

UCH-FC  
DOC-BMG/N  
U92  
c.1

**PARTICIPACIÓN DE P35, ACTIVADOR  
NEUROESPECÍFICO DE CDK5, EN LA MUERTE  
CELULAR INDUCIDA POR EL PÉPTIDO BETA  
AMIELOIDE.  
ASPECTOS CELULARES Y MOLECULARES**

**TESIS  
ENTREGADA A LA  
UNIVERSIDAD DE CHILE  
EN CUMPLIMIENTO PARCIAL DE LOS REQUISITOS  
PARA OPTAR AL GRADO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR,  
CELULAR Y NEUROCIENCIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**POR**

**ELÍAS SAMUEL UTRERAS PURATICH**

**JULIO, 2006**



**Director de Tesis: Dr. Christian González Billault  
Co-Director de Tesis: Dr. Ricardo Maccioni Baraona**

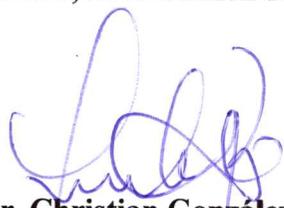
**FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACION  
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

**ELÍAS SAMUEL UTRERAS PURATICH**

ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencia, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 15 de Junio de 2006.



**Prof. Dr. Christian González Billault**  
Director de Tesis  
Facultad de Ciencias  
Universidad de Chile

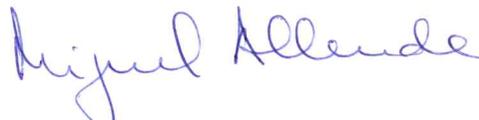


**Prof. Ricardo Maccioni Baraona**  
Co-Director de Tesis  
Facultad de Medicina  
Universidad de Chile

Comisión Evaluadora de la Tesis

*C. Vergara*  
**Prof. Dra. Cecilia Vergara**  
Presidenta Comisión

**Prof. Dra. Ana María Cárdenas**

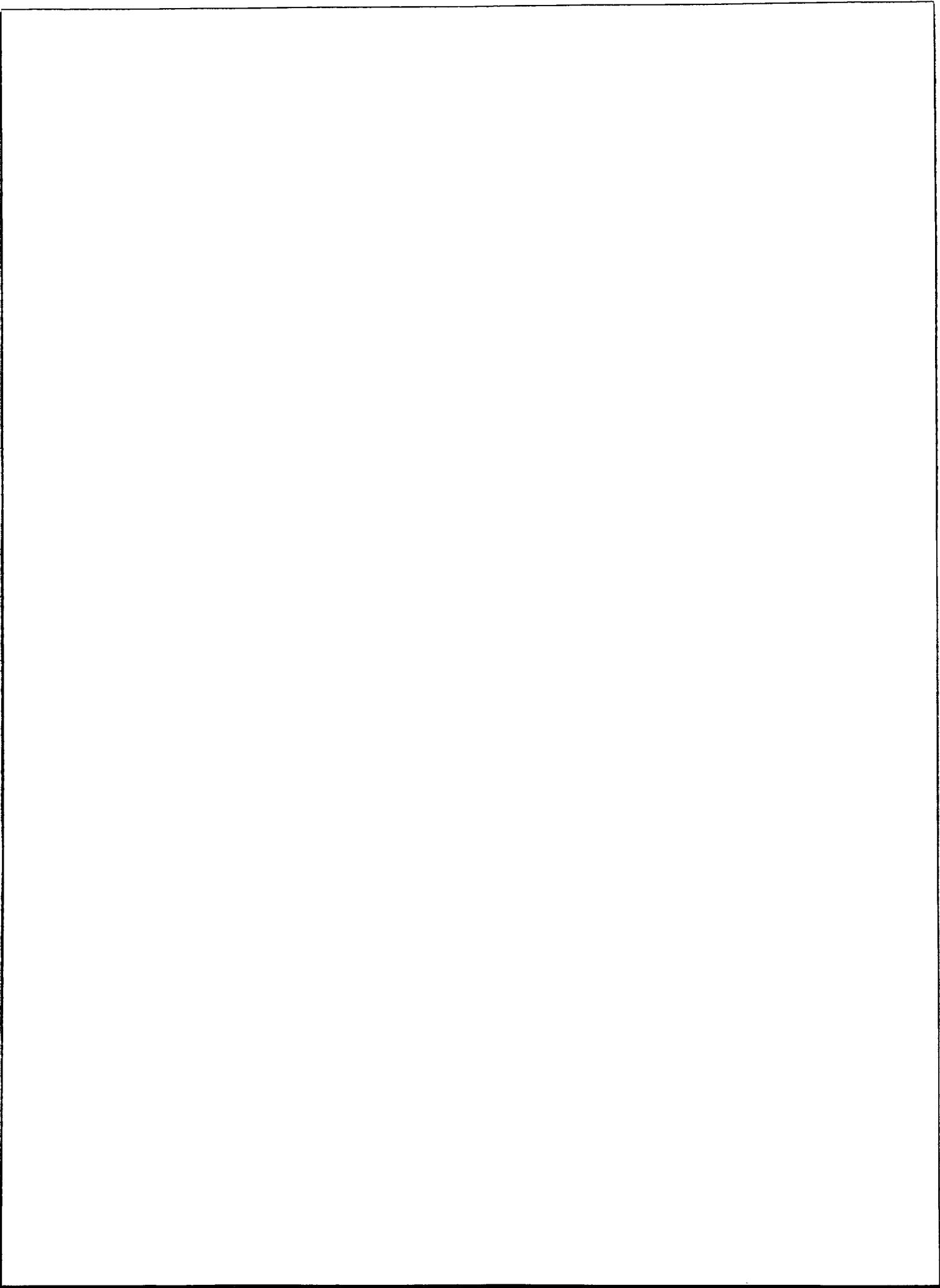


**Prof. Dr. Miguel Allende**

**Prof. Dr. Francisco Aboitiz**

## **FUENTES DE FINANCIAMIENTO**

Este trabajo fue posible gracias al financiamiento proporcionado por Proyecto FONDECYT Post-Doctoral 3010060 Dr. Christian González, Proyecto Fundación Andes C-14060/12 Dr. Christian González, Proyecto DID 03/02-2 Dr. Christian González, Beca CONICYT e Instituto Milenio de Estudios Avanzados CBB.



*... esta tesis se la dedico a las dos mujeres que más quiero en esta vida, mi madre y mi esposa ...*

## BIOGRAFÍA



Mi nombre es Elías Samuel Utreras Puratich. Nací en Santiago el 25 de Diciembre de 1974. Tengo 31 años de edad. Mi enseñanza básica la estudié en la Escuela Municipal D-568 y la enseñanza media la estudié en el Liceo A N°9 de Aplicación. Luego de rendir la Prueba de Aptitud Académica en 1992, ingresé a la carrera de Licenciatura en Bioquímica en la Universidad de Santiago de Chile. En el año 1996 entré al laboratorio de Inmunología de la Reproducción para hacer mi tesis de pregrado bajo dirección de la Dra. Mónica Imarai.

El tema de mi tesis fue “Expresión y Regulación de la Molécula de Adhesión Intercelular 1 (ICAM-1) en el Epitelio Oviductal Humano”. Durante mi estancia en este laboratorio publiqué dos trabajos, uno perteneciente a mi tesis de pregrado y el otro relacionado al trabajo de ese laboratorio. Luego realicé mi práctica profesional en el laboratorio de Endocrinología de la Pontificia Universidad Católica de Chile (PUC) en la “Caracterización de Isoformas de la Hormona FSH”, bajo la dirección del Dr. Horacio Croxato. En el año 1999, obtuve mi título Profesional de Bioquímico, y mi grado académico de Licenciado en Bioquímica. Ese mismo año, ingresé al laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Endocrinología de la PUC y trabajé como ayudante de Investigación por 2 años en la “Expresión y Regulación de las Conexinas 43 y 26 en el Epitelio Oviductal de la Rata”, también bajo la dirección del Dr. Horacio Croxato. En el año 2001 ingresé al Programa de Doctorado en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias. Después de rendir mi examen de calificación, realicé mi Tesis de Doctorado en el Laboratorio de Neurociencias bajo la dirección del Dr. Christian González Billault. El título de mi tesis fue “Participación de p35, Activador Neuroespecífico de Cdk5, en la Muerte Celular Inducida por el Péptido Beta-Amiloide. Aspectos Celulares y Moleculares”. Por último, el 21 de Enero del año 2006 me casé con una mujer maravillosa, Isabel, y juntos emprenderemos viaje hacia Washington DC, Estados Unidos, para realizar un post-doctorado en el Instituto Nacional de Salud (NIH).

## AGRADECIMIENTOS

*Esta parte de la tesis siempre es complicada de escribir pero trataré de ser justo y agradecer a cada uno de las personas que fueron importantes e influyentes en este trabajo.*

*En primer lugar quiero agradecer a mi tutor, Dr. Christian González, por haber confiado en mí y por permitirme realizar mi tesis en su laboratorio. Gracias por todos tus consejos y por brindarme tu apoyo y conocimiento en todas las etapas de esta tesis.*

*También quiero agradecer al Dr. Ricardo Maccioni por su apoyo y por la infraestructura necesaria para poder desarrollar mi tesis.*

*Agradezco a mi comisión de tesis por sus recomendaciones y sugerencias que mejoraron esta tesis. En especial a la Dra. Cecilia Vergara por su acucioso trabajo de revisión y por su rapidez en la entrega de las correcciones.*

*Quiero agradecer además a mis compañeros y amigos que ya se han ido y a los que todavía quedan en el laboratorio. A, Claudita, Paula, JP, Ruben, Hans, Daniel, Felipe, Tomás, RQ, Marcela, Claudio, Pablito Muñoz, Karel, Lorena S., Chinito, Jaime, Sergio, y a tantos otros que me quedan en el tintero con los que he compartido estos entretenidos 5 años de mi vida. Gracias por su amistad, ayuda, carretes, presencia, apoyo y por los innumerables momentos que compartimos. Espero verlos en un futuro cercano, aquí o en cualquier parte del mundo.*

*Ahora quiero agradecer a los nuevos integrantes del Laboratorio de Neurociencias. A Vicente, Nancy, Pamela, Erick, Juan y Seba. Sigán adelante en el lab y obtengan muy buenos resultados.*

*Quiero agradecer a una mujer muy especial, a mi madre por su fe en Dios y su apoyo espiritual en todos los desafíos a los que me he enfrentado. Gracias por ser tan especial. También agradezco a mis hermanos, Ana, Pablo y David por su apoyo en todos estos años de mi vida.*

*Por último, y no menos importante quiero agradecer a mi mujer, Isabel por ser mi fuente de admiración e inspiración. Gracias por creer en mí.*

*Finalmente, todo lo que soy se lo agradezco a DIOS, que para mí es La Fuerza Creadora de la Vida ...*

## ÍNDICE DE MATERIAS

	página
ÍNDICE DE MATERIAS.....	<i>i-iv</i>
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	<i>v-vi</i>
ABREVIATURAS.....	<i>vii</i>
1.- RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
2.- INTRODUCCIÓN.....	5
2.1.- La Enfermedad de Alzheimer.....	5
2.1.1.- Perspectiva Histórica.....	5
2.1.2.- Etiopatología y Epidemiología.....	5
2.1.3.- Anatomía Patológica.....	6
2.2.- La Proteína tau.....	10
2.3.- La Quinasa Cdk5.....	11
2.3.1.- Características del Complejo Cdk5/p35.....	12
2.3.2.- Regulación de la Cdk5.....	12
2.3.3.- Expresión Espacial y Temporal de p35 y p39.....	13
2.3.4.- Localización de p35 y p39.....	14
2.3.5.- Degradación de p35.....	14
2.3.6.- Regulación transcripcional de p35 y Cdk5.....	15
2.4.- Funciones del Complejo Cdk5/p35.....	16

<b>2.4.1.- Migración Neuronal.....</b>	<b>16</b>
<b>2.4.2.- Dinámica de Actina.....</b>	<b>17</b>
<b>2.4.3.- Estabilidad y Transporte de MT.....</b>	<b>18</b>
<b>2.4.4.- Adhesión Celular.....</b>	<b>19</b>
<b>2.4.5.- Guía Axonal.....</b>	<b>20</b>
<b>2.4.6.- Estructura Sináptica.....</b>	<b>20</b>
<b>2.4.7.- Endocitosis.....</b>	<b>21</b>
<b>2.4.8.- Memoria y Aprendizaje.....</b>	<b>22</b>
<b>2.4.9.- Apoptosis.....</b>	<b>23</b>
<b>2.4.10.- Dolor.....</b>	<b>23</b>
<b>2.5.- Modelos Genéticos para Cdk5 y p35.....</b>	<b>24</b>
<b>2.5.1.- Ratones Transgénicos para Cdk5.....</b>	<b>24</b>
<b>2.5.2.- Ratones Transgénicos para p25.....</b>	<b>25</b>
<b>2.5.3.- Ratones Transgénicos para p35.....</b>	<b>26</b>
<b>2.6.- Desregulación de Cdk5 y Neurodegeneración.....</b>	<b>27</b>
<b>3.- HIPÓTESIS.....</b>	<b>30</b>
<b>4.- OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>31</b>
<b>4.1.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>31</b>
<b>5.- MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
<b>5.1.- MATERIALES.....</b>	<b>32</b>
<b>5.1.1.- Material Biológico.....</b>	<b>32</b>
<b>5.1.2.- Reactivos Químicos y de Cultivo Celular.....</b>	<b>32</b>
<b>5.2.- MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
<b>5.2.1.- Cultivo Celular.....</b>	<b>33</b>

<b>5.2.2.- Clonación de p35 en el Vector BiTetO-EGFP.....</b>	<b>33</b>
<b>5.2.3.- Transfección de Líneas Celulares.....</b>	<b>34</b>
<b>5.2.4.- Preparación de Extractos de Proteínas Para Estudios de Inmunodetección e Inmunoprecipitación .....</b>	<b>34</b>
<b>5.2.5.- Inmunodetección.....</b>	<b>35</b>
<b>5.2.6.- Inmunoprecipitación.....</b>	<b>36</b>
<b>5.2.7.- Ensayo de Actividad de Cdk5.....</b>	<b>36</b>
<b>5.2.8.- Inmunofluorescencia.....</b>	<b>37</b>
<b>5.2.9.- Extracción de DNA Genómico de Colas de Ratón.....</b>	<b>37</b>
<b>5.2.10.- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....</b>	<b>38</b>
<b>5.2.11.- Extracción de RNA Total y RT-PCR.....</b>	<b>39</b>
<b>5.2.12.- Southern blot.....</b>	<b>39</b>
<b>5.2.13.- Transfecciones Simples, Dobles y Triples de Neuronas Hipocampales de Ratón.....</b>	<b>40</b>
<b>5.2.14.- Agregación del Péptido <math>\beta</math>-Amiloide.....</b>	<b>41</b>
<b>5.2.15.- Ensayo de Citotoxicidad.....</b>	<b>41</b>
<b>5.2.16.- Estadística.....</b>	<b>42</b>
<b>6.- RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
<b>6.1.- GENERACIÓN DE UN RATÓN TRANSGÉNICO CONDICIONAL.....</b>	<b>43</b>
<b>6.1.1.- Sistema de Expresión Condicional (tet-off).....</b>	<b>43</b>
<b>6.1.2.- Clonamiento de cDNA de p35 en el Vector de Expresión Condicional.....</b>	<b>45</b>
<b>6.1.3.- Transfección del Vector BiTetO en Células N<sub>2</sub>A-tTA.....</b>	<b>48</b>
<b>6.1.4.- Preparación del Vector BiTetO-p35/EGFP Para la Microinyección.....</b>	<b>54</b>

6.1.5.- Microinyección del Vector BiTetO-p35/EGFP.....	56
6.2.- CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LOS ANIMALES.....	56
6.2.1.- Genotipificación por PCR.....	56
6.2.2.- Genotipificación por <i>Southern blot</i> .....	58
6.2.3.- Mantención de las Colonias y Cruces de Animales.....	62
6.3.- CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS ANIMALES.....	62
6.3.1.- Análisis de Expresión de los Transgenes.....	62
6.3.2.- Análisis de Expresión y Fosforilación de tau en Animales Dobles Transgénicos.....	66
6.4.1.- Expresión del Transactivador.....	71
6.4.2.- Accesibilidad del Transgén BiTetO-p35/EGFP al tTA.....	74
6.4.3.- Porcentaje de metilación del transgén.....	74
6.5.- RELACIÓN ENTRE EL Ab Y LA VÍA Cdk5/p35.....	76
6.5.1.- Ensayo de Citotoxicidad de células N <sub>2</sub> A Transfectadas con BitetO-p35/EGFP y tTA y Tratadas con A $\beta$ .....	78
6.5.2.- Ensayo de Citotoxicidad de Neuronas Hipocampales Transfectadas con BiTetO-p35/EGFP y tTA y Tratadas con A $\beta$ .....	78
6.5.3.- Reversibilidad de la Sobreexpresión de p35 en Neuronas Hipocampales tratadas con A $\beta$ .....	84
7.- DISCUSIÓN.....	90
8.- CONCLUSIONES.....	116
9.- BIBLIOGRAFÍA.....	118

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	página
<b>Figura 1:</b> Historia de la Enfermedad de Alzheimer.....	6
<b>Figura 2:</b> Agregados proteicos presentes en la EA.....	9
<b>Figura 3:</b> Diseño del ratón transgénico condicional.....	44
<b>Figura 4:</b> Generación del vector BiTetO-p35/EGFP.....	46
<b>Figura 5:</b> Secuencia y alineamiento del vector BiTetO-p35/EGFP.....	47
<b>Figura 6:</b> Transfección transiente del vector BiTetO-p35/EGFP en células N <sub>2</sub> A.....	49
<b>Figura 7:</b> Inmunofluorescencia de células N <sub>2</sub> A-tTA transfectadas con el vector BiTetO-p35/EGFP.....	50
<b>Figura 8:</b> Expresión y regulación de transgenes en células N <sub>2</sub> A-tTA.....	52
<b>Figura 9:</b> Ensayo de actividad quinasa.....	53
<b>Figura 10:</b> Linearización del vector BitetO-p35/EGFP con la enzima de restricción VspI.....	55
<b>Figura 11:</b> Genotipificación de los ratones transgénicos.....	59
<b>Figura 12:</b> Transmisión del transgén a la progenie.....	60
<b>Figura 13:</b> Genotipificación de los ratones transgénicos tTA y transmisión del transgén a la progenie.....	61
<b>Figura 14:</b> <i>Southern Blot</i> contra EGFP.....	63
<b>Figura 15:</b> Genotipificación de animales dobles transgénicos.....	64
<b>Figura 16:</b> Expresión de los transgenes a 1 mes de edad.....	67
<b>Figura 17:</b> Expresión de los transgenes a los 2 meses de edad.....	68
<b>Figura 18:</b> Expresión de los transgenes a los 3 meses de edad.....	69
<b>Figura 19:</b> Expresión de los transgenes a los 4 meses de edad.....	70

<b>Figura 20:</b> Patrón de fosforilación de tau en ratones dobles transgénicos.....	72
<b>Figura 21:</b> Expresión del transactivador tTA en cerebro de ratón.....	73
<b>Figura 22:</b> Transfección de neuronas hipocampales provenientes de ratones <i>wt</i> y simples transgénicos (L3, L5, L7, L9) .....	75
<b>Figura 23:</b> Metilación del transgén.....	77
<b>Figura 24:</b> Inducción de apoptosis por el tratamiento con A $\beta$ <sub>1-42</sub> de células N <sub>2</sub> A transfectadas con BiTetO-p35/EGFP y tTA.....	79
<b>Figura 25:</b> Determinación de apoptosis por TUNEL en células N <sub>2</sub> A.....	80
<b>Figura 26:</b> Morfología de neuronas hipocampales co-transfectadas con BiTetO-p35/EGFP y tTA en presencia y ausencia de A $\beta$ <sub>1-42</sub> .....	82
<b>Figura 27:</b> Determinación de apoptosis mediante TUNEL-peroxidasa de neuronas hipocampales de ratón tratadas con A $\beta$ <sub>1-42</sub> ... ..	83
<b>Figura 28:</b> Sinergismo entre A $\beta$ <sub>1-42</sub> y la sobreexpresión de p35 en cultivo primario de neuronas hipocampales.....	85
<b>Figura 29:</b> Cuantificación del sinergismo entre A $\beta$ <sub>1-42</sub> y la sobreexpresión de p35 en cultivo primario de neuronas hipocampales.....	86
<b>Figura 30:</b> Triple transfección de neuronas hipocampales de ratón.....	87
<b>Figura 31:</b> Reversión de la expresión de p35.....	89
<b>Figura 32:</b> Modelo del sinergismo entre la vía amieloidogénica y el complejo cdk5/p35.....	112
<b>Tabla 1:</b> Microinyección del vector BiTetO-p35/EGFP.....	57
<b>Tabla 2:</b> Cruces y genotipos de los animales dobles transgénicos.....	65

## ABREVIATURAS

A $\beta$ <sub>1-42</sub>	péptido beta amiloide 1-42
AchR	receptor de acetilcolina
AP-1	activador de proteína 1
APP	proteína precursora del amiloide
BSA	suero albumina
CamKII $\alpha$	proteína quinasa II dependiente de Ca <sup>+2</sup> /calmodulina
cdk5	quinasa dependiente de ciclina 5
CFP	proteína fluorescente cian
CRMP-2	collapsin response mediator protein-2
Dcx	doblecortina
Dox	doxiciclina
DTT	ditiotreitól
EA	Enfermedad de Alzheimer
EAE	Enfermedad de Alzheimer Esporádica
EAF	Enfermedad de Alzheimer Familiar
ECL	Reactivo quimiolumincente para <i>western blot</i>
EGFP	proteína fluorescente verde mejorada
EVS	endocitosis de vesículas sinápticas
FBS	suero fetal de bovino
FITC	isotiocianato de fluoresceína
G418	gentamicina sulfato
gsk3b	glicógeno sintasa quinasa 3 beta
bHLH	factor de transcripción <i>pronuclear basic helix-loop-helix</i>
JNK3	la quinasa N-terminal c-Jun
KO	Knock out
LTP	potenciación a largo plazo
MAPs	proteínas asociadas a microtúbulos
MAPK	proteína quinasa activada por mitógeno
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
MEPP	miniature end-plate potencial
MTs	microtúbulos
N <sub>2</sub> A-tTA	línea celular de neuroblastoma de ratón transfectada establemente con tTA
NGF	factor de crecimiento neural
Ngn1/2	neuroregulina 1/2
Nudel	proteína homóloga de NUDE en <i>Aspergillus</i>
ONF	ovillos neurofibrilares
PHF	filamentos helicoidales pareados
PS	placas seniles
PSD	densidad postsináptica
TBD	dominio de unión a la tubulina
Tet	tetraciclina
TRIC	rodamina
tTA	transactivador dependiente de tetraciclina

## 1.- RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo que se caracteriza por dos tipos de agregados proteicos: extracelulares (placas seniles) e intracelulares (ovillos neurofibrilares, ONF). Los ONF están formados principalmente por la proteína tau hiperfosforilada. Varias quinasas pueden fosforilar tau, incluyendo Gsk3 $\beta$ , MAP quinasa, la proteína quinasa A y la quinasa dependiente de ciclina 5 (cdk5). Se ha postulado que la desregulación de cdk5 sería un evento determinante en la hiperfosforilación de tau en la EA. cdk5 se asocia con la proteína p35, expresada predominantemente en neuronas, por lo que la mayor actividad de cdk5 está concentrada en sistema nervioso. La sobreexpresión de p25 (fragmento proteolítico de p35) en varios modelos de ratones transgénicos produce un aumento en la actividad de cdk5 que conlleva hiperfosforilación de tau, muerte neuronal y astrogliosis. Con estas evidencias de la participación del complejo cdk5/p35 en procesos de neurodegeneración como la EA, se generó un modelo de ratón transgénico condicional para expresar la proteína p35 en cerebro de manera regulable con el sistema de expresión génica dependiente de tetraciclina (Tet). Para ello se generó el vector BiTetO-p35/EGFP y se analizó la expresión y la regulación de este transgén en células N<sub>2</sub>A-tTA. Posteriormente, se obtuvieron 4 líneas de animales transgénicos fundadores (L3, L5, L7 y L9) que transportan el transgén. Estos animales fueron cruzados con animales que sobreexpresan tTA en el sistema nervioso central obteniéndose animales dobles transgénicos (BiTetO-p35/EGFP y tTA). Mediante *western blot* se determinó que no hubo sobreexpresión de p35 ni expresión de EGFP en todos los animales dobles transgénicos analizados. Posiblemente debido a una inactivación y un posterior silenciamiento de los transgenes. Por ello, estudios desarrollados en cultivos primarios de neuronas mostraron que, neuronas transfectadas con BiTetO-p35/EGFP y tTA en presencia de A $\beta$ <sub>1-42</sub> presentaron mayor susceptibilidad a la neurotoxicidad inducida por el amiloide. El mecanismo de acción del péptido involucraría la activación de vías apoptóticas puesto que se determinó que la mayoría de las neuronas transfectadas que sobreexpresaban p35 eran positivas para caspasa 3 activada. Además, se determinó que en neuronas hipocámpales la

reversión de la sobreexpresión de p35 con tetraciclina revirtió en parte la muerte de las neuronas por apoptosis. Estos resultados demuestran la participación del complejo cdk5/p35 y un posible sinergismo con la vía amieloidogénica en la inducción de apoptosis en neuronas hipocámpales.

## ABSTRACT

---

Alzheimer's Disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by the presence of two protein aggregates found both extracellular (Senile Plaques) and intracellularly (Neurofibrillary Tangles, NFT). NFT are mainly composed by hyperphosphorylated tau. To date several protein kinases have been implicated in the phosphorylation of tau protein, including Gsk3 $\beta$ , MAP kinase, protein kinase A and cyclin-dependent kinase 5 (cdk5). A deregulation in the activity of cdk5 had been postulated to participate in the abnormal tau hyperphosphorylation found in AD. Activation of cdk5, occur after the association of cdk5 with p35, a neuron-specific activator, explaining that the activity of cdk5 is found predominantly in the nervous system. The over-expression of p25 (a proteolytic fragment of p35, induced by limited proteolysis due to calpain) in transgenic mice models induce an increase in the activity of cdk5, responsible for increased tau hyperphosphorylation, neuronal death and astrogliosis. With these evidences that implicate does cdk5/p35 in AD, we generated a conditional transgenic mice model that over-express p35 protein in brain under the control of the tetracycline dependent system (Tet). A BiTetO-p35/EGFP vector was generated and assayed in N<sub>2</sub>A-tTA cells for both expression and regulation. Then, we obtained four transgenic mice founders (L3, L5, L7 and L9). These animals were then breed with mice that over-express tTA in the central nervous system in order to obtain double transgenic animals (BiTetO-p35/EGFP and tTA) which over-express p35 in the forebrain. As denoted by western blots assay neither EGFP nor p35 were over-expressed in the brain of double transgenic mice. An explanation for these results could be related with inactivation and silencing of the transgenes. Finally, mouse hippocampal neurons were transfected with BiTetO-p35/EGFP and tTA in the presence of A $\beta$ <sub>1-42</sub>. Neurons over-expressing p35 and EGFP displayed increased immunofluorescence against activated caspase 3 (a canonical apoptosis marker). Additionally, the reversion of p35 and EGFP over-expression with tetracycline was able to decrease the amount of cells displaying activated caspase 3. Altogether, these results implicate the participation of the cdk5/p35 complex in the events occurring after A $\beta$  addition leading to apoptosis and a

possible synergisms with the amieloidogenic pathway in the induction of apoptosis in hippocampal neurons.

## **2.- INTRODUCCIÓN**

---

### **2.1.- La Enfermedad de Alzheimer**

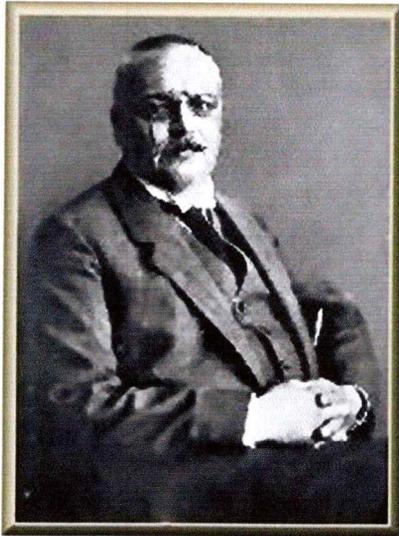
#### **2.1.1.- Perspectiva Histórica.**

Alois Alzheimer publicó en 1907 su ahora famoso trabajo con la descripción de los cambios cognitivos e histopatológicos de la paciente Auguste D., a la que él atendía desde el año 1901. Pocos años después, en 1910, el alumno del Profesor Alzheimer, Emil Kraepelin designó esta nueva entidad con el apellido de su maestro, y desde entonces este mal se conoce como enfermedad de Alzheimer (EA). Con posterioridad, en 1911, Alzheimer describió con detalle un nuevo caso al presentar la historia clínica de Johan F., que acompañó con imágenes histopatológicas muy ilustrativas de las lesiones en el cerebro (Beyer, 2002; Graeber y col., 1997) (**Figura 1**).

#### **2.1.2.- Etiopatología y Epidemiología**

La EA es un desorden neuropsiquiátrico que afecta principalmente a la población mayor de 65 años de edad y es la causa más frecuente de deterioro mental tanto en el período presenil (menos de 65 años) como en el senil. Esta enfermedad se caracteriza por una pérdida progresiva de la memoria, desórdenes cognitivos severos, y una pérdida de las capacidades de atención y de raciocinio. Se considera la primera causa de

A)

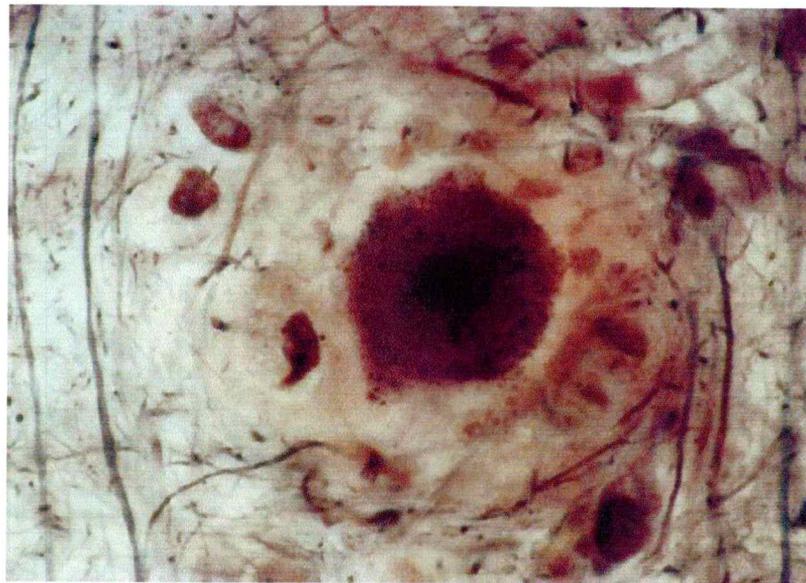


B)



**Augusta D.** © Dr. Konrad Maurer  
Universidad Johann Wolfgang Goethe

C)



**Figura 1:** Historia de la Enfermedad de Alzheimer. **A)** En 1907, Alois Alzheimer, siquiatra y neuropatólogo alemán describió la enfermedad que después llevaría su nombre. **B)** En 1901, ingresó una paciente de 51 años de edad llamada **Augusta D** en el hospital de Frankfurt con cuadro clínico que posteriormente sería analizado por Alois Alzheimer. **C)** Tinción de placas amiloides clásicas en la corteza de un paciente con Alzheimer (Graeber y col., 1997).

demencia en la vejez (Ferry and Katzman, 1983; Maccioni y col., 2001a). La etiopatología de la EA se puede dividir en dos partes:

a) **Enfermedad de Alzheimer Familiar (EAF)**: afecta entre el 3 y el 5% de los pacientes debido a transmisión autosómica dominante de alteraciones en varios genes principalmente en los genes para las presenilina 1 y 2, presentes en los cromosomas 14 y 1, respectivamente, o de la proteína precursora de amiloide, APP (cromosoma 21). La edad de presentación de la EAF suele ser antes de los 65 años.

b) **Enfermedad de Alzheimer Esporádica (EAE)**: la etiología de esta enfermedad es multifactorial con diversos factores de riesgo, que incluyen la vulnerabilidad genética, la edad y factores de riesgo ambientales, como traumatismos, problemas en la nutrición, hábitos y estilos de vida, que parecen favorecer su desarrollo. Los traumatismos craneoencefálicos graves tanto como el estrés crónico y problemas neuro-psiquiátricos como la depresión y otros pueden ser factores que contribuyen a la aparición de la EAE. Sobre el 95% de los pacientes con la EA entran en esta categoría.

### **2.1.3.- Anatomía Patológica.**

Esta enfermedad se caracteriza macroscópicamente por una atrofia cerebral difusa que predomina en las circunvoluciones de las áreas de asociación con relativa preservación de las áreas motora primaria, somatosensorial y visual.

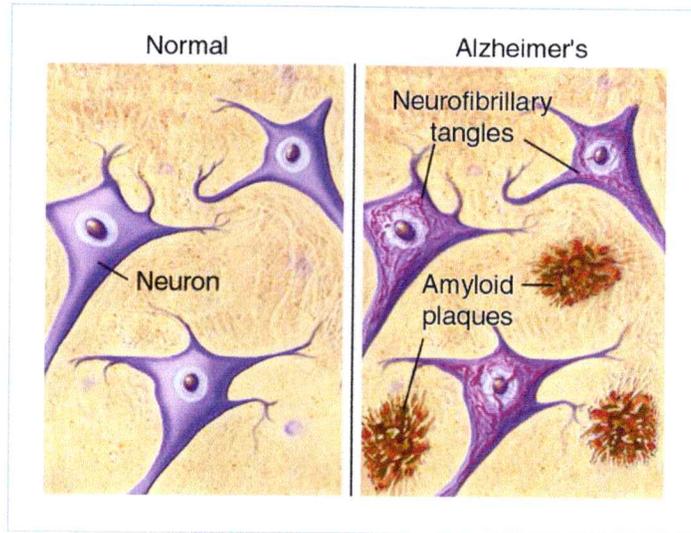
Microscópicamente se distingue por la formación de agregados proteicos extra e intracelulares que desencadenan muerte neuronal lo que lleva a un creciente daño cognitivo principalmente en la corteza e hipocampo, y que finalmente desencadena la muerte neuronal (Ferry and Katzman, 1983; Yankner, 1996; Maccioni y col., 2001a).

Las principales manifestaciones en estado avanzado de esta enfermedad son las placas seniles (PS) y los ovillos neurofibrilares (ONF) (**Figura 2A**).

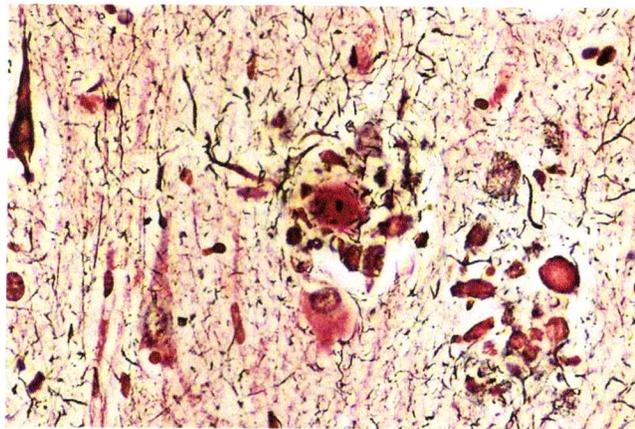
a) **Las Placas Seniles:** tienen un diámetro que oscila entre 5 y 150  $\mu\text{m}$  y constan de un núcleo central que contiene amiloide y materiales inorgánicos, como aluminosilicatos, rodeado de neuritas en diverso grado de degeneración (**Figura 2B**). Los depósitos extracelulares son acúmulos de filamentos proteicos altamente insolubles, formados por depósitos del péptido hidrofóbico de 4kDa denominado beta-amiloide ( $A\beta$ ).  $A\beta$  es el producto del procesamiento proteolítico de la proteína precursora APP.  $A\beta$  puede formar depósitos extracelulares, que son inicialmente no-fibrilares y luego fibrilares dando origen así a las PS (Goedert y col., 1991; Price y Sisodia, 1998; Selkoe, 2000).

b) **Ovillos Neurofibrilares:** Los ONF son estructuras filamentosas argirófilas que se sitúan en el soma neuronal y las dendritas (**Figura 2C**). Están formados por manojos de filamentos helicoidales apareados (**PHF**) de 10 nm de espesor. Estudios inmunocitoquímicos han revelado que en la composición de estos filamentos intervienen proteínas de los neurofilamentos y proteínas asociadas a los microtúbulos, mayoritariamente la proteína tau (Goedert y col., 1991; Maccioni y col., 2001b).

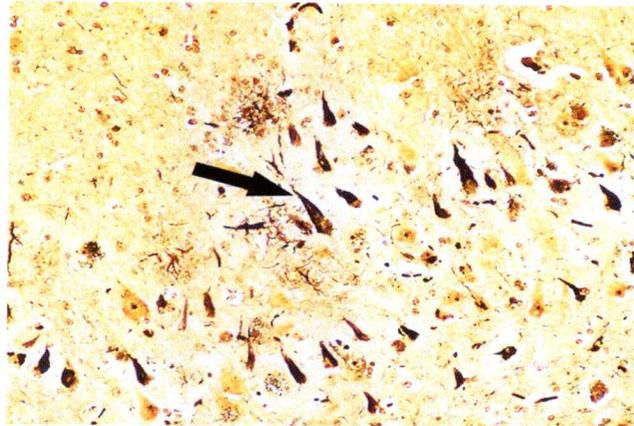
A)



B)



C)



**Figura 2:** Agregados proteicos presentes en la EA. A) Esquema donde se muestran las PS y los ONF en las neuronas. B) En un corte de cerebro humano de un paciente con EA se observa un PS formada por una masa redondeada hialina (amiloide) rodeada de fibrillas teñidas con tinción de Bodian. Objetivo 500x C) Los ONF son agregados intracelulares presentes dentro de neuronas de corteza e hipocampo. La figura muestra un corte de hipocampo teñido con la tinción de plata Bielschowsky. La flecha indica una neurona con ONF.

Las lesiones básicas en la enfermedad de Alzheimer se distribuyen por la neocorteza y la paleocorteza. El área entorrinal se afecta selectivamente, lo que contribuye a la desaferenciación del hipocampo. También degeneran los núcleos de proyección cerebral colinérgicos (núcleo basal de Meynert, banda diagonal de Broca y núcleo septal medial), serotoninérgicos (núcleos de rafe) y noradrenérgicos (locus ceruleus).

## **2.2.- La proteína tau**

La proteína tau pertenece a la familia de proteínas asociada a microtúbulos (MAPs). Tau ha sido caracterizada como un importante promotor del ensamblaje de tubulina para formar los microtúbulos (MTs), su unión a los MTs reduce la inestabilidad dinámica de éstos incrementando la asociación de tubulina al extremo en crecimiento y reduciendo su disociación de los MTs (Maccioni y Cambiazo, 1995; Avila y col., 2004).

Existen dos grandes vías de regulación de la actividad de tau en la célula nerviosa. La primera está dada por la expresión de isoformas de tau como resultado del empalme alternativo. En el cerebro humano, el empalme alternativo del mRNA genera 6 diferentes isoformas de tau con largos entre 352 y 441 aminoácidos. Estas isoformas difieren la una de la otra por tener 3 o 4 repeticiones de 18 aminoácidos en la región carboxilo terminal, y que constituyen el dominio de unión a tubulina (TBD). La presencia de 3 o 4 repeticiones se correlaciona con la estabilización de los MTs. A mayor número de repeticiones, mayor estabilidad de los MT, y viceversa (Maccioni y Cambiazo, 1995). Cuatro de las isoformas de tau poseen las cuatro repeticiones; dos

isoformas poseen 3 repeticiones y la isoforma fetal posee tres repeticiones (Avila y col., 2004).

La segunda vía de regulación de tau se refiere a modificaciones postraduccionales, esencialmente fosforilaciones y glicaciones (Maccioni y Cambiazo, 1995; Avila y col, 2004). Las fosforilaciones normales determinarían el grado de interacción de tau con los MTs y su actividad estabilizadora. Sin embargo, hiperfosforilaciones anómalas de tau facilitarían los cambios conformacionales que la transforman en una proteína que se autoagrega, formando los PHF y posteriormente los ONF (Maccioni y Cambiazo, 1995; Avila y col., 2004). Diferentes proteínas quinasas han sido implicadas en la fosforilación de tau, incluyendo la glicógeno sintasa quinasa  $3\beta$  (Gsk3 $\beta$ ) (Hong y col., 1997), MAP quinasa, la proteína quinasa A (Schneider y col., 1999) y la quinasa dependiente de ciclina 5 (cdk5) (Alvarez y col., 1999; 2001; Patrick y col., 1999) entre otras. Nuestro laboratorio participó de la serie de descubrimientos que llevaron a demostrar el papel crítico en la desregulación de cdk5 como evento primario en la cascada de reacciones que llevan a la hiperfosforilación de tau y sus efectos en promover el desarrollo de la EA (Baumann y col., 1993, Yamaguchi y col., 1996; Sengupta y col., 1997; Alvarez y col., 1999, Patrick y col., 1999, Munoz y col., 2000; Alvarez y col., 2001).

### **2.3.- La Quinasa Cdk5**

En los 15 años posteriores al descubrimiento de la quinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5), varias importantes funciones han sido asignadas a esta quinasa, incluyendo

migración neuronal, liberación de neurotransmisores, plasticidad neuronal, memoria, aprendizaje, adicción, y apoptosis, estableciendo a cdk5 como un regulador clave de las funciones neuronales (Pareek y col., 2006). Además, en los últimos años, muchas evidencias indican que la desregulación de esta quinasa está implicada en la patología de enfermedades neurodegenerativas (Maccioni y col., 2001b; Dhavan y Tsai, 2001).

### **2.3.1.- Características del Complejo Cdk5/p35**

La cdk5 es una serina/treonina quinasa con actividad postmitótica que fosforila motivos proteicos *KSP* sobre Map1B, *KSPXX* sobre tau (Maccioni y col., 2001b; Dhavan y Tsai, 2001), y *KSPXX* sobre proteínas de los neurofilamentos (Sun y col., 1996). Esta quinasa perteneciente a la familia de las quinasas dependientes de ciclinas. cdk5 tiene sobre un 60 % de homología con CDC2 y cdk2, sin embargo ningún papel se le ha atribuido a esta quinasa en la regulación del ciclo celular. La proteína cdk5 se expresa en todos los tejidos y se ha detectado una mayoritaria actividad quinasa asociada en el sistema nervioso (Dhavan y Tsai, 2001; Maccioni y col., 2001b). Además, se ha detectado cdk5 activa en tejidos no neuronales, tales como mioblastos, unión neuromuscular, células hematopoyéticas y durante la espermatogénesis (Dhavan y Tsai, 2001; Fu y col., 2005).

### **2.3.2.- Regulación de la Cdk5**

La principal forma de regulación de otros miembros de la familia Cdks es su asociación con su ciclina activadora. cdk5 se une a dos activadores, no ciclinas, que son p35 y p39, para producir su función. A pesar del hecho que p35 y p39 tienen poca similitud de secuencia a las ciclinas, estudios de modelamiento molecular y mutagénesis han predicho que p35 puede adoptar una estructura terciaria como ciclina (Dhavan y Tsai, 2001). Además, el grupo de Tarricone y col. (Tarricone y col., 2001), cristalizó la proteína cdk5 unida a p25, un fragmento proteolítico de 208 residuos carboxilo terminal del activador p35, y se demostró que p25 se pliega en una conformación muy similar a la de las ciclinas (Tarricone y col., 2001). En este contexto, y considerando la perspectiva fisiopatológica, nuestro laboratorio y otros investigadores lograron demostrar que en la vía hacia el Alzheimer, la interacción de p35 con cdk5 activada mediante fosforilación sobre Ser159 lleva a un complejo altamente estable (Sharma y col., 1999; Alvarez y col., 2001; Muñoz y col., 2000), que incrementa de manera incontrolada su actividad fosforilante de tau, en sitios Ser202 y Thr205, evento crítico en la etiopatogénesis de la EA (Alvarez y col., 1999; 2001).

### **2.3.3.- Expresión Espacial y Temporal de p35 y p39**

Cdk5 se expresa en la mayoría de los tejidos, no obstante altos niveles de actividad quinasa son detectados mayoritariamente en el sistema nervioso (Tsai y col., 1993). Esto se explica por el patrón de expresión de sus activadores, p35 y p39, que es alto en neuronas postmitóticas (Zheng y col., 1998). La expresión temporal y espacial de p35 y p39 en el cerebro parece ser complementaria (Cai y cols., 1997; Zheng y col.,

1998; Wu y col., 2000). Estas proteínas fueron localizadas espacial y temporalmente en distintos compartimientos subcelulares. p39 se expresa en SNC postnatalmente en cambio p35 tiene un pico de expresión en el desarrollo del SNC. p39 se expresa principalmente en compartimientos sinápticos tales como conos de crecimiento, fracciones insoluble a detergente y fracciones de membrana (Humbert y col., 2000a; Humbert y col., 2000b; Dhavan y Tsai, 2001). Por otro lado, se sabe que p39 puede compensar algunas (pero no todas) de las funciones de p35 (Ko y col., 2001). Sin embargo, la carencia de un fenotipo visible del ratón *KO* de p39 permite argumentar que p35 puede enmascarar la ausencia de p39 (Ko y col., 2001).

#### **2.3.4.- Localización de p35 y p39**

Estudios inmunocitoquímicos mostraron que la señal de p35 es intensa en la periferia celular, y que tanto p35 como p39 están enriquecidos en las fracciones de membrana (Nikolic y col., 1998; Humbert y col., 2000b). Un hallazgo de importancia ha sido el encontrar una señal N-terminal de miristoilación en p35 y p39 que destina estas proteínas a la membrana celular (Patrick y col., 1999; Dhavan y Tsai, 2001). Cuando se sobreexpresa *cdk5* no presenta un patrón de distribución específico, pero cuando se co-expresa con p35 se localiza en dominios de la membrana celular (Patrick y col., 1999). Es decir, la distribución de *cdk5* es dependiente de la distribución de p35 y p39.

#### **2.3.5.- Degradación de p35**

Experimentos de pulso y caza en cultivos primarios de neuronas corticales y en células transfectadas mostraron que p35 es una proteína inestable con una vida media de 20-30 min en neuronas corticales (Patrick y col., 1998). p35 es multi-ubiquitinado y degradado a través de la vía del proteosoma. La inhibición de la actividad de cdk5 por roscovitina aumenta la estabilidad de p35 varias veces. Esto se debe probablemente a la disminución de la fosforilación de p35 por Cdk5 (Patrick y col., 1998). Estas observaciones posiblemente reflejen una fina regulación de la actividad de cdk5 mediante un *feedback* negativo en neuronas. Por otro lado, p25 tiene una vida media de 5 a 10 veces más larga que p35 correlacionándose con un aumento en la actividad de cdk5 (Patrick y col., 1999).

### **2.3.6.- Regulación transcripcional de p35 y Cdk5**

cdk5 es regulada a nivel transcripcional por el factor de transcripción  $\Delta$ FosB.  $\Delta$ FosB es inducido en hipocampo y en otras regiones del cerebro por repetidos ataques electroconvulsivos, un efectivo tratamiento antidepresivo (Chen y col., 2000; Dhavan y Tsai, 2001). Además,  $\Delta$ FosB puede ser inducido por exposición crónica a cocaína (Bibb y col. 2001; Dhavan y Tsai, 2001).  $\Delta$ FosB se une a JunD y forma el complejo activador de proteína-1 (AP-1), el cual se une al promotor del gen cdk5 e induce su transcripción (Chen y col., 2000; Bibb y col., 2001; Dhavan y Tsai, 2001). Por otro lado, la regulación de p35 a nivel transcripcional es inducida mediante receptores del tipo integrinas o por el factor de crecimiento nervioso (NGF) (Paglini y col., 1998; Li y col., 2000; Harada y col., 2001). La cascada de las MAPK, es requerida para la regulación de la expresión de

p35 inducida por NGF (Harada y col., 2001), o por IL-6 (Quintanilla y col., 2004) a través de la inducción del factor de transcripción *egr1*. Adicionalmente, se ha descrito que otros factores de transcripción como Brn-1 y Brn-2 se unen al promotor de p39 y p35 y regulan su expresión durante el desarrollo del sistema nervioso central (McEvelly y col., 2002). Recientemente se ha descrito que factores de transcripción *pronuclear basic helix-loop-helix* (bHLH) tales como neuroregulina 1 y 2 (Ngn1/2), Mash1 y NeuroD pueden regular la expresión de p35 durante el desarrollo y la migración neuronal (Ge y col., 2006). Por último, tanto la expresión de cdk5 como de p35 aumenta por el tratamiento con cocaína, debido a un aumento del factor de transcripción  $\Delta$ FosB (Bibb, y col., 2001; Dhavan y Tsai, 2001).

## **2.4.- Funciones del Complejo Cdk5/p35**

Un importante mecanismo para regular numerosos procesos es la fosforilación de sustratos por quinasas específicas. El complejo cdk5/p35 ha sido implicado en el desarrollo y el mantenimiento del sistema nervioso central. cdk5 participa en la migración neuronal, dinámica de actina, estabilidad y transporte de MT, adhesión celular, guía axonal, estructura sináptica, endocitosis, memoria y aprendizaje, apoptosis y dolor entre otros procesos (Dhavan y Tsai, 2001; Pareek y Kulkarni, 2006).

### **2.4.1.- Migración Neuronal**

Los ratones deficientes en *cdk5* o sus activadores (*p35* y *p39*) poseen defectos en el posicionamiento de neuronas postmitóticas en el cerebro (Ohshima y col., 1996; Chae y col., 1997; Ko y col., 2001). Para entender la naturaleza de los defectos en la migración se realizó un estudio *ex vivo* en neuronas migrando provenientes de ratones *KO p35* (Gupta y col., 2003). Las diferencias de migración neuronal entre los ratones sugiere que el fenotipo de laminación invertida en la neocorteza de *KO p35* está unido a la disrupción en el modo de migración dependiente de glía radial. Más que una migración dependiente de glía que fue predominante en ratones *wild type*, las neuronas en los ratones *KO p35* migran primariamente a través de mecanismos independientes de glía (Gupta y col., 2003). Por otro lado, los ratones *KO p39* no presentaron diferencias en la laminación de las principales estructuras del cerebro. Esto se debe principalmente a que *p35* puede suplir la falta de *p39* (Ko y col., 2001). Por otra parte, *cdk5* fosforila la tirosina quinasa FAK, que es el mayor regulador de la movilidad celular a través de las adhesiones focales. Esta fosforilación desencadena una reorganización en el citoesqueleto de actina y en una pequeña red de MT que acompañan al núcleo de las neuronas migrando (Xie y col., 2003; Samuels y Tsai, 2004). Además, *cdk5* fosforila a doblecortina (*Dcx*) y disminuye su afinidad por los MT y por ende regula la migración neuronal (Tanaka y col., 2004).

#### **2.4.2.- Dinámica de Actina**

La sobreexpresión de *p35* y *p39* en fibroblastos produce reorganización del citoesqueleto de actina y la formación de lamelipodios y filopodios (Humbert y col., 1998; Nikolic y col., 1998). La familia Rho de las pequeñas GTPasas es importante en

regular la dinámica de actina, y miembros de esta familia están directamente implicados en guía axonal, crecimiento de neuritas y movilidad celular (Dhavan y Tsai, 2001). En cultivos neuronales, p35 y cdk5 están localizados en la periferia de los conos de crecimiento, co-localizando con F-actina, RAC y su efector PAK1 (Nikolic y col., 1998). Cdk5 fosforila a PAK1 de manera dependiente de RAC, lo que resulta en una disminución en la actividad quinasa de PAK1. Debido a que PAK-1 está implicada en la polimerización de actina, esta modificación de PAK1 regula la dinámica de actina en neuronas promoviendo migración neuronal y crecimiento neurítico (Nikolic y col., 2001). Por otra parte, se ha postulado que cdk5 estaría modulando vía Rac1 y Cdc42 el ordenamiento del citoesqueleto de actina, en una vía en que interviene cofilina (Ariadna Mendoza-Naranjo, Tesis Doctoral 2005).

#### **2.4.3.- Estabilidad y Transporte de MT**

cdk5 se asocia con el citoesqueleto de MT, y puede ser purificada desde MT del cerebro de bovino (Ishuguro y col., 1992). Varias MAPs, incluyendo a las MAPs axonales Map1B y tau, son sustratos de cdk5 (Ishuguro y col., 1992; Paglini y col., 1998; Maccioni y col., 2001; Dhavan y Tsai, 2001). La fosforilación de Map1B por cdk5 en neuronas cerebelares está implicada en la extensión de neuritas (Paglini y col., 1998). La fosforilación de tau (una MAP específica de neuronas) por cdk5 reduce la unión de tau a MT, inhibiendo la habilidad de tau para promover el ensamble de MT (Patrick y col., 1999). cdk5 también fosforila neurofilamentos (Veraanna y col., 1995; Sun y col., 1996). Los neurofilamentos tienen una función bien establecida en el control del calibre de los axones. Debido a esto, se ha determinado que en el ratón transgénico que

sobreexpresa p25 hay un aumento en el grosor de los axones (Ahlijanian y col., 2000) que posiblemente se deba a la fosforilación de los neurofilamentos por el complejo cdk5/p25 (Ahlijanian y col., 2000). Por otro lado, cdk5 puede fosforilar la cadena pesada de los neurofilamentos regulando así el transporte axonal de neurofilamentos (Ackerley y col., 2003). Cdk5 también participa en el transporte axonal, principalmente por la fosforilación de Nudel (proteína homóloga a NUDE de *Aspergillus*) (Dhavan y Tsai, 2001; Gupta y col., 2002). Nudel es expresado en cerebro, donde se asocia con dineína, el principal motor retrógrado. Por otro lado, cdk5 también participa en el transporte anterógrado debido a que la inhibición de cdk5, guía a la activación de la quinasa GSK3 $\beta$ , la cual fosforila la cadena liviana de kinesina (motor anterógrado) y libera el cargo transportado (Morfini y col., 2004).

#### **2.4.4.- Adhesión Celular**

Una de las características de los ratones deficientes en p35 y cdk5 es la falla en la migración de neuronas nacidas tardíamente de atravesar las neuronas preexistentes en la corteza. Un posible mecanismo que podría explicar este fenotipo es la participación de cdk5/p35 en la adhesión celular. Mediante experimentos de doble híbrido se determinó que p35 interactúa con  $\beta$ -catenina. Las proteínas p35 y  $\beta$ -catenina interactúan *in vitro* y en células COS transfectadas. Inclusive, hubo asociación entre el complejo cdk5/p35 y el complejo  $\beta$ -catenina-N-cadherina en corteza. Además, la transfección de cdk5/p35 en células COS conlleva una disminución en la interacción entre  $\beta$ -catenina/N-cadherina y por lo tanto una pérdida en la adhesión celular (Kwon y col., 2000). Además,

recientemente se determinó que el complejo cdk5/p35 fosforila a  $\beta$ -catenina y regula su interacción con presenilina1 (Kesavapany y col., 2001).

#### **2.4.5.- Guía Axonal**

El complejo cdk5/p35 se ha implicado en la regulación de la guía axonal en el sistema nervioso (Brown y col., 2004; Del Rio y col., 2004; Uchida y col., 2005). cdk5 está implicada en la señalización de Semaforina-3A (Sema3A) y de Netrina. Un componente de la vía de señalización de semaforina es CRMP-2 (collapsin response mediator protein-2), una fosfoproteína neuronal que participa en el crecimiento axonal y la dinámica de MT. cdk5 fosforila a CRMP-2 en Ser522, y esta fosforilación fue esencial para el colapso del cono de crecimiento inducida por Sema3A (Brown y col., 2004; Uchida y col., 2005). Por otro lado, cdk5 participa en la señalización de Netrina1 principalmente por la fosforilación de Map1B inducida por Netrina 1 (Del Rio y col., 2004).

#### **2.4.6.- Estructura Sináptica**

cdk5, p35 y p39 son abundantemente expresados en cerebro adulto. Además, ellos están presentes en fracciones subcelulares que son enriquecidas en membranas sinápticas (Humbert y col., 2000; Dhavan y Tsai, 2001). En el terminal presináptico cdk5 fosforila a sinapsina 1, munc18 y amfifisina. Estas proteínas están implicadas en neurosecreción y endocitosis (Dhavan y Tsai, 2001). Por otro lado, en el terminal

postsináptico cdk5 fosforila a PSD-95, una proteína andamio implicada en el agrupamiento de proteínas en la densidad postsináptica glutamatérgicas, lo que desencadena una inhibición en el *clustering* de receptores NMDA en estas sinapsis (Morabito y col., 2004). Por otro lado, cdk5 participa del desarrollo de la unión neuromuscular (Fu y col., 2001; Fu y col., 2005). En ratones deficientes de cdk5, hay defectos en el *clustering* de receptores de Acetilcolina (AChR) y en la neurotransmisión, determinado por una mayor frecuencia de MEPP (miniature end-plate potencial) en *KO* cdk5. Además, las proyección motoras axonales son aberrantes, revelando el papel esencial de cdk5 en la regulación del desarrollo de las sinapsis neuromusculares (Fu y col., 2005).

#### **2.4.7.- Endocitosis**

La endocitosis de vesículas sinápticas (EVS) es mediada por una familia de proteínas llamadas defosfinas, que incluyen amfifisina 1, dinamina 1, sinapsina, Munc18, entre otras (Nguyen y Bibb, 2003; Tan y col., 2003; Tomizawa y col., 2003). Estas proteínas son constitutivamente fosforiladas y luego desfosforiladas en respuesta a excitación del terminal presináptico por calcineurina. Dos grupos han identificado a cdk5 como la enzima responsable de la fosforilación de dinamina 1 (Tan y col., 2003; Tomizawa y col., 2003). No obstante, los hallazgos de estos dos grupos difieren sustancialmente, y las implicaciones de sus datos para el papel de cdk5 en EVS parecen estar en completa oposición. Por un lado, Tan y colaboradores demostraron que cdk5 fosforila a dinamina 1 en Ser774 y Ser778 siendo esencial para la EVS (Tan y col., 2003), mientras que Tomizawa y colaboradores determinaron la fosforilación dinamina

1 cdk5 en Thr780 regula negativamente la EVS (Tomizawa y col., 2003). En resumen, no está claro si cdk5 aumenta o inhibe la EVS, o cdk5 puede cumplir ambos papeles dependiendo del *round* de endocitosis (Nguyen y Bib, 2003). Además, cdk5 puede fosforilar a sinapsina (Matsubara y col., 1996) y Munc18 (Shuang y col., 1998) regulando sus funciones en la endocitosis.

#### 2.4.8.- Memoria y Aprendizaje

La formación de memoria requiere una serie de procesos moleculares, tales como fosforilación de proteínas, expresión génica y síntesis de proteínas *de novo*, guiando a cambios estructurales y funcionales de las neuronas (Fischer y col., 2002). Mediante hibridización subtractiva se determinó que cdk5 se expresa diferencialmente en cerebro de ratones estresados con respecto a ratones control. La inyección de butirolactona (inhibidor de cdk5) en el hipocampo disminuye el aprendizaje asociativo. En efecto, un aumento transiente en la actividad de cdk5 dentro del sistema hipocampal se requiere para procesos como aprendizaje y memoria (Fisher y col., 2002). Por otro lado, cdk5/p35 puede interactuar con la subunidad  $\alpha$  de la proteína quinasa II dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$ /calmodulina (CamKII $\alpha$ ) y  $\alpha$ -actinina, dos proteínas localizadas en la densidad postsináptica (PSD) (Dhavan y col., 2002). Esta asociación podría sugerir un *crossstalk* entre las vías de transducción de CamKII $\alpha$  y cdk5 y podría ser un componente más del complejo mecanismo que contribuye a la plasticidad sináptica, memoria y aprendizaje (Dhavan y col., 2002). Por otra parte, en un ratón transgénico condicional que sobreexpresa transientemente p25 seguido de represión del transgén, se determinó un

mejoramiento de la potenciación a largo plazo (LTP) y una facilitación de la memoria dependiente de hipocampo. En cambio, una prolongada expresión de p25 en este mismo ratón causa severos déficit cognitivos, los que fueron acompañados por pérdida neuronal y sináptica y disminución en LTP (Fischer y col., 2005).

#### **2.4.9.- Apoptosis**

*In vivo*, la actividad de cdk5 es fuertemente regulada. La ausencia de cdk5 es letal para desarrollo del sistema nervioso central. Sin embargo, demasiada actividad de cdk5 es también tóxica a las células, particularmente a neuronas, guiando a apoptosis neuronal bajo condiciones fisiológicas y patológicas (Patrick y col., 1999; Weishaupt y col., 2003; Gong y col., 2003). cdk5 participa en la apoptosis neuronal por medio de la fosforilación de varios sustratos, entre los cuales esta el factor de transcripción MEF2 (Gong y col., 2003), la quinasa N-terminal c-Jun (JNK3) (Li y col., 2002), la proteína supresora de tumores p53 (Zhang y col., 2002), entre otras.

#### **2.4.10.- Dolor**

Recientemente, se ha implicado a la participación de cdk5 en las vías del dolor (Pareek y col., 2006a; Pareek y Kulkarni, 2006b). Tanto cdk5 como p35 se expresan en neuronas nociceptivas, que están encargadas de censar la respuesta inflamatoria periférica. Además, en ratones *KO* para p35, los que muestran una disminuida actividad de cdk5, mostraron retardo en la respuesta a un estímulo doloroso. En cambio, ratones que sobreexpresan p35 (Takahashi y col., 2005), los cuales muestran elevado niveles de

actividad de cdk5, fueron más sensibles al estímulo doloroso (Pareek y col., 2006a). La vía de transducción de señales de proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) está implicada en el dolor. cdk5 regula esta vía a través de la fosforilación de Mek1, regulando así la activación de ERK1/2 (Pareek y Kulkarni, 2006b).

## **2.5.- Modelos Genéticos para Cdk5 y p35**

cdk5 y su activador específico neuronal p35 son moléculas esenciales para la migración neuronal y para la organización en estratos de las estructuras laminadas del cerebro como corteza, hipocampo, cerebelo y bulbo olfatorio (Ohshima y col., 1996; Chae y col., 1997; Dhavan y Tsai, 2001).

### **2.5.1.- Ratones Transgénicos Para Cdk5**

Los ratones nulos para cdk5 son letales perinatalmente y presentan inversión de de las principales estructuras laminadas del cerebro (Ohshima y col., 1996). A causa que cdk5 se expresa tanto en neuronas como en astrocitos, no ha sido claro si el fenotipo letal observado en los animales *KO* para cdk5 es primariamente atribuible a defectos en neuronas o astrocitos. Por lo tanto, en el año 2001 se generó un ratón transgénico que sobreexpresa cdk5 bajo el promotor de p35 en un *background* genético nulo para cdk5 (Tanaka y col., 2001). Estos animales fueron fértiles y viables a pesar que la expresión de cdk5 fue limitada principalmente a neuronas. Por ello, en este trabajo quedó claramente demostrado que la actividad de cdk5 es necesaria para un desarrollo normal y la sobrevivencia de neuronas expresando p35 (Tanaka y col., 2001).

### **2.5.2.- Ratones Transgénicos Para p25.**

A la fecha, se han generado cuatro modelos de ratones transgénicos que sobreexpresan p25, un fragmento proteolítico de p35 (Ahlijanian y col., 2000; Takashima y col., 2001; Bian y col., 2002; Angelo y col., 2003). De estos cuatro modelos, solo dos presentan perturbaciones a nivel ultraestructural en la organización del citoesqueleto, debido principalmente a una amplia degeneración axonal (Ahlijanian y col., 2000; Bian y col., 2002). Estos cambios son localizados predominantemente en amígdala, tálamo, hipotálamo y corteza. La sobreexpresión de p25 resulta en un aumento de la actividad de cdk5 que fue suficiente para producir hiperfosforilación de la proteína tau en fosfoepítopes de tipo Alzheimer (Ahlijanian y col., 2000; Bian y col., 2002). En cambio, en los otros dos modelos transgénicos de sobreexpresión de p25, no se observaron cambios en la organización del citoesqueleto (Takashima y col., 2001; Angelo y col., 2003). En estos ratones no hubo hiperfosforilación de la proteína tau ni muerte neuronal, al contrario de lo que ocurre en los modelos transgénicos mencionados anteriormente. Las discrepancias en los resultados obtenidos puede deberse principalmente a los distintos promotores del transgén utilizados y por ende, a los diferentes niveles de sobreexpresión del transgén en los 4 modelos transgénicos generados (Takashima y col., 2001; Angelo y col., 2003).

En los cuatro modelos transgénicos de p25 analizados no se observó formación de ONF, uno de los principales agregados intracelulares en la EA. En cambio, en ratones que sobreexpresan mutantes de la proteína tau, principalmente en Val337 o Pro301 si hubo formación de ONF (Tanemura y col., 2001, Götz y col., 2001a; Götz y col., 2001b;

Lewis y col., 2001). Por otro lado, se generó un ratón doble transgénico mediante el cruce de un ratón transgénico que sobreexpresa p25 (Ahlijanian y col., 2000) con un ratón que sobreexpresa la proteína tau humana mutante P301L (Lewis y col., 2001). Los ratones dobles transgénicos p25/tau produjeron un aumento en la hiperfosforilación y agregación de tau, lo que conlleva a un aumento en la formación de ONF comparados con animales simple transgénicos de tau. Es decir, un aumento en la actividad de cdk5 por p25 considerablemente genera un aumento en el desarrollo de la patología neurofibrilar (Noble y col., 2003).

Cruz y colaboradores generaron un ratón transgénico que sobreexpresa p25 condicionalmente en cerebro anterior postnatal mediante el sistema de expresión dependiente de tetraciclina (Cruz y col., 2003). Estos animales transgénicos presentan pérdida de neuronas en corteza e hipocampo, seguido de atrofia cerebral, astrogliosis y activación de caspasa 3 (marcador de apoptosis). Además, en estos animales la proteína tau endógena fue hiperfosforilada y se generaron agregados de tau y hubo un progresivo desarrollo de la patología neurofibrilar (Cruz y col., 2003).

### **2.5.3.- Ratones Transgénicos Para p35.**

Se han generado 2 ratones transgénicos que sobreexpresan p35 (Van den Haute y col., 2001; Takahashi y col., 2005). El primer ratón transgénico de p35 fue generado por el grupo de Van den Haute y colaboradores. Estos animales sobreexpresan p35 en cerebro lo que conlleva un aumento en la actividad de cdk5 que no fue suficiente para hiperfosforilar la proteína tau. Posiblemente, debido a que el nivel umbral de producción de p35, necesario para una efectiva activación de cdk5 para actuar como una quinasa de

tau, no fue alcanzado en estos animales (Van den Haute y col., 2001). Por otro lado, el grupo de Kulkarni y colaboradores generaron dos ratones transgénicos que sobreexpresan p35 en un *background* nulo para p35 (Tgp35;p35<sup>-/-</sup>) y en un *background wild type* (Tgp35) (Takahashi y col., 2005). En los ratones Tgp35;p35<sup>-/-</sup> la sobreexpresión de p35 revirtió los defectos en laminación de la corteza en animales *KO* para p35. Por otro lado, los niveles de la proteína p35 fueron 1,6 veces más altos en ratones Tgp35 con respecto a ratones *wt* (Takahashi y col., 2005). Además en estos ratones Tgp35 se demostró que el aumento en la actividad de cdk5 generado por la sobreexpresión de p35 contribuye a la atenuación de la señalización de dopamina mediada por cocaína (Takahashi y col., 2005).

## **2.6.- Desregulación de Cdk5 y Neurodegeneración**

La actividad de cdk5 es regulada principalmente por la expresión y la localización de p35. El mejor ejemplo de desregulación de cdk5 es a través del corte proteolítico mediado por calpaina de p35 generando p25 (Lee y col., 2000). Una potencial relación entre cdk5/p25 y la patología de los ONF en la EA ha sido propuesta basados sobre los elevados niveles de p25 detectados en los cerebros de pacientes con Alzheimer (Patrick y col., 1999; Tseng y col., 2002, Otth y col., 2000). Análisis *in vitro* apoyan esta hipótesis, ya que altos niveles de p25, pero no de p35, en cultivos primarios de neuronas de ratón aumenta la fosforilación de tau y hay una disrupción del citoesqueleto (Patrick y col., 1999; Van den Haute y col., 2001). Además, una aguda exposición al péptido A $\beta$ , o agentes que causan un influjo de calcio, pueden inducir una

proteólisis inducida por calpaina de p35 a p25 (Lee y col., 2000; Alvarez y col., 1999), aunque esto no necesariamente aumenta la fosforilación de tau en células en cultivo (Kerokoski y col., 2002). Inversamente, la toxicidad de A $\beta$  puede ser reducida por inhibidores de cdk5, tales como butirolactona (Alvarez y col., 1999; Lee y col., 2000; Munoz y col., 2000; Alvarez y col., 2001). Estos resultados han sido interpretados sugiriendo que altos niveles de A $\beta$  en la EA puede gatillar la conversión de p35 a p25, guiando a la activación de cdk5 y a una consecuente hiperfosforilación de tau. No obstante, al ensayar esta hipótesis en ratones transgénicos que sobreexpresan p25 se han generado resultados conflictivos con respecto al aumento en la fosforilación de tau y una falla en generar ONF (Ahlijanian y col., 2000; Takashima y col., 2001; Bian y col., 2002; Angelo y col., 2003). Además, el aumento de los niveles de p25 en el cerebro de pacientes con EA no ha sido corroborado (Taniguchi y col., 2001; Takashima y col., 2001; Yoo y Lubec, 2001; Tandom y col., 2003). En conjunto estos antecedentes no arrojan una clara conclusión respecto del verdadero papel de p25 como el fragmento activador responsable del aumento de fosforilación de la proteína tau en la EA.

Debido a la gran cantidad de discrepancia que hay acerca de la participación del complejo cdk5/p35 o cdk5/p25 en los procesos neurodegenerativos en la EA, el tema de estudio de la presente tesis ha sido la comprensión de la participación de p35 en la neurotoxicidad mediada por el amiloide tanto en un modelo *in vivo* (un modelo de ratón transgénico condicional que exprese la proteína p35 en cerebro de manera regulable) como *in vitro* (cultivos primarios de neuronas transfectados para sobreexpresar a p35). En el caso del modelo *in vivo* se escogió el sistema dependiente de tetraciclina (tTA). Este sistema binario puede ser regulado ya que la transcripción del transgén de interés

depende de la presencia de una proteína viral denominada el transactivador de tetraciclina (tTA). La proteína tTA puede tener dos conformaciones espaciales dependiendo de si esta o no, unida a tetraciclina o un análogo como la doxiciclina. En el sistema que utilizaremos en esta tesis, el tTA cambia su conformación tridimensional cuando se le une tetraciclina, y este cambio impide que tTA pueda unirse a las regiones regulatorias del transgén de interés, apagando de esta forma la expresión de dichos transgenes. Es por esto, que el sistema se denomina Tet-Off.

Este sistema de expresión condicional dependiente de tetraciclina ya ha sido utilizado para estudiar varias enfermedades neurodegenerativas (Yamamoto y col., 2000; Lucas y col., 2001; Cruz y col. 2003). Por lo tanto, es interesante analizar de forma regulada la sobreexpresión de p35 y su contribución a la EA.

### **3.- HIPÓTESIS**

---

La sobreexpresión de p35, activador neuroespecífico de cdk5, en cultivos celulares y en el sistema nervioso central de un ratón transgénico condicional produce un aumento en la actividad de cdk5, y potencia la muerte debida al péptido A $\beta$ .

## **4.- OBJETIVO GENERAL**

El objetivo general de este trabajo de Tesis Doctoral es analizar los mecanismos en torno a la desregulación del sistema cdk5/p35 en el contexto de los procesos neurodegenerativos asociados a la EA, basados en los hallazgos de nuestro laboratorio entre otros, que apuntan hacia un mecanismo por el cual se desregula la actividad del complejo originando hiperfosforilación en la proteína tau.

### **4.1.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.- Desarrollar un modelo de ratón transgénico condicional que sobreexpresa p35 en el sistema nervioso central.
  
- 2.- Analizar la participación de p35 en los procesos neurodegenerativos en relación con la EA.
  - 2.1.- Caracterización genotípica de los animales
  - 2.2.- Caracterización fenotípica de los animales
  
- 3.- Establecer la relación entre el péptido A $\beta$  y la vía de cdk5/p35 en el contexto de la neurodegeneración en la EA.

## **5.- MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1.- MATERIALES**

#### **5.1.1.- Material Biológico**

La cepa de ratones C57BL/6J tTA (Mayford y col. 1996) fue gentilmente donada por el Dr. J. Lucas (Madrid, España). También se utilizó la cepa de ratones FVB para generar los animales transgénicos BitetO-p35/GFP. Además, se utilizó la línea celular N<sub>2</sub>A (neuroblastoma de ratón) (ATCC-CCL-131). Por otro lado, se utilizó la cepa de E. coli DH5 $\alpha$  (Promega).

#### **5.1.2.- Reactivos Químicos y de Cultivo Celular**

Los reactivos y productos químicos de uso general utilizados en el desarrollo de esta tesis fueron obtenidos de Sigma, TCL, Calbiochem, Winkler y Sudelab. Las películas autoradiográficas de FujiFilm (HR-U30). El medio Neurobasal (NB), Hank (HBSS), suplemento N2 y B27 de Gibco. Los oligonucleótidos fueron obtenidos de Invitrogen. Reactivo quimiolumincente para *western blot* ECL fue obtenido de Perkin Elmer. El péptido amiloide se obtuvo por “*custom made*” síntesis Global Peptide para el Laboratorio del Dr. Maccioni.

## **5.2.- MÉTODOS**

### **5.2.1.- Cultivo Celular**

La línea N<sub>2</sub>A-tTA expresa constitutivamente el transgén tTA. Estas células fueron crecidas en medio DMEM (Gibco) suplementado con suero fetal bovino (FBS) (Gibco) al 10%, 100 µg/mL de penicilina y estreptomicina (Gibco) y G418 Sulfate (Gibco) 250 µL/mL y cultivadas en placas de cultivo a 37°C, en un incubador con 5% de CO<sub>2</sub> y humedad controlada al 95% hasta alcanzar la densidad deseada.

Cultivos primarios de neuronas de hipocampo se prepararon de embriones en E18 de ratones FVB, según protocolo descrito por Banker y Cowan, 1977. El tejido se resuspendió en tampón Hank -Tripsina EDTA 0,25% (Gibco) y se incubó por 10 min a 37°C. Después de 3 lavados con HBBS el tejido se disocio mecánicamente con pipeta Pasteur. Las células se sembraron en medio neurobasal (NB)-10% de suero de caballo (Gibco), suplementado con 1mM de glutamina y piruvato (Gibco), durante 3 horas a una densidad de 20.000 células/cm<sup>2</sup>. Posteriormente se cambió el medio a NB-B27 o NB-N2 (Gibco), suplementado con 1 mM de glutamina y piruvato (Gibco). Los cultivos se mantuvieron en incubador humidificado a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### **5.2.2.- Clonación de p35 en el Vector BiTetO-EGFP**

El cDNA de p35 se amplificó a partir de un plasmidio donado gentilmente por el Dr. A. Cáceres (Córdoba, Argentina), con los siguientes partidores sentido y antisentido (Invitrogen™) que contienen en sus extremos las secuencias de corte de las enzimas de restricción MluI (partidor sentido: 5'-GAC GCG TAT GGG CAC GGT GCT GTC C-3') y NheI (antisentido: 5'-GCG CTA GCG GCT CAC CGA TCC AGC C-3'). Luego el producto amplificado p35 se clonó en el vector TOPO TA Cloning® Kits (Invitrogen™) y posteriormente el cDNA p35 se liberó al digerir con las enzimas NheI y MluI (Fermentas), y se clonó en el vector BiTetO-EGFP (Clontech) digerido con las mismas enzimas. Por último, los clones positivos se analizaron mediante análisis de restricción y por secuenciación.

### **5.2.3.- Transfección de Líneas Celulares**

Para verificar la funcionalidad del vector recién construido, se transfectó la línea celular de neuroblastoma de ratón N<sub>2</sub>A-tTA con el vector BiTetO-p35/EGFP durante 48 h. Se utilizó el reactivo de transfección TransFast™ (Promega) y/o Lipofectamina 2000 (Invitrogen™) más Opti-MEM (Invitrogen™) como vehículo de transfección según protocolos establecidos por el fabricante.

### **5.2.4.- Preparación de los Extractos de Proteínas Para Estudios de Inmunodetección e Inmunoprecipitación**

Después de las 48 h de transfección, se retiró el medio de cultivo y las células fueron lavadas 3 veces con PBS 1X (NaCl 137 mM, KCl 27 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>+7H<sub>2</sub>O 4.3 mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.4 mM, pH=7.3) y homogenizadas con 150 µL de tampón de lisis RIPA (Tris 50 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, NP-40 1%, desoxicolato de sodio 0,5% y SDS 0,1%) más inhibidores de proteasas (PMSF 100 µg/mL, aprotinin 2 µg/mL, leupeptina 2 µM y pepstatina 1 µg/mL) mediante raspado de las placas de cultivo con *scraper*. Posteriormente, a los homogenizados se agregó 1% de Tritón X100 y luego fueron sonicados. Los extractos fueron centrifugados a 12000 rpm por 15 min a 4°C y las proteínas contenidas en el sobrenadante se cuantificaron por medio del método de Bradford modificado (BioRad).

### 5.2.5.- Inmunodetección

En experimentos de *western blot*, las proteínas del sistema nervioso fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida de 6% a 15% más SDS 0,1%, transferidas a membranas de nitrocelulosa y procesadas mediante un procedimiento estándar descrito por Alvarez y col. 1999. De 10 a 30 µg de proteínas se cargaron en un gel de acrilamida, que luego fue trasferido a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente, se bloqueó 1 h a TA en PBS-*Tween20* 0,05%-leche 5%, y luego se incubó toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios preparados en PBS-*Tween20*-leche 1%. Al día siguiente, las membranas se lavaron 3 veces por 10 min a TA con PBS-*Tween20* 0,05%. Luego se incubó el anticuerpo secundario también preparado en PBS-*Tween20* 0,05%-leche 1% por 1 h a TA, y las membranas fueron lavadas

finalmente con PBS-*Tween20* 0,05% por 3 veces por 10 min a TA. El reactivo ECL (Perkin Elmer) fue agregado a las membranas durante 2 min y posteriormente las membranas fueron expuestas a Film (Fujifilm HR-U30) y luego reveladas.

#### **5.2.6.- Inmunoprecipitación**

De 200 a 500 µg de extractos proteicos de células N2A transfectadas con el vector BiTetO-p35/EGFP fueron incubados con 5 µL de proteína A 50% (Sigma) por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente esta mezcla se centrifugó a 1000 rpm por 10 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se incubó a 4°C toda la noche con 5 µL de un anticuerpo policlonal anti-Cdk5 (C8) (Santa Cruz Biotechnology). Al otro día, se agregó 20 µL de proteína A 50% (Sigma) a los inmunoprecipitados por 2 h a 4°C. Luego los IPP se centrifugaron 1000 rpm por 10 min a 4°C para obtener los inmunocomplejos. El pellet obtenido se lavó 3 veces con tampón RIPA. Finalmente los pellet que contienen los inmunocomplejos fueron fraccionados en geles de SDS-PAGE.

#### **5.2.7.- Ensayo de Actividad de Cdk5**

Los ensayos de actividad quinasa *in vitro* fueron realizados según protocolos descritos por Alvarez y col., 2001. Los inmunocomplejos precipitados en el paso anterior (inmunoprecipitación) con el anticuerpo anti-cdk5 fueron lavados 3 veces con tampón RIPA y una vez con tampón quinasa (Hepes 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MnCl<sub>2</sub> 5 mM, DTT 1 µM) más ATP frío 1 µM. Estos inmunoprecipitados se incubaron con 2,5

$\mu\text{g}$  de histona H1 más 5  $\mu\text{Ci}$  [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] ATP en un volumen de 50  $\mu\text{L}$  por 30 min a 30°C. Después de la incubación, las reacciones fueron analizadas por fraccionamiento en geles SDS-PAGE, luego fueron transferidas a nitrocelulosa y autoradiografiadas en el equipo PhosphoImager. Posteriormente, la cantidad de cdk5 de cada ensayo quinasa fue ensayada en las mismas membranas mediante *western blot*.

### 5.2.8.- Inmunofluorescencia

Los ensayos de inmunofluorescencia fueron realizados según protocolos descritos por Álvarez y col., 2001. Brevemente, células N2A y neuronas hipocámpales fueron crecidas sobre *coverslip*. Luego fueron fijadas con una mezcla de paraformaldehído 4%-sacarosa 4% por 20 min a 37°C. La permeabilización se realizó con Metanol frío a -20°C por 10 min y con PBS1X-tritón x-100 0,1% por 10 min. Luego los *coverslip* fueron bloqueados durante 1 h con BSA al 5% e incubadas durante toda la noche a 4°C o 1 h a T.A. con los anticuerpos primarios preparados en BSA 1% en PBS1X. Luego, los *coverslip* fueron lavados 3 veces con PBS1X e incubados durante 1 h a T.A. con anticuerpos secundarios anti-rabbit y anti-mouse acoplados a isotiocianato de fluoresceína (FITC), Rodamina (TRIC) y Alexa Fluor 546 (Molecular Probes). Después de 3 lavados con PBS1X, los *coverslip* fueron montados sobre portaobjetos con el reactivo Fluorsave (Calbiochem) y visualizados en el microscopio confocal invertido LSM 510 (Zeiss).

### 5.2.9.- Extracción de DNA Genómico de Colas de Ratón

Se disectó una biopsia de cola de ratón (1 cm) y se agregó 500  $\mu\text{L}$  de Buffer de digestión de tejido (50 mM tris pH=8,3; 100 mM NaCl; 5 mM EDTA y 0,8% SDS) y 4  $\mu\text{L}$  de proteinasa K 20 mg/mL. Esta mezcla fue incubada con agitación a 55°C de 2 a 4 h. Una vez disuelto el tejido se agregó 1 volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico 25/24/1 y se centrifugó 10 min a 14000 rpm. Se separó la fase acuosa y se agregó otro volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico 25/24/1, se centrifugó 10 min a 14000 rpm y a la fase acuosa se le agregó 1/10 volumen de Acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 2,5 volúmenes de etanol puro. Se agitó por inversión hasta la formación de un ovillo de DNA, el cual fue resuspendido en 100  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O precalentada a 55°C por 10 min. El DNA resuspendido fue guardado a -20°C.

#### **5.2.10.- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Para analizar el genotipo de los ratones, se extrajo DNA genómico de las colas de los animales (según protocolo arriba descrito), y posteriormente se realizó un PCR con partidores específicos contra EGFP y tTA (Invitrogen<sup>TM</sup>). La secuencia de los partidores de EGFP son las siguientes: EGFP sentido 5',-AAG TTC ATC TGA ACC ACC G-3' y EGFP antisentido 5'-TCC TTG AAG AAG ATG GTG CG-3'. El protocolo de amplificación consistió en 30 ciclos de 0,5 min a 94°C, 1 min a 62°C y 1 min a 72°C y se obtuvo un fragmento de tamaño 173 pb. Los partidores para tTA son: tTA sentido 5'-ACT AAG TCA TCG CGA TGG AGC-3' y tTA antisentido 5'-CGA AAT CGT CTA GCG CGT CGG-3'. El protocolo de amplificación consistió en un pre-PCR de 5 min a

94°C, 1 min a 53°C y 1 min a 75°C, seguido de 30 ciclos de 1 min a 94°C, 40 s a 53°C y 1 min a 72°C. La amplificación generó un producto de 593 pb.

#### **5.2.11.- Extracción de RNA Total y RT-PCR**

Se extrajo RNA total de cerebro de ratón (corteza, hipocampo y cerebelo) mediante el reactivo TRIZOL (Invitrogen™). El tejido (100 mg) más 1 mL de TRIZOL fue homogenizado mecánicamente en un homogenizador de vidrio. Se incubó por 5 min y se adicionó 200 µL de cloroformo, se agitó por 15 s y se incubó 3 min a T.A. Después de la centrifugación a 12000 rpm por 15 min a 4°C, se separó la fase acuosa y se le adicionó 500 µL de isopropanol. Se incubó por 10 min a T.A. y se centrifugó a 12000 rpm por 10 min a 4°C. El RNA se lavó con 1 mL de etanol 75%. Se centrifugó y el pellet de RNA se resuspendió en 50 µL de agua libre de RNAsas. Para determinar la concentración y la pureza de RNA se midió la OD260 nm y 280 nm.

La reacción de transcripción inversa se realizó similar al protocolo que trae la enzima Super Script II (Invitrogen™). Por otro lado, como control de la reacción de RT-PCR se utilizaron los siguientes partidores contra cdk5: cdk5 sentido 5'-ATT GTG GCT CTG AAG CGT GTC-3' y cdk5 antisentido 5'-CTT GTC ACT ATG CAG GAC ATC-3'. El protocolo de amplificación consistió en 30 ciclos de 0.5 min a 94°C, 1 min a 55°C y 1 min a 72°C. La amplificación generó un producto de 138 pb.

#### **5.2.12.- Southern blot**

A partir de DNA genómico de las colas de los ratones, se procedió a genotipar a los animales usando la técnica de *Southern blot* (Sambrook y Russell, 2001). Para ello, 10 µg de DNA fueron digeridos con BamHI, y una vez separados por electroforesis en geles de agarosa al 0,8% fueron transferidos a membranas GeneScreen Plus (NEN). Posteriormente las membranas fueron incubadas en 0,5M tampón fosfato pH 7.0 que contenía, 1% BSA, 7% SDS, 15% formamida y 1 mM EDTA. Luego de preincubar las membranas durante 1 h a 60°C en esta solución, se agregó una sonda del gen GFP marcada con dCTP-P<sup>32</sup> por el sistema RediPrime (Amersham) y se incubaron toda la noche a 60°C. Al día siguiente, las membranas fueron lavadas 1 vez durante 1 h con 0,15 M tampón fosfato más 0,1% SDS, y dos veces por 30 min con 0,03M tampón fosfato más 0,1% SDS. Posteriormente las membranas fueron expuestas durante varios días a -70°C y finalmente los resultados fueron analizados en el equipo Molecular Image (BioRad).

### **5.2.13.- Transfecciones Simples, Dobles y Triples de Neuronas Hipocampales de Ratón.**

Cultivos primarios de neuronas hipocampales de 2 a 3 días fueron transfectados con: a) Solo Lipofectamina, b) BiTetO-p35/EGFP, c) BiTetO-p35/EGFP y tTA y d) BiTetO-p35/EGFP, tTA y CFP (vector de expresión constitutiva). Se retiró el medio de cultivo se incubaron con los vectores durante 3,5 h en medio Opti-MEM (Gibco). Luego se retiró la solución de transfección y se incubaron con NB-B27. Se agregó tetraciclina

1 µg/mL y se incubó durante 24 h. Al cabo de ese tiempo las neuronas fueron fijadas y permeabilizadas para luego realizar la inmunocitoquímica.

#### **5.2.14.- Agregación del Péptido $\beta$ -Amiloide**

El péptido A $\beta_{1-42}$  fue obtenido mediante síntesis ordenada para el Laboratorio del Dr. Maccioni por el sistema “custom made” a Global Peptide. Para obtener fibras amiloides de A $\beta_{1-42}$  se indujo la formación mediante agitación (Evans y col., 1995). Se resuspendió 1 mg de péptido liofilizado en 67 µL de DMSO estéril, se le adicionaron 933 µL de PBS estéril y se dejó agitando durante 7 días a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 14000 rpm por 30 min a 4 °C, para finalmente resuspender el sedimento en PBS estéril a una concentración de 1 µg/µL. La formación de las fibras amiloides se confirmó por microscopía electrónica, en microscopio JEOLX100 de la Unidad de Microscopía Avanzada (UMA) del Instituto Milenio CBB.

#### **5.2.15.- Ensayo de Citotoxicidad**

Luego de transfectar neuronas hipocampales con los vectores arriba descritos, se agregó 10 µM de A $\beta_{1-42}$  durante 24 h. Posteriormente las neuronas fueron fijadas y permeabilizadas. El nivel de apoptosis fue determinado mediante el kit *In Situ Cell Death Detection* (Roche) y mediante inmunofluorescencia contra caspasa 3 activada. Las preparaciones fueron analizadas utilizando el microscopio Confocal Zeiss LSM 510 de la Unidad de Microscopía Avanzada (UMA) del Instituto Milenio CBB.

### **5.2.16.- Estadística**

Se llevaron a cabo análisis estadísticos paramétricos (ANOVA, Test Tukey HSD, Test de Student) y no paramétricos (Test Mann Whitney y Test de Fisher).

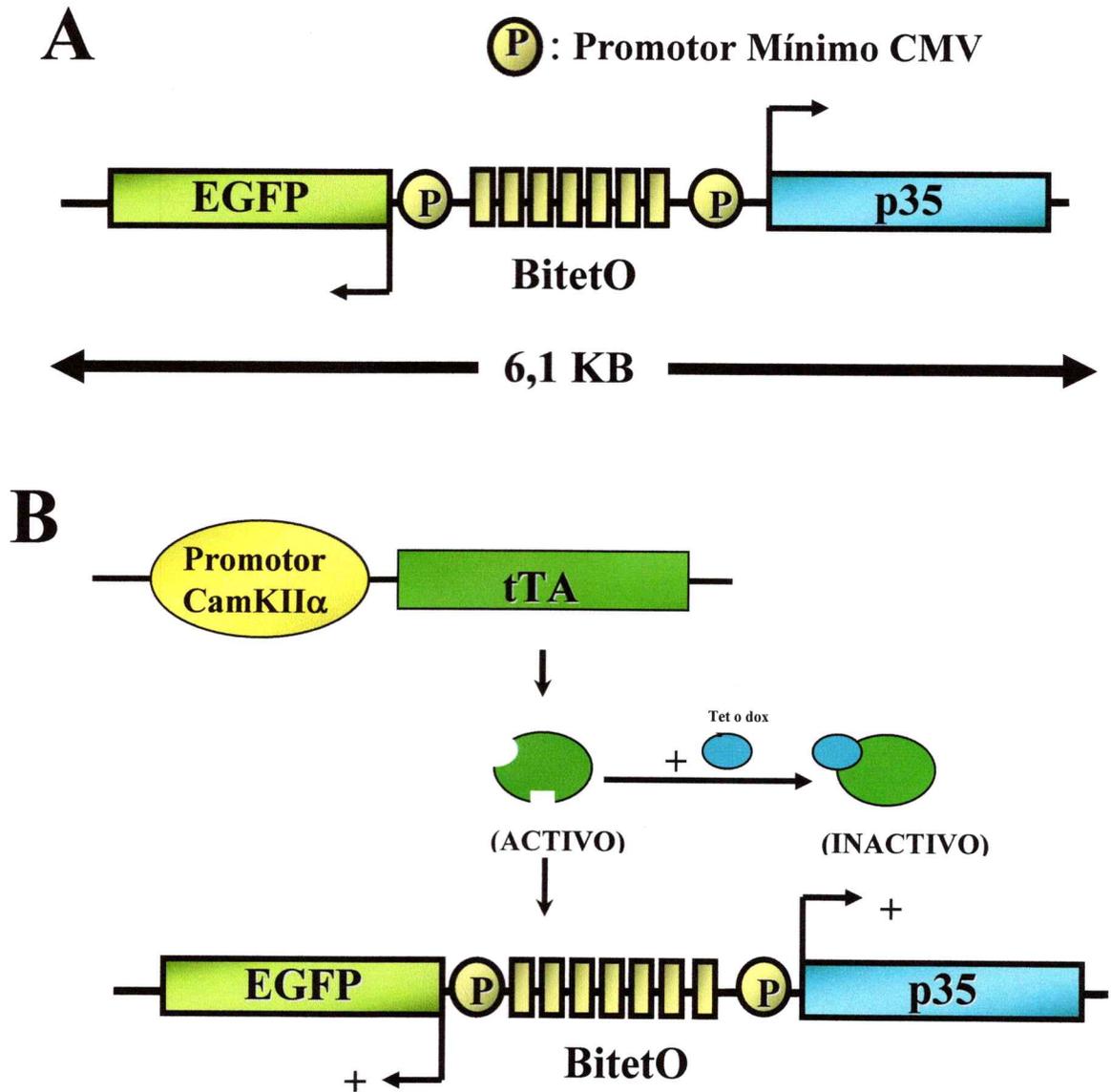
## **6.- RESULTADOS**

---

### **6.1.- GENERACIÓN DE UN RATÓN TRANSGÉNICO CONDICIONAL**

#### **6.1.1.- Sistema de Expresión Condicional (tet-off)**

Para la generación de un ratón transgénico condicional se utilizó el sistema dependiente de tetraciclina (Furth y col., 1994; Kistner y col., 1996; Mayford y col., 1996). La regulación del transgén se alcanzó a través de un transactivador regulado por tetraciclina (tTA), una proteína de fusión entre el dominio de unión del represor tet y el dominio de activación VP16 (Furth y col., 1994). Esta proteína se une específicamente al operador tetO e induce la transcripción de un promotor mínimo de citomegalovirus (CMV) adyacente. La combinación de ambos, tTA y elementos TetO permite la expresión continua de un transgén dado. Tetraciclina y sus análogos pueden unirse a tTA. Cuando esto sucede, tTA no puede unirse a TetO y la transcripción es inhibida. Se generó un ratón transgénico usando un vector con un promotor bidireccional respondedor TetO seguido del cDNA de p35 en una dirección y el cDNA de la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP) en la otra dirección (**Figura 3A**). Estos ratones se designaron como BiTetO-p35/EGFP. El otro componente necesario para la expresión de p35 y EGFP en nuestro sistema binario, fue el transgén tTA. Este transgén se encuentra codificado en un segundo animal transgénico bajo el control del promotor calcio/calmodulina quinasa II $\alpha$  (CamKII $\alpha$ ) (Mayford y col., 1996). En estos ratones la expresión del transgén tTA está condicionada al sistema nervioso central, con una

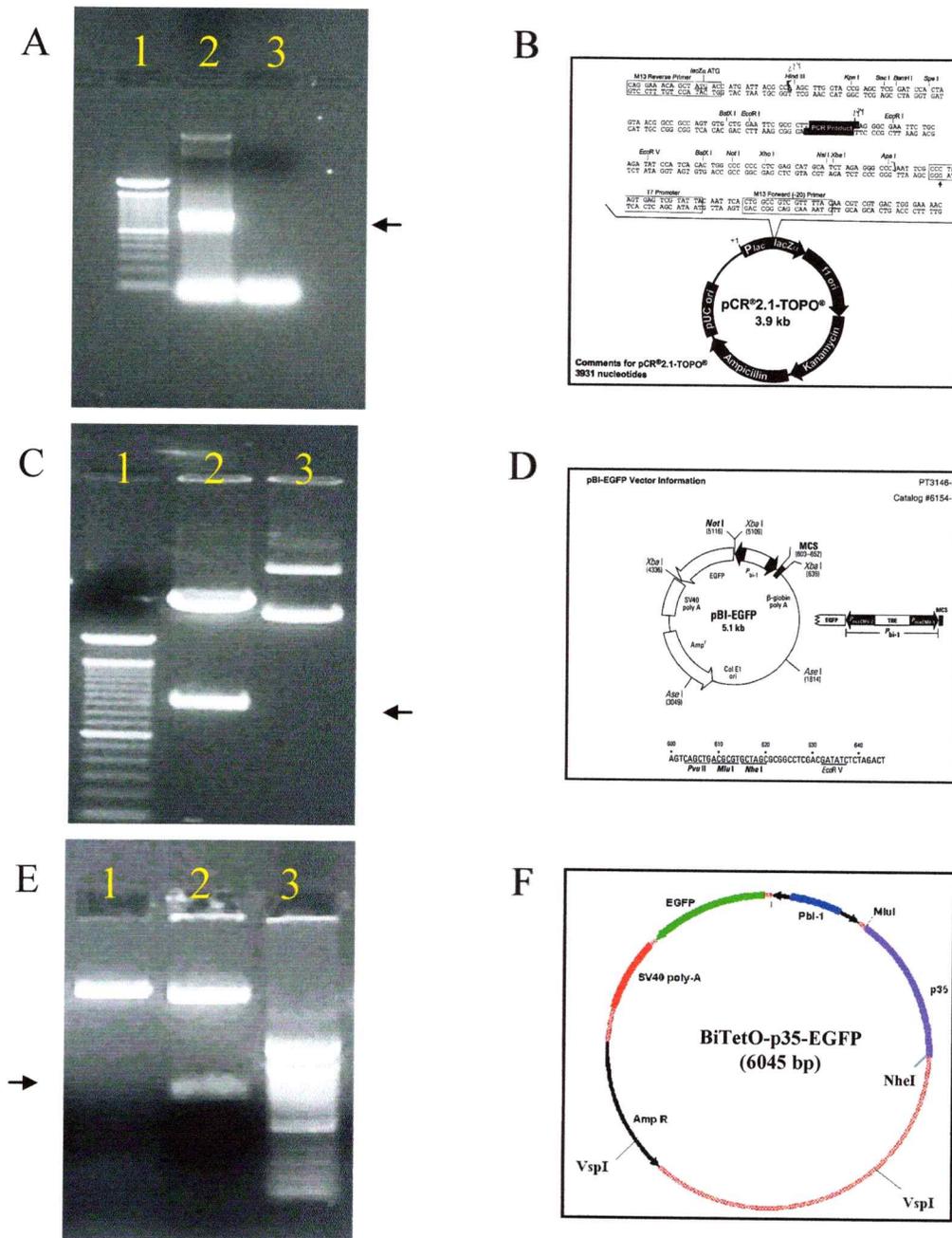


**Figura 3:** Diseño del ratón transgénico condicional. **A:** Representación esquemática del vector BitetO de expresión inducible. Este vector consiste de 7 copias de una secuencia operador palindrómica llamada tet flanqueada por dos secuencias promotoras mínimas CMV en orientaciones divergentes. El promotor bidireccional está seguido por el cDNA de p35 en una dirección y el cDNA de EGFP en la otra. **B:** Representación esquemática del sistema de regulación dependiente de tetraciclina. La transcripción de la molécula tTA está regulada por el promotor de la CamKII $\alpha$ . En su forma activa, tTA se une a las secuencias operadoras tet comandando la expresión de ambos transgenes. La tetraciclina o su análogo doxiciclina pueden inhibir la expresión de los transgenes debido a la unión a tTA.

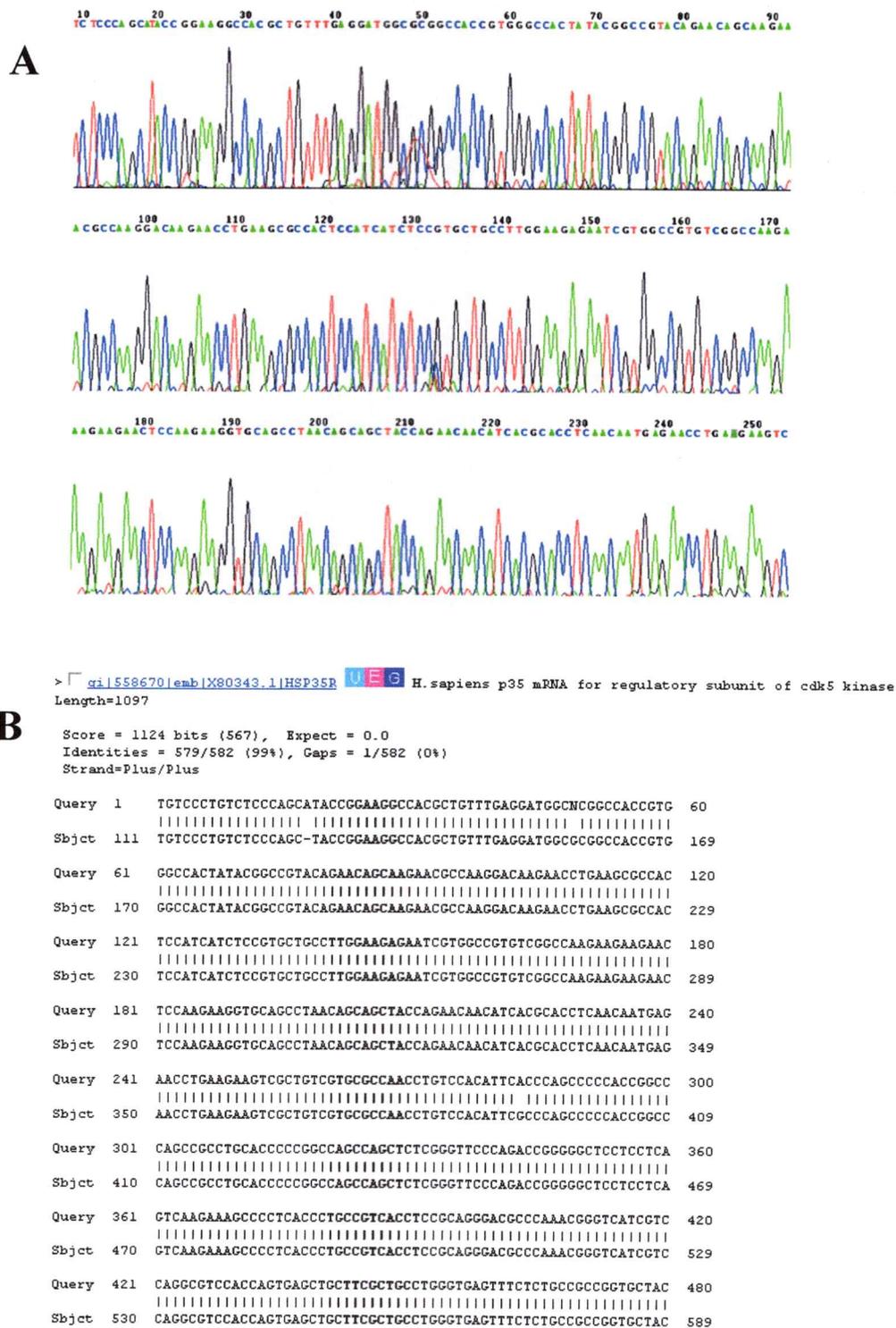
expresión particularmente alta en el cerebro anterior adulto (Mayford y col., 1996). Cuando los ratones BiTetO-p35/GFP son cruzados con ratones CamKII $\alpha$ -tTA, la progenie doble transgénica constitutivamente expresará ambos transgenes (p35 y EGFP). Esta expresión, no obstante, puede ser inhibida en presencia de tetraciclina o de su análogo doxiciclina (dox) (**Figura 3B**).

### 6.1.2.- Clonamiento de cDNA de p35 en el Vector de Expresión Condicional

Se generó el vector bidireccional BiTetO que transporta p35 y EGFP. Para ello, el cDNA de p35 se amplificó mediante PCR a partir del plasmidio con los partidores sentido (extremo amino) y antisentido (extremo carboxilo) que contienen en sus extremos las secuencias de corte de las enzimas de restricción MluI y NheI (**Figura 4A**). Luego, el producto amplificado por PCR de p35 se purificó y se subclonó en el vector pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> (**Figura 4B**). Este subclonamiento ocurre ya que en los extremos de los productos de PCR, la Taq polimerasa coloca una timina y el vector pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> es un vector lineal con una adenina en cada extremo y de este modo, ambos fragmentos se ligan (**Figura 4C**). Posteriormente, se liberó el cDNA de p35 con las enzimas MluI y NheI y se clonó direccionalmente en el vector pBI-EGFP digerido con las mismas enzimas (**Figura 4D**). Al digerir este último vector con las enzimas MluI y NheI se liberó un fragmento sobre las 900 pb, lo cual es esperado ya que el fragmento de p35 es de 924 pb (**Figura 4E**). A este vector, que transporta EGFP en una dirección y p35 en la otra dirección se le denominó BiTetO-p35/EGFP (**Figura 4F**). Para corroborar este resultado se secuenció el vector BiTetO-p35/EGFP (**Figura 5A**) con el partidador sentido



**Figura 4:** Generación del vector BiTetO-p35/EGFP. **A:** Mediante PCR con partidores específicos contra p35 se obtuvo el cDNA de p35. 1) estandar 100 bp; 2) producto de PCR p35 (0,924 Kb); 3) control negativo; flecha: indica el producto de PCR de p35 en carril 2. **B:** Mapa del vector pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>. **C:** Clonamiento del cDNA p35 en vector pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>. 1) estandar 100 bp; 2) pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> digerido con MluI y NheI; 3) pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> sin digerir; flecha: indica el cDNA de p35 liberado en el carril 2. **D:** Mapa del vector pBI-EGFP. **E:** Clonamiento de p35 en vector pBI-EGFP. 1) pBI-EGFP sin digerir; 2) pBI-EGFP digerido con MluI y NheI; 3) estandar 100 bp; flecha: indica el cDNA de p35 liberado en el carril 2. **F:** Mapa del vector BiTetO-p35/EGFP.

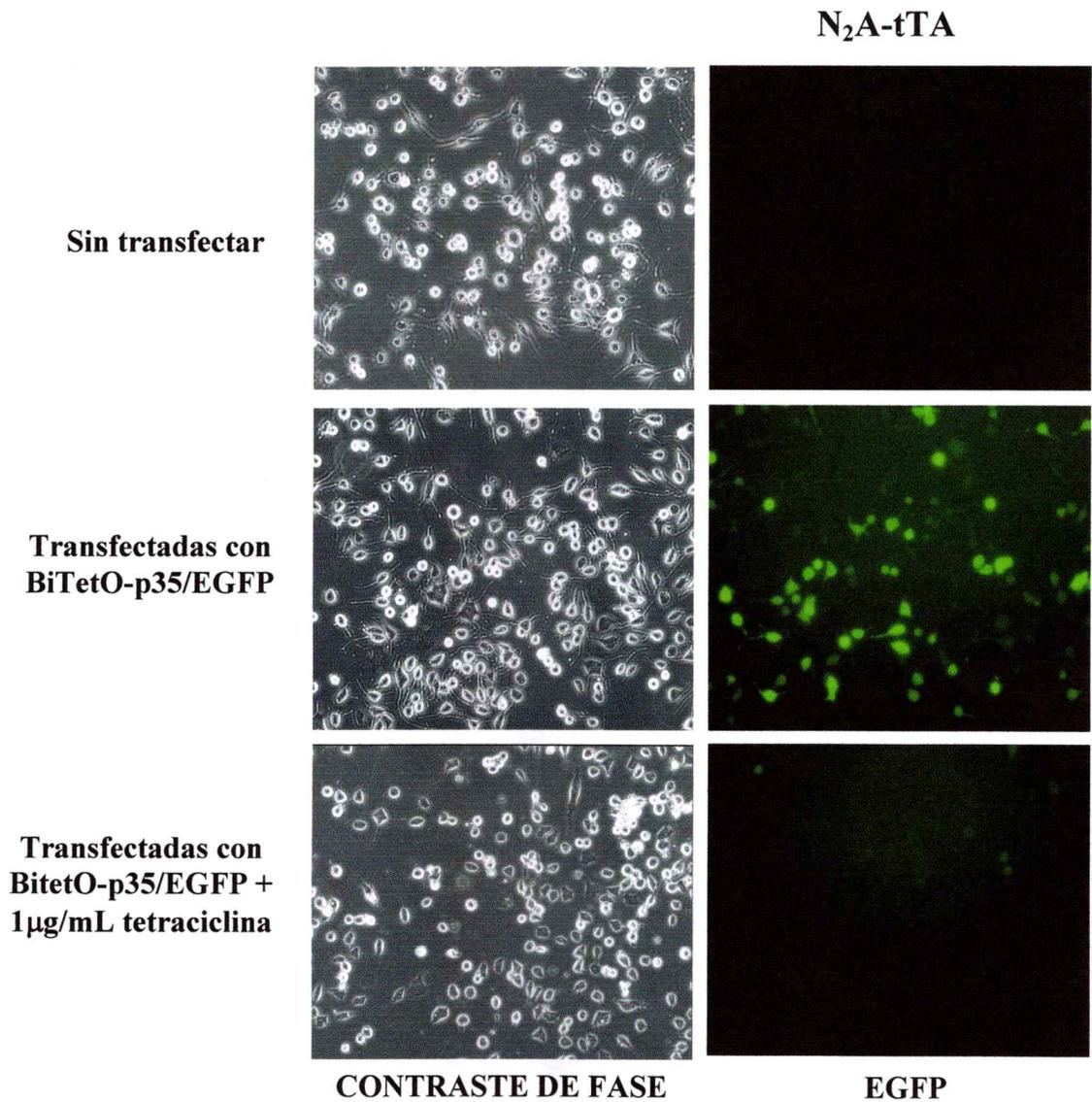


**Figura 5:** Secuencia y alineamiento del vector BiTetO-p35/EGFP. **A:** el vector BiTetO-p35/EGFP fue secuenciado con el partidor sentido de p35. **B:** Alineamiento de la secuencia con la base de datos (BLAST). Se obtuvo sobre un 99% de identidad con el cDNA de p35 de humano (N° de acceso: 558670).

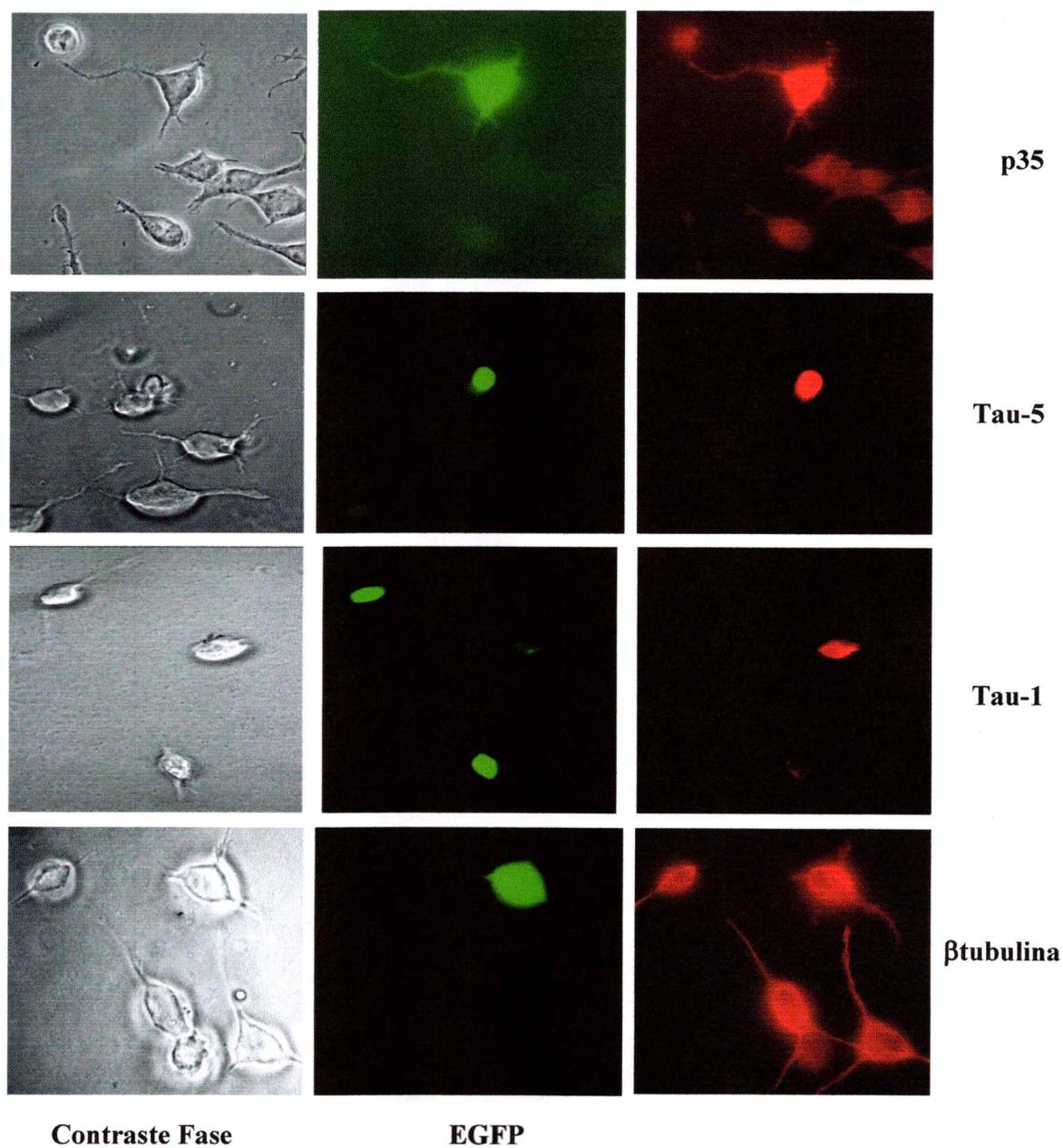
de p35 y luego de un alineamiento con la base de datos se obtuvo sobre un 99% de identidad con el cDNA de p35 de humano (N° de acceso: 558670) (**Figura 5B**).

### **6.1.3.- Transfección del Vector BiTetO-p35/EGFP en células N<sub>2</sub>A-tTA**

Se verificó la expresión del vector BiTetO-p35/EGFP en células N<sub>2</sub>A transfectadas establemente con tTA. La eficiencia de transfección de estas células fue en promedio de un 48±5,7 % determinado mediante la fluorescencia intrínseca de EGFP (**Figura 6**). Además, se realizaron inmunofluorescencias contra p35, tau y β-tubulina de estas células transfectadas. La proteína p35 se expresa constitutivamente en bajos niveles. Luego de transfectar el vector BiTetO-p35/EGFP, los niveles de p35 aumentan considerablemente y esto se corrobora por la expresión de EGFP en las mismas células, es decir, ambos transgenes son expresados en las mismas células (**Figura 7**). Por otro lado, los niveles de la proteína tau son muy bajos en células N<sub>2</sub>A-tTA. Por esta razón, se co-transfectaron con un vector que transporta el cDNA de tau humana en presencia del vector BiTetO-p35/EGFP. Con un anticuerpo contra tau total (Tau-5) se analizó la expresión de tau en las mismas células EGFP positivas (**Figura 7**). Debido a que el anticuerpo AT-8, que reconoce los residuos fosforilados en Ser202 y Ser205 en la proteína tau, no funciona bien en inmunofluorescencia, se utilizó el anticuerpo recíproco denominado Tau-1, que reconoce estos mismos residuos pero desfosforilados. En células que sobreexpresan p35, y por ende poseen mayor actividad de cdk5, la marca para Tau-1 fue menor que en células no transfectadas en donde la marca para Tau-1 fue mas alta (**Figura 7**). Es decir, indirectamente se demuestra que la sobreexpresión de p35 induce



**Figura 6:** Transfección transiente del vector BiTetO-p35/EGFP en presencia y ausencia de 1 µg/mL de tetraciclina en células N<sub>2</sub>A transfectadas establemente con el transactivador (tTA). Mediante el conteo de células en microscopia en contraste de fase y fluorescencia para EGFP se determinó que la eficiencia de transfección de estas células fue en promedio de 48±5,7% de células transfectadas. Las imágenes fueron tomadas con el objetivo 20x del Microscopio Confocal.

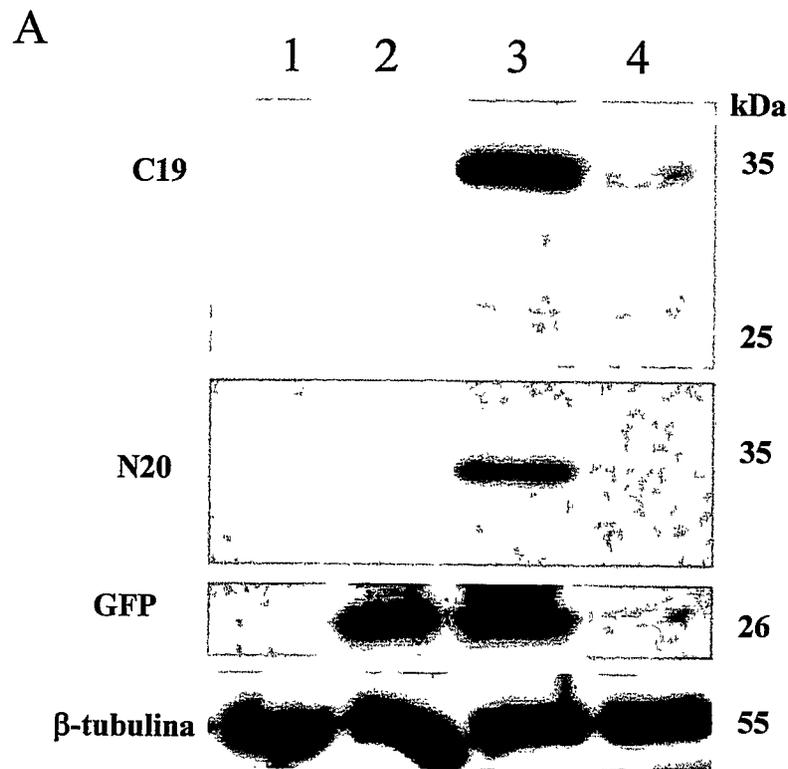


**Figura 7:** Inmunofluorescencia de células N2A-tTA transfectadas con el vector BiTetO-p35/EGFP. En los paneles de izquierda a derecha se muestran imágenes de contraste de fase, fluorescencia de EGFP y las distintas inmunofluorescencias con los anticuerpos descritos a la derecha. Se analizó p35 (C19), Tau-5, Tau-1 y  $\beta$ -tubulina. Las imágenes fueron tomadas con el objetivo 63x del microscopio confocal.

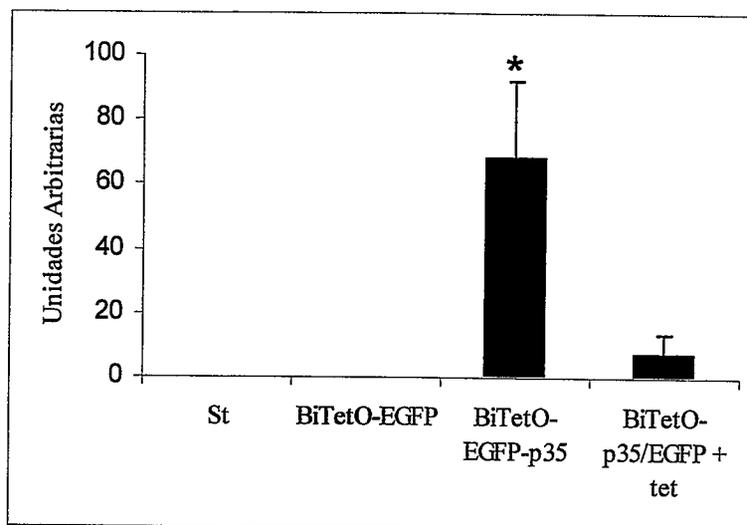
una mayor fosforilación de tau. Por último, se utilizó un anticuerpo anti  $\beta$ -tubulina para determinar que la morfología de las células transfectadas y no transfectadas no cambió sustancialmente (**Figura 7**).

Mediante *western blots* se determinó que ambos transgenes (p35 y EGFP) son altamente expresados en células N<sub>2</sub>A-tTA luego de una transfección transiente de 48 h. En cambio, la expresión de éstas proteínas disminuyó drásticamente en presencia de 1  $\mu$ g/mL de tetraciclina, indicando que la expresión de ambos transgenes efectivamente era dependiente de tetraciclina (**Figura 8A**). Los niveles endógenos de p35 en estas células son muy bajos, casi indetectables por *western blot*, por lo tanto la cuantificación de la expresión de p35 en células transfectadas fue muy alta ( $68,1 \pm 23,7$ ; n=4) con respecto a la expresión endógena de p35. Además, en los extractos provenientes de células transfectadas en presencia de tetraciclina hubo una drástica disminución de casi 10 veces con respecto a las células transfectadas sin tetraciclina ( $7,5 \pm 6,0$ ; n=4; p=0,015; Test Mann Whitney) (**Figura 8B**).

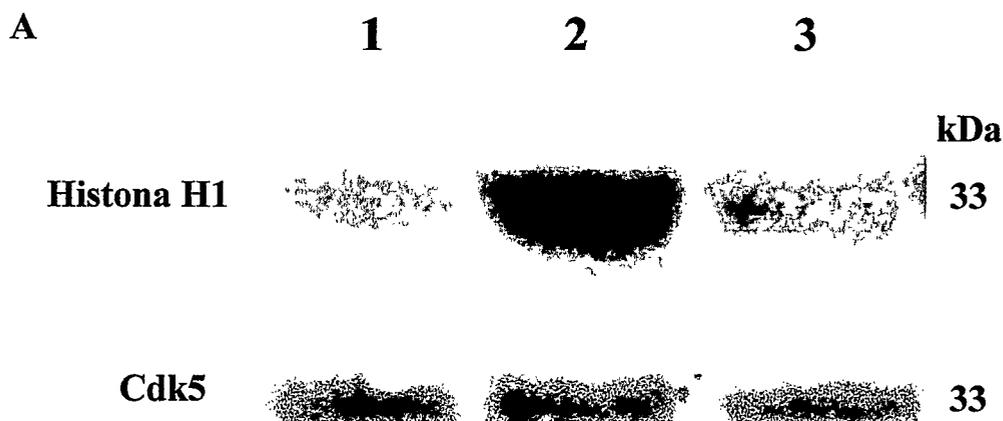
Por otro lado, se realizaron ensayos de actividad quinasa de los extractos proteicos de células N<sub>2</sub>A-tTA transfectadas con BiTetO-p35/EGFP. Estos extractos fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo policlonal anti-cdk5 (C8) y se utilizó histona H1 como sustrato de la actividad quinasa y fósforo gama radioactivo ( $P^{32}$ ). Los niveles de cdk5 en cada inmunoprecipitado fueron analizados con anticuerpo monoclonal anti-cdk5 (J3), encontrándose similares niveles en los tres casos analizados (**Figura 9A**). Una vez cuantificada la incorporación de ATP- $P^{32}$  a Histona H1 se determinó que la actividad de cdk5 aumentó cerca de 4 veces en células transfectadas con BiTetO-p35/EGFP versus células sin transfectar (p<0,01 test Tukey HSD) y este



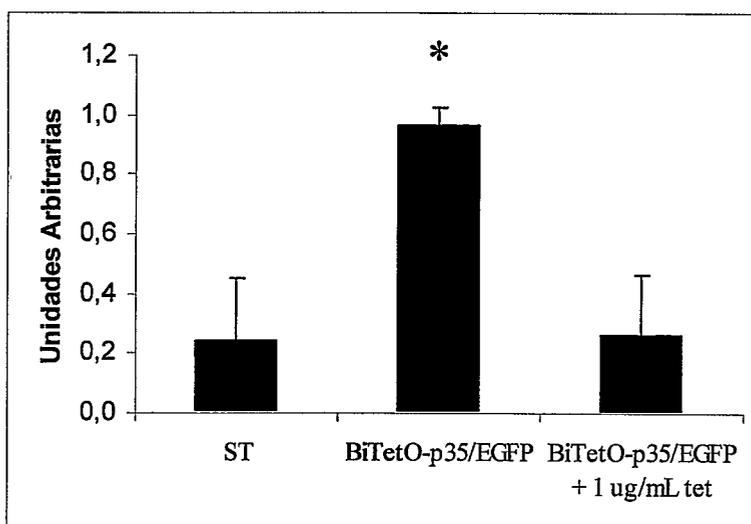
**B**



**Figura 8:** Expresión y regulación de transgenes en células  $N_2A$ -tTA. **A:** Se transfectaron células  $N_2A$ -tTA con: **1)** sin transfectar, **2)** BiTetO-EGFP, **3)** BiTetO-p35/EGFP y **4)** BiTetO-p35/EGFP más 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de tetraciclina. Mediante *western blot* y con anticuerpos específicos se determinó la expresión de p35 (C19, N20), EGFP y  $\beta$ -tubulina en células. **B:** Cuantificación de la expresión de p35 en células  $N_2A$ -tTA transfectadas ( $n=4$ ) con BiTetO-p35/EGFP en ausencia ( $68,05 \pm 23,77$ ) y presencia de tetraciclina ( $7,48 \pm 6,03$ ). El asterisco representa una diferencia significativa entre las barras ( $p \leq 0,015$ ; Test Mann Whitney).



**B**

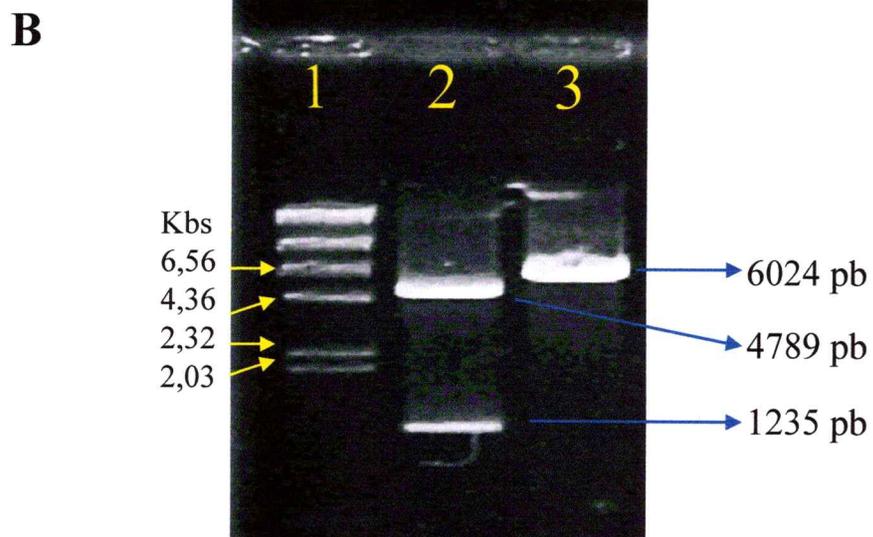
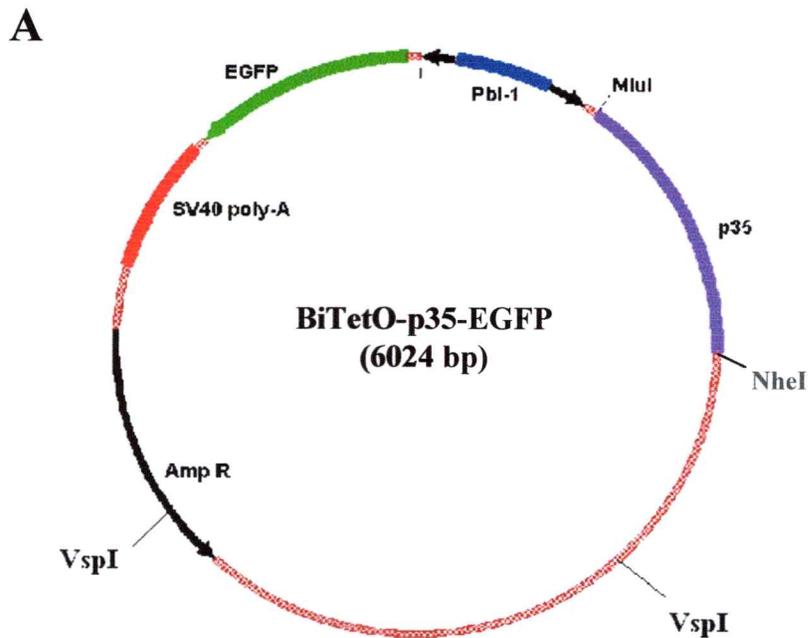


**Figura 9:** Ensayo de actividad quinasa. **A:** Extractos proteicos de células  $N_2A$ -tTA transfectadas con BiTetO-p35/EGFP fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo policlonal contra cdk5 (C8) y se realizó un ensayo de actividad quinasa con Histona H1 como sustrato ( $n=3$ ). Incorporación de ATP- $P^{32}$  en Histona H1 en células 1) sin transfectar, 2) transfectadas con BiTetO-p35/EGFP y 3) transfectadas con BiTetO-p35/EGFP más  $1\mu\text{g/mL}$  de tetraciclina. Los niveles inmunoprecipitados de cdk5 no varían en los tres casos analizados determinado mediante *western blot* con el anticuerpo monoclonal contra cdk5 (J3). **B:** La actividad de Cdk5 aumenta en las células transfectadas con BiTetO-p35/EGFP ( $0,96\pm 0,06$ ) versus células sin transfectar ( $0,24\pm 0,21$ ;  $p<0,01$  test Tukey HSD) y este aumento cae a los niveles basales en presencia de tetraciclina ( $0,27\pm 0,20$ ;  $p<0,01$  test Tukey HSD).

aumento disminuyó a los niveles basales en presencia de tetraciclina ( $p < 0,01$  test Tukey HSD) (**Figura 9B**). Con respecto al aumento de 68 veces en la expresión de p35 en células transfectadas y correlacionando estos valores con un aumento de solo 4 veces en la actividad de cdk5, se puede especular que a pesar de la gran cantidad de p35 en estas células, la limitante debe ser la cantidad de cdk5 endógena, quedando un exceso de p35. Tomados en su conjunto estos experimentos demostraron que el vector generado para hacer los animales transgénicos, expresaba ambos transgenes al mismo tiempo, que su expresión era reversible y que el aumento de p35 tenía un correlato funcional, como era el aumento de actividad *in vitro* de la enzima cdk5.

#### **6.1.4.- Preparación del Vector BiTetO-p35/EGFP Para la Microinyección**

Luego de analizar que el sistema de expresión condicional funciona en células  $N_2A$ -tTA, es decir, que se sobreexpresan ambos transgenes y su expresión es regulada por tetraciclina, entonces se preparó el vector BiTetO-p35/EGFP para la microinyección. Se ha descrito que la eficiencia de integración de un vector lineal aumenta más de 5 veces con respecto a un vector circular (Brinster y cols, 1985). Por esta razón, el vector BiTetO-p35/EGFP fue digerido con la enzima *VspI*, que corta este plasmidio en dos sitios (**Figura 10A**), obteniéndose dos fragmentos: el primero que corresponde a un fragmento de 4.789 pb que contiene todos los elementos necesarios para la expresión de EGFP y p35 condicionada por tTA; y un fragmento de 1.235 pb que se elimina (**Figura 10B**). Posteriormente el primer fragmento lineal, que seguiremos llamando BiTetO-p35/EGFP, se purificó del gel de agarosa y fue resuspendido en *transgenic buffer* estéril y almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta la microinyección.



**Figura 10:** Linearización del vector BiTetO-p35/EGFP con la enzima de restricción VspI. **A:** Mapa del vector BiTetO-p35/EGFP donde se señalan los dos sitios de corte de la enzima VspI y 1 sitio de corte para MluI. **B:** Gel de agarosa con el vector digerido: 1)  $\lambda$ -HindIII, 2) vector BiTetO-p35/EGFP digerido con VspI. De esta digestión se generan 2 fragmentos de 4.789 pb (vector que contiene EGFP, el promotor y p35) y de 1.235 pb (fragmento que se elimina). 3) vector BiTetO-p35/EGFP linearizado con MluI.

### **6.1.5.- Microinyección del Vector BiTetO-p35/EGFP**

El vector BiTetO-p35/EGFP linearizado y purificado se microinyectó en cigotos en estado de pronúcleos provenientes de ratones de la cepa FVB. Estos cigotos fueron implantados en el útero de ratonas pseudo-preñadas hasta llevar a término el parto. Se realizaron 5 rondas de microinyección y se obtuvieron un total de 37 animales (**Tabla N°1**). Mediante análisis de PCR con partidores específicos para EGFP se determinó la identidad de los animales transgénicos. De los 37 animales obtenidos después de la microinyección, solo 6 animales fueron positivos para la PCR de EGFP (16,2% de eficiencia de producción de transgénicos). De estos 6 animales, un ratón no transmitió el transgén a la progenie (**L1**) y otro animal murió, quedándonos solo con 4 animales transgénicos lo que representa el 10,8% de eficiencia de producción de animales transgénicos (**Tabla N°1**). Estos valores están dentro del rango descrito en literatura (Brinster y col., 1985).

## **6.2.- CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LOS ANIMALES**

### **6.2.1.- Genotipificación por PCR**

Mediante PCR se determinó la expresión de EGFP en 5 animales fundadores, los que corresponden a las 5 líneas transgénicas que fueron analizadas (**L1, L3, L5, L7 y L9**). Todas las líneas transgénicas analizadas presentaban el transgén de EGFP en sus

**Tabla 1: Microinyección del vector BiTetO-p35/EGFP**

<b>Microinyección</b>	<b>Nº total de animales</b>	<b>Nº de animales positivos para EGFP</b>	<b>% de animales positivos para EGFP</b>
<i>1er Round</i>	4	1	
<i>2do Round</i>	5	0	
<i>3er Round</i>	8	0	
<i>4to Round</i>	8	0	
<i>5to Round</i>	12	5	
<b>TOTAL</b>	<b>37</b>	<b>6 (4)</b>	<b>16,2 (10,8)</b>

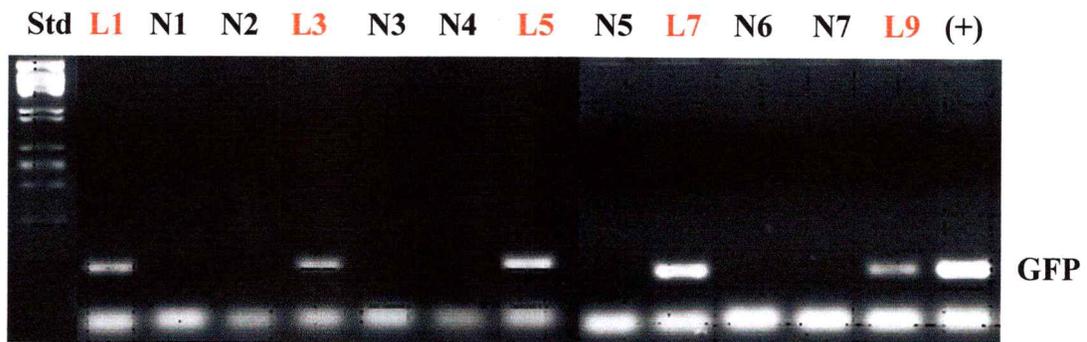
DNAs genómicos. Por el contrario, los animales control (*wild type*) no presentaban amplificación por PCR del gen que codifica para EGFP (Figura 11).

Otro factor importante de analizar fue la transmisión del transgén BiTetO-p35/EGFP de una generación a otra, ya que los animales fundadores podrían no transmitir el transgén a la progenie como se ha reportado en la literatura (Hammes y Schedl, 2000). Por esta razón, se evaluó mediante PCR las descendencias de las 5 líneas fundadoras. Cuatro de los 5 animales fundadores transmitieron el transgén a la progenie (L3, L5, L7 y L9) y solo la L1 no transmitió el transgén a su descendencia (Figura 12) por lo que este animal fundador no se siguió analizando.

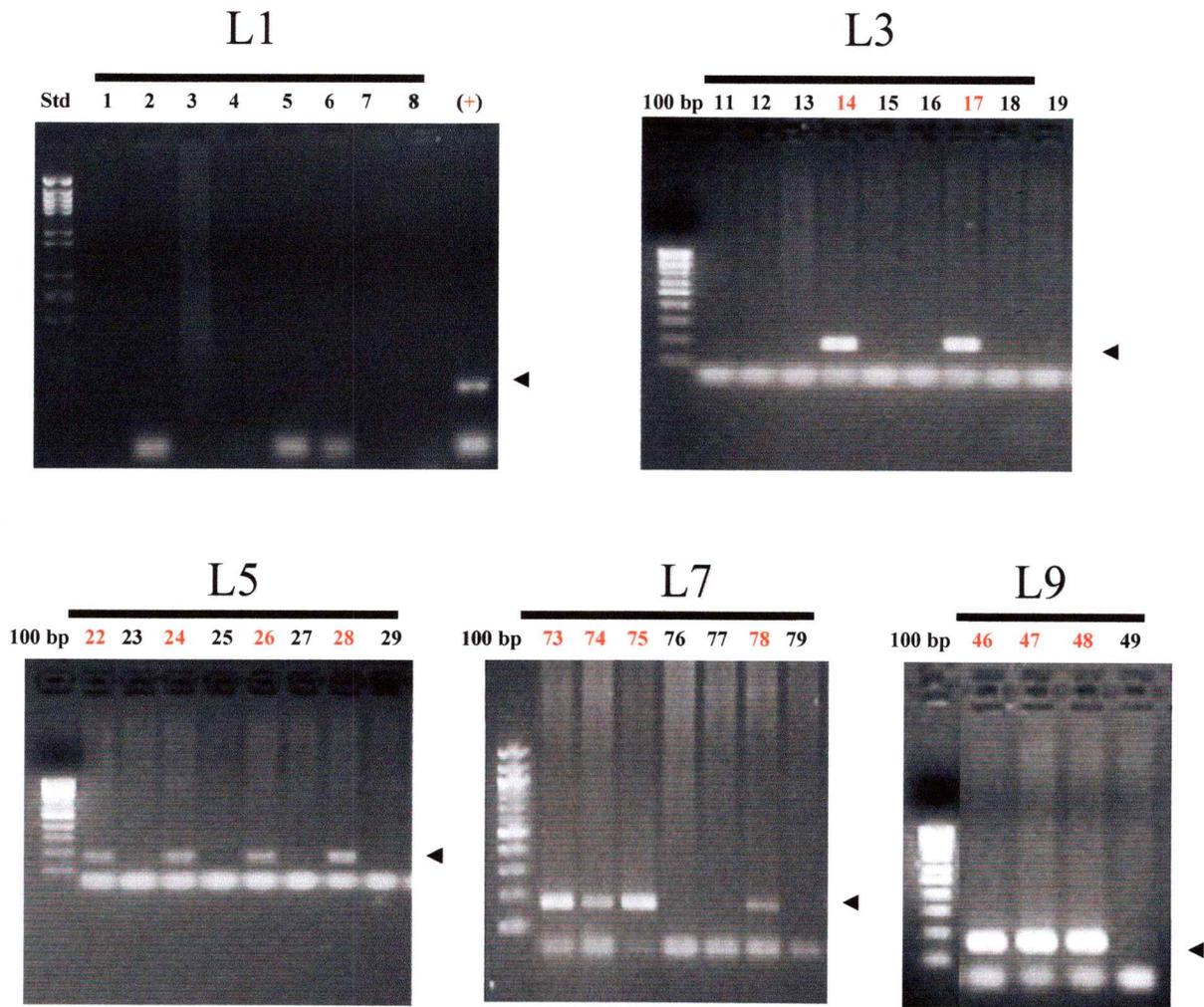
Por otro lado, los animales transgénicos tTA también fueron genotipificados mediante PCR con partidores específicos contra tTA. Además, se analizó la transmisión del transgén tTA a la progenie (Figura 13).

### 6.2.2.- Genotipificación por *Southern blot*

Para confirmar la identidad de las 4 líneas transgénicas se utilizó una técnica más específica que el PCR como es el *Southern blot*. Para ello, 10 µg de DNA genómico fueron digeridos con la enzima de restricción BamHI, separados en gel de agarosa y transferidos a una membrana de nylon que posteriormente fue hibridizada con una sonda de EGFP marcada con dCTP- $\alpha$ P<sup>32</sup>. Las 4 líneas fundadoras dieron positivas para el *Southern blot* contra EGFP, obteniéndose una banda de aproximadamente 0,76 Kb. Además se observó distintas intensidades de banda entre cada línea, lo que sugiere un distinto número de copias del transgén insertado en el DNA genómico. Por otra parte, se



**Figura 11:** Genotipificación de los ratones transgénicos. Mediante PCR con partidores específicos contra EGFP se determinaron cuales animales eran transgénicos (L1, L3, L5, L7 y L9) y *wild type* (N1, N2, N3, N4, N5, N6 y N7). Como control positivo se utilizó un DNA control que contiene EGFP. El producto de PCR tiene un tamaño de 173 pb. La banda que aparece en la parte de debajo de todos los carriles corresponde a los partidores.



**Figura 12:** Transmisión del transgén a la progenie. Se analizaron las progenies de los 5 animales fundadores. En 4 de las 5 líneas analizadas, el transgén fue transmitido a la progenie. Solo la línea 1 no transmitió el transgén. Los números representan las camadas de animales de cada fundador. Los números en rojo son animales positivos para EGFP y los números en negro animales *wt*. La fecha indica la posición del fragmento de PCR de EGFP (173 pb).



**Figura 13:** Genotipificación de los ratones transgénicos tTA y transmisión del transgén a la progenie. Mediante PCR con partidores específicos contra tTA se analizaron los animales fundadores y la progenie. Los dos animales fundadores, 657 y 658 expresan tTA y transmiten el transgén a la descendencia. Los números en rojo son animales positivos para tTA y los negros son negativos para tTA. La fecha indica la posición del fragmento de PCR que tiene un tamaño de 593 pb.

realizó un *Southern blot* contra EGFP para 4 animales descendientes del fundador L9. Tres de los 4 animales dieron PCR y *Southern blot* positivos para EGFP, confirmando que el transgén se transmite a la descendencia (Figura 14).

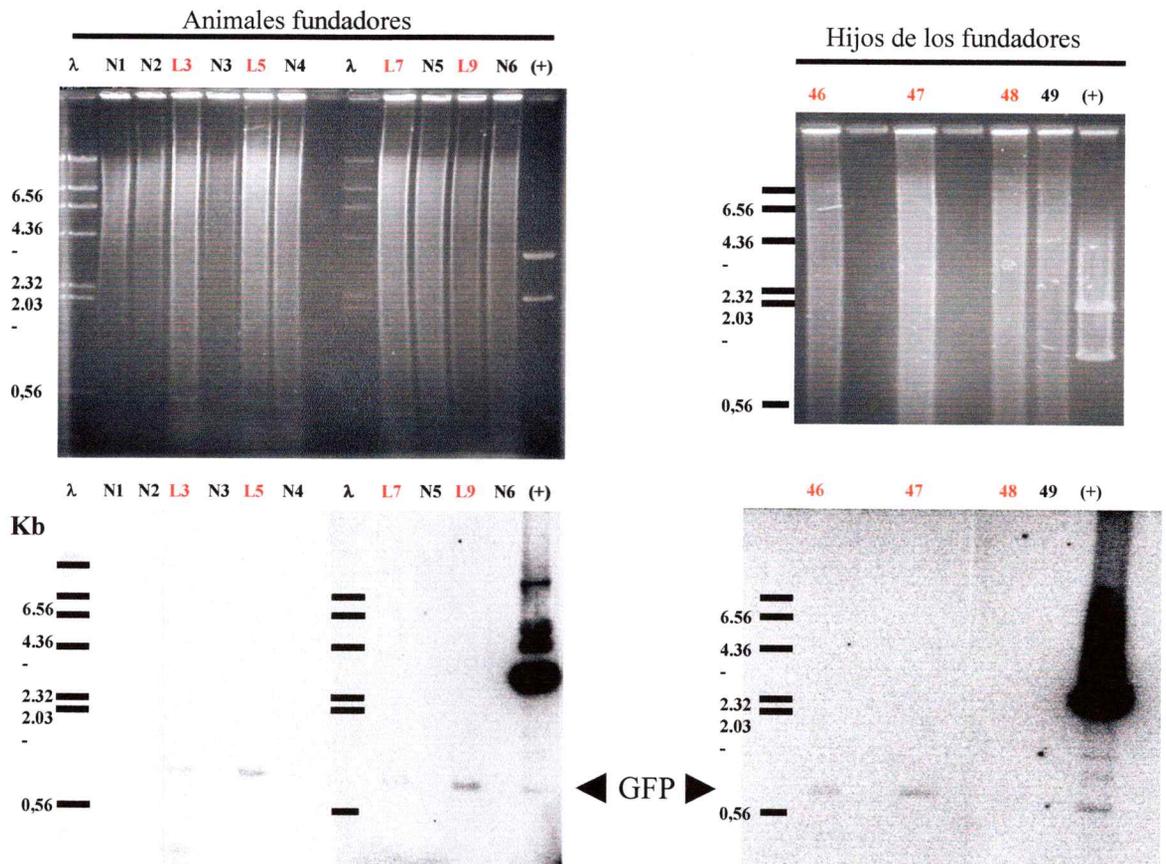
### 6.2.3.- Mantenimiento de las Colonias y Cruces de Animales

Después de la genotipación de los animales fundadores (L3, L5, L7 y L9), de su descendencia y de los animales tTA, se hicieron cruces con animales *wild type* de las mismas cepas para expandir y establecer las colonias y así mantener los transgenes en heterocigosidad. Las colonias fundadoras L3, L5, L7 y L9 fueron cruzadas con ratones tTA para obtener animales dobles transgénicos (Figura 15). De los diversos cruces (L3, L5, L7 y L9 x tTA) se obtuvieron 109 animales provenientes de 16 camadas con los 4 posibles genotipos: *wild type*, EGFP, tTA y EGFP/tTA (dobles transgénicos) (Tabla N°2). Estos genotipos se confirmaron mediante PCR contra EGFP y tTA a partir de DNA genómico obtenido de una biopsia de cola de estos animales (Figura 15).

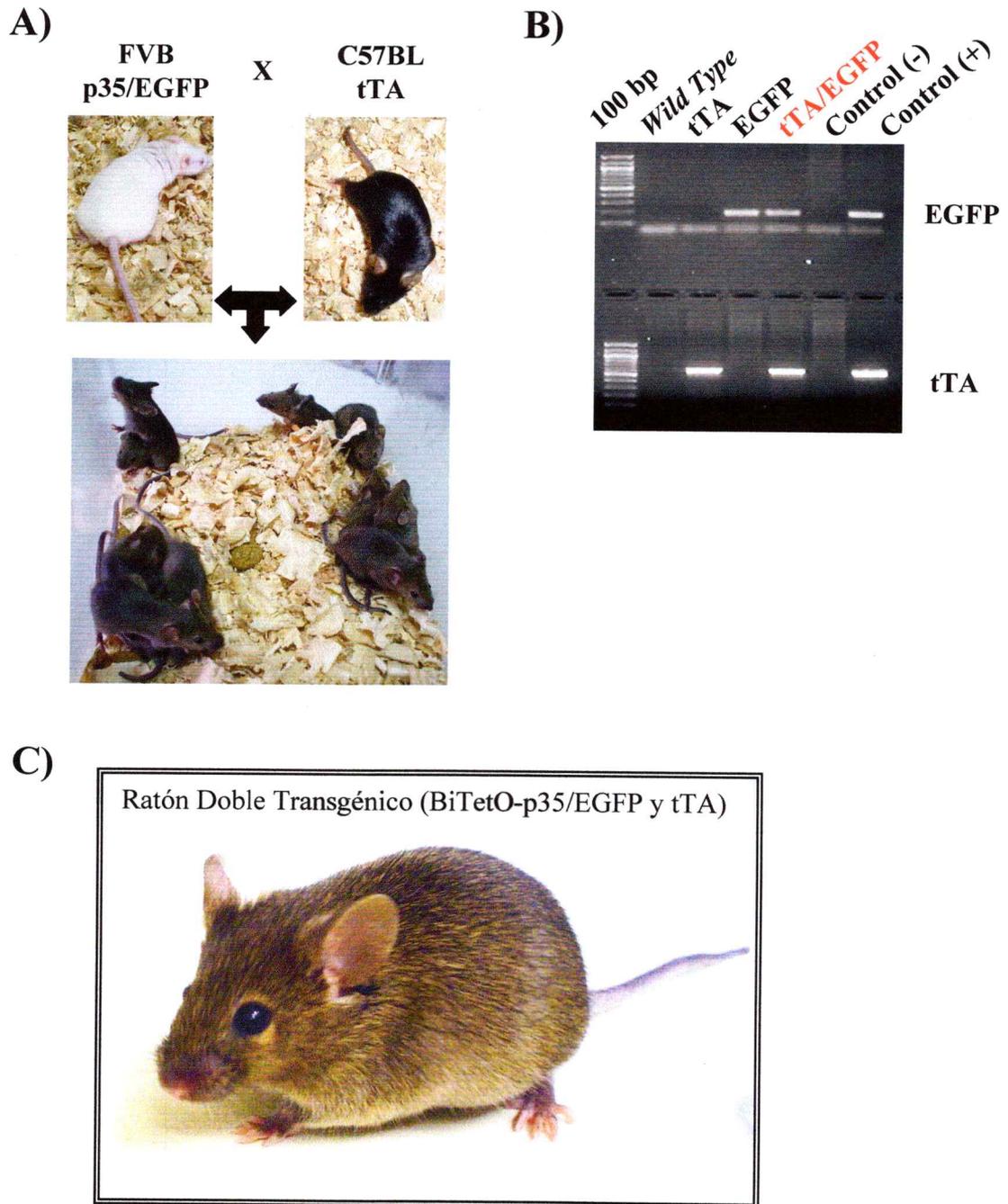
## 6.3.- CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS ANIMALES

### 6.3.1.- Análisis de Expresión de los Transgenes

De un total de 109 animales obtenidos de los cruces de ratones simples transgénicos, se han analizado 14 animales dobles transgénicos provenientes de las 4 líneas fundadoras. Se analizó la expresión de p35 y EGFP de animales *wild type* (*wt*),



**Figura 14:** *Southern Blot* contra EGFP. 10  $\mu$ g de DNA genómico fueron digeridos con BamHI, separados en gel de agarosa, transferidos a una membrana de nylon e hibridados con una sonda de EGFP marcada con dCTP- $\alpha$ P<sup>32</sup>. Las 4 líneas fundadoras dieron positivas para el *Southern blot* contra EGFP, obteniéndose una banda de aproximadamente 0,76 Kb. Además se observó distintas intensidades de banda entre cada línea, lo que sugiere un distinto número de copias del transgén insertado en el DNA genómico. Por otra parte, se realizó un *Southern blot* contra EGFP para 4 animales descendientes del fundador L9, de los cuales 3 de los 4 animales dieron PCR y *Southern blot* positivos para EGFP, confirmando que el transgén se transmite a la descendencia.



**Figura 15:** Genotipificación de animales dobles transgénicos. **A)** Ratones FVB simples transgénicos (L3, L5, L7 y L9) transportando el transgén BiTetO-p35/EGFP fueron cruzados con ratones C57BL/6J transportando el transgén tTA. **B)** De estos cruces se obtuvieron animales viables y fértiles con los 4 posibles genotipos (*wt*, tTA, EGFP, tTA/EGFP) determinados mediante PCR con partidores específicos para tTA y EGFP. **C)** Ratón doble transgénico BiTetO-p35/EGFP y tTA.

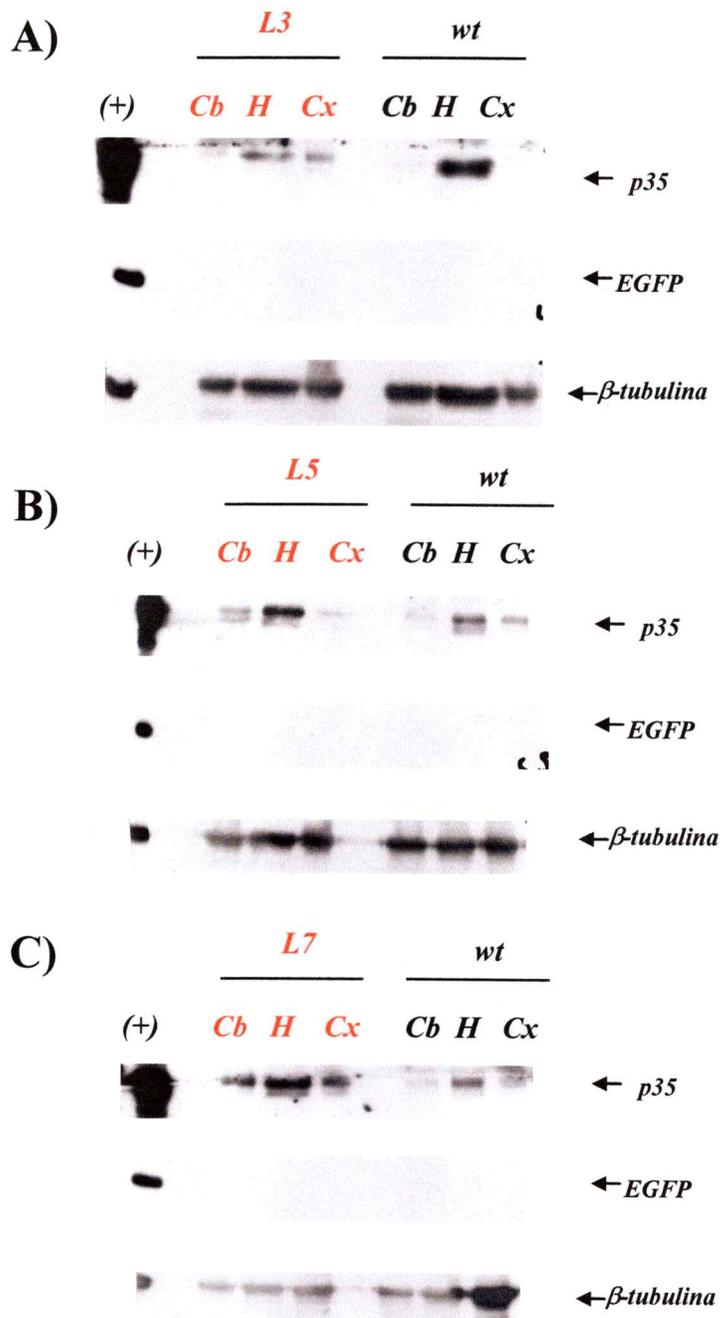
**Tabla 2: Cruces y genotipos de los animales dobles transgénicos**

Nº cruce	Cruces	Nº crías	Genotipación mediante PCR
1	657 tTA x 3 EGFP (Línea 3)	9 crías	2 wt    4 tTA 0 EGFP    3 dtg
2	658 tTA x 5 EGFP (Línea 5)	11 crías	3 wt    2 tTA 4 EGFP    2 dtg
3	763 tTA x 28 EGFP (Línea 5)	5 crías	5 wt    0 tTA 0 EGFP    0 dtg
4	763 tTA x 32 EGFP (Línea 5)	10 crías	4 wt    0 tTA 6 EGFP    0 dtg
5	658 tTA x 5 EGFP (Línea 5)	8 crías	4 wt    2 tTA 1 EGFP    1 dtg
6	657 tTA x 9 EGFP (Línea 9)	4 crías	1 wt    2 tTA 1 EGFP    0 dtg
7	2 tTA x 14 EGFP (Línea 3)	7 crías	2 wt    1 tTA 3 EGFP    1 dtg
8	6 tTA x 17 EGFP (Línea 3)	8 crías	1 wt    3 tTA 2 EGFP    2 dtg
9	1 tTA x 36 EGFP (Línea 7)	5 crías	3 wt    1 tTA 1 EGFP    0 dtg
10	11 tTA x 46 EGFP (Línea 9)	8 crías	3 wt    0 tTA 5 EGFP    0 dtg
11	12 tTA x 42 EGFP (Línea 7)	4 crías	1 wt    0 tTA 3 EGFP    0 dtg
12	5 tTA x 9 EGFP (Línea 9)	3 crías	1 wt    0 tTA 0 EGFP    2 dtg
13	7 tTA x 48 EGFP (Línea 9)	7 crías	4 wt    1 tTA 2 EGFP    0 dtg
14	3 tTA x 9 EGFP (Línea 9)	7 crías	2 wt    1 tTA 2 EGFP    2 dtg
15	2 tTA x 9 EGFP (Línea 9)	4 crías	1 wt    2 tTA 1 EGFP    0 dtg
16	4 tTA x 112 EGFP (Línea 7)	9 crías	2 wt    0 tTA 6 EGFP    1 dtg
<b>Total de animales</b>		<b>109 animales</b>	<b>39 wt    19 tTA 37 EGFP    14 dtg</b>

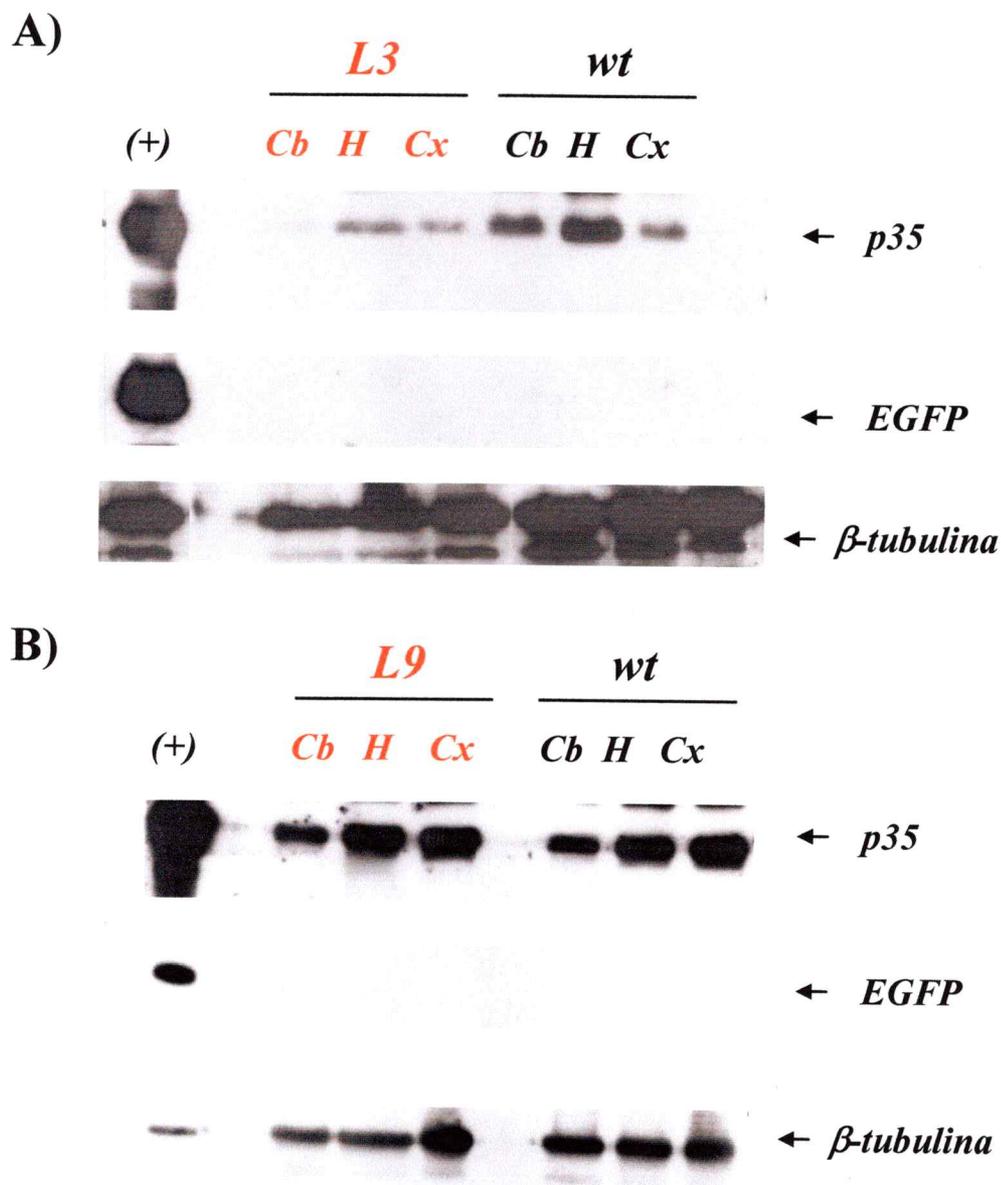
simples y dobles transgénicos. Luego de sacrificar los animales, se disectó corteza (cx), hipocampo (h) y cerebelo (cb), se hicieron extractos proteicos y se analizó la expresión de p35 y EGFP mediante *western blot*. Animales *wt* y dobles transgénicos fueron sacrificados a 1, 2, 3 y 4 meses de edad y los niveles de proteína p35 y EGFP fueron analizados mediante *western blot* (**Figuras 16-19**). La expresión de p35 siempre fue más alta en corteza e hipocampo que en cerebelo lo que está de acuerdo con la literatura (Wu y col., 2000). No obstante, los niveles de expresión de p35 no difieren entre animales *wt* y dobles transgénicos en todas las líneas analizadas (L3, L5, L7 y L9) y a todos los tiempos descritos (**Figuras 16-19**). Por otra parte, tampoco hubo expresión de EGFP en las distintas zonas del cerebro analizadas. Sin embargo el anticuerpo contra EGFP reconoce una banda de 27 kDa que corresponde al tamaño de EGFP en un extracto de células N2A-tTA transfectadas con el vector BiTetO-p35-EGFP (control positivo de EGFP y p35). En resumen, no hubo sobreexpresión de p35 ni expresión de EGFP en los distintos tejidos analizados de animales dobles transgénicos.

### **6.3.2.- Análisis de Expresión y Fosforilación de tau en Animales Dobles Transgénicos**

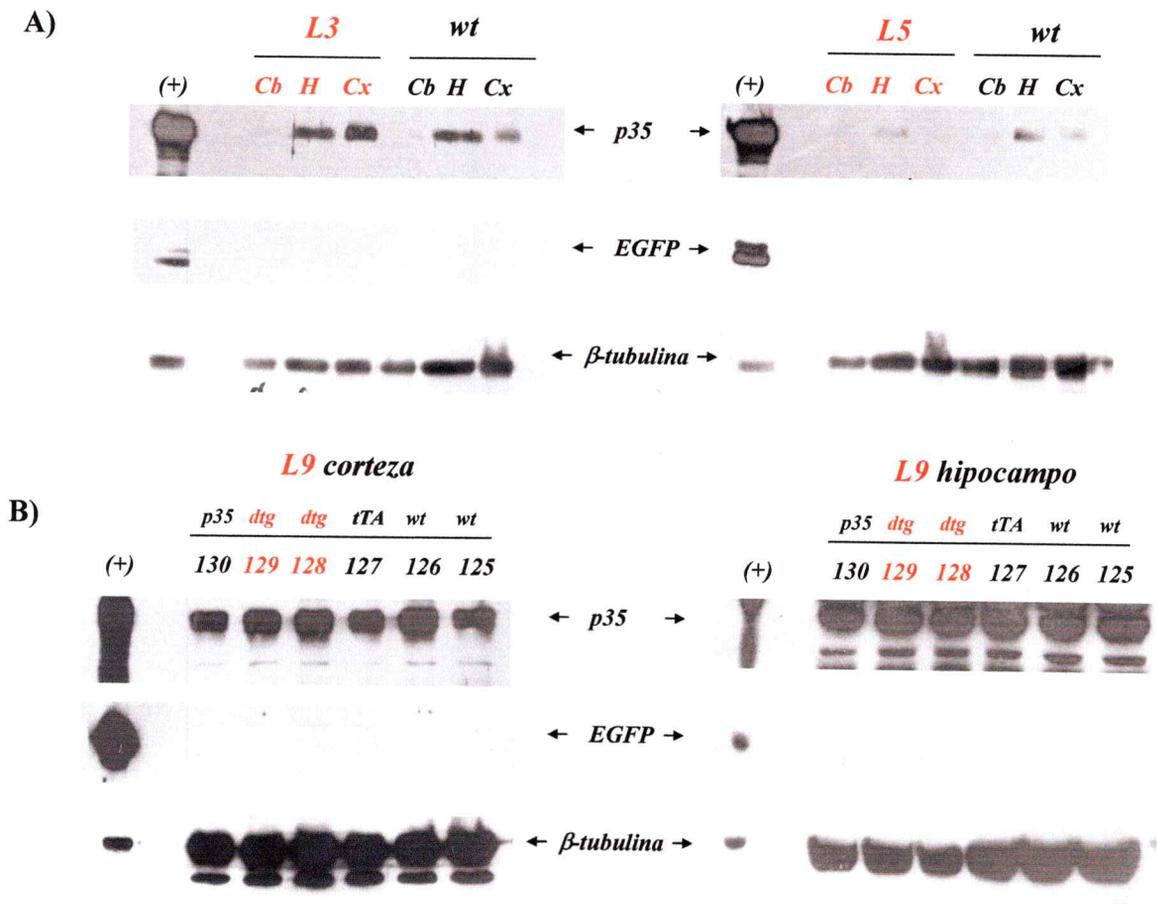
Para complementar los resultados obtenidos a partir de los niveles de expresión de p35 y EGFP, se analizaron los niveles de expresión y fosforilación de tau en extracto proteico de corteza, hipocampo y cerebelo provenientes de cerebros de animales *wt* y dobles transgénicos. En estos extractos se encontró que no hubo un aumento en inmunodetección con el anticuerpo AT-8 en la hiperfosforilación de tau de animales



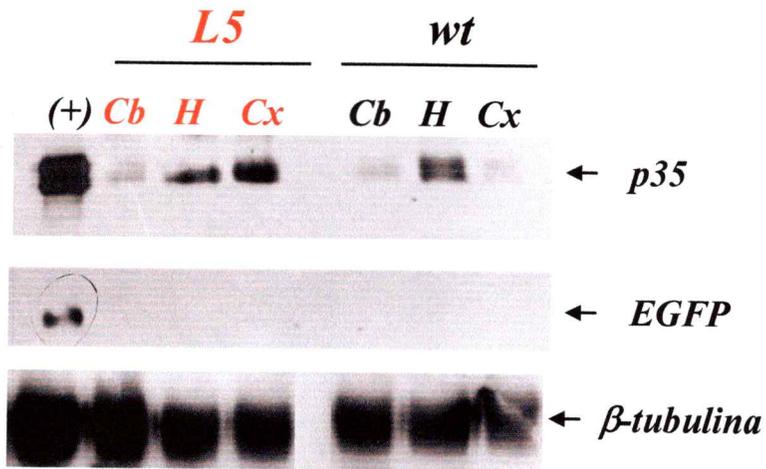
**Figura 16:** Expresión de los transgenes a 1 mes de edad. p35 y EGFP fueron analizados en distintas zonas del cerebro de animales dobles transgénicos y *wild type*. En los paneles **A**, **B** y **C** se muestra un análisis tipo *western blot* de extractos proteicos obtenidos a partir de corteza (Cx), hipocampo (H) y cerebelo (Cb) de ratones *wild type* (*wt*) y dobles transgénicos (**L3**, **L5** y **L7**). Se analizó la expresión de p35 con el anticuerpo C19 y no se observó diferencia de expresión entre los animales *wt* y dobles transgénicos. EGFP se detectó con un anticuerpo policlonal solo en el carril control (+) que corresponde a un extracto de proteínas de células N<sub>2</sub>A-tTA transfectadas con el vector BitetO-p35/EGFP. Como control de carga se utilizó un anticuerpo policlonal contra β-tubulina.



**Figura 17:** Expresión de los transgenes a los **2 meses** de edad. p35 y EGFP fueron analizados en distintas zonas del cerebro de animales dobles transgénicos y *wild type*. En los paneles **A** y **B** se muestra un análisis tipo *western blot* de extractos proteicos obtenidos a partir de cx, h y cb de ratones *wt* y dobles transgénicos (**L3** y **L9**). Se analizó la expresión de p35 con el anticuerpo C19 y no se observó diferencia de expresión entre los animales *wt* y dobles transgénicos. EGFP se detectó con un anticuerpo policlonal solo en el carril control (+) que corresponde a un extracto de proteínas de células N<sub>2</sub>A-tTA transfectadas con el vector BiTetO-p35/EGFP. Como control de carga se utilizó un anticuerpo policlonal contra  $\beta$ -tubulina.



**Figura 18:** Expresión de los transgenes a los 3 meses de edad. p35 y EGFP fueron analizados en distintas zonas del cerebro de animales dobles transgénicos y *wild type*. **A)** se muestra un *western blot* de extractos proteicos obtenidos a partir de *Cx*, *H* y *Cb* de ratones *wt* y dobles transgénicos (**L3** y **L5**). No hubo diferencia en la expresión de p35 entre animales *wt* y dobles transgénicos. NO hubo expresión de EGFP en los tejidos analizados en animales *wt* y dobles transgénicos excepto en el carril control (+) que corresponde a un extracto de proteínas de células N<sub>2</sub>A-tTA transfectadas con el vector BiTetO-p35/EGFP. **B)** Expresión de p35 y EGFP en corteza e hipocampo de una camada completa de animales perteneciente a la línea **L9**. Tampoco hubo diferencia en la expresión de p35 y EGFP entre animales *wt*, simples y dobles transgénicos. Como control de carga se utilizó un anticuerpo policlonal contra  $\beta$ -tubulina.



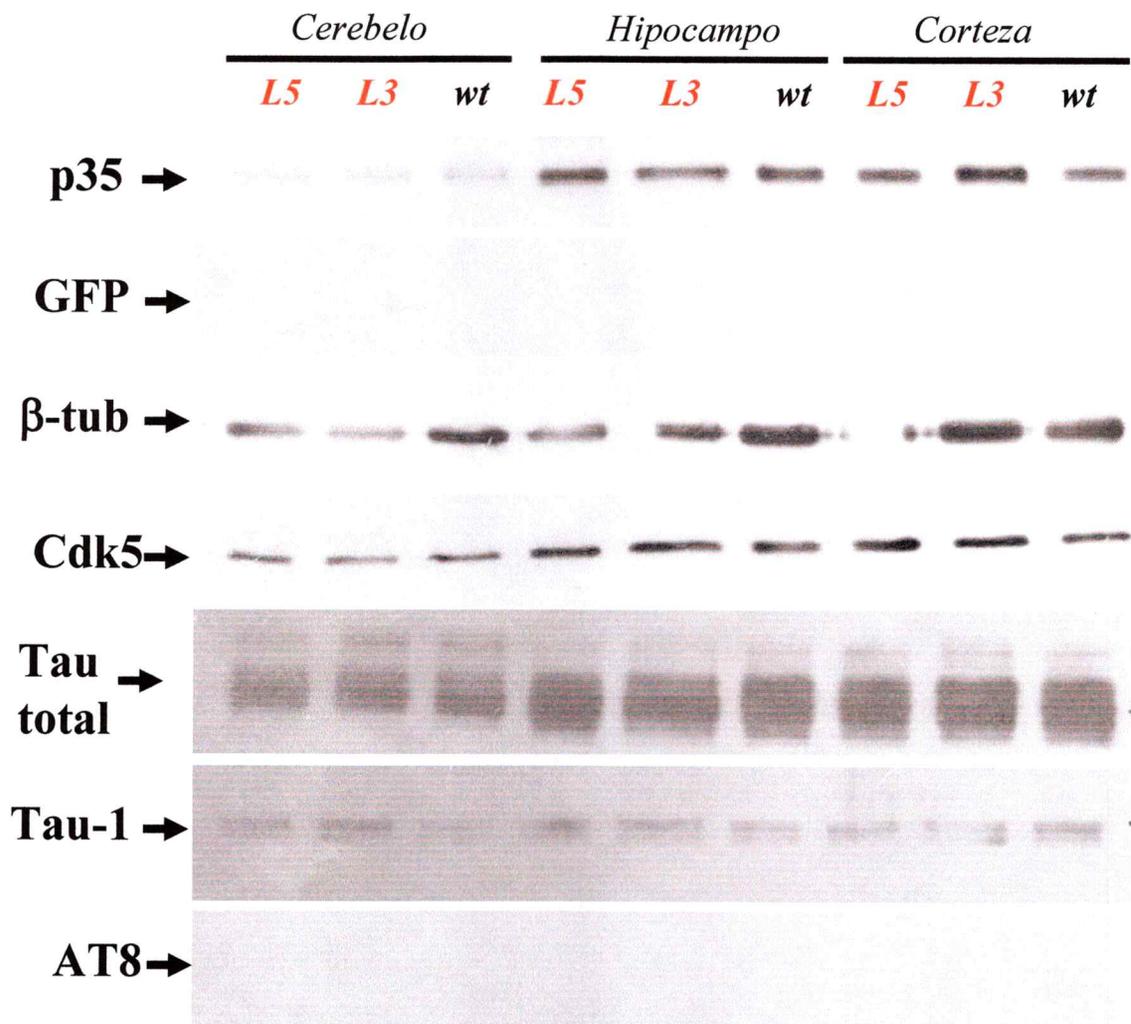
**Figura 19:** Expresión de los transgenes a los 4 meses de edad. p35 y EGFP fueron analizados en distintas zonas del cerebro de animales dobles transgénicos (**L5**) y *wt*. Se analizó la expresión de p35 con el anticuerpo C19 y no se observó diferencia de expresión entre los animales *wt* y dobles transgénicos. EGFP se detectó con un anticuerpo policlonal solo en el carril control (+) que corresponde a un extracto de proteínas de células N<sub>2</sub>A-tTA transfectadas con el vector BiTetO-p35/EGFP. Como control de carga se utilizó un anticuerpo policlonal contra  $\beta$ -tubulina.

dobles transgénicos con respecto a los animales *wt* (**Figura 20**). Además, tampoco hubo disminución en la inmunodetección con tau-1 en los dobles transgénicos con respecto a los *wt*. Además, como control de carga se analizaron los niveles endógenos de tau-total, cdk5 y  $\beta$ -tubulina (**Figura 20**).

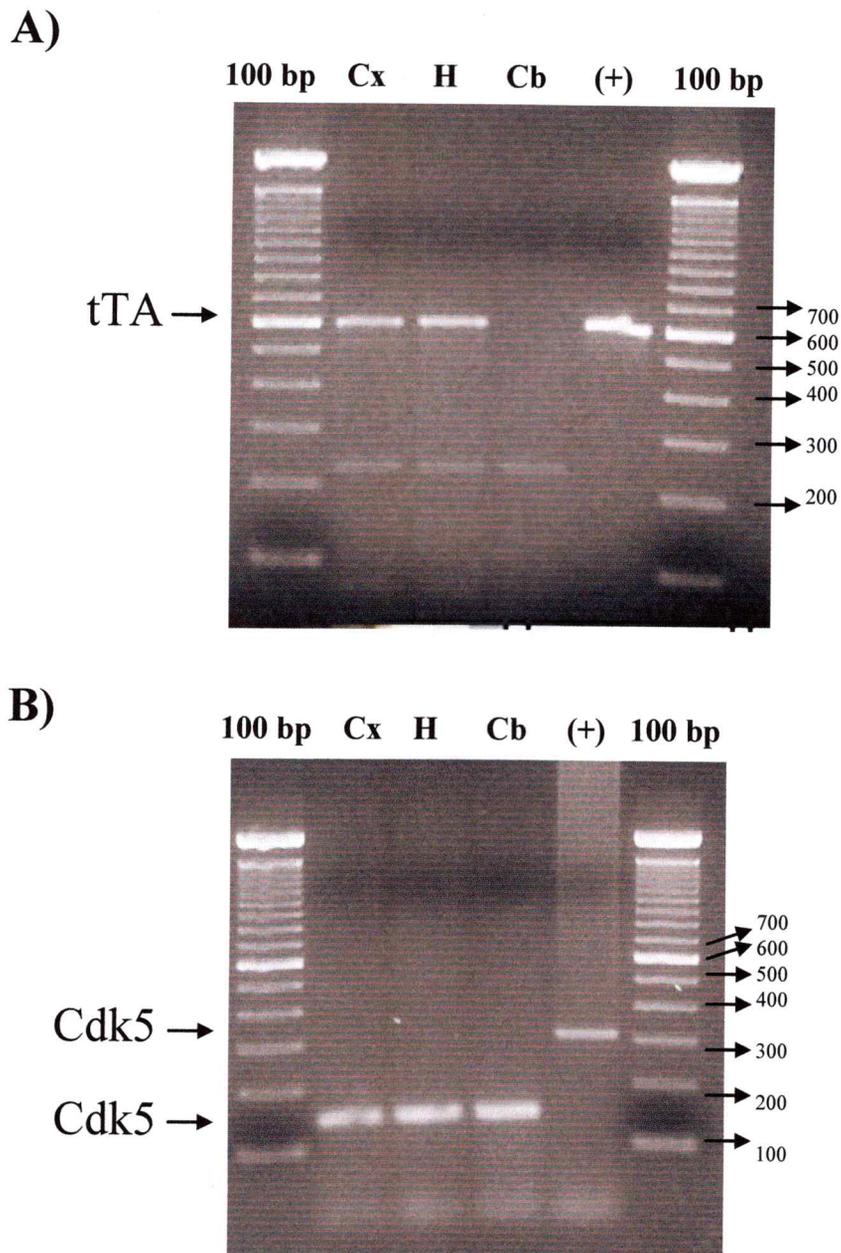
Tomando en conjunto estos resultados se demostró que no hubo sobreexpresión de p35 ni expresión de EGFP en los distintos tejidos analizados de animales dobles transgénicos y además el patrón de fosforilación de la proteína tau no varió en los animales dobles transgénicos con respecto a los animales *wt*. Hay una serie de posibles causas que explicarían porque los transgenes que pueden ser encontrados en el genoma de los ratones no se expresan, algunas de ellas se discuten a continuación:

#### **6.4.1.- Expresión del Transactivador**

La expresión de tTA fue analizada mediante RT-PCR. Se aisló RNA total de corteza (cx), hipocampo (h) y cerebelo (cb) de un animal heterocigoto adulto tTA, y con partidores específicos para tTA se demostró que este mensajero se expresa en cx e h y no en cb, tal como se esperaba para el patrón de expresión del promotor CamKII $\alpha$  (Mayford y col. 1996) (**Figura 21A**). Como control positivo de la reacción de RT-PCR, se utilizaron partidores específicos contra cdk5 y se amplificó un fragmento de 138 pb en los tres tejidos analizados. El control positivo de este PCR corresponde a DNA genómico de ratón y debido a que estos partidores fueron diseñados en exones



**Figura 20:** Patrón de fosforilación de tau en ratones dobles transgénicos. Se realizaron *western blot* de extractos de proteínas de cx, H y cb a partir de cerebros de ratones dobles transgénicos (L3 y L5) y ratones controles, con anticuerpos contra p35 (C19), GFP, Cdk5 (C8), Tau total, Tau-1 y AT8. No hubo diferencia en el patrón de fosforilación de tau entre los animales dobles transgénicos y controles.



**Figura 21:** Expresión del transactivador tTA en cerebro de un ratón transgénico para tTA. **A)** A partir de RNA total de cx, h y cb se realizó un RT-PCR con partidores contra tTA. Se determinó que tTA se expresa en cx e h pero no en cb tal como se esperaba (593 pb). **B)** Como control positivo de la reacción de RT se utilizaron partidores contra cdk5. Se determinó que cdk5 se expresa en cx, h y cb (138b). Como control positivo se utilizó DNA genómico de ratón y se obtuvo una banda de 308 pb ya que los partidores fueron diseñados en diferentes exones por lo tanto, el tamaño de la banda del control positivo fue mayor.

diferentes (2 y 4) del gen *cdk5*, es que se observa una banda de 308 pb en el control positivo (**Figura 21B**).

#### **6.4.2.- Accesibilidad del Transgén BiTetO-p35/EGFP al tTA**

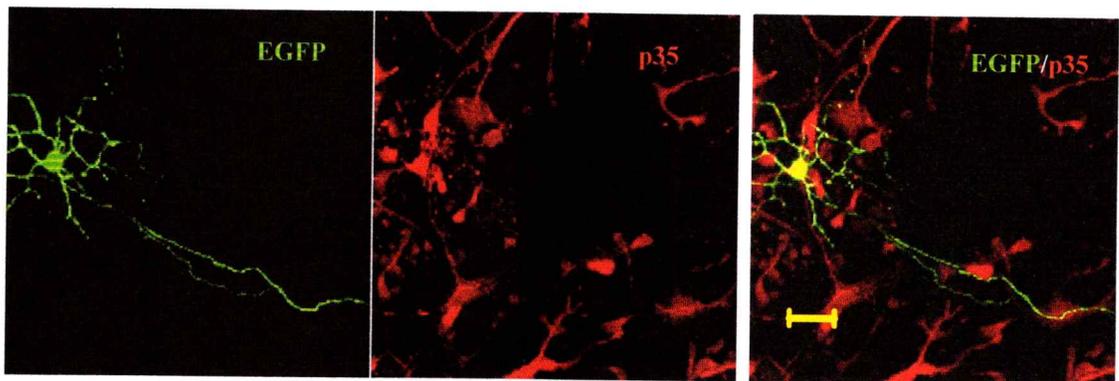
Para evaluar si el transgén BiTetO-p35/EGFP es accesible al transgén tTA se realizaron cultivos primarios de neuronas hipocampales de ratones simples transgénicos (L3, L5, L7 y L9) y de ratones *wt*. Las neuronas provenientes de ratones simples transgénicos fueron transfectadas con 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de tTA bajo un promotor fuerte (CMV), para el caso de ratones *wt* fueron co-transfectadas con los vectores BiTetO-p35/EGFP y tTA. Mediante inmunofluorescencia se determinó que en los cultivos de neuronas hipocampales de ratones simples transgénicos no hubo transactivación, es decir, no se observaron neuronas EGFP positivas en ninguna de las 4 líneas analizadas (**Figura 22A**). En cambio, en los cultivos primarios provenientes de ratones *wt*, si hubo transactivación ya que hubo expresión de EGFP y un aumento en la expresión de p35 en las mismas neuronas analizadas (**Figura 22B**). Por lo tanto, una posible explicación de los resultados anteriormente descritos podría ser que el transgén BiTetO-p35/EGFP se insertó en una región silente del DNA, o fue silenciado después de integrarse en el DNA genómico ya que una sobreexpresión de tTA en esas neuronas fue incapaz de transactivar el transgén bidireccional.

#### **6.4.3.- Porcentaje de Metilación del transgén.**

A)



B)



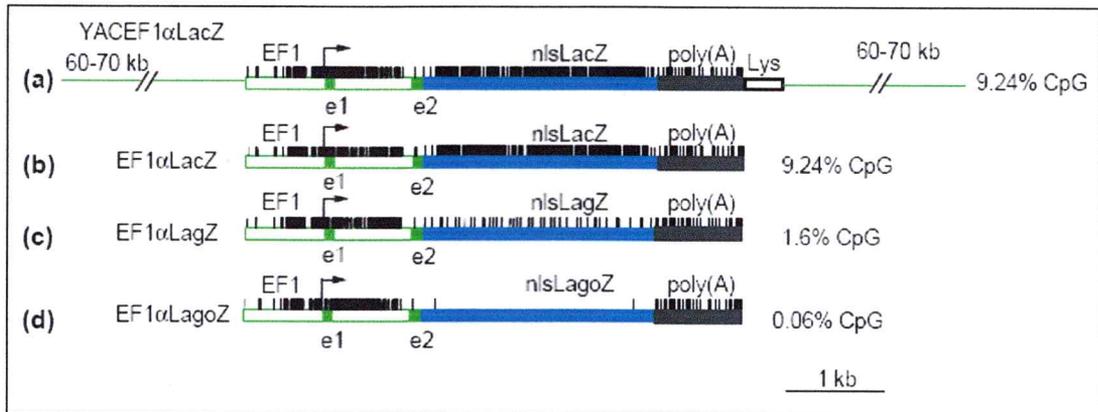
**Figura 22:** Co-Transfección de neuronas hipocámpales provenientes de ratones *wt* y simples transgénicos (L3, L5, L7, L9). **A)** Neuronas hipocámpales de ratones simples transgénicos fueron transfectadas con tTA. En ninguno de los campos analizados hubo neuronas EGFP positivas. A pesar que mediante PCR se determinó que estos animales transportan el transgén BiTetO-p35/EGFP, no hubo neuronas positivas cuando fueron transfectadas con tTA. **B)** En cambio, en neuronas provenientes de animales *wt* co-transfectadas con BiTetO-p35/EGFP y tTA si se obtuvieron neuronas EGFP. Además, hubo colocalización con p35 determinado por inmunofluorescencia. La barra amarilla representa 50  $\mu$ m.

La metilación de secuencias no promotoras puede resultar en silenciamiento transcripcional de un gen reportero (Hsieh, 1994; Kass y col., 1997; Chevalier-Mariette y col., 2003). Es así, que se determinó que la densidad de secuencias CpG en regiones transcritas de los transgenes pueden causar represión de la transcripción. Un bajo porcentaje de CpG en el transgén (0,06%) produjo una alta expresión del transgén, y viceversa, cerca del 10% de dinucleótido CpG produjo una represión total en la expresión del transgén por metilación (Chevalier-Mariette y col., 2003) (Figura 23). En nuestro caso el porcentaje de dinucleótidos CpG fue de 4,7% (228 dinucleotidos de CpG en todo el transgén de 4810 pb), por lo tanto los valores están dentro del rango en el cual el transgén puede ser silenciado por metilación. Por lo tanto, en conjunto estos resultados sugieren que una posible explicación para los resultados obtenidos en los ratones dobles transgénicos sería que el transgén BiTetO-p35/EGFP podría haberse integrado al DNA genómico y debido al alto porcentaje de dinucleotidos CpG del transgén, este podría haberse silenciado mediante metilación y por ello no hubo transactivación.

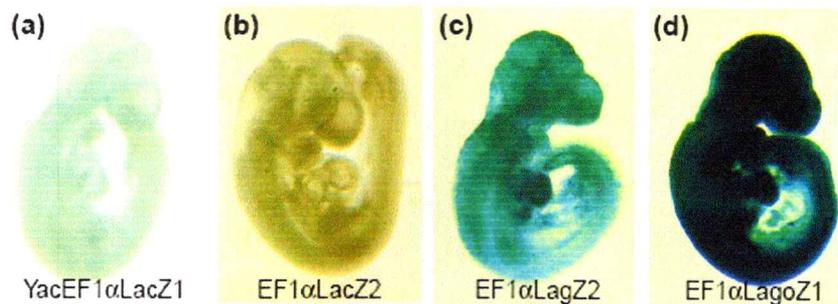
#### **6.5.- RELACIÓN ENTRE EL A $\beta$ Y LA VÍA DE Cdk5/p35**

Debido a los resultados anteriormente descritos, el tercer objetivo de esta tesis con respecto a la activación de la vía de transducción de señales que modula la actividad de cdk5 en respuesta a la presencia del péptido A $\beta$ , fue realizado en cultivos celulares de origen neuronal (N<sub>2</sub>A) y en cultivos primarios de neuronas hipocampales de ratón.

**A**



**B**



**C**

YACEF $\alpha$ LacZ	EF1 $\alpha$ LacZ	EF1 $\alpha$ LagZ	EF1 $\alpha$ LogoZ	BiTetO-p35/EGFP
9.24% CpG	9.24% CpG	1.6% CpG	0.06% CpG	4.7% CpG
No hubo expresión del transgen	No hubo expresión del transgen	Expresión variable del transgen	Fuerte expresión del transgen	No hubo expresión del transgen

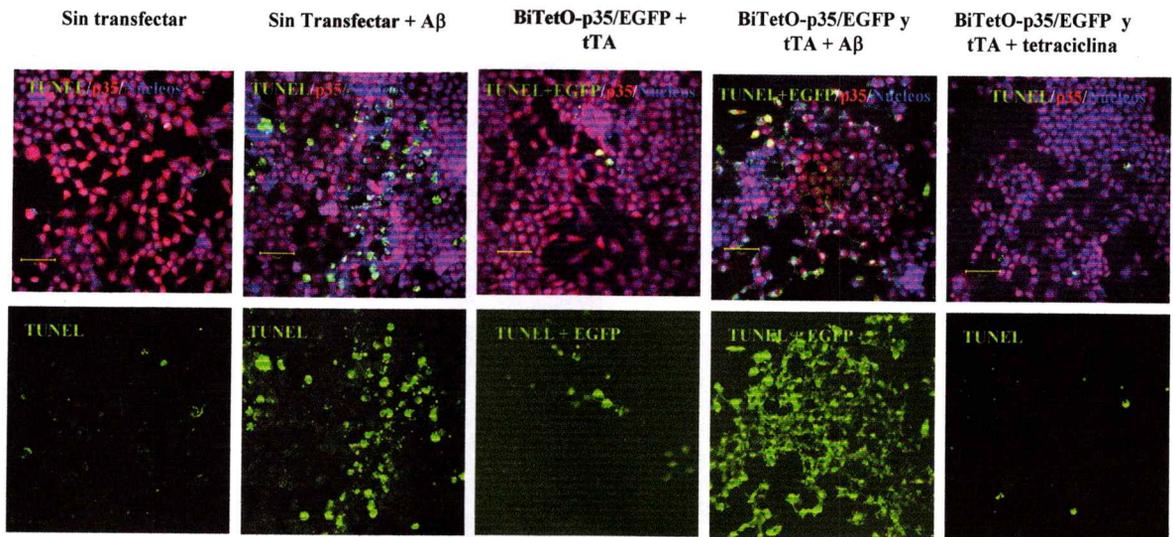
**Figura 23:** Metilación del transgén. Se determinó que la densidad de secuencias CpG en regiones transcritas de los transgenes pueden causar represión de la transcripción (Chevalier-Mariette y col., 2003). A) Esquema de 4 transgenes que codifican para LacZ con distinto porcentaje de CG (Chevalier-Mariette y col., 2003). B) Tinción con  $\beta$ -gal de embriones en E9 provenientes de ratones transgénicos expresando el transgén LacZ con distintos porcentaje de CpG. Un bajo porcentaje de CpG en el transgén (0,06%) produjo una alta expresión, y viceversa, cerca del 10% de CpG produjo una represión total en la expresión del transgén (Chevalier-Mariette y col., 2003). C) Tabla con los datos del porcentaje de CpG de los cuatro transgenes que codifican para LacZ con distinto porcentaje de CpG y en amarillo el porcentaje de CpG de mi transgén (BiTetO-p35/EGFP). En nuestro caso el porcentaje de CpG fue de 4,7% (228 dinucleótidos de CpG en todo el transgén de 4810 pb), por lo tanto los valores están dentro del rango en el cual el transgén puede ser silenciado por metilación.

### **6.5.1.- Ensayo de Citotoxicidad de células N<sub>2</sub>A Transfectadas con BiTetO-p35/EGFP y tTA y tratadas con A $\beta$ .**

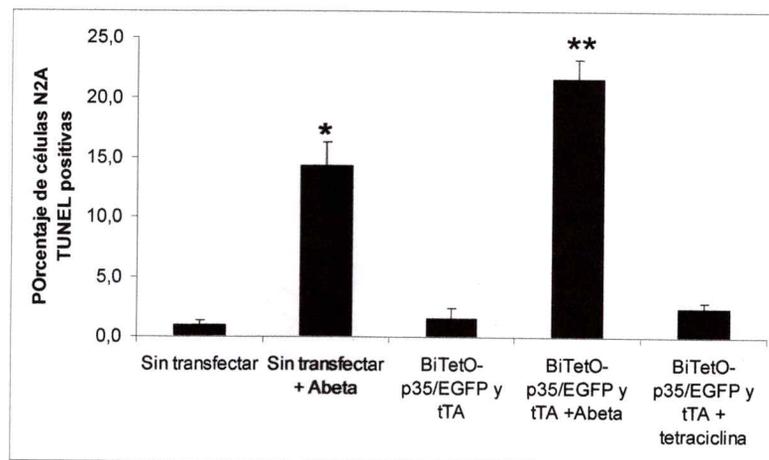
Células N<sub>2</sub>A fueron co-transfectadas con BiTetO-p35/EGFP y tTA en presencia y ausencia de 10  $\mu$ M péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> durante 24 h. De esta manera, utilizando un *kit* que determina apoptosis mediante el método de TUNEL, se determinó que en células N<sub>2</sub>A sin transfectar la apoptosis fue menor que en células tratadas con A $\beta$ <sub>1-42</sub> (1,0 $\pm$ 0,4 v/s 14,3 $\pm$ 1,9; p $\leq$ 0,005 Test Student) (**Figura 24**). Además, la transfección de células N<sub>2</sub>A co-transfectadas con BiTetO-p35/EGFP y tTA no indujo apoptosis con respecto a las células sin transfectar (1,6 $\pm$ 0,9 v/s 1,0 $\pm$ 0,4; p=0,354 Test Student). En cambio, el porcentaje de apoptosis de células tratadas con A $\beta$ <sub>1-42</sub> fue mayor en células co-transfectadas que en células sin transfectar (21,6 $\pm$ 1,7 v/s 14,3 $\pm$ 1,9; p $\leq$ 0,0085 Test Student). Es decir, la sobreexpresión de p35 en estas células predispone a la muerte por apoptosis en presencia de A $\beta$ <sub>1-42</sub> (**Figura 24**). El problema de utilizar este *kit* de apoptosis fue que el rango de emisión del fluoróforo es el mismo que EGFP, por lo tanto el aumento en el porcentaje de células apoptóticas en la condición de co-transfección en presencia de A $\beta$ <sub>1-42</sub> puede ser difícil de interpretar, ya que tanto los núcleos estarán verdes por apoptosis y el citoplasma de las células también por la transfección con EGFP (**Figura 25**).

### **6.5.2.- Ensayo de Citotoxicidad de Neuronas Hipocampales Transfectadas con BiTetO-p35/EGFP y tTA y tratadas con A $\beta$ .**

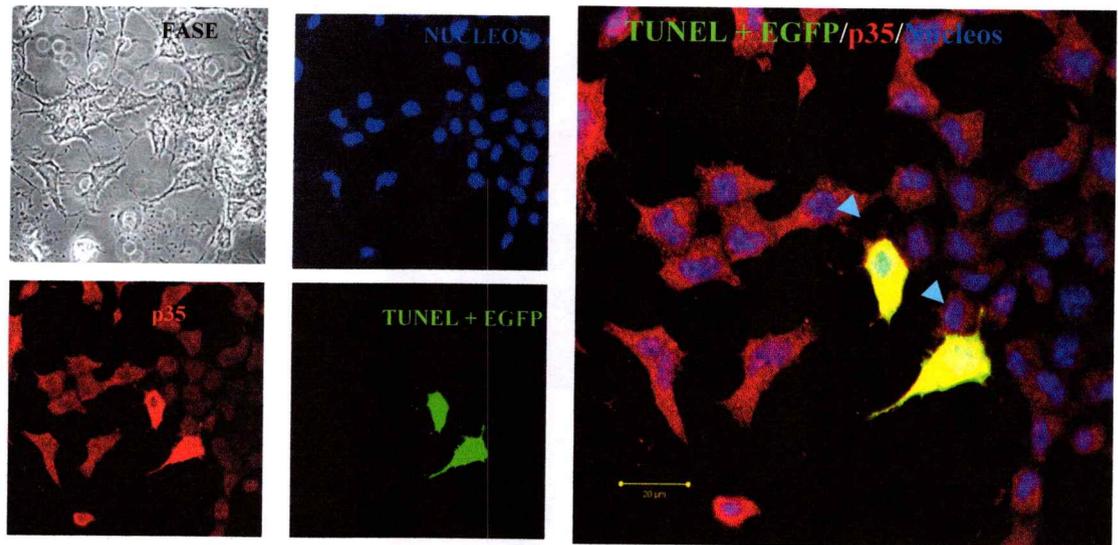
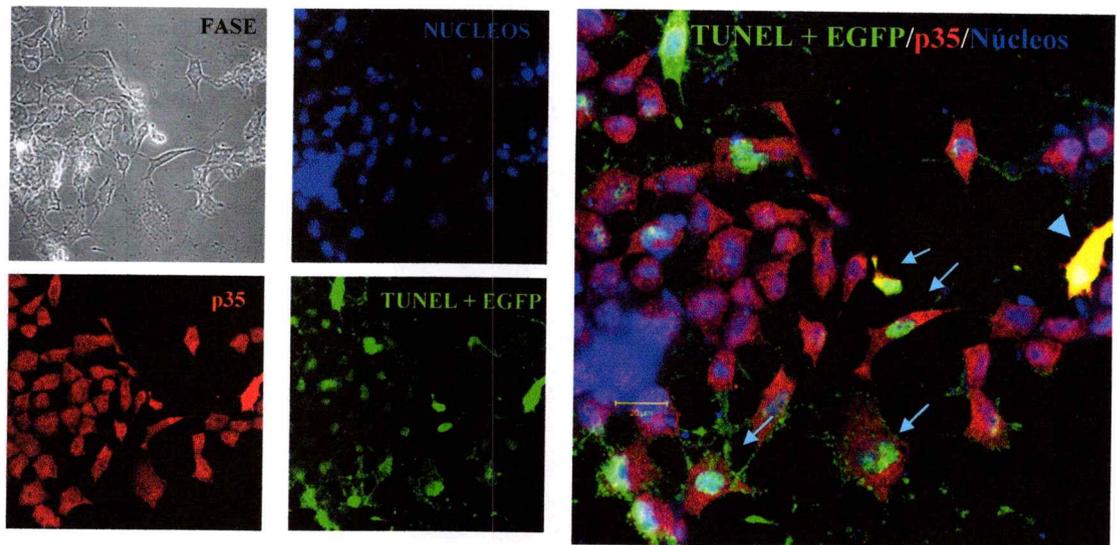
**A**



**B**

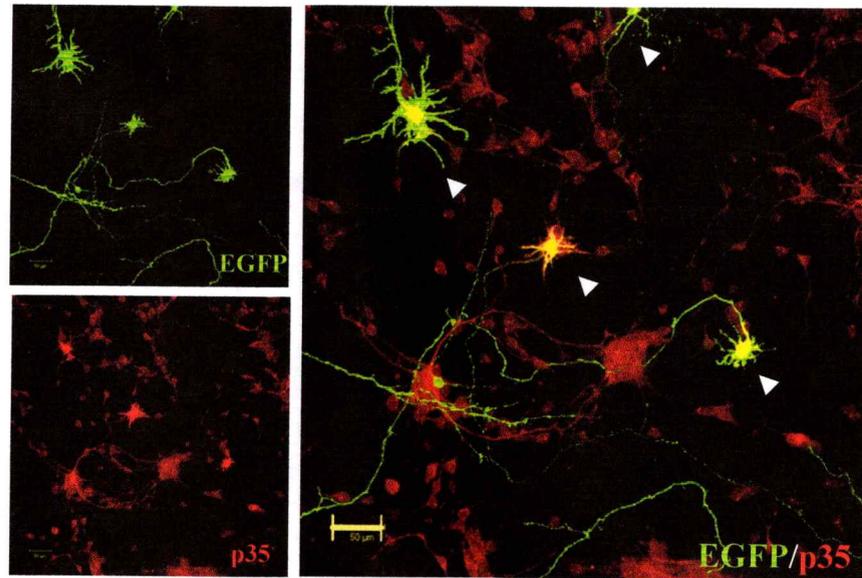
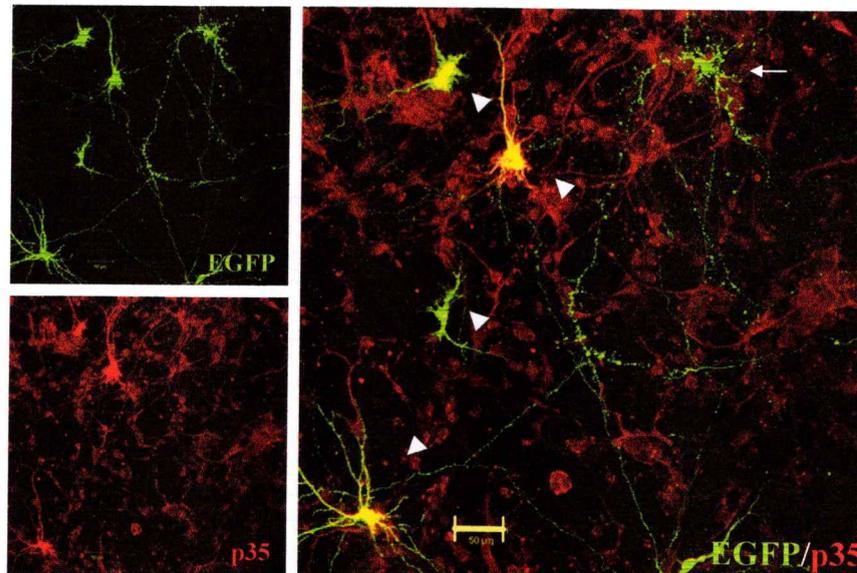


**Figura 24:** Inducción de apoptosis por el tratamiento con  $A\beta_{1-42}$  de células  $N_2A$  transfectadas con BiTetO-p35/EGFP y tTA. A) De izquierda a derecha se observan los paneles característicos de células: sin transfectar, sin transfectar +  $10 \mu M A\beta_{1-42}$ , transfectadas con BiTetO-p35/EGFP y tTA, transfectadas con BiTetO-p35/EGFP y tTA +  $10 \mu M A\beta_{1-42}$  y transfectadas con BiTetO-p35/EGFP +  $1 \mu g/mL$  de tetraciclina. En el panel de arriba se observa la co-localización de una inmunofluorescencia para p35 (rojo), células TUNEL y EGFP positivas (verde), núcleos (azul). En el panel de abajo se muestra solo la fluorescencia en verde que representa las células TUNEL positivas y las EGFP positivas. La barra amarilla representa  $50 \mu m$ . B) Cuantificación del porcentaje de células TUNEL positivas ( $n=3$ ). El tratamiento con  $A\beta_{1-42}$  indujo aumento en el porcentaje de muerte (\*,  $p \leq 0,005$  Test Student). La co-transfección de  $N_2A$  con BiTetO-p35/EGFP y tTA no indujo muerte por apoptosis, en cambio, el porcentaje de apoptosis de células tratadas con  $A\beta_{1-42}$  fue mayor en células co-transfectadas que en células sin transfectar ( $21,6 \pm 1,7$  v/s  $14,3 \pm 1,9$ ;  $p \leq 0,0085$  Test Student).

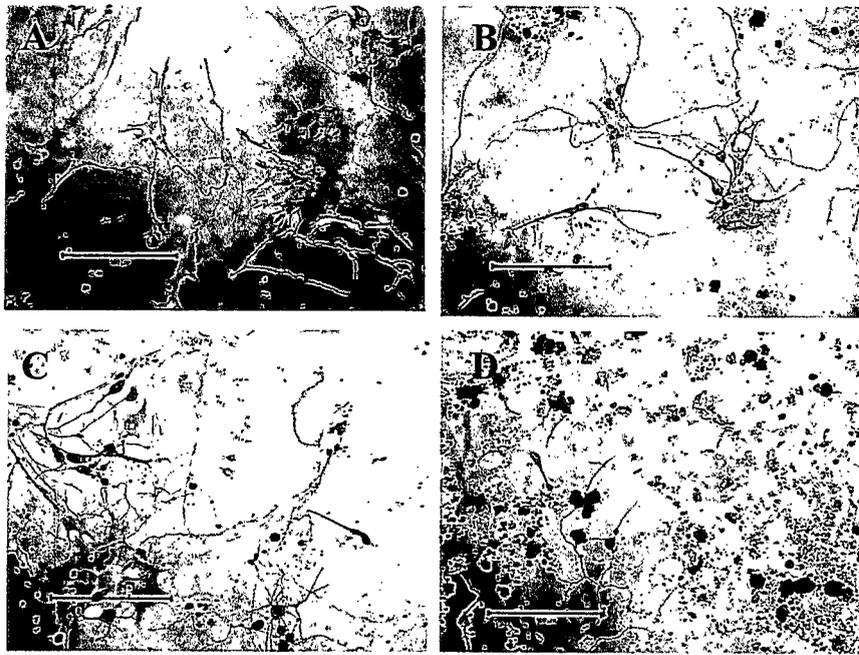
**A****B**

**Figura 25:** Determinación de apoptosis por TUNEL en células N<sub>2</sub>A. A) En este panel se observan células N<sub>2</sub>A co-transfectadas con BiTetO-p35/EGFP y tTA. Se muestra el contraste de fase, los núcleos (azul), la inmunofluorescencia para p35 (rojo), y células TUNEL y EGFP positivas (verde). En la foto de la derecha se muestra la colocalización de estos canales. Las cabezas de flecha celestes indican dos células co-transfectadas con altos niveles de p35 y EGFP. La barra amarilla representa 20 µm. B) En este panel se muestran células N<sub>2</sub>A co-transfectadas con BiTetO-p35/EGFP y tTA en presencia de 10 µM Aβ<sub>1-42</sub>. El panel en verde representa las células TUNEL positivas y las EGFP positivas. Las cabezas de flechas celestes indican a una célula transfectada, ya que los niveles de p35 están aumentados. Las flechas delgadas celestes muestran células TUNEL positivas, principalmente la marca verde está en el núcleo. La barra amarilla representa 20 µm.

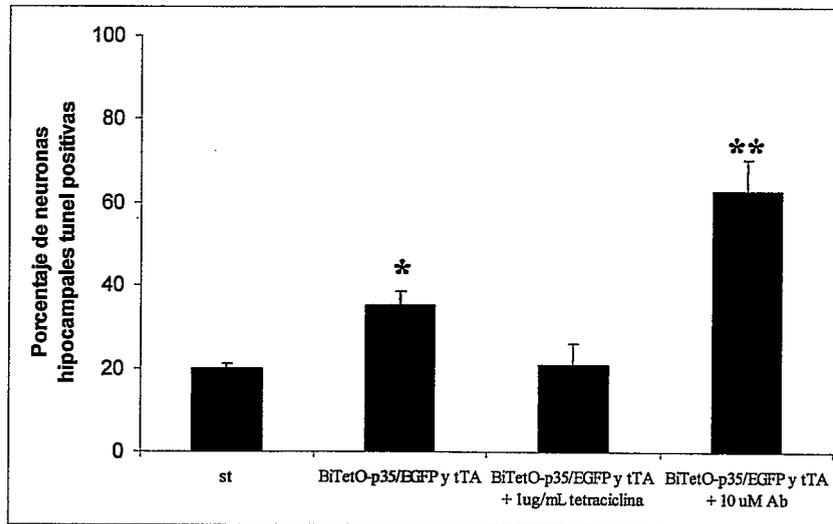
Cultivos primarios de neuronas hipocampales de ratón fueron co-transfectados con BiTetO-p35/EGFP y tTA en presencia o ausencia de 10  $\mu$ M de  $A\beta_{1-42}$ . Mediante inmunofluorescencia contra p35 y EGFP se determinó que la morfología de algunas neuronas EGFP positivas fue muy similar a neuronas entrando a un proceso de muerte. Es decir, los procesos neuríticos presentan discontinuidad en la fluorescencia de EGFP probablemente debido a una disrupción en el citoesqueleto, además los niveles de p35 en estas neuronas disminuyen a los niveles basales (**Figura 26**). En cambio, en neuronas co-transfectadas provenientes de cultivos no tratados con  $A\beta_{1-42}$ , la expresión de EGFP y p35 es alta y la morfología de estas células es similar a neuronas normales (**Figura 26**). Por otra parte, el mismo *kit* para determinar apoptosis fue utilizado en neuronas hipocampales co-transfectadas, pero esta vez el revelado de la marca apoptótica fue realizado con peroxidasa (**Figura 27**). Los cultivos primarios de neuronas hipocampales son muy sensibles, por ello el porcentaje de muerte en cultivos sin transfectar ya bordea el 20%. La co-transfección de neuronas hipocampales con BiTetO-p35/EGFP y tTA indujo un aumento en el porcentaje de apoptosis neuronal comparado con neuronas sin transfectar ( $35,2\pm 3,2$  v/s  $20,0\pm 1,2$ ;  $p\leq 0,008$  Test Student). Además, el aumento en el porcentaje de apoptosis cae a los niveles basales en presencia de 1  $\mu$ g/mL de tetraciclina ( $20,8\pm 5,1$ ;  $p\leq 0,096$  Test Student). Por otro lado, el tratamiento con 10  $\mu$ M de  $A\beta_{1-42}$  indujo un aumento en el porcentaje de muerte de neuronas co-transfectadas con respecto a neuronas co-transfectadas en ausencia de  $A\beta_{1-42}$  ( $62,6\pm 7,6$  v/s  $35,2\pm 3,2$ ;  $p\leq 0,014$  Test Student) (**Figura 27**). Tomando en su conjunto estos resultados, se sugiere que existiría un sinergismo entre la vía amieloidogénica y el complejo cdk5/p35.

**A****B**

**Figura 26:** Morfología de neuronas hipocámpales co-transfectadas con BiTetO-p35/EGFP y tTA en presencia y ausencia de  $A\beta_{1-42}$ . **A)** Neuronas hipocámpales de ratón transfectadas con BiTetO-p35/EGFP y tTA en ausencia de  $A\beta_{1-42}$ . En rojo se observa la inmunolocalización de p35 y en verde la fluorescencia de EGFP y en rojo y verde la co-localización de las imágenes. Las cabezas de flechas indican 4 neuronas co-transfectadas que expresan EGFP y sobreexpresan p35. La barra amarilla representa 50  $\mu\text{m}$ . **B)** Neuronas hipocámpales de ratón transfectadas con BiTetO-p35/EGFP y tTA en presencia de 10  $\mu\text{M}$  de  $A\beta_{1-42}$  por 24h. Algunas neuronas transfectadas presentan una morfología apoptótica con varicosidades y procesos neuríticos discontinuos, además el aumento de p35 en estas neuronas cae a los niveles basales. Las cabezas de flechas indican 4 neuronas co-transfectadas que expresan EGFP y sobreexpresan p35, en cambio la flecha muestra 1 neurona con morfología apoptótica y con niveles de p35 basales. La barra amarilla representa 50  $\mu\text{m}$ .



**E**

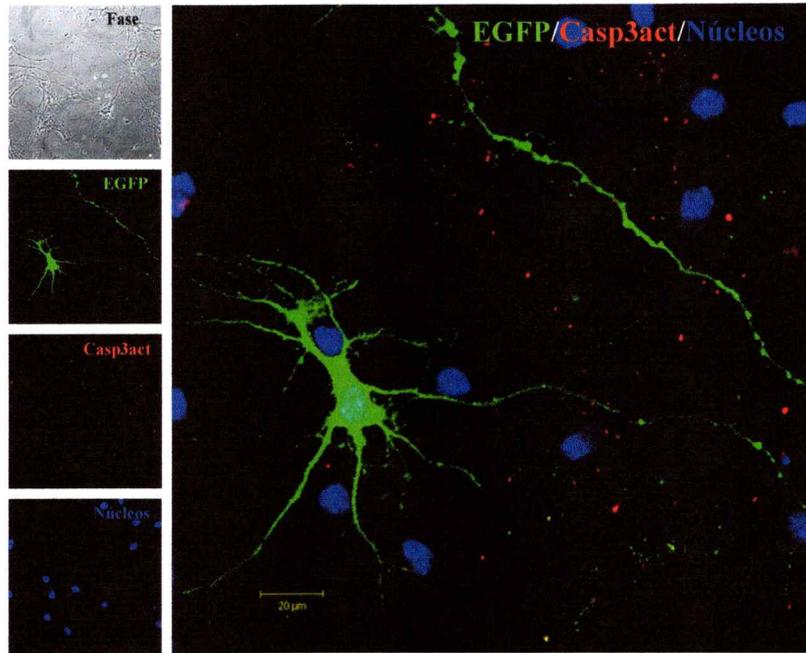
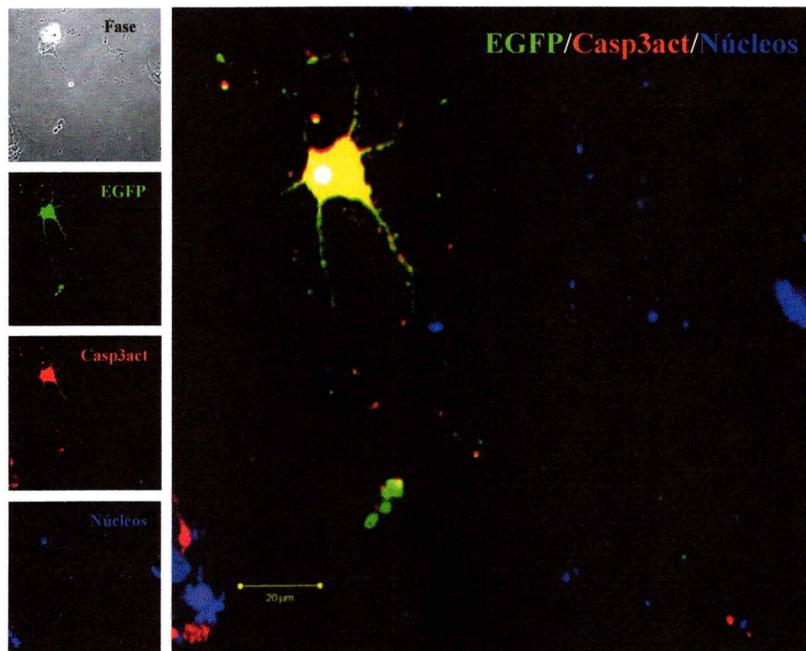


**Figura 27:** Determinación de apoptosis mediante TUNEL-peroxidasa en cultivo primario de neuronas hipocámpales de ratón tratadas con  $A\beta_{1-42}$ . Imágenes representativas de un cultivo primario de neuronas hipocámpales tratadas con: A) sin transfectar, B) co-transfectadas con BiTetO-p35/EGFP y tTA, C) co-transfectadas con BiTetO-p35/EGFP y tTA más 1  $\mu\text{g/mL}$  de tetraciclina y D) co-transfectadas con BiTetO-p35/EGFP y tTA más 10  $\mu\text{M}$   $A\beta_{1-42}$  durante 24 h. La barra negra representa 100  $\mu\text{m}$ . E) Cuantificación de las neuronas TUNEL positivas en las cuatro condiciones. El porcentaje de muerte de neuronas co-transfectadas con BiTetO-p35/EGFP y tTA fue mayor que en cultivos sin transfectar ( $35,2 \pm 3,2$  v/s  $20,0 \pm 1,2$ ;  $p \leq 0,008$  Test Student). Además, el aumento en la apoptosis cae a los niveles basales en presencia de tetraciclina ( $20,8 \pm 5,1$ ;  $p \leq 0,096$  Test Student). Por otro lado,  $A\beta_{1-42}$  indujo un aumento en el porcentaje de muerte de neuronas co-transfectadas con respecto a neuronas co-transfectadas en ausencia de  $A\beta_{1-42}$  ( $62,6 \pm 7,6$  v/s  $35,2 \pm 3,2$ ;  $p \leq 0,014$  Test Student).

Otra manera de determinar apoptosis en cultivos primarios de neuronas hipocampales, fue utilizar un anticuerpo contra caspasa 3 activada (proteína clave en la ejecución de la apoptosis). Este anticuerpo reconoce un fragmento proteolítico de 17/19kDa de caspasa 3 activada. En cultivo primario de neuronas hipocampales co-transfectados con BiTetO-p35/EGFP y tTA en presencia o en ausencia de  $A\beta_{1-42}$  (**Figura 28**). Mediante un conteo de neuronas se determinó que la frecuencia de células positivas para caspasa 3 activada y positivas para EGFP fue mayor en presencia de  $A\beta_{1-42}$  que en ausencia (63% casp3act(+)/EGFP(+) v/s 21% casp3act(+)/EGFP(+);  $p \leq 0,0033$ , Test de Fisher) (**Figura 29**). Es decir, la mayoría de las neuronas EGFP positivas también fueron positivas para caspasa 3 activada en presencia de  $A\beta_{1-42}$ . Estos resultados corroboran el sinergismo que existe entre la vía amiloidogénica y la actividad del complejo cdk5/p35.

### **6.5.3.- Reversibilidad de la Sobreexpresión de p35 en Neuronas Hipocampales tratadas con $A\beta_{1-42}$ .**

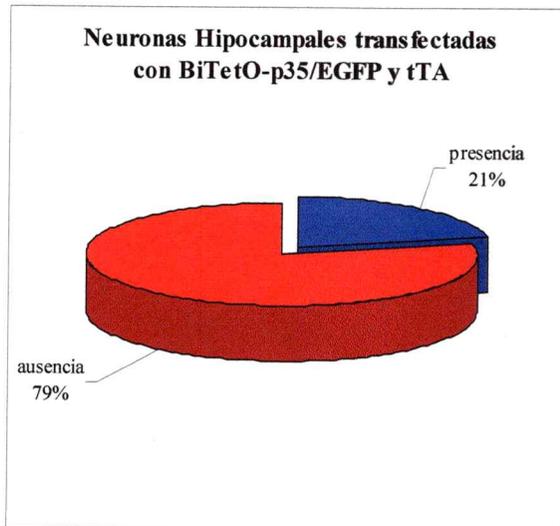
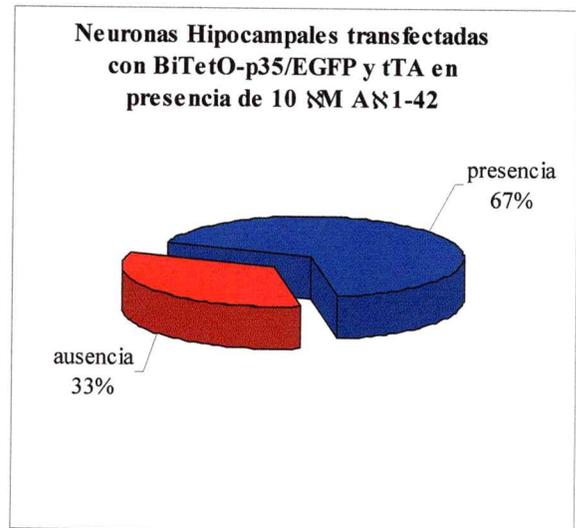
La reversibilidad de la expresión de p35 fue evaluada en neuronas hipocampales triple transfectadas con: BiTetO-p35-EGFP, tTA y un vector de expresión constitutiva para la proteína fluorescente cian (CFP). Las neuronas triple transfectadas en ausencia de tetraciclina expresan EGFP, tienen altos niveles de p35 y expresan CFP. Es decir, los tres vectores entran a las mismas neuronas (**Figura 30**). Una vez evaluada la efectividad de la triple transfección de neuronas hipocampales se procedió a realizar un estudio de reversibilidad en la expresión de p35. Para ello, neuronas hipocampales fueron

**A****B**

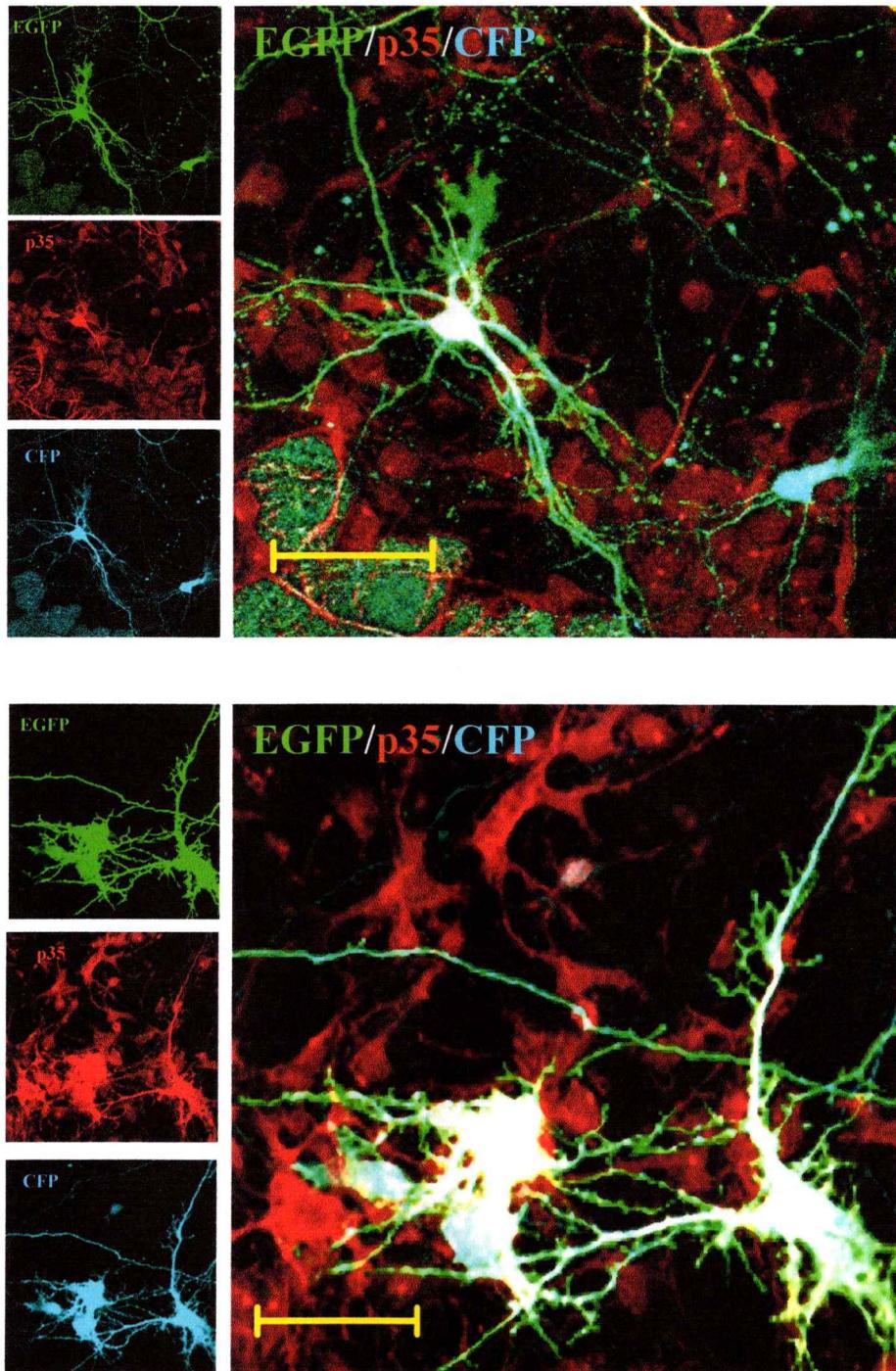
**Figura 28:** Sinergismo entre  $A\beta_{1-42}$  y la sobreexpresión de p35 en cultivo primario de neuronas hipocámpales. **A)** Neuronas hipocámpales de ratón co-transfectadas con BiTetO-p35/EGFP y tTA. Mediante inmunofluorescencia contra caspasa 3 activada (rojo), EGFP (verde) y núcleos (azul) se determinó que en ausencia de  $A\beta_{1-42}$  hay un bajo porcentaje de neuronas EGFP positivas y muertas (caspasa 3 activada positivas), en cambio en **B)** neuronas co-transfectadas con BiTetO-p35/EGFP y tTA en presencia de 10  $\mu$ M  $A\beta_{1-42}$  la mayoría de las neuronas EGFP positivas también fueron caspasa 3 activada. La barra amarilla en cada composición representa 20  $\mu$ m.

**A**

Categorías	Presencia Casp3act y EGFP	Ausencia casp3act y EGFP	Nº Casos
BiTetO-p35/EGFP y tTA	4	15	19
BiTetO-p35/EGFP y tTA más A $\beta$ <sub>1-42</sub>	16	8	24

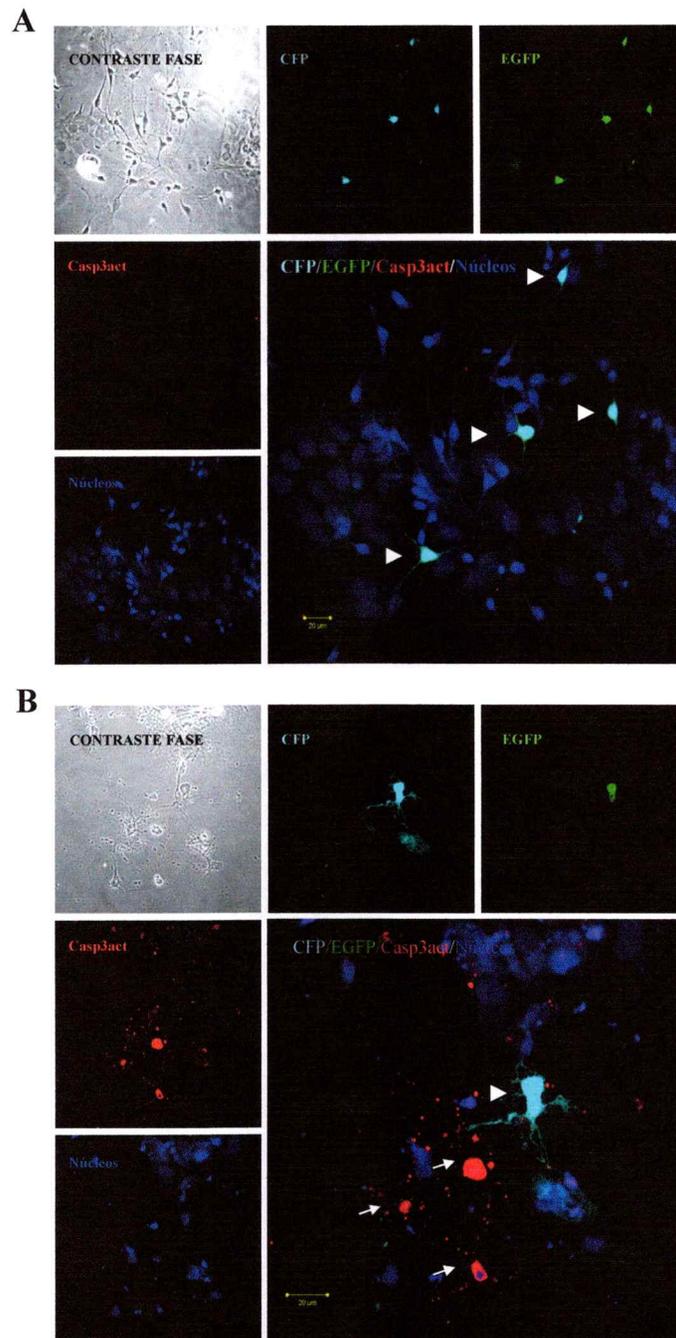
**B****C**

**Figura 29:** Cuantificación del sinergismo entre A $\beta$ <sub>1-42</sub> y la sobreexpresión de p35 en cultivo primario de neuronas hipocampales. A) Tabla de frecuencias de presencia o ausencia de neuronas EGFP y caspasa 3 activadas positivas, en cultivos neuronales co-transfectados con BiTetO-p35/EGFP y tTA en presencia y ausencia de 10  $\mu$ M de A $\beta$ <sub>1-42</sub>. B y C) Gráficos de torta representando la tabla de frecuencias presentada antes. Mediante la correlación exacta de Fisher se determinó que la frecuencia de neuronas EGFP positivas y caspasa 3 activadas positivas fue mayor en presencia de A $\beta$ <sub>1-42</sub> que en ausencia ( $p \leq 0.0033$ ).



**Figura 30:** Triple transfección de neuronas hipocámpales de ratón. Neuronas hipocámpales de ratón fueron co-transfectados con BiTetO-p35/EGFP, tTA y un vector de expresión constitutiva para CFP. Mediante inmunofluorescencia con anticuerpos contra p35 (rojo), EGFP (verde) y CFP (celeste) se determinó que los tres vectores se transfectaban a las mismas neuronas. Los paneles de la derecha muestran la co-localización de los tres canales. La barra amarilla representa 50  $\mu\text{m}$ .

transfectadas con BiTetO-p35/EGFP, tTA y CFP en ausencia y presencia de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de tetraciclina y 10  $\mu\text{M}$   $\text{A}\beta_{1-42}$ . Los resultados obtenidos mostraron que en presencia de tetraciclina más  $\text{A}\beta_{1-42}$  la mayoría de las neuronas apoptóticas (caspasa 3 activada) fueron las que no estaban transfectadas (CFP positivas) (Figura 31). Estos resultados confirmarían que, entre la vía amiloidogénica y el aumento en la actividad de cdk5/p35, existiría una correlación fisiológica.



**Figura 31:** Reversión de la expresión de p35. A) Neuronas hipocámpales de ratón co-transfectadas con BiTetO-p35/EGFP, tTA y CFP. Mediante inmunofluorescencia contra caspasa 3 activada (rojo), EGFP (verde) y CFP (celeste) se determinó que los tres vectores se transfectaban en las mismas neuronas. B) Neuronas hipocámpales de ratón co-transfectadas con BiTetO-p35/EGFP, tTA y CFP en presencia de 1  $\mu\text{g/mL}$  de tetraciclina y 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{A}\beta_{1-42}$ . Los resultados mostraron que en presencia de tetraciclina más  $\text{A}\beta_{1-42}$  la mayoría de las neuronas apoptóticas (caspasa 3 activada) fueron las que no estaban transfectadas (CFP positivas). Las cabezas de flechas muestran las neuronas triple transfectadas y las flechas muestran la neuronas apoptóticas (casp3act). La barra amarilla representa 20  $\mu\text{m}$ .

## 7.- DISCUSIÓN

A la fecha se han generado varios modelos animales transgénicos para el estudio de la enfermedad de Alzheimer. Entre estos modelos hay animales transgénicos que sobreexpresan p25 (Ahlijanian y col., 2000; Takashima y col., 2001; Bian y col., 2002; Angelo y col., 2003; Cruz y col., 2003), ratones que sobreexpresan la proteína tau (Tanemura y col., 2001, Götz y col., 2001a; Götz y col., 2001b; Lewis y col., 2001) y también un ratón que sobreexpresa condicionalmente Gsk3 $\beta$  (Lucas y col., 2001), entre otros. Por lo tanto, como todavía no hay claridad en el papel que podría cumplir p35 en la EA, es que en este trabajo se intentó generar un animal transgénico condicional que sobreexpresara p35 en el sistema nervioso central.

Hace más de 15 años que se descubrió cdk5 y hasta la fecha todavía se encuentran nuevas funciones para esta enzima. cdk5 fue identificada como un miembro de la familia de las quinasas dependientes de ciclinas que están primariamente implicadas en el ciclo celular. Quince años después, está claro que cdk5 no depende de ciclinas, ni está implicada en el ciclo celular. En vez de eso, cdk5 participa en una gran variedad de procesos neuronales. Varios sustratos de cdk5 han sido identificados, pero dado la heterogeneidad de la función de cdk5, esta lista es probablemente incompleta. A la fecha, cdk5 ha sido implicada en variados procesos tales como migración neuronal, dinámica de actina, estabilidad y transporte de MT, adhesión celular, guía axonal, estructura sináptica, endocitosis, memoria y aprendizaje, apoptosis, abuso de drogas y recientemente en dolor (Dhavan y Tsai, 2001; Pareek y col., 2006).

En condiciones fisiológicas, cdk5 se une a sus reguladores alostéricos p35 y p39, por lo que la regulación de la actividad quinasa depende principalmente de la expresión tanto temporal como espacial y de la localización intracelular de estas proteínas. En condiciones patológicas, la actividad quinasa cdk5 se ve desregulada debido a la producción de p25, que es un fragmento proteolítico de p35, producido por la activación de una proteasa llamada calpaina. En condiciones neurotóxicas, tales como daño isquémico, tratamiento con  $\beta$ -amiloide o estrés oxidativo, hay activación de calpaina lo que causa la producción de p25 a partir de p35 (Patrick y col., 1999; Lee y col., 2000). La generación y acumulación de este activador patológico transforma a cdk5 en una quinasa hiperactiva que puede gatillar varios eventos asociados con neurodegeneración (Alvarez y col., 1999; 2001). Aunque esta hipótesis todavía no ha sido completamente corroborada (Taniguchi y col., 2001; Takashima y col., 2001; Yoo y Lubec, 2001; Tandom y col., 2003). Una potencial relación entre cdk5 y p25 y la patología de los ONF en la EA ha sido propuesta basada en los elevados niveles de p25 detectados en cerebros de pacientes con EA (Patrick y col., 1999; Tseng y col., 2002). Análisis *in vitro* sustentan esta hipótesis debido a que la alta expresión de p25, pero no de p35, en neuronas de cultivo primario de ratón aumentan la fosforilación de tau y la ruptura del citoesqueleto (Patrick y col., 1999; Van den Haute y col., 2001). Además, la exposición a péptido A $\beta$ , o agentes que causan influjo de calcio, pueden inducir proteólisis de p35 a p25 mediado por calpaina (Lee y col., 2000; Alvarez y col., 2001), aunque esto no necesariamente aumenta la fosforilación de tau en células en cultivo (Kerokoski y col., 2002). Además, la toxicidad de A $\beta$  puede ser reducida por inhibidores de cdk5 (Lee y col., 2000; Alvarez y col., 2001). Estos resultados han sido interpretados de manera que

altos niveles de A $\beta$  en la EA pueden desencadenar la conversión de p35 a p25, produciendo la activación de cdk5 y la consecuente fosforilación de tau. No obstante, al ensayar esta hipótesis en ratones transgénicos que sobreexpresan p25 se han generado resultados conflictivos con respecto al aumento en la fosforilación de tau (Ahlijanian y col., 2000; Takashima y col., 2001; Bian y col., 2002; Angelo y col., 2003; Cruz y col., 2003). La sobreexpresión p25 resultó en un aumento de la actividad de cdk5 que fue suficiente para producir hiperfosforilación de la proteína tau en fosfoepítomos de tipo Alzheimer (Ahlijanian y col., 2000; Bian y col., 2002; Cruz y col., 2003). En cambio, en los otros 2 modelos de sobreexpresión de p25, no se observaron cambios en la organización del citoesqueleto (Takashima y col., 2001; Angelo y col., 2003). En estos modelos no hay una hiperfosforilación de la proteína tau ni muerte neuronal al contrario de lo que ocurre en los modelos transgénicos mencionados anteriormente. Posiblemente la discrepancia en los resultados obtenidos se deba a los promotores utilizados y a los niveles de sobreexpresión de p25 que en estos animales fueron inferiores a la sobreexpresión de p25 en los modelos anteriores (Takashima y col., 2001; Angelo y col., 2003).

Por otro lado, el aumento de los niveles de p25 en cerebros de pacientes con EA no ha sido corroborado (Takashima y col., 2001; Taniguchi y col., 2001; Yoo y Lubec, 2001; Borghi y col., 2002; Tandom y col., 2003). Es decir, todavía no está claro el papel que cumple p25 en la EA. Por otra parte, p25 ha sido implicado en la activación de cdk5 en otras enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Niemann-Pick tipo C (NPC) (Bu y col., 2002), en cambio p25 no contribuiría a la patogenia de la esclerosis lateral amiotrófica (ALS) (Takahashi y Kulkarni, 2004). Además, la

inducción de isquemia en ratas produce la formación de p25 en neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo. La generación de p25 fue asociada con una prolongada activación de cdk5 lo que aumentó la fosforilación del receptor de NMDA (Wang y col., 2003). Por último, después del tratamiento de ratones con MPTP (producto que produce las características bioquímicas y patológicas de la enfermedad de Parkinson (EP)) se produce p25, implicando así una activación de cdk5 en la EP (Smith y col., 2003).

Varias líneas de ratones transgénicos que expresan p25 han sido generadas para estudiar los efectos fisiológicos de la formación de p25 (Ahlijanian y col., 2000; Takashima y col., 2001; Bian y col., 2002; Angelo y col., 2003; Cruz y col., 2003; Giese y col., 2005). Estas líneas difieren en el nivel de expresión y la distribución de p25, y algunas no son apropiadas para investigar el papel de la formación de p25 en la EA. Por ejemplo, en ratón transgénico que sobreexpresa altas cantidades de p25 bajo el promotor PDGF beta (factor de crecimiento derivado de plaquetas beta) en cerebro y en médula espinal, ocurre una semiparálisis de los miembros superiores y muerte prematura (Bian y col., 2002); este severo fenotipo evita un análisis de la formación de memoria y de procesos dependientes de la edad. De este modo, para evaluar el papel fisiológico potencial de la formación de p25 en la EA, es importante restringir la expresión de p25 a áreas relevantes del cerebro tales como cerebro anterior. Adicionalmente, es importante evitar la expresión embrionaria de p25, ya que como mencionamos anteriormente cdk5 es importante en el desarrollo del sistema nervioso (Dhavan y Tsai, 2001). De acuerdo a esto, dos líneas de ratones transgénicos cumplen con este criterio, ya que la expresión de p25 está comandada por el promotor de CamKII $\alpha$  (Angelo y col., 2003; Cruz y col., 2003). Este promotor no es activo durante el desarrollo embrionario y además conduce

la expresión del transgén predominantemente en hipocampo y corteza, que son las principales áreas afectadas en etapas tempranas de la EA.

La expresión de p25 causa sobreactivación de cdk5 en todas las líneas transgénicas ensayadas (Ahlijanian y col., 2000; Takashima y col., 2001; Bian y col., 2002; Angelo y col., 2003; Cruz y col., 2003). En cambio, a pesar del aumento de p25 en estos ratones hay inconsistencias en los resultados sobre la hiperfosforilación de la proteína tau (Ahlijanian y col., 2000; Takashima y col., 2001; Bian y col., 2002; Angelo y col., 2003; Cruz y col., 2003). La mejor interpretación de esos resultados es que el nivel de expresión de p25 es un factor importante. Los ratones que sobreexpresan p25 al mismo nivel que p35 no tienen tau hiperfosforilada, mientras que los ratones transgénicos que expresan altos niveles de p25 más que p35, poseen tau hiperfosforilada. De esta forma, altos niveles de expresión de p25 producen una agregación de tau, como se demostró por *western blots* de proteínas insolubles en sarcosil sulfato o laureato (Cruz y col., 2003). Parece controversial todavía, si altos niveles de expresión de p25 son suficientes para causar formación de ONF, o si se requieren factores adicionales (Cruz y col., 2003). Sosteniendo lo anterior, sobre los factores adicionales, un estudio demostró que la sobreexpresión de p25 en combinación con la sobreexpresión de tau humana mutada en un ratón doble transgénico produce una hiperfosforilación de tau y una acumulación de tau agregada en corteza y tronco encefálico. Esto fue acompañado por un aumento en la tinción de ONF (Noble y col., 2003). Además, tau insoluble fue asociada con Gsk3 $\beta$ . Así, cdk5 puede tener un gran impacto sobre la progresión en la patología de tau que probablemente implica varias quinasas (Noble y col., 2003). Por otro lado, faltaría determinar si *in vivo* cdk5/p25 directamente fosforila tau, o si este

complejo regula indirectamente la fosforilación de tau vía otra quinasa, como se propone en los estudios con el ratón *KO* de p35 (Hallows y col., 2003). En este estudio se generó un ratón *KO* para p35, y se observó un aumento en la fosforilación de proteínas del citoesqueleto tales como tau, neurofilamentos y Map2 acompañado por una disminución en la actividad de cdk5, apoyando la idea de que cdk5 no fosforila directamente proteínas del citoesqueleto. Además, en estos animales se determinó que la actividad de Gsk3 $\beta$  estaba aumentada sugiriendo que esta quinasa puede ser regulada por cdk5 (Hallows y col., 2003). Tomando en conjunto estas evidencias indicarían que cdk5 cumple un papel importante en la fosforilación de tau pero no descarta la participación de otras quinasas en este proceso.

Interesantemente, en la mayoría de los estudios, la sobreexpresión de p25 produce solo un aumento aproximado de dos veces en la actividad de cdk5, independiente de nivel de expresión de p25. Es decir, una alta expresión de p25 no se correlaciona con una alta sobreactivación de cdk5 en estos ratones transgénicos (Ahlijanian y col., 2000; Takashima y col., 2001; Bian y col., 2002; Angelo y col., 2003; Cruz y col., 2003). Esto es similar a lo obtenido por nosotros en cultivo de células N<sub>2</sub>A. En efecto, el nivel de sobreexpresión de p35 en células transfectadas no se correlaciona con el nivel actividad de cdk5. Lo que podría haber ocurrido es que pese a gran aumento de p35, la cantidad de cdk5 endógena de estas células es baja. Además, la eficiencia de transfección de un vector varía en cada ensayo, por esto no podemos determinar si en las células co-transfectadas con BiTetO-p35/EGFP y tTA utilizadas para los ensayos de actividad, la sobreexpresión de p35 fue igual a los ensayos de inmunodetección de p35.

Por otro lado, a la fecha se han generado dos modelos de sobreexpresión de p35 (Van den Haute y col., 2001; Takahashi y col., 2005). En el primer modelo, p35 está bajo el control del promotor Thy-1, un promotor de expresión específico de sistema nervioso. La sobreexpresión de p35 fue suficiente para aumentar la actividad de cdk5, sin embargo no hubo hiperfosforilación de tau en estos animales. Posiblemente, debido a que el nivel umbral de producción de p35, necesario para una efectiva activación de cdk5 para actuar como una quinasa de tau, no fue alcanzado en estos animales (Van den Haute y col., 2001). Por último, en un reciente trabajo se generó un ratón transgénico que sobreexpresa p35 bajo el promotor de este mismo gen (Takahashi y col., 2005). En este trabajo los niveles de la proteína p35 fueron 1,6 veces más altos en ratones Tgp35 con respecto a ratones *wt*. Además en estos ratones Tgp35 se demostró que el aumento en la actividad de cdk5 generado por la sobreexpresión de p35 contribuye a la atenuación de la señalización de dopamina mediada por cocaína (Takahashi y col., 2005). Por último, la participación de cdk5 en los procesos neurodegenerativos tales como la hiperfosforilación de tau no fue evaluada en este trabajo.

Por lo tanto, pese a que todavía no se puede tener claridad acerca de la participación del complejo cdk5/p35 o cdk5/p25 en los procesos neurodegenerativos en la EA nosotros intentamos generar un ratón transgénico condicional que sobreexpresa la proteína p35 en cerebro de manera regulable con el sistema de expresión génica dependiente de tetraciclina (Tet).

Los ratones genéticamente alterados son un poderoso sistema modelo para el estudio de la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas. La identificación de mutaciones patogénicas en estas enfermedades ha permitido crear modelos de ratones transgénicos, y su caracterización ha demostrado el papel que cumplen estas proteínas

patogénicas en estos desordenes. Además, se han podido reproducir enfermedades somáticas que no necesariamente requieren de la presencia de mutaciones en los genes en cuestión. A pesar de estos avances, los ratones hechos con técnicas de transgénesis tradicional no son idealmente convenientes para resolver muchas preguntas de importancia fundamental en las enfermedades neurodegenerativas. Por ejemplo, los transgénicos clásicos no permitirían la identificación de eventos tempranos en la patogénesis de enfermedades. Además, al usar promotores activos constitutivamente no se puede determinar si la naturaleza progresiva de estas enfermedades requiere una continua expresión de la proteína mutante, o por otro lado, estos ratones transgénicos clásicos no permiten determinar si la proteína patogénica produce un proceso reversible en la enfermedad o no. Estos tipos de preguntas solo pueden ser resueltos en un sistema en el cual la expresión de la proteína patogénica puede ser encendida o apagada en tiempos definidos (Yamamoto y col., 2001b).

El sistema de expresión condicional dependiente de tetraciclina ha sido usado para sobreexpresar varias proteínas relevantes en algunas enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la sobreexpresión condicional de huntingtina como modelo de la enfermedad de Huntington (Yamamoto y col., 2000); la sobreexpresión condicional de Gsk3 $\beta$  como modelo de la EA (Lucas y col., 2001); la sobreexpresión condicional de p25, también como modelo de la EA (Cruz y col., 2003); la sobreexpresión condicional de ataxina mutante como modelo de la ataxia espinocerebelar de tipo 1 (SCA1) (Zu y col., 2004); y la sobreexpresión condicional del factor neurotrófico derivado de una línea celular glial (GDNF) (Kholodilov y col., 2004), entre otros modelos. Sin embargo, como existe discrepancia en la participación

de p25 o p35 en la EA, todavía no se ha generado un ratón que sobreexpresara condicionalmente p35 en el sistema nervioso. Por esta razón, en este trabajo apuntamos nuestros esfuerzos a la generación de un ratón transgénico condicional que sobreexpresara p35 en el SNC. La funcionalidad de este sistema de expresión condicional fue probada por transfección transiente en células N2A, y mediante ensayos de *western blot*, inmunofluorescencia y ensayo de actividad quinasa, se determinó que tanto p35 como EGFP se expresan en las mismas células, y el aumento de expresión de p35 indujo un aumento en la actividad quinasa de Cdk5. Además, la expresión de ambos transgenes es regulada por tetraciclina. Similarmente a lo reportado por Lucas y col., el sistema de expresión condicional funciona bastante bien en líneas celulares tales como Cos-7 y N2A (Lucas y col., 2001). Una vez evaluada la funcionalidad y la regulación del sistema de expresión condicional, se linearizó el vector BiTetO-p35/EGFP, debido a que la eficiencia de microinyección e integración del transgén es más de 5 veces mayor al usar un vector lineal que circular (Brinster y col., 1985). Después de la microinyección del vector BiTetO-p35/EGFP se obtuvo un 10,8% de eficiencia de producción de animales transgénicos lo que está dentro del rango descrito en literatura (Brinster y col., 1985). Por otra parte, existen varios factores que pueden influir en la eficiencia de la transgénesis, incluyendo la preparación del DNA (contaminantes con sustancias tóxicas), forma del DNA (lineal o circular), tamaño del DNA, concentración del DNA y  $MgCl_2$  y el uso de distintas cepas de ratones (Brinster y col., 1985).

Los potenciales ratones transgénicos fundadores que se desarrollaron desde los cigotos microinyectados fueron analizados para determinar la inserción del transgén mediante PCR y *Southern blot*. Debido a que el DNA genómico se digiere parcialmente con una enzima de corte frecuente como BamHI, el tamaño del transgén es desconocido

y las condiciones óptimas del *Southern blot* son difíciles de obtener. A pesar de ello, se obtuvo solo una banda de aproximadamente 0,76 Kb, lo que representa un solo sitio de integración del transgén (Hammes y Schell, 2000). Esta única banda se obtuvo solo en los 4 animales positivos para EGFP determinado mediante PCR, confirmando así las 4 líneas transgénicas que transportan el transgén BiTetO-p35/EGFP, que fueron denominadas L3, L5, L7 y L9.

El mecanismo preciso de integración del DNA inyectado se desconoce todavía. Sin embargo, este proceso puede ocurrir por medio de la formación de concatámeros y por inserción cromosomal (Auerbach, 2004). La mayoría de las veces más de una copia del transgén se integra en el genoma y usualmente en el mismo sitio cromosómico. Múltiple copias del transgén se integran como un reordenamiento en tandem usualmente formando un reordenamiento lineal cabeza-cola (Brinster y col., 1985), también llamado concatámero. El sitio de integración del transgén ocurre al azar y principalmente en lugares con rotura de la doble hélice, y ocurre principalmente durante la fase S del ciclo celular (Sonoda y col., 2001). El número de roturas cromosómicas generadas al azar podría ser el factor limitante para la transgénesis. La teoría que el extremo del transgén podría iniciar la integración en las rupturas de la doble hélice están de acuerdo con un aumento de 5 veces en la eficiencia de integración al usar un DNA linearizado comparado con un DNA circular (Brinster y col., 1985). Tres factores tienen una influencia en el éxito y la sincronización de la integración del transgén después de la microinyección pronuclear: la concentración del DNA, la capacidad del sistema de reparación del DNA así como la actividad transcripcional y de replicación del embrión. De este modo, la integración probablemente ocurre antes o durante la replicación del DNA en el primer o segundo ciclo. Si hay un retardo en la integración del transgén al

DNA genómico, la integración ocurre luego que el cigoto ya se ha dividido y el transgén se puede integrar en células somáticas y no sexuales, por lo tanto, el transgén puede no ser transmitido a la progenie. En nuestro caso, solo 1 de 5 líneas transgénicas no transmitió el transgén a la progenie pudiendo ser la causa lo mencionado anteriormente. Animales fundadores (L3, L5, L7 y L9) fueron cruzados con animales transgénicos para tTA. De estos cruces se obtuvieron 109 animales provenientes de 16 camadas con los 4 posibles genotipos: *wt*, EGFP, tTA y EGFP/tTA (dobles transgénicos). Teóricamente, los animales obtenidos seguirán los principios de la segregación Mendeliana y por tanto, el porcentaje esperado para cada genotipo es de 25%. En cambio los porcentajes obtenidos fueron: *wt* (35,8%), EGFP (33,9%), tTA (17,4%) y EGFP/tTA (12,2%) y la explicación puede deberse principalmente al bajo número de animales analizados. Otra posibilidad puede ser que la expresión de p35 en los animales dobles transgénicos fuera letal. Sin embargo, la expresión de tTA está comandada por el promotor CamKII $\alpha$ , el cual se expresa en cerebro anterior postnatal (Mayford y col., 1996). Además, la sobreexpresión condicional de p25 comandada por CamKII $\alpha$ -tTA no causó la muerte a los animales dobles transgénicos (Cruz y col., 2003). Finalmente, no se apreció escape de expresión de p35 en animales simples transgénicos que pudiese dar cuenta de ganancia de función toxica para p35.

La expresión de los transgenes fue evaluada mediante *western blot* en animales dobles transgénicos y *wt*. Este análisis fue realizado en las 4 líneas fundadoras y a 1, 2, 3 y 4 meses de edad y se determinó que la expresión de p35 fue más alta en corteza e hipocampo que en cerebelo, lo que está de acuerdo con lo descrito en literatura (Wu y col., 2000). No obstante, los niveles de expresión de p35 fueron similares entre animales

*wt* y dobles transgénicos en todas las líneas analizadas. Además, no hubo expresión de EGFP en las distintas zonas del cerebro analizadas. Por otro lado, se evaluó el patrón de fosforilación de la proteína tau en cerebro de ratones *wt* y dobles transgénicos. No hubo hiperfosforilación de tau detectado con el anticuerpo AT-8, que reconoce los residuos de aminoácidos Ser202 y Ser205 fosforilados (Alvarez y col., 2001). Por otro lado, no hubo variación en los niveles de tau desfosforilada en estos mismos epítopes, detectado con el anticuerpo Tau-1, entre animales *wt* y dobles transgénicos (Alvarez y col., 2001). Tomando en conjunto estos resultados, podemos concluir que a pesar de haber obtenido animales dobles transgénicos transportando ambos transgenes (BiTetO-p35/EGFP y tTA), no hubo sobreexpresión de p35, ni expresión de EGFP en las regiones analizadas del cerebro. Además, tampoco hubo cambio en el patrón de fosforilación de tau entre animales *wt* y dobles transgénicos.

La ausencia de sobreexpresión de p35 ni EGFP en los cerebros de las 4 líneas analizadas puede ser explicada por:

- a) Expresión espacial y temporal del transactivador (tTA).
- b) Accesibilidad del transgén BiTetO-p35/EGFP al tTA.
- c) Insuficiente número de copias del transgén integrado en el DNA genómico.
- d) Inactivación del transgén por elementos del DNA genómico.
- e) Posible toxicidad de p35 en embriones de animales dobles transgénicos.

La expresión de tTA está comandada por el promotor CamKII $\alpha$ , el cual se expresa predominantemente en cerebro anterior adulto, incluyendo corteza, hipocampo y estriado pero no en cerebelo (Mayford y col, 1996). Debido a la ausencia de anticuerpos contra tTA, se realizó un RT-PCR con partidores contra tTA y se demostró que este transactivador se expresa en corteza e hipocampo y no en cerebelo, similar a lo descrito anteriormente. Sin embargo, existen otros problemas que se deben tener presentes con respecto a la expresión de tTA. El grupo de Böger y colaboradores, determinó que podrían existir dos posibilidades para explicar fallas en la transactivación de genes blanco para tTA: el activador ocupa sus sitios de unión pero la transmisión de la señal de activación es inhibida, o alternativamente, la unión del activador al DNA es estorbado por factores en la cromatina (Böger y Gruss, 1999). También demostraron que tTA es sensible a cambios en el estado de acetilación de la cromatina, es decir, que la inhibición de la deacetilasa de histonas (HDAC) por butirato induce una hiperacetilación de histonas y esto podría ser un posible mecanismo para promover preactivación del sistema dependiente de tetraciclina (Böger y Gruss, 1999). En nuestro caso, solo podemos decir que el mensajero de tTA se expresa en los tejidos en que debía hacerlo comandado por el promotor CamkII $\alpha$ , pero no podemos conocer el estado de acetilación del transgén o la cantidad de tTA expresada en los tejidos.

Con respecto a la accesibilidad del transgén BiTetO-p35/EGFP al tTA, se realizaron transfecciones transientes de tTA en cultivos primarios de neuronas hipocampales provenientes de ratones *wt* y simples transgénicos (L3, L5, L7 y L9). En todos los cultivos analizados, solo pudimos encontrar neuronas EGFP positivas en los cultivos de animales *wt* transfectados con BiTetO-p35/EGFP y tTA. Es decir, la cantidad

de tTA no es la limitante en la transactivación, ya que al transfectar tTA el nivel de transactivador en neuronas transfectadas es muy alto, aún así no hubo neuronas positivas, en cambio cuando se transfectaron neuronas hipocampales de ratones *wt* con ambos transgenes, si se obtuvieron neuronas EGFP positivas. Por lo tanto, probablemente la falla en la transactivación puede ser un problema de accesibilidad del transactivador al BiTetO-p35/EGFP o una inactivación del transgén por elementos del genoma.

Otra posibilidad podría ser el bajo número de copias en que se integró el transgén BiTetO-p35/EGFP. Los transgenes utilizados en microinyección pronuclear se integran al azar, en sitios impredecibles en el genoma del ratón con una frecuencia no mayor al 30% (Smith K., 2001). Además, el DNA integrado se presenta en un reordenamiento de multicopias. El número de copias insertadas puede variar ampliamente, entre 1 y varios cientos de copias, con un consecuente impacto sobre los niveles de expresión del mRNA y proteínas. En nuestro caso los resultados obtenidos podrían sugerir que el número de copias del transgén integrado son insuficientes para inducir una sobreexpresión detectable de los transgenes.

Una de las mayores desventajas de la microinyección pronuclear de DNA es su baja eficiencia en la producción de ratones transgénicos, con un aún menor número de fundadores transgénicos generados, en los que se expresa apropiadamente el transgén (con niveles deseables y correcta expresión espacial y temporal). En varios estudios se han encontrado diferencias en la sobreexpresión de un transgén dado debido a los diferentes sitios de integración. El nivel de expresión del transgén más que ser dependiente del número de copias, frecuentemente es influenciado por secuencias

genómicas flanqueantes del sitio de integración (Auerbach, 2004). Este efecto de posicionamiento puede reducir o completamente evitar la expresión del transgén, debido a que el transgén se ha insertado en una región transcripcionalmente inactiva del genoma o por acción de elementos regulatorios específicos de silenciamiento del genoma. Por otro lado, secuencias flanqueantes de los transgenes pueden contener elementos regulatorios de genes vecinos que actúan sobre el promotor del transgén como un *enhancer* resultando una expresión ectópica (incorrecta expresión espacial) (Auerbach, 2004). Una manera de evitar los problemas de silenciamiento del transgén por regiones regulatorias del DNA es el uso de regiones *insulators* que flanquean un transgén dado (Burgess-Beusse y col., 2002). Los *insulators* son secuencias de DNA que se colocan flanqueado el transgén y pueden servir como barreras en contra del secuestro de la cromatina. Algunos *insulators* también pueden actuar como elementos bloqueadores de la influencia activadora de *enhancers* lejanos asociados a otros genes. Uno de los *insulators* más conocidos es el que está presente en la región 5' del locus de  $\beta$ -globina. Esta región marca el límite entre un dominio de cromatina abierta y una región de cromatina condensada constitutivamente. Un análisis detallado de esta región mostró que ésta posee una actividad bloqueadora de *enhancers* y una capacidad de expresar genes reporteros sin importar el efecto de posicionamiento del transgén (Burgess-Beusse y col., 2002). Recientemente se caracterizó una proteína llamada CTCF que es capaz de unirse a la región *insulators* HS4. Esta proteína se une a la matriz nuclear y formaría un dominio que evitaría la acción de elementos reguladores del genoma (Yusufzai y col., 2004). Por lo tanto, los *insulators* son una valiosa herramienta que sirve para prevenir problemas de expresión de un transgén dado.

El sistema de expresión condicional dependiente de tetraciclina presenta algunos problemas como efectos de posicionamiento, variabilidad y de heterogeneidad sobre la expresión del transgén (Furth y col., 1994; Schultze y col., 1996; Krestel y col., 2001, Robertson y col., 2002). Por ejemplo, en el trabajo de Robertson y colaboradores se generaron de 5 líneas de ratones transgénicos transportando el reportero LacZ y 4 líneas transportando CMV-tTA. De las cuales ninguna línea CMV-tTA y solo 1 línea transportando el gen reportero LacZ funcionó (Robertson y col., 2002). Por otra parte, el grupo de Krestel y colaboradores demostraron que 4 de 6 líneas transgénicas fundadoras transportando tTA funcionaron bien. No obstante, las líneas fundadoras que no respondieron, se sugiere que el nivel de expresión y/o inducción de tTA son afectados por locus de inserción transgénica. Además de las 4 líneas que funcionaron, los niveles de expresión de tTA fueron variables (Krestel y col., 2001). Los efectos de posición y heterogeneidad en la expresión de los transgenes son comunes fallas y son probablemente relacionadas a metilación del transgén (Hsieh, 1994; Kass y col., 1997; Robertson y col., 2002; Chevalier-Mariette y col., 2003; Pedram y col., 2006).

La metilación de residuos de citosina de dinucleótidos CpG del DNA constituye la base del control epigenético de la expresión génica en animales vertebrados. El patrón de metilación genómica tiene una importancia crítica en varios procesos biológicos tales como silenciamiento de elementos parásitos, desarrollo e *imprinting* genómico (Chevalier-Mariette y col., 2003). La metilación de promotores no produce silenciamiento de la transcripción hasta que las proteínas de unión a metilcitosina (MBPs) son reclutadas a esta región. Entonces el DNA de estas regiones silentes es empaquetado en nucleosomas que contienen histona H3 deacetilada (Chevalier-Mariette

y col., 2003). La metilación de secuencias CpG puede resultar en silenciamiento transcripcional de un gen reportero (Hsieh, 1994; Kass y col., 1997; Chevalier-Mariette y col., 2003). De esta manera se determinó que la densidad de secuencias CpG en regiones transcritas de los transgenes pueden causar represión de la transcripción. Un bajo porcentaje de CpG en el transgén (0,06%) produjo una alta expresión del transgén, y viceversa, cerca del 10% de metilación produjo una represión total en la expresión del transgén (Chevalier-Mariette y col., 2003). En nuestro caso el porcentaje de dinucleótidos CpG fue de 4,7% (228 CpG en el transgén (4810 pb), por lo tanto los valores están dentro del rango en el cual el transgén puede ser silenciado por metilación.

Recientemente, se determinó que los transgenes insertados en el DNA cerca de los telómeros pueden ser silenciados por un efecto de posición de los telómeros (TPE). El análisis de los transgenes teloméricos demostró que ellos fueron expresados en bajos niveles, comparado al mismo transgén integrado en un sitio intersticial. Además, hubo una gran metilación en los transgenes teloméricos (Pedram y col., 2006). El sitio de inserción de nuestro transgén no fue determinado, aunque no podemos descartar su integración en regiones cercanas a los telómeros.

Otra desventaja del sistema de expresión condicional dependiente de tetraciclina fue la necesidad de generar 2 líneas transgénicas separadas para cada componente del sistema. Shultze y colaboradores generaron un constructo que transporta todas las secuencias regulatorias necesarias y los transgenes sobre un solo plasmidio (Shultze y col., 1996). Este ratón controla eficiente y fuertemente la expresión de un gen reportero y es regulado por tetraciclina. Teóricamente, este sistema consume menos tiempo y evita la segregación genética de los elementos controladores durante el cruzamiento (Shultze y col., 1996). No obstante, el uso de líneas dobles transgénicas es mas flexible si un

desea hacer uso de varias diferentes líneas de transactivador específicas de tejido, para estudiar el efecto de un único transgén (Riding y col., 2001).

Por último, la sobreexpresión de p35 posiblemente podría ser tóxica en un embrión completo y esto podría contribuir a seleccionar los animales. Es decir, los transgenes podrían silenciarse para que los animales doble transgénicos puedan nacer. No obstante, pensamos que esto no es muy probable debido a que la sobreexpresión de p25 utilizando un sistema análogo al nuestro no produjo un efecto tóxico sobre los embriones (Cruz y col., 2003).

Resumiendo las razones antes descritas podemos concluir que pese a haber generado cuatro líneas fundadoras transgénicas que transportan el transgén BiTetO-p35/EGFP, no hubo sobreexpresión de los transgenes, probablemente debido a metilación y posterior silenciamiento del transgén insertado.

Debido a los resultados anteriormente descritos, el desarrollo del tercer objetivo de esta tesis con respecto a la activación de la vía de transducción de señales que modula la actividad de cdk5 en respuesta a la presencia del péptido A $\beta$ , fue realizado en cultivos celulares de origen neuronal (N<sub>2</sub>A) y en cultivo primario de neuronas hipocampales de ratón. Estos cultivos fueron co-transfectados con BiTetO-p35/EGFP y tTA en presencia o ausencia del péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> y mediante la técnica de TUNEL, e inmunofluorescencia contra caspasa 3 activada se determinó que en células tratadas con A $\beta$  significativamente aumenta la apoptosis con respecto a células sin A $\beta$ . Estos resultados están de acuerdo a lo descrito en literatura que A $\beta$  induce muerte por apoptosis (Alvarez y col., 1999; Alvarez y col., 2001). La relación entre el péptido A $\beta$  y la vía de cdk5/p35

en neurodegeneración ya ha sido establecida (Alvarez y col., 1999, Alvarez y col., 2001). En estos trabajos se demostró que en el tratamiento con A $\beta$  de neuronas hipocampales de rata en cultivo, significativamente aumenta la actividad enzimática de cdk5. Además, el efecto neurotóxico de A $\beta$  sobre los cultivos primarios, disminuye marcadamente con la co-incubación de A $\beta$  y butirolactona, un inhibidor de cdk5, y la muerte de las neuronas también fue evitada por el uso de una sonda antisentido contra cdk5 (Alvarez y col., 1999). Además, se determinó que el aumento en la actividad de cdk5 mediado por A $\beta$  está asociado a cambios en la fosforilación de la proteína tau, principalmente por un aumento en la fosforilación en el epítotope AT-8 y una disminución del epítotope Tau-1 (Alvarez y col., 2001). Por otro lado, no hubo cambios en los niveles de mRNA de cdk5 y de p35 después del tratamiento con A $\beta$ , sugiriendo que el aumento en la actividad de cdk5 podría deberse a un mecanismo post-traducciona (Alvarez y col., 2001).

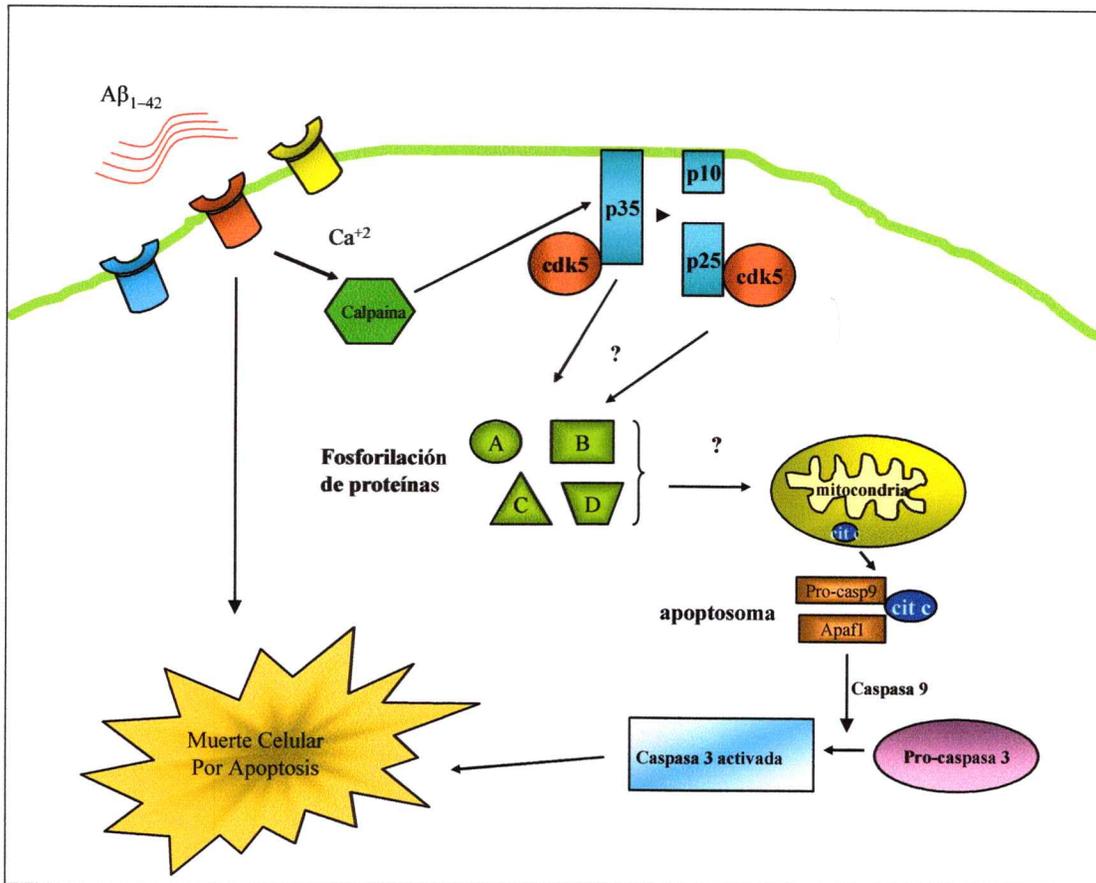
Los experimentos desarrollados en esta tesis sustentan un papel para cdk5 en apoptosis, ya que, experimentos desarrollados en líneas celulares y en cultivos primarios de neuronas hipocampales indicaron que hay un aumento en la citotoxicidad debida al péptido A $\beta$ . Si bien existen diferencias entre células N2A y neuronas hipocampales en la susceptibilidad al péptido amiloide, es claro, que la sobreexpresión de p35 contribuye a incrementar la muerte debida al efecto neurotóxico del péptido. Estos resultados sugirieron que efectivamente la presencia de más p35, y posterior activación de cdk5, serian responsables de incrementar procesos apoptóticos. Es por esto que se analizó la presencia de dos marcadores canónicos de apoptosis como son TUNEL y caspasa 3 activada. Interesantemente tanto en células N<sub>2</sub>A como en neuronas, la presencia de

mayores niveles de p35 se correlacionó con un aumento en la frecuencia de células presentando estos marcadores apoptóticos. Si bien la correlación no es completa, se puede concluir que existe un efecto causal entre la expresión de p35, y la susceptibilidad a la muerte inducida por A $\beta$ . La última parte del diseño experimental consideró demostrar que la reversión de la sobreexpresión tendría un efecto sobre la muerte inducida por A $\beta$ . Para ello se desarrollo un protocolo complejo que considero la expresión de las proteínas de interés, en conjunto con una variante de la proteína verde fluorescente (CFP) como indicador de transfección. Esta descrito en literatura, y así hemos demostrado en esta tesis, que en las transfecciones múltiples los cDNA se expresan por igual en las células transfectadas (Lin y col., 2004). De acuerdo a esto, hemos conseguido en esta tesis expresar hasta 3 construcciones diferentes en las mismas neuronas en cultivo, sin disminuir de por si las bajas eficiencias de transfección. Interesantemente estos experimentos muestran que las células cuya expresión de p35 es regulada por tetraciclina muestran una protección al efecto neurotóxico del péptido A $\beta$ , en detrimento de aquellas células que no sobreexpresaron el transgen. Al respecto es necesario discutir dos puntos adicionales. En primer lugar la respuesta de las neuronas al péptido amiloide parece no ser homogénea. Este es un aspecto que ha suscitado una gran discusión ya que durante mucho tiempo se ha asumido que las diferencias en las respuestas de las neuronas al péptido amiloide se relacionaría con la accesibilidad a las fibrillas de amiloide. No obstante esto, estudios recientes utilizando fibras fibrilares, pequeños oligómeros y péptido amiloide soluble han indicado que existiría una heterogeneidad en la susceptibilidad de las distintas poblaciones de neuronas hipocámpales al péptido A $\beta$ , y no todas responderían por igual (Maloney y col., 2005).

El segundo punto se relaciona con el hecho que las células que no han sido transfectadas con los transgenes parecen tener una mayor susceptibilidad al péptido amiloide, frente a aquellas transfectadas y posteriormente reguladas por tetraciclina. Una posible explicación para esto, es que el protocolo para que funcione necesita que las neuronas expresen los transgenes al menos por algunas horas, antes de ser inhibidos por tetraciclina. En este contexto, podría postularse que esta sobreexpresión y posterior inhibición hace que las células transfectadas no se comporten exactamente igual a aquellas que no fueron transfectadas, y podría ser parte de la heterogeneidad de la respuesta.

En su conjunto estos experimentos indican que efectivamente la inducción de la actividad de cdk5, por sobreexpresión regulada de p35 esta modulando la respuesta celular a la neurotoxicidad inducida por A $\beta$ . Los mecanismos involucrados no están totalmente claros pero podrían incluir la participación de cdk5, por un lado en la prevención y por el otro en la inducción de la apoptosis (Eilers y col., 1998; Li y col., 2002; Zheng y col, 2005; Patrick y col., 1999; Alvarez y col., 1999; 2001; Weishaupt y col., 2003). cdk5 puede participar en prevenir la apoptosis a través de la fosforilación de la quinasa 3 N-terminal c-Jun (JNK3). La activación de JNK3 induce apoptosis (Eilers y col., 1998). Es decir, cdk5 al fosforilar JNK3 regula negativamente la actividad de esta quinasa protegiendo la muerte de las neuronas por apoptosis (Li y col., 2002). Por otro lado, en neuronas corticales infectadas con un péptido inhibidor de cdk5 (CIP) se redujo la fosforilación de tau y la apoptosis. Además, la apoptosis en neuronas corticales inducida en presencia de A $\beta$  también fue reducida por CIP (Zheng y col, 2005). Contrariamente, otros autores relacionan la desregulación de cdk5 con una inducción de

apoptosis (Patrick y col., 1999; Alvarez y col., 1999; 2001; Weishaupt y col., 2003). En particular, cdk5 se ha relacionado con la hiperfosforilación de tau y neurofilamentos. Además, la expresión de p25 en ratones transgénicos resultó en hiperfosforilación de tau y neurofilamentos, seguida de una disrupción del citoesqueleto (Ahlijanian y col., 2000; Bian y col, 2002; Cruz y col, 2003). Consistente con la hipótesis que cdk5/p25 es un activador río arriba de la activación de la cascada de muerte neuronal en la EA, el tratamiento de neuronas hipocámpales con A $\beta$  1-42 indujo la ruptura de p35 a p25 y aumentó la actividad de cdk5 (Lee y col., 2000) y la inhibición de cdk5 con butirolactona protegería a las neuronas contra la muerte (Alvarez y col., 2001). Estas discrepancias sobre el papel que podría desempeñar cdk5 en la apoptosis podrían explicar nuestros resultados sobre la reversión de la expresión de p35. Ya que células que no han sido transfectadas con los transgenes parecen tener una susceptibilidad mayor al péptido amiloide, frente a aquellas transfectadas y posteriormente reguladas por tetraciclina. Posiblemente debido a que la expresión temprana de p35 durante la transfección y antes de la reversión, podría proteger a las neuronas del péptido amiloide, con respecto a las neuronas no transfectadas. Por último, un posible mecanismo de acción del sinergismo entre el péptido amiloide y el complejo cdk5/p35 en la activación de vías apoptóticas que desencadenaría la muerte neuronal se muestra en la **Figura 32**. En este modelo se muestra la vía apoptótica iniciada por la unión de A $\beta$  a varios receptores. Esta unión puede inducir un influjo de calcio que desencadenaría activación de calpaina y una concomitante proteólisis de p35 a p25. Tanto cdk5/p35 o cdk5/p25 podrían regular la fosforilación de proteínas que participarían en la disfunción mitocondrial. Luego de la liberación de citocromo c y posterior unión a pro-caspasa 9 y



*Adaptado de Weishaupt y col., 2002.*

**Figura 32:** Modelo del sinergismo entre la vía amieloidogénica y el complejo cdk5/p35. En este modelo se muestra la vía apoptótica iniciada por la unión de  $A\beta$  a varios receptores. Esta unión puede inducir un influjo de calcio lo que desencadenaría activación de calpaina y una concomitante proteólisis de p35 a p25. cdk5/p35 o cdk5/p25 podrían regular la fosforilación de proteínas que participarían en la disfunción mitocondrial. Luego de la liberación de citocromo c y posterior unión a pro-caspasa 9 y Apaf1 para formar el apoptosoma, el que a su vez proteoliza la caspasa efectora pro-caspasa 3 generando caspasa 3 activada la que desencadenaría la muerte por apoptosis. Por otro lado,  $A\beta$  podría inducir apoptosis por un mecanismo que no incluya cdk5.

Apaf1 para formar el apoptosoma, el que a su vez proteoliza la caspasa efectora pro-caspasa 3 generando caspasa 3 activada la que desencadenaría la muerte por apoptosis. Por otro lado, A $\beta$  podría inducir apoptosis por un mecanismo que no incluya cdk5 (Figura 32). La posición de cdk5 dentro de la cascada de eventos permanece especulativa, ya que los blancos río abajo no han sido identificados: No obstante, hay evidencias que cdk5 está localizada río arriba de la disfunción mitocondrial. Ya que al inhibir cdk5 con butirolactona se protege de la muerte neuronal (Alvarez y col., 2001).

Una gran cantidad de trabajos (Yamamoto y col., 2000; Lucas y col., 2001; Cruz y col., 2003; Zu y col., 2004; Kholodilov y col., 2004) han postulado que generando un modelo transgénico, que implique alteración de una función clave de un sistema de proteínas o complejos macromoleculares que se quiere analizar, resolvería el problema para definir la función de un gen concreto en una patología concreta. Sin embargo, debe considerarse que la mayoría de las enfermedades somáticas, especialmente aquellas que decursan con neurodegeneración dependen de múltiples factores como en el caso de la EA. En este contexto, los estudios bioquímicos y el análisis de las interacciones macromoleculares, combinado con estudios estructurales mediante microscopía confocal y electrónica aportan una valiosa información (Sjoberg y col., 2006), que permite complementar aspectos difíciles de reproducir en los estudios *in vivo*. No obstante, actualmente los modelos de pérdida y ganancia de función en vertebrados e invertebrados se han convertido en el *gold standard* para poder entender la real participación de un gen en estudios de Biomedicina.

El sistema de expresión condicional dependiente de tetraciclina tet-Off es una poderosa herramienta para sobreexpresar condicionalmente un transgén. En nuestro caso se pretendía generar un ratón que sobreexpresara condicionalmente p35 en el cerebro anterior postnatal. Este modelo animal hubiera servido para evaluar el papel de p35, por sobre p25, en la activación de cdk5, ya que todavía existen controversias al respecto. Además, en este modelo se hubiera inducido la generación de p25 por el tratamiento con agentes que inducen activación de calpaina mediante un influjo de calcio tales como glutamato, ionomicina, péptido A $\beta$ , peróxido de hidrógeno, etc. (Lee y col., 2000). Por lo tanto, en este modelo hubiera servido para discriminar la importancia de los niveles de p35 y p25 sobre la activación de cdk5.

La principal característica del modelo de sobreexpresión dependiente de tetraciclina es la condicionalidad. Es decir, se puede sobreexpresar una proteína en un tejido específico y en un periodo de tiempo determinado. La idea principal de generar un ratón transgénico condicional que sobreexpresara p35 fue evaluar la reversibilidad de varios parámetros como memoria y aprendizaje en la participación de cdk5/p35 en la EA.

Otra ventaja de generar un ratón transgénico que sobreexpresara condicionalmente p35 en el sistema nervioso central sería evaluar el papel que cumple el complejo cdk5/p35 en otros procesos en que está implicada esta quinasa (Dhavan y Tsai, 2000; Pareek y Kulkarni, 2006). Esto podría llevarse a cabo al cruzar los animales transgénicos para BiTetO-p35/EGFP con animales que expresen tTA bajo un promotor específico de sistema nervioso periférico por ejemplo, para estudiar la participación del complejo cdk5/p35 en dolor o en desarrollo de la unión neuromuscular (Pareek y Kulkarni, 2006;

Fu y col., 2001; 2005). Por otro lado, también se podría estudiar la participación de cdk5/p35 en el desarrollo del sistema nervioso al usar un ratón transgénico para tTA bajo el promotor específico de algún gen que se expresa en el desarrollo. Es decir, el sistema dependiente de tetraciclina es muy útil para comandar la expresión de un gen espacial y temporalmente. Por lo tanto, tener un ratón que sobreexpresa p35 condicionalmente sería una muy valiosa herramienta para evaluar la participación de cdk5 en procesos tales como guía axonal, adhesión celular, dolor y otros.

## 8.- CONCLUSIONES

- La sobreexpresión de p35 y EGFP mediante el sistema de expresión condicional dependiente de tetraciclina tet-Off funciona en líneas celulares N<sub>2</sub>A y en cultivo primario de neuronas hipocampales de ratón. Es decir, ambos transgenes se expresan en las mismas células y la expresión es regulada por tetraciclina. Además, el aumento en los niveles de p35 fue suficiente para aumentar la actividad de cdk5.
- Se generaron 4 líneas fundadoras de animales transgénicos que transportan el transgén BiTetO-p35/EGFP determinado mediante PCR y *southern blot*. Al cruzar estos animales con ratones tTA obtuvimos animales dobles transgénicos y luego de analizar mediante *western blot* los niveles de los transgenes p35 y EGFP se determinó que no hubo diferencia entre los animales *wt* y dobles transgénicos. Es decir, no hubo transactivación, posiblemente debido a metilación y posterior silenciamiento de los transgenes.
- Cultivos celulares de origen neuronal (N<sub>2</sub>A) y cultivos primarios de neuronas hipocampales de ratón fueron co-transfectados con BiTetO-p35/EGFP y tTA en presencia o ausencia de 10  $\mu$ M péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> y mediante la técnica de TUNEL, e inmunofluorescencia contra caspasa 3 activada se determinó el tratamiento con el péptido A $\beta$  aumenta significativamente la apoptosis con respecto a células sin A $\beta$ .

- Por último, neuronas hipocampales co-transfectadas con BiTetO-p35/EGFP, tTA y CFP en presencia de tetraciclina y A $\beta$ <sub>1-42</sub> fueron menos sensibles al efecto neurotóxico del péptido A $\beta$ , en detrimento de aquellas células que no sobreexpresaron el transgen. En resumen, estos datos sugieren que cdk5 cumple un papel muy importante en los procesos gatillados por las fibras de amiloide en cultivo de neuronas hipocampales de ratón. Generando un gran interés en el contexto de la patogénesis de la EA. Además estos resultados confirmarían que, entre la vía amiloidogénica y el aumento en la actividad de cdk5/p35, existiría una correlación fisiológica.

## 9.- BIBLIOGRAFÍA

- Ackerley S., Thornhill P., Grierson A.J., Brownlee J., Anderton B.H., Leigh P.N., Shaw C.E. and Miller C.C. (2003) Neurofilament heavy chain side arm phosphorylation regulates axonal transport of neurofilaments. *J Cell Biol* **161**:489-95.
- Ahlijanian M., Barrezueta N., Williams R., Jakowski A., Kowsz K., McCarthy S., Coskran T., Carlo A., Seymour P., Burkhardt J., Nelson R. and McNeish J. (2000) Hyperphosphorylated tau and neurofilament and cytoskeletal disruption in mice overexpressing human p25, an activator of cdk5. *Proc Natl Acad Sci* **97**: 2910-2915.
- Alvarez A., Toro R., Caceres A. and Maccioni RB. (1999) Inhibition of tau phosphorylating protein kinase cdk5 prevents beta-amyloid-induced neuronal death. *FEBS Lett* **459**:421-6.
- Alvarez A., Munoz J.P. and Maccioni R.B. (2001) A Cdk5-p35 stable complex is involved in the beta-amyloid-induced deregulation of Cdk5 activity in hippocampal neurons. *Exp Cell Res* **264**:266-74.
- Angelo M., Plattner F., Irvine E.E. y Giese K.P. (2003) Improved reversal learning and altered fear conditioning in transgenic mice with regionally restricted p25 expression. *Eur J Neurosci*. **18**:423-31.
- Auerbach A.B. (2004) Production of functional transgenic mice by DNA pronuclear Microinjection. *Acta Bioquímica Polonica* **51**:9-31.
- Avila J., Lucas J.J., Perez M. and Hernandez F. (2004) Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev* **84**:361-384.
- Banker GA., Cowan WM. (1977) Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res* **126**: 397-42.
- Baumann K., Mandelkow E.M., Biernat J., Piwnica-Worms H. and Mandelkow E. (1993) Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5. *FEBS Lett*. **336**:417-24.
- Beyer K. (2002). Caracterización genética de la Enfermedad de Alzheimer: estudio poblacional. Tesis de Doctorado. 167pp. Barcelona. España.
- Bian F., Nath R., Sobocinski G., Booher R., Lipinski W., Callahan M., Pack A., Wang K. and Walker L. (2002) Axonopathy, Tau abnormalities, and Dyskinesia, but no Neurofibrillary Tangles in p25-Transgenic Mice. *J Comp Neurol* **446**: 257-266.

- Bibb J., Chen J., Taylor J., Svenningsson P., Nishi A., Snyder G., Yan Z., Sagawa Z., Ouimet C., Nair A., Nestler E. and Greengard P. (2001) Effects of chronic exposure to cocaine are regulated by the neuronal protein cdk5. *Nature* **410**: 376-380
- Boger H. and Gruss P (1999) Functional determinants for the tetracycline-dependent transactivator tTA in transgenic mouse embryos. *Mech Dev.* **83**: 141-53.
- Borghini R., Giliberto L., Assini A., Delacourte A., Perry G., Smith A., Strocchi P., Zaccheo D., and Tabaton M. (2002) Increase of cdk5 is related to neurofibrillary pathology in progressive supranuclear palsy. *Neurology.* **58**:589-92.
- Brown M., Jacobs T., Eickholt B., Ferrari G., Teo M., Monfries C., Qi R.Z., Leung T., Lim L. and Hall C. (2004) Alpha2-chimaerin, cyclin-dependent Kinase 5/p35, and its target collapsin response mediator protein-2 are essential components in semaphorin 3A-induced growth-cone collapse. *J Neurosci* **24**:8994-9004.
- Brinster R., Chen H., Trumbauer M., Yagle M. and Palmiter R. (1985) Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proc Natl Acad Sci* **82**: 4438-4442.
- Bu B., Li J., Davies P. and Vincent I. (2002) Deregulation of cdk5, hyperphosphorylation, and cytoskeletal pathology in the Niemann-Pick type C murine model. *J Neurosci.* **22**: 6515-25.
- Burgess-Beusse B., Farrell C., Gaszner M., Litt M., Mutskov V., Recillas-Targa F., Simpson M., West A. and Felsenfeld G. (2002) The insulation of genes from external enhancers and silencing chromatin. *Proc Natl Acad Sci USA.* **99**: 16433-16437.
- Cai X.H., Tomizawa K., Tang D., Lu Y.F., Moriwaki A., Tokuda M., Nagahata S., Hatase O. and Matsui H. (1997) Changes in the expression of novel Cdk5 activator messenger RNA (p39nck5ai mRNA) during rat brain development. *Neurosci Res.* **28**: 355-60.
- Chae T., Kwon Y., Bronson R., Dikkes P., Li E. and Tsai L. (1997) Mice lacking p35, a neural specific activator of Cdk5, display cortical lamination defects, seizure, and adult lethality. *Neuron* **18**: 29-42.
- Chen J., Zhang Y., Zelz M., Steffen C., Ang E., Zeng L. and Nestler E. (2000) Induction of Cyclin-dependent kinase 5 in the Hippocampus by chronic Electroconvulsive Seizures: Role of  $\Delta$ FosB. *J Neurosci* **20**: 8965-8971.
- Chevalier-Mariette C., Henry I., Montfort L., Capgras S., Forlani S., Muschler J. and Nicolas J.F. (2003) CpG content affects gene silencing in mice: evidence from novel transgenes. *Genome Biol.* **4**:R53.

- Cruz J., Tseng H., Goldman J., Shih H and Tsai L. (2003) Aberrant Cdk5 Activation by p25 triggers pathological events leading to neurodegeneration and neurofibrillary tangles. *Neuron* **40**: 471-483.
- Del Rio J.A., Gonzalez-Billault C., Urena J.M., Jimenez E.M., Barallobre M.J., Pascual M., Pujadas L., Simo S., La Torre A., Wandosell F., Avila J. and Soriano E. (2004) MAP1B is required for Netrin 1 signaling in neuronal migration and axonal guidance. *Curr Biol* **14**: 840-50.
- Dhavan R. and Tsai L.H. (2001) A decade of Cdk5. *Nature Review Molecular Cell Biology* **2**: 749-759.
- Dhavan R., Greer P.L., Morabito M.A., Orlando L.R. and Tsai L.H.(2002) The cyclin-dependent kinase 5 activators p35 and p39 interact with the alpha-subunit of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II and alpha-actinin-1 in a calcium-dependent manner. *J Neurosci* **22**: 7879-91.
- Eilers A., Whitfield J., Babij C., Rubin L.L. and Ham J. (1998) Role of the Jun kinase pathway in the regulation of c-Jun expression and apoptosis in sympathetic neurons. *J Neurosci*. **18**: 1713-24.
- Evans KC., Berger E., Cho C., Weisgraber K. and Lansbury P. (1995) Apolipoprotein E is a kinetic but not a thermodynamic inhibitor of amyloid formation: Implications for the pathogenesis and treatment of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci* **92**: 763-67.
- Fischer A., Sananbenesi F., Schrick C., Spiess J. and Radulovic J. (2002) Cyclin-dependent kinase 5 is required for associative learning. *J Neurosci* **22**: 3700-7.
- Fischer A., Sananbenesi F., Pang P.T., Lu B. and Tsai L.H. (2005) Opposing roles of transient and prolonged expression of p25 in synaptic plasticity and hippocampus-dependent memory. *Neuron* **48** :825-38.
- Fu A.K., Fu W.Y., Cheung J., Tsim K.W., Ip F.C., Wang J.H. and Ip N.Y. (2001) Cdk5 is involved in neuregulin-induced AChR expression at the neuromuscular junction. *Nat Neurosci* **4** :374-81.
- Fu A.K., Ip F.C., Fu W.Y., Cheung J., Wang J.H., Yung W.H. and Ip N.Y. (2005) Aberrant motor axon projection, acetylcholine receptor clustering, and neurotransmission in cyclin-dependent kinase 5 null mice. *Proc Natl Acad Sci* **102** :15224-9.
- Furth P., Onge L., Böger H., Gruss P., Gossen M., Kistner A., Bujard H. and Hennighausen. L. (1994) Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. *Proc Natl Acad Sci* **91**: 9302-9306.
- Ge W., He F., kim K., Bianchi B., Coskum V., Nguyen L., Wu X., Zhao J., Heng J., Martinowich K., Tao J., Wu H., Castro D., Sobeih M., Corfas G., Gleeson J., Greenberg

- M., Guillemot F. and Sun Y. (2006) Coupling of cell migration with neurogenesis by proneural bHLH factors. *Proc Natl Acad Sci* **103**: 1319-1324.
- Giese K.P., Ris L. and Plattner F. (2005) Is there a role of the cyclin-dependent kinase 5 activator p25 in Alzheimer's disease? *Neuroreport*. **16**: 1725-30.
- Gong X., Tang X., Wiedmann M., Wang X., Peng J., Zheng D., Blair L.A., Marshall J. and Mao Z. (2003) Cdk5-mediated inhibition of the protective effects of transcription factor MEF2 in neurotoxicity-induced apoptosis. *Neuron*. **38**: 33-46.
- Götz J., Chen F., Barmettler R. and Nitsch R. (2001a) Tau Filament Formation in Transgenic Mice Expressing P301L Tau. *J Biol Chem* **276**: 529-534.
- Götz J., Chen F., van Dorpe J. and Nitsch R. (2001b) Formation of Neurofibrillary Tangles in P301L Tau Transgenic Mice Induced by A $\beta$ 42 Fibrils. *Science* **293**: 1491-1495.
- Graeber M., Egensperger, Banati R., Müller U., Bisek K., Hoff P., Möller H., Fujisawa K. and Mehraein P. (1997) Rediscovery of the case described by Alois Alzheimer in 1911: historical, histological and molecular genetic analysis. *Neurogenetics*. **1**: 73-80.
- Goedert M., Sisodia S.S. and Price D.L. (1991) Neurofibrillary tangles and beta-amyloid deposits in Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol*. **1**: 441-7.
- Gupta A., Tsai L. and Wynshaw-Boris A. (2002) Life is a journey: a genetic look at neocortical development. *Nature Reviews* **3**: 342-357.
- Gupta A., Sanada K., Miyamoto D.T., Rovelstad S., Nadarajah B., Pearlman A.L., Brunstrom J. and Tsai L.H. (2003) Layering defect in p35 deficiency is linked to improper neuronal-glia interaction in radial migration. *Nature Neuroscience* **6**: 1284-91
- Hammes A. and Schell A. (2000) Generation of transgenic mice from plasmid, BACs and YACs. In Jackson I. and Abbott C.M. *Mouse genetics and Transgenics. A practical approach*. 217-245 pp. Oxford University Press. New York.
- Hallows J., Chen K., DePinho R. and Vincent I. (2003) Decreased cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) activity is accompanied by redistribution of cdk5 and cytoskeletal proteins and increased cytoskeletal protein phosphorylation in p35 null mice. *J Neurosci* **23**: 10633-10644.
- Harada T., Morooka T., Ogawa S. and Nishida E. (2001) ERK induces p35, a neuron-specific activator of Cdk5, through induction of Egr1. *Nature Cell Biol* **3**: 453-459.
- Hong M., Chen D., Klein P., and Lee V. (1997) Lithium reduces tau phosphorylation by inhibition of glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem* **272**: 25326-25332.

- Hsieh C.L. (1994) Dependence of transcriptional repression on CpG methylation density. *Mol Cell Biol.* **14**: 5487-94.
- Humbert S., Lanier L. and Tsai L.H. (2000a) Synaptic localization of p39, a neuronal activator of cdk5. *Neuroreport* **11**: 2213-2216.
- Humbert S., Dhavan R. and Tsai L.H. (2000b) p39 activates cdk5 in neurons, and is associated with the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* **113**: 975-983.
- Ishiguro K., Takamatsu M., Tomizawa K., Omori A., Takahashi M., Arioka M., Uchida T. and Imahori K. (1992) Tau protein kinase I converts normal tau protein into A68-like component of paired helical filaments. *J Biol Chem* **267**: 10897-901.
- Kass S.U., Landsberger N. and Wolffe A.P. (1997) DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation. *Curr Biol.* **7**: 157-65.
- Kesavapany S., Lau K.F., McLoughlin D.M., Brownlee J., Ackerley S., Leigh P.N., Shaw C.E. and Miller C.C. (2001) p35/cdk5 binds and phosphorylates beta-catenin and regulates beta-catenin/presenilin-1 interaction. *Eur J Neurosci* **13**: 241-7.
- Kerokoski P., Suuronen T., Salminen A., Soininen H. and Pirttila T. (2002) Cleavage of the cyclin-dependent kinase 5 activator p35 to p25 does not induce tau hyperphosphorylation. *Biochem. Biophys. Res Commun.* **298**: 693-698.
- Kholodilov N., Yarygina O., Oo T.F., Zhang H., Sulzer D., Dauer W. and Burke R.E. (2004) Regulation of the development of mesencephalic dopaminergic systems by the selective expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in their targets. *J Neurosci.* **24**: 3136-46.
- Kistner A., Gossen M., Zimmermann F., Jerecic J., Ullmer C., Lübbert H. and Bujard H. (1996) Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci* **93**: 10933-10938.
- Ko J., Humbert S., Bronson R., Takahashi S., Kulkarni A., Li E., and Tsai L.H. (2001) p35 and p39 Are Essential for Cyclin-Dependent Kinase 5 Function during Neurodevelopment. *J Neurosci* **21**: 6758-6771.
- Krestel H.E., Mayford M., Seeburg P.H., Sprengel R. (2001) A GFP-equipped bidirectional expression module well suited for monitoring tetracycline-regulated gene expression in mouse. *Nucleic Acids Res.* **29**: E39.
- Kwon Y.T., Gupta A., Zhou Y., Nikolic M. and Tsai L.H. (2000) Regulation of N-cadherin-mediated adhesion by the p35-Cdk5 kinase. *Curr Biol* **10**:363-72
- Lee M.S., Kwon Y.T., Li M., Peng J., Friedlander R.M. and Tsai L.H. (2000) Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature.* **405**: 360-4.

- Lewis J., Dickson D., Lin W., Chisholm L., Corral A., Jones G., Yen S., Sahara N., Skipper L., Yager D., Eckman C., Hardy J., Hutton M. and McGowan E. (2001) Enhanced Neurofibrillary Degeneration in Transgenic Mice Expressing Mutant Tau and APP. *Science* **293**: 1487-1491.
- Li B., Zhang L., Gu J., Amin N. and Pant H.C. (2000) Integrin  $\alpha 1\beta 1$ -Mediated Activation of Cyclin-Dependent Kinase 5 Activity Is Involved in Neurite Outgrowth and Human Neurofilament Protein H Lys-Ser-Pro Tail Domain Phosphorylation. *J Neurosci* **20**: 6055-6062.
- Li B.S., Zhang L., Takahashi S., Ma W., Jaffe H., Kulkarni A.B. and Pant H.C. (2002) Cyclin-dependent kinase 5 prevents neuronal apoptosis by negative regulation of c-Jun N-terminal kinase 3. *EMBO J.* **21**: 324-33.
- Lin S.Y., Raval S., Zhang Z., Deverill M., Siminovitch K.A., Branch D.R. and Haimovich B. (2004) The protein-tyrosine phosphatase SHP-1 regulates the phosphorylation of alpha-actinin. *J Biol Chem.* **279**: 25755-64.
- Lucas J. Hernández F., Gómez-Ramos P., Morán M., Hen R. and Avila J. (2001) Decreased nuclear  $\beta$ -catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3 $\beta$  conditional transgenic mice. *EMBO J* **20**: 27-39.
- Maccioni R.B. and Cambiasso V. (1995) Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly. *Physiol Rev* **75**: 835-864.
- Maccioni R., Muñoz J. and Barbeito L. (2001a) The Molecular Bases of Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative disorders. *Arch Med Res* **32**: 367-381.
- Maccioni R., Otth C., Concha I. and Muñoz J. (2001b) The protein kinase Cdk5. Structural aspects, roles in neurogenesis and involvement in Alzheimer's pathology. *Eur J Biochem* **268**: 1518-1527.
- Maloney M.T., Minamide L.S., Kinley A.W., Boyle J.A. and Bamberg J.R. (2005) Beta-secretase-cleaved amyloid precursor protein accumulates at actin inclusions induced in neurons by stress or amyloid beta: a feedforward mechanism for Alzheimer's disease. *J Neurosci.* **25**:11313-21.
- Matsubara M., Kusubata M., Ishiguro K., Uchida T., Titani K. and Taniguchi H. (1996) Site-specific phosphorylation of synapsin I by mitogen-activated protein kinase and Cdk5 and its effects on physiological functions. *J Biol Chem.* **271**: 21108-13.
- Mayford M., Bach M.E., Huang Y., Wang L., Hawkins R. and Kandel E.R. (1996) Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science* **274**: 1678-83.

- McEvelly R., Ortiz de Diaz M., Schonemann M., Hooshmand F. and Rosenfeld M. (2002) Transcriptional Regulation of Cortical Neuron Migration by POU Domain Factors. *Science* **295**: 1528-1532.
- Mendoza-Naranjo Ariadna (2005) Participación de las RHO GTPasas Rac1 y Cdc42 en cambios citoesqueléticos inducidos por el péptido beta amiloide en neuronas. Tesis de Doctorado. Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. 142 pp.
- Morabito M.A., Sheng M. and Tsai L.H. (2004) Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates the N-terminal domain of the postsynaptic density protein PSD-95 in neurons. *J Neurosci.* **24**: 865-76.
- Morfini G., Szebenyi G., Brown H., Pant H.C., Pigino G., DeBoer S., Beffert U. and Brady S.T. (2004) A novel CDK5-dependent pathway for regulating GSK3 activity and kinesin-driven motility in neurons. *EMBO J* **23**: 2235-45.
- Munoz J.P., Alvarez A. and Maccioni RB. (2000) Increase in the expression of the neuronal cyclin-dependent protein kinase cdk-5 during differentiation of N2A neuroblastoma cells. *Neuroreport.* **11**: 2733-8.
- Nikolic M., Chou M., Lu W., Mayer B. and Tsai LH. (1998) The p35/Cdk5 kinase is a neuron-specific Rac effector that inhibits Pak1 activity. *Nature* **395**:194-198.
- Nguyen C. and Bibb J.A. (2003) Cdk5 and the mystery of synaptic vesicle endocytosis. *J Cell Biol.* **163**: 697-9.
- Noble W., Olm V., Takata K., Casey E., Mary O., Meyerson J., Gaynor K., LaFrancois J., Wang L., Kondo T., Davies P., Burns M., Veraanna, Nixon R., Dickson D., Matsuoka Y., Ahlijanian M., Lau L. and Duff K. (2003) Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo. *Neuron* **38**: 555-565.
- Ohshima T., Ward J., Huh C., Longenecker G., Veeranna, Pant H., Brady R., Martin L. and Kulkarni A. (1996) Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death. *Proc Natl Acad Sci* **93**: 11173-11178.
- Oth C., Concha II., Arendt T., Stieler J., Schliebs R., Gonzalez-Billault C. and Maccioni RB. (2002) AbetaPP induces cdk5-dependent tau hyperphosphorylation in transgenic mice Tg2576. *J Alzheimers Dis.* **4**: 417-30.
- Paglino G., Pigino G., Kunda P., Morfina G., Maccioni R., Quiroga S., Ferreira A. and Caceres A. (1998) Evidence for the Participation of the Neuron-Specific CDK5 Activator P35 during Laminin-Enhanced Axonal Growth. *J Neurosci* **18**: 9858-9869.

Pareek T., Keller J., Kesavapany S., Pant H., Iadarola M., Brady R. and Kulkarni AB. (2006a) Cyclin-dependent kinase 5 activity regulates pain signaling. *Proc Natl Acad Sci* **103**: 791-796.

Pareek T.K. and Kulkarni A.B. (2006b) Cdk5: A New Player in Pain Signaling. *Cell Cycle*. **5**: 585-8.

Patrick G., Zhou P., Kwon Y., Howley P. and Tsai L. (1998) p35, the Neuronal-specific Activator of Cyclin-dependent Kinase 5 (Cdk5) Is Degraded by the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *J Biol Cell* **273**: 24057-24064.

Patrick G., Zukerberg L., Nicolic M., Monte S., Dikkes P. and Tsai L. (1999) Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* **402**: 615-622.

Pedram M., Sprung C.N., Gao Q., Lo A.W., Reynolds G.E. and Murnane J.P. (2006) Telomere position effect and silencing of transgenes near telomeres in the mouse. *Mol Cell Biol*. **26**: 1865-78.

Price D., and Sisodia S. (1998). Mutante genes in familial Alzheimer's disease and transgenic models. *Annu Rev Neurosci* **21**: 479-505.

Quintanilla R.A., Orellana D.I., Gonzalez-Billault C., Maccioni R.B. (2004) Interleukin-6 induces Alzheimer-type phosphorylation of tau protein by deregulating the cdk5/p35 pathway. *Exp Cell Res*. **295**: 245-57.

Rashid T, Banerjee M, Nikolic M (2001) Phosphorylation of Pak1 by the p35/Cdk5 kinase affects neuronal morphology. *J Biol Chem* **276**: 49043-52.

Ryding A.D., Sharp M.G., Mullins J.J. (2001) Conditional transgenic technologies. *J Endocrinol*. **171**: 1-14.

Robertson A., Perea J., Tolmachova T., Thomas P.K. and Huxley C. (2002) Effects of mouse strain, position of integration and tetracycline analogue on the tetracycline conditional system in transgenic mice. *Gene*. **282**: 65-74.

Ryding A., Sharp M. and Mullins J. (2001) Conditional transgenic technologies. *Journal of Endocrinology* **171**:1-14.

Sambrook J. and Russell D. (2001) *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Samuel B.A. and Tsai L.H. (2004) Nucleokinesis illuminated. *Nature Neuroscience* **7**: 1169-1170.

- Schultze N., Burki Y., Lang Y., Certa U. and Bluethmann H. (1996) Efficient control of gene expression by single step integration of the tetracycline system in transgenic mice. *Nat Biotechnol.* **14**: 499-503.
- Selkoe D. (2000) Toward a Comprehensive Theory for Alzheimer's Disease. Hypothesis: Alzheimer's Disease Is Caused by the Cerebral Accumulation and Cytotoxicity of Amyloid  $\beta$ -Protein. *Ann N Y Acad Sci.* **924**: 17-25
- Sengupta A., Wu Q., Grundke-Iqbal I., Iqbal K. and Singh T.J. (1997) Potentiation of GSK-3-catalyzed Alzheimer-like phosphorylation of human tau by cdk5. *Mol Cell Biochem.* **167**: 99-105.
- Schneider A., Biernat J., Von Bergen M., Mandelkow E. and Mandelkow E.M. (1999) Phosphorylation that Detaches Tau Protein from Microtubules (Ser262, Ser214) Also Protects It against Aggregation into Alzheimer Paired Helical Filaments. *Biochemistry* **38**: 3549-3558.
- Sharma P., Sharma M., Amin N.D., Albers R.W. and Pant H.C. (1999) Regulation of cyclin-dependent kinase 5 catalytic activity by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**: 11156-60.
- Shuang R., Zhang L., Fletcher A., Groblewski G.E., Pevsner J. and Stuenkel E.L. (1998) Regulation of Munc-18/syntaxin 1A interaction by cyclin-dependent kinase 5 in nerve endings. *J Biol Chem.* **273**: 4957-66.
- Sjoberg M.K., Shestakova E., Mansuroglu Z., Maccioni R.B. and Bonnefoy E. (2006) Tau protein binds to pericentromeric DNA: a putative role for nuclear tau in nucleolar organization. *J Cell Sci.* **119**: 2025-34.
- Smith K. (2001) Theoretical mechanisms in targeted and random integration of transgene DNA. *Reprod. Nutr. Dev.* **41**: 465-485.
- Smith P.D., Crocker S.J., Jackson-Lewis V., Jordan-Sciutto K.L., Hayley S., Mount M.P., O'Hare M.J., Callaghan S., Slack R.S., Przedborski S., Anisman H. and Park D.S. (2003) Cyclin-dependent kinase 5 is a mediator of dopaminergic neuron loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**: 13650-5.
- Sonoda E., Takata M., Yamashita Y.M., Morrison C. and Takeda S. (2001) Homologous DNA recombination in vertebrate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**: 8388-94.
- Sun D., Leung C. and Liem R. (1996) Phosphorylation of the High Molecular Weight Neurofilament Protein (NF-H) by Cdk5 and p35. *J. Biol. Chem.* **271**: 14245-14251.
- Takahashi S. and Kulkarni A.B. (2004) Mutant superoxide dismutase 1 causes motor neuron degeneration independent of cyclin-dependent kinase 5 activation by p35 or p25. *J Neurochem.* **88**: 1295-304.

- Takahashi S., Ohshima T., Cho A., Sreenath T., Iadarola M., Pant H., Kim Y., Nairn A., Brady R., Grengard P. and Kulkarny A. (2005) Increased activity of cyclin-dependent kinase 5 leads to attenuation of cocaine-mediated dopamine signaling. *Proc Natl Acad Sci* **102**: 1737-1742.
- Takashima A., Murayama M., Yasutake K., Takahashi H., Yokohama M. and Ishiguro K. (2001) Involvement of cyclin dependent kinase 5 activator p25 on tau phosphorylation of mouse brain. *Neuroscience Letters* **306**: 37-40.
- Tan T.C., Valova V.A., Malladi C.S., Graham M.E., Berven L.A., Jupp O.J., Hansra G., McClure S.J., Sarcevic B., Boadle R.A., Larsen M.R., Cousin M.A. and Robinson P.J. (2003) Cdk5 is essential for synaptic vesicle endocytosis. *Nat Cell Biol.* **5**: 701-10.
- Tanaka T., Veeranna, Ohshima T., Rajan P., Amin N., Cho A., Sreenath T., Pant H., Brady R. and Kulkarni A. (2001) Neuronal cyclin-dependent kinase 5 activity is critical for survival. *J Neurosci* **21**: 550-558.
- Tanaka T., Serneo F., Tseng H., Kulkarni AB., Tsai L. and Glesson J. (2004) Cdk5 phosphorylation of doublecortin Ser297 regulates its effect on neuronal migration. *Neuron* **41**: 215-227.
- Tandon A., Yu H., Wang H., Rogaeva E., Sato C., Chishti MA., Kawarai T., Hasegawa H., Chen F., Davies P., Fraser P., Westaway D. and George-Hyslop P. (2003) Brain levels of CDK5 activator p25 are not increased in Alzheimer's or other neurodegenerative diseases with neurofibrillary tangles. *J Neurochem* **86**: 572-81.
- Tanemura K., Akagi T., Murayama M., Kikuchi N., Murayama O., Hashikawa T., Yoshiike Y., Park J., Matsuda K., Nakao S., Sun X., Sato S., Yamaguchi H. and Takashima A. (2001) Formation of filamentous tau aggregation in transgenic mice expressing V337M human tau. *Neurobiology of Disease* **8**: 1036-1045.
- Taniguchi S., Fujita Y., Hayashi S., Kakita A., Takahashi H., Murayama S., Saido T.C., Hisanaga S., Iwatsubo T. and Hasegawa M. (2001) Calpain-mediated degradation of p35 to p25 in postmortem human and rat brains. *FEBS Lett.* **489**: 46-50.
- Tarricone C., Dhavan R., Peng J., Areces L., Tsai L. and Musacchio A. (2001) Structure and Regulation of the Cdk5-p25<sup>nck5a</sup> Complex. *Molecular Cell* **8**: 657-669.
- Terry R.D. and Katzman R. (1983) Senile dementia of the Alzheimer type. *Ann Neurol.* **14**: 497-506.
- Tseng H.C., Zhou Y., Shen Y. and Tsai L.H. (2002) A survey of Cdk5 activator p35 and p25 levels in Alzheimer's disease brains. *FEBS Lett.* **523**: 58-62.
- Tomizawa K., Sunada S., Lu Y.F., Oda Y., Kinuta M., Ohshima T., Saito T., Wei F.Y., Matsushita M., Li S.T., Tsutsui K., Hisanaga S., Mikoshiba K., Takei K. and Matsui H.

- (2003) Cophosphorylation of amphiphysin I and dynamin I by Cdk5 regulates clathrin-mediated endocytosis of synaptic vesicles. *J Cell Biol.* **163**: 813-24.
- Tsai LH., Takahashi T., Caviness Jr, VS. and Harlow E. (1993) Activity and expression pattern of cyclin-dependent kinase 5 in the embryonic mouse nervous system. *Development* **119**: 1029-1040.
- Van den Haute C., Spittaels K., Van Dorpe J., Lasrado R., Vandezande K., Laenen I., Geerts H. and Van Leuven F. (2001) Coexpression of human cdk5 and its activator p35 with human protein tau in neurons in brain of triple transgenic mice. *Neurobiol Dis.* **8**: 32-44.
- Uchida Y., Ohshima T., Sasaki Y., Suzuki H., Yanai S., Yamashita N., Nakamura F., Takei K., Ihara Y., Mikoshiba K., Kolattukudy P., Honnorat J. and Goshima Y. (2005) Semaphorin3A signalling is mediated via sequential Cdk5 and GSK3beta phosphorylation of CRMP2: implication of common phosphorylating mechanism underlying axon guidance and Alzheimer's disease. *Genes Cells* **10**: 165-79.
- Veeranna, Shetty K.T., Link W.T., Jaffe H., Wang J. and Pant HC. (1995) Neuronal cyclin-dependent kinase-5 phosphorylation sites in neurofilament protein (NF-H) are dephosphorylated by protein phosphatase 2A. *J Neurochem.* **64**: 2681-90.
- Wang J., Liu S., Fu Y., Wang J.H. and Lu Y. (2003) Cdk5 activation induces hippocampal CA1 cell death by directly phosphorylating NMDA receptors. *Nat Neurosci.* **6**: 1039-47.
- Weishaupt J.H., Neusch C., Bahr M. (2003) Cyclin-dependent kinase 5 (CDK5) and neuronal cell death. *Cell Tissue Res.* **312**: 1-8.
- Wu D., Yu Y., Lee N., Yu A., Wang J. and Han Y. (2000) The Expression of Cdk5, p35, p39, and Cdk5 Kinase Activity in Developing, Adult, and Aged Rat Brains. *Neurochemical Research* **25**: 923-929.
- Xie Z., Sanada K., Samuels B., Shih H. And Tsai LH. (2003) Serine 732 phosphorylation of KAK by cdk5 is important for microtubule organization nuclear movement, and neuronal migration. *Cell* **114**: 469-482.
- Yamaguchi H., Ishiguro K., Uchida T., Takashima A., Lemere C.A. and Imahori K. (1996) Preferential labeling of Alzheimer neurofibrillary tangles with antisera for tau protein kinase (TPK) I/glycogen synthase kinase-3 beta and cyclin-dependent kinase 5, a component of TPK II. *Acta Neuropathol (Berl)*. **92**: 232-41.
- Yamamoto A., Lucas J.J. and Hen R. (2001a) Reversal of Neuropathology and Motor Dysfunction in a Conditional Model of Huntington's Disease. *Cell* **101**: 57-66.
- Yamamoto A., Hen R., and Dauer W (2001b) The Ons and Offs of Inducible Transgenic Technology: A Review. *Neurobiology of Disease* **8**:923-932.

Yankner B. (1996) Mechanisms of Neuronal Degeneration in Alzheimer's Disease. *Neuron* **16**: 921-932.

Yoo B.C. and Lubec G. (2001) p25 protein in neurodegeneration. *Nature* **411**: 763-4.

Yusufzai T.M. and Felsenfeld G. (2004) The 5'-HS4 chicken beta-globin insulator is a CTCF-dependent nuclear matrix-associated element. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**: 8620-4.

Zhang J., Krishnamurthy P.K. and Johnson G.V. (2002) Cdk5 phosphorylates p53 and regulates its activity. *J Neurochem* **81**: 307-13.

Zheng M., Leung CL. and Liem RK. (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**: 141-159.

Zheng Y.L., Kesavapany S., Gravell M., Hamilton R.S., Schubert M., Amin N., Albers W., Grant P. and Pant H.C. (2005) A Cdk5 inhibitory peptide reduces tau hyperphosphorylation and apoptosis in neurons. *EMBO J.* **24**: 209-20

Zu T., Duvick L.A., Kaytor M.D., Berlinger M.S., Zoghbi H.Y., Clark H.B. and Orr H.T. (2004) Recovery from polyglutamine-induced neurodegeneration in conditional SCA1 transgenic mice. *J Neurosci.* **24**: 8853-61.