
- Furmanski, P., Silverman, D. J. y colaboradores (1971). "Expression of differentiated functions in mouse neuroblastoma mediated by dibutyryl-cyclic adenosine monophosphate." Nature. 233(5319): 413-415.
- García-Mata, R., Wennerberg, K. y colaboradores (2006). "Analysis of activated GAPs and GEFs in cell lysates." Methods Enzymol. 406: 425-437.
- Gonzalez-Billault, C., Avila, J. y colaboradores (2001). "Evidence for the role of MAP1B in axon formation." Mol Biol Cell. 12(7):2087-98

- Habets, G., Scholtes, E. y colaboradores (1994). "Identification of an invasion-inducing gene, Tiam-1, that encodes a protein with homology to GDP-GTP exchangers for Rho-like proteins." Cell. 77(4): 537-549.
- Hayashi, K. (2002). "PAK1 Is Involved in Dendrite Initiation as a Downstream Effector of Rac1 in Cortical Neurons." Mol Cell Neurosci. 20(4):579-94
- Henríquez, D., Bodaleo, F. y colaboradores (2012). "The light chain 1 subunit of the microtubule-associated protein 1B (MAP1B) is responsible for Tiam1 binding and Rac1 activation in neuronal cells." PLoS One. 7(12):e53123.
- Hisanaga, S. y Saito, T. (2003). "The regulation of cyclin-dependent kinase 5 activity through the metabolism of p35 or p39 Cdk5 activator." Neurosignals. 12(4-5): 221-229.
- Humbert, S., Dhavan, R. y colaboradores (2000). "p39 activates cdk5 in neurons, and is associated with the actin cytoskeleton." J Cell Sci. 113 (Pt 6): 975-983.
- Ino, H., Ishizuka, T. y colaboradores (1994). "Expression of CDK5 (PSSALRE kinase), a neural cdc2-related protein kinase, in the mature and developing mouse central and peripheral nervous systems." Brain Res. 661(1-2):196-206
- Itoh, R. E., Kurokawa, K. y colaboradores (2002). "Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells." Mol Cell Biol 22(18):6582-91
- Jacobs, T., Causeret, F. y colaboradores (2007). "Localized activation of p21-activated kinase controls neuronal polarity and morphology." J Neurosci. 27(32): 8604-8615.
- Jessberger, S., Gage, F. H., Eisch, A. J., Lagace, D.C. (2009). "Making a neuron: Cdk5 in embryonic and adult neurogenesis". Trends Neurosci. 32(11):575-82.
- Johnsson A. K., Dai, Y. y colaboradores (2014). "The Rac-FRET mouse reveals tight spatiotemporal control of Rac activity in primary cells and tissues." Cell Rep. 6(6):1153-64.
- Kaech, S. y Banker, G. (2006). "Culturing hippocampal neurons." Nat Protoc. 1(5): 2406-2415.

- Kawauchi, T., Chihama, K., y colaboradores (2005). "MAP1B phosphorylation is differentially regulated by Cdk5/p35, Cdk5/p25, and JNK." Biochem Biophys Res Commun 331(1):50-5
- Kim, Y., Sung, J. y colaboradores (2006). "Phosphorylation of WAVE1 regulates actin polymerization and dendritic spine morphology." Nature, 442(7104): 814-817.
- Knaus, U. G., Wang, Y., y colaboradores (1998). "Structural Requirements for PAK Activation by Rac GTPases." J Biol Chem, 273.
- Ko, J., Humbert, S. y colaboradores (2001). "p35 and p39 are essential for cyclin-dependent kinase 5 function during neurodevelopment." J Neurosci, 21(17): 6758-6771.
- Kranenburg, O., Scharnhorst, V. y colaboradores (1995). "Inhibition of cyclin-dependent kinase activity triggers neuronal differentiation of mouse neuroblastoma cells." J Cell Biol, 131(1): 227-234.
- Kumazawa, A., Mita, N. y colaboradores (2013). "Cyclin-dependent kinase 5 is required for normal cerebellar development." Mol Cell Neurosci, 52: 97-105.
- Kunda, P., Paglini, G. y colaboradores (2001). "Evidence for the involvement of Tiam1 in axon formation." J Neurosci, 21(7): 2361-2372.
- Lai, K. -O., Wong, A. y colaboradores (2012). "TrkB phosphorylation by Cdk5 is required for activity-dependent structural plasticity and spatial memory." Nat Neurosci, 15(11): 1506-1515.
- Lambert, J., Lambert, Q. y colaboradores (2002). "Tiam1 mediates Ras activation of Rac by a PI(3)K-independent mechanism." Nat Cell Biol, 4(8): 621-625.
- Leeuwen, F. N., Kain, H. E. y colaboradores (1997). "The guanine nucleotide exchange factor Tiam1 affects neuronal morphology; opposing roles for the small GTPases Rac and Rho." J Cell Biol, 139(3):797-807
- Lew, J., Beaudette, K. y colaboradores (1992). "Purification and characterization of a novel proline-directed protein kinase from bovine brain." J Biol Chem, 267(19): 13383-13390.

- Lew, J., Huang, Q. y colaboradores (1994). "A brain-specific activator of cyclin-dependent kinase 5." Nature, 371(6496): 423-426.
- Lu K. P., Liou Y. C. y colaboradores (2002). "Pinning down proline-directed phosphorylation signaling." Trends Cell Biol. 12(4):164-72
- Manser, E., Leung, T. y colaboradores (1994). "A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1." Nature, 367(6458): 40-46.
- Matsuo, N., Terao, M. y colaboradores (2003). "Roles of STEF/Tiam1, guanine nucleotide exchange factors for Rac1, in regulation of growth cone morphology." Mol Cell Neurosci. 24(1): 69-81.
- Meijer, L., Borgne, A. y colaboradores (1997). "Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5." Eur J Biochem 243(1-2): 527-536.
- Ménard, L., Tomhave, E. y colaboradores (1992). "Rac1, a low-molecular-mass GTP-binding-protein with high intrinsic GTPase activity and distinct biochemical properties." Eur J Biochem 206(2):537-46.
- Mertens, A. E., Roovers, R. C. y colaboradores (2003). "Regulation of Tiam1-Rac signalling." FEBS Lett 546(1): 11-16.
- Meyerson, M., Enders, G. y colaboradores (1992). "A family of human cdc2-related protein kinases." EMBO J. 11(8): 2909-2917.
- Michiels, F., Habets, G. y colaboradores (1995). "A role for Rac in Tiam1-induced membrane ruffling and invasion." Nature, 375(6529): 338-340.
- Michiels, F., Stam, J. y colaboradores (1997). "Regulated membrane localization of Tiam1, mediated by the NH2-terminal pleckstrin homology domain, is required for Rac-dependent membrane ruffling and C-Jun NH2-terminal kinase activation." J Cell Biol. 137(2): 387-398.
- Miki, H., Yamaguchi, H. y colaboradores (2000). "IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling." Nature, 408(6813): 732-735.

- Minegishi, S., Asada, A. y colaboradores (2010). "Membrane association facilitates degradation and cleavage of the cyclin-dependent kinase 5 activators p35 and p39." Biochemistry, 49(26): 5482-5493.
- Miyamoto, Y., Yamauchi, J. y colaboradores (2006). "TrkB binds and tyrosine-phosphorylates Tiam1, leading to activation of Rac1 and induction of changes in cellular morphology." Proc Natl Acad Sci USA, 103(27): 10444-10449.
- Modi, P. K., Komaravelli, N. y colaboradores (2012). "Interplay between MEK-ERK signaling, cyclin D1, and cyclin-dependent kinase 5 regulates cell cycle reentry and apoptosis of neurons." Mol Biol Cell, 23(18):3722-30
- Montenegro-Venegas, C., Tortosa, E. y colaboradores (2010). "MAP1B regulates axonal development by modulating Rho-GTPase Rac1 activity." Molecular Biol Cell, 21(20): 3518-3528.
- Mullins, R., Heuser, J. y colaboradores (1998). "The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments." Proc Natl Acad Sci USA, 95(11): 6181-6186.
- Nakayama, A., Harms, M. y colaboradores (2000). "Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons." J Neurosci, 20(14): 5329-5338.
- Nikolic, M., Chou, M. y colaboradores (1998). "The p35/Cdk5 kinase is a neuron-specific Rac effector that inhibits PAK1 activity." Nature, 395(6698): 194-198.
- Nikolic, M., Dudek, H. y colaboradores (1996). "The cdk5/p35 kinase is essential for neurite outgrowth during neuronal differentiation." Genes Dev, 10(7):816-25.
- Nishimura, T., Yamaguchi, T. y colaboradores (2005). "PAR-6-PAR-3 mediates Cdc42-induced Rac activation through the Rac GEFs STEF/Tiam1." Nat Cell Biol, 7(3): 270-277.
- Obenauer, J., Cantley, L. y colaboradores (2003). "Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs." Nucleic Acids Res, 31(13): 3635-3641.

- Ohshima, T., Kozak, C. y colaboradores (1996). "Molecular cloning and chromosomal mapping of the mouse gene encoding cyclin-dependent kinase 5 regulatory subunit p35." Genomics. 35(2): 372-375.
- Ohshima, T., Ward, J. y colaboradores (1996). "Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death." Proc Natl Acad Sci USA. 93(20): 11173-11178.
- Paglini, G., Peris, L. y colaboradores (2001). "The Cdk5-p35 kinase associates with the Golgi apparatus and regulates membrane traffic." EMBO Rep. 2(12): 1139-1144.
- Paglini, G., Pigino, G. y colaboradores (1998). "Evidence for the participation of the neuron-specific CDK5 activator P35 during laminin-enhanced axonal growth." J Neurosci. 18(23): 9858-9869.
- Patrick, G., Zhou, P. y colaboradores (1998). "p35, the neuronal-specific activator of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) is degraded by the ubiquitin-proteasome pathway." J Biol Chem. 273(37): 24057-24064.
- Patrick, G., Zukerberg, L. y colaboradores (1999). "Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration." Nature. 402(6762): 615-622.
- Patzke, H. and Tsai, L. H. (2002). "Calpain-mediated cleavage of the cyclin-dependent kinase-5 activator p39 to p29." J Biol Chem. 277(10): 8054-8060.
- Peterson, D., Ando, D. y colaboradores (2010). "No difference in kinetics of tau or histone phosphorylation by CDK5/p25 versus CDK5/p35 in vitro." Proc Natl Acad Sci USA. 107(7): 2884-2889.
- Pigino, G., Paglini, G. y colaboradores (1997). "Analysis of the expression, distribution and function of cyclin dependent kinase 5 (cdk5) in developing cerebellar macroneurons." J Cell Sci. 110 (Pt 2): 257-270.
- Polakis, P., Weber, R. y colaboradores (1989). "Identification of the ral and rac1 gene products, low molecular mass GTP-binding proteins from human platelets." J Biol Chem. 264(28):16383-9

- Poon, R. Y. C., Lew, J. y colaboradores (1997). "Identification of Functional Domains in the Neuronal Cdk5 Activator Protein." J Biol Chem. 272(9):5703-8.
- Prasad, K. N. (1991). "Differentiation of neuroblastoma cells: a useful model for neurobiology and cancer." Biol Rev Camb Philos Soc. 66(4): 431-451.
- Prasad, K. N. y Sheppard J. R. (1972). "Neuroblastoma cell culture: membrane changes during cyclic AMP-induced morphological differentiation." Proc Soc Exp Biol Med. 141(1): 240-243.
- Qiu, R., Chen, J. y colaboradores (1995). "An essential role for Rac in Ras transformation." Nature. 374(6521): 457-459.
- Rashid, T., Banerjee, M. y colaboradores (2001). "Phosphorylation of PAK1 by the p35/Cdk5 kinase affects neuronal morphology." J Biol Chem. 276(52): 49043-49052.
- Ridley, A., Paterson, H. y colaboradores (1992). "The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling." Cell. 70(3): 401-410.
- Sananbenesi, F., Fischer, A. y colaboradores (2007). "A hippocampal Cdk5 pathway regulates extinction of contextual fear." Nat Neurosci. 10(8):1012-9
- Sarniere, P. y Bamburg, J. (2004). "Regulation of the neuronal actin cytoskeleton by ADF/cofilin." J Neurobiol. 58(1): 103-117.
- Sasaki, Y., Cheng, C. y colaboradores (2002). "Fyn and Cdk5 mediate semaphorin-3A signaling, which is involved in regulation of dendrite orientation in cerebral cortex." Neuron. 35(5): 907-920.
- Suetsugu, S., Kurisu, S. y colaboradores (2006). "Optimization of WAVE2 complex-induced actin polymerization by membrane-bound IRSp53, PIP(3), and Rac." J Cell Biol. 173(4): 571-585.
- Sugihara, K., Nakatsuji, N. y colaboradores (1998). "Rac1 is required for the formation of three germ layers during gastrulation." Oncogene. 17(26): 3427-3433.
- Tahirovic, S., Hellal, F. y colaboradores (2010). "Rac1 regulates neuronal polarization through the WAVE complex." J Neurosci. 30(20): 6930-6943.

- Tang, D., Yeung, J. y colaboradores (1995). "An isoform of the neuronal cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) activator." J Biol Chem.270(45): 26897-26903.
- Tarricone, C., Dhavan, R. y colaboradores (2001). "Structure and regulation of the CDK5-p25(nck5a) complex." Mol Cell. 8(3): 657-669.
- Ten Klooster, J., Evers, E. y colaboradores (2006). "Interaction between Tiam1 and the Arp2/3 complex links activation of Rac to actin polymerization." Biochem J. 397(1): 39-45.
- Threadgill, R., Bobb, K. y colaboradores (1997). "Regulation of dendritic growth and remodeling by Rho, Rac, and Cdc42." Neuron. 19(3): 625-634.
- Tortosa, E., Montenegro-Venegas, C. y colaboradores (2011). "Microtubule-associated protein 1B (MAP1B) is required for dendritic spine development and synaptic maturation." J Biol Chem. 286(47):40638-48.
- Tsai, L., Delalle, I. y colaboradores (1994). "p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5." Nature. 371(6496): 419-423.
- Utreras, E., Maccioni, R. y colaboradores (2009). "Cyclin-dependent kinase 5 activator p35 over-expression and amyloid beta synergism increase apoptosis in cultured neuronal cells." Neuroscience. 161(4):978-87.
- van Leeuwen, F. N., Kain, H. E. y colaboradores (1997). "The guanine nucleotide exchange factor Tiam1 affects neuronal morphology; opposing roles for the small GTPases Rac and Rho." J Cell Biol. 139(3):797-807
- van Leeuwen, F. N., van der Kammen, R. A. y colaboradores (1995). "Oncogenic activity of Tiam1 and Rac1 in NIH3T3 cells." Oncogene. 11(11): 2215-2221.
- Vidal, C., Geny, B. y colaboradores (2002). "Cdc42/Rac1-dependent activation of the p21-activated kinase (PAK) regulates human platelet lamellipodia spreading: implication of the cortical-actin binding protein cortactin." Blood. 100(13): 4462-4469.
- Woodcock, S. A., Rooney, C., y colaboradores (2009). "SRC-induced disassembly of adherens junctions requires localized phosphorylation and degradation of the rac activator tiam1." Mol Cell. 33(5):639-53

- Worthylake, D., Rossman, K. y colaboradores (2000). "Crystal structure of Rac1 in complex with the guanine nucleotide exchange region of Tiam1." Nature. 408(6813): 682-688.
- Xin, X., Wang, Y. y colaboradores (2008). "Regulation of Kalirin by Cdk5." J Cell Sci. 121(Pt 15):2601-11.
- Yamada, M., Saito, T. y colaboradores (2007). "Cdk5-p39 is a labile complex with the similar substrate specificity to Cdk5-p35." J Neurochem. 102(5): 1477-1487.
- Yoo, S., Kim, Y. y colaboradores (2012). "A gene trap knockout of the Tiam-1 protein results in malformation of the early embryonic brain." Mol Cells. 34(1): 103-108.
- Young, T. K. y Tsai, L. (1998). "A novel disruption of cortical development in p35^{-/-} mice distinct from reeler." J Comp Neurol. 395.
- Zenke, F. T., King, C. C., y colaboradores (1999). "Identification of a Central Phosphorylation Site in p21-activated Kinase Regulating Autoinhibition and Kinase Activity." J Biol Chem. 274.
- Zhang, H. y Macara, I. (2006). "The polarity protein PAR-3 and TIAM1 cooperate in dendritic spine morphogenesis." Nat Cell Biol. 8(3): 227-237.
- Zheng, M., Leung, C. y colaboradores (1998). "Region-specific expression of cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) and its activators, p35 and p39, in the developing and adult rat central nervous system." J Neurobiol. 35(2): 141-159.
- Zukerberg, L. R., Patrick, G. N. y colaboradores (2000). "Cables links Cdk5 and c-Abl and facilitates Cdk5 tyrosine phosphorylation, kinase upregulation, and neurite outgrowth." Neuron. 26(3):633-46.