

A Miquel

A mis padres

*Gracias por el apoyo y cariño de estos
años sin vuestra ayuda nunca
hubiera llegado hasta aquí.*



Universitat de Lleida

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques

**ESTUDIO DE LA REGULACIÓN POR CALCIO Y
CALMODULINA DE LAS VÍAS IMPLICADAS EN LA
SUPERVIVENCIA DE LAS MOTONEURONAS EN
CULTIVO**

María José Pérez García

Lleida, Mayo 2006

ESTUDIO DE LA REGULACIÓN POR CALCIO Y CALMODULINA DE LAS VÍAS IMPLICADAS EN LA SUPERVIVENCIA DE LAS MNs EN CULTIVO.

Memoria presentada por María José Pérez García para optar al grado de Doctor en Bioquímica por la Universitat de Lleida. El presente trabajo se ha realizado en el Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques de la Facultat de Medicina, Universidad de Lleida, bajo la co-dirección de Rosa M. Soler Tatché y Joan X. Comella Carnicé.

*Discovery consist in seeing what everyone else has seen and
thinking what no one else has thought.*
Albert Szent-Gyorgi (1893-1986)

ÍNDICE

I.ÍNDICE

I. RESUMEN	VII
II. ABREVIATURAS	XV
1.INTRODUCCIÓN	1
1.1 La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA)	1
1.1.1. ELA Familiar (ELA _F)	1
1.1.2 ELA Esporádica (ELA _E)	6
1.2 La Motoneurona	7
1.3 Muerte Celular Programada	12
1.3.1 La PCD en poblaciones de MNs durante el desarrollo	15
1.3.2 La muerte apoptótica neuronal	16
1.3.3 La Teoría Neurotrófica	22
1.4 Las Motoneuronas y Factores Neurotróficos	23
1.4.1 FAMILIA DE LIGANDOS DEL GDNF (GFLs)	26
1.4.1.1 Los receptores de la familia de ligandos del GDNF	29
1.4.1.2 Señalización mediada por Ret	32
1.4.1.2.1. Señalización mediada por Ret : cis y trans	34
1.4.1.2.2 Señalización por GDNF/GFR α dependiente de Ret	35
1.4.1.2.3 Señalización por GDNF/GFR α independiente de Ret	38
1.4.1.3. Knock out para los ligandos y los receptores de los GFLs.....	39
1.4.2 LA FAMILIA DE LAS NEUROTROFINAS	41
1.4.2.1 Los receptores de la familia de las neurotrofinas: Trk y p75NTR.....	43
1.4.2.2 Señalización por neurotrofinas mediada por Trk	45
1.4.2.3 Señalización por neurotrofinas mediada por p75.....	48
1.4.2.4 KO para las neurotrofinas y sus receptores	49
1.4.3 OTRAS FAMILIAS DE FACTORES NEUROTRÓFICOS ..	50
1.4.3.1 La familia de las citoquinas	50

1.4.3.1.1. Receptores para las citoquinas:	
<i>LIFRβ</i> y <i>gp130</i>	51
1.4.3.2. Los ratones KO para citoquinas	53
1.5. Vías De Señalización Implicadas En Supervivencia y	
Diferenciación	54
1.5.1 Vía de la PI3K/PKB	54
1.5.1.1 <i>La vía de la PI3K/Akt: Supervivencia celular</i>	57
1.5.2 Vía de la PLC γ	59
1.5.3 . Vía de la RAS/MAPK: Diferenciación celular	59
1.6 Actividad Eléctrica y Supervivencia Neuronal	60
1.7 Señalización Mediada Por CaMKs y Calmodulina	62
2. OBJETIVOS	75
3. MATERIALES Y MÉTODOS	77
3.1 Reactivos y Enzimas Utilizados	77
3.2 Vectores	77
3.2.1 Vectores Lentivirales	78
3.2.2 Vectores de expresión para células eucariotas.....	79
3.2.3 Construcción del vector pcDNA3-FLAG-gCaMKIV	80
3.2.4 Construcción del vector pcDNA3-FLAG-gCaMKIV _{CA} ...	82
3.3 RT-PCR.....	82
3.4 Cultivos Celulares	83
3.4.1. Cultivo primario de motoneuronas	83
3.4.2 .. Líneas celulares	87
3.4.3 Línea PC12	87
3.4.4 Línea celular HEK293T (Human Embryonic Kidney).....	87
3.5 Métodos De Transfección	88
3.5.1 Lípidos catiónicos.....	88
3.5.2 Método de Electroporación	89
3.5.3 Fosfato Cálculo	90
3.5.4 Infección con Lentivirus	91
3.6 Técnicas Bioquímicas.....	91
3.6.1 Tratamiento de las células y tipos de lisados celulares.....	91

3.6.2 Western Blot.....	93
3.6.3 Ensayo de actividad quinasa in vitro	97
3.6.3.1 Actividad PI-3K	97
3.6.3.2. Actividad PKB	99
3.6.3.3 Actividad CaMKIV	100
3.6.4 Experimentos de pull-down	101
3.6.4.1. Análisis de la interacción entre la CaM y la PI-3K (p85)	101
3.6.4.2. Análisis de interacción entre la CaMKIV y la PI-3K (p85)	101
3.7 Estudio de la Viabilidad Celular	102
3.7.1 Valoración de la supervivencia	102
3.7.2 Valoración de la muerte celular	103
3.7.2.1 Tinción con bis-benzimida de Hoescht 33258	103
3.7.2.2 Inmunocitoquímica con caspasa-3 activa	103
3.7.2.3 Recuento de células apoptóticas (Blebbing)	104
3.8 Hibridación <i>In Situ</i>	104
3.8.1 Preparación de la sonda	105
3.8.1 Hibridación in situ whole mount.....	105
3.8.2 Hibridación in situ (slices).....	107
3.9 Otras Técnicas	108
3.9.1 Método de Fluo-4	108
4. RESULTADOS.....	115
4.1 <i>Glial Cell Line Derived Neurotrophic Factor Increases Intracellular Calcium Concentration</i>.....	115
4.1.1 GDNF Increases Intracelular calcium concentration	115
4.1.2 Ca ²⁺ and CaM are involved in GDNF induced PKB activation	118
4.1.3 CaM antagonist W13 prevented GDNF induced MNs survival	122
4.1.4 PKB _{CA} prevent the cell death induced by CaM antagonist.....	125
4.1.5 Ca ²⁺ and CaM are involved in GDNF-induced PI-3K activation	126

4.1.6 CaM associates with the 85 kDa regulatory subunit of PI-3K.....	128
4.2 CaMKIV regulates chicken motoneurons survival thought the activation of protein kinase B.....	133
4.2.1 Constitutively active form of CaMKIV prevent cell death induced by trophic factor deprivation	133
4.2.2 Molecular cloning of gCaMKIV	135
4.2.3 Cloned CaMKIV is expressed in purified culture spinal cord MNs.....	138
4.2.4 Chicken CaMKIV activation is Ca ²⁺ and CaM dependent and its constitutively active forms induces MNs survival.	139
4.2.5 Endogenous CaMKIV mediates MNs survival.....	143
4.2.6 gCaMKIV _{CA} induce PKB phosphorylation	145
4.2.7 gCaMKIV associates with 85 kDa regulatory subunit of PI-3K.....	147
5. DISCUSION	151
5.1 Regulación de la vía PI-3K/PKB mediada por Ca²⁺ and CaM y su implicación en la supervivencia de las MNs en cultivo	154
5.1.1 Diferentes factores neurotróficos promueven incrementos intracelulares de calcio a partir de los reservorios	154
5.1.2 Efecto biológico de la CaM en cultivo de MNs	158
5.2 Clonaje de la gCaMKIV. Implicación en cultivo de MNs	161
5.2.1 Clonaje y caracterización de la CaMKIV	161
5.2.2 La gCaMKIV tiene actividad dependiente de calcio y la forma activa induce la supervivencia de las MNs	165
5.2.3 La gCaMKIV _{CA} se asocia a la subunidad reguladora de la PI-3K e induce la fosforilación de la PKB	168
5.2.4 El fenotipo de los ratones nulos para CaMKIV	172
6. CONCLUSIONES	177

7. PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS	181
8. PUBLICACIONES	187
9. BIBLIOGRAFÍA	193

RESUMEN

I. RESUMEN

Las neuronas tanto *in vivo* como *in vitro* requieren factores neurotróficos para su supervivencia y diferenciación. En concreto, las motoneuronas (MNs) responden a diferentes factores neurotróficos, entre los que se encuentran la familia de ligandos del GDNF y la familia de las neurotrofinas. Estas células no sólo sobreviven en presencia de estos factores, sino que la propia actividad neuronal y por consiguiente la despolarización de membrana también promueve su supervivencia, incrementando los niveles de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) y activando diferentes vías de señalización.

En este trabajo se estudia el papel del calcio y la calmodulina (CaM) en la regulación de la vía de supervivencia PI3K/PKB, en un modelo de MNs de embrión de pollo tratadas con GDNF. Los resultados obtenidos demuestran que GDNF promueve incrementos moderados en la $[Ca^{2+}]_i$ que pueden resultar en la activación de la CaM. El tratamiento con antagonistas de la CaM inhibe la activación de la PI3K y PKB *in vitro*, bloqueando la supervivencia inducida por GDNF. El mecanismo por el cual la CaM ejerce este efecto está poco caracterizado. Tanto la PI-3K como la PKB, proteína que actúa por debajo en la vía de señalización de la PI-3K, son importantes mediando la supervivencia por factores neurotróficos. De hecho, se ha demostrado que GDNF promueve la supervivencia neuronal a través de la activación de esta vía. Experimentos de inmunoprecipitación demuestran una interacción *in vitro* entre la subunidad reguladora de la PI-3K y CaM. Esta interacción es independiente de factor neurotrófico, pero se bloquea con el tratamiento con quelantes de calcio como EGTA. De estos resultados se concluye que los cambios producidos en $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por GDNF, promueven la supervivencia neuronal a través de un mecanismo que implica una regulación directa de la PI-3K por la CaM.

Como segundo objetivo de este estudio, analizamos el papel de la quinasa regulada por calcio/CaM la CaMKIV en la supervivencia neuronal. Tras el clonaje y la caracterización de la CaMKIV de pollo (gCaMKIV), demostramos que la forma constitutivamente activa de la gCaMKIV es capaz de fosforilar a PKB, lo que se traduce en la supervivencia de las MNs en ausencia de factores neurotróficos. Por contra, el bloqueo de la expresión endógena de la gCaMKIV,

Resumen

utilizando RNAs de interferencia, reduce el porcentaje de supervivencia mediado por GDNF y por la despolarización de membrana. Experimentos de inmunoprecipitación han demostrado una interacción *in vitro* entre la subunidad p85 de la PI-3K y la CaMKIV.

En conclusión, se describe por primera vez, como GDNF induce incrementos en $[Ca^{2+}]_i$, activando CaM, que se encuentra unida a la PI-3K. Además, CaMKIV se puede unir a CaM y juntas regular la vía PI-3K/PKB promoviendo la supervivencia. Estos resultados aportan parte de las claves moleculares que regulan la supervivencia de estas neuronas, pudiendo así aplicar estos conocimientos para la comprensión y las posibles estrategias terapéuticas relacionadas con las enfermedades donde hay una degeneración de las MNs.

II. SUMMARY

Neurons require neurotrophic factors for their survival and differentiation both *in vivo* and *in vitro*. In particular, motoneurons respond to a series of neurotrophic factors such as the family of the neurotrophins and the Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) Family Ligands (GFLs). Moderate increases of intracellular calcium concentration induced by either the activation of tropomyosin receptor kinase (Trk) receptor for neurotrophins or by neuronal activity, regulate neuronal survival.

In the present report we wanted to establish the role of calcium and calmodulin in the activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K) pathway by GDNF. Our results demonstrate that GDNF treatment promotes moderate increases of intracellular calcium concentration by mobilizing this cation from internal stores, resulting in the activation of calmodulin.

The effects of $[Ca^{2+}]_i$ increase after membrane depolarization are mainly mediated by calmodulin (CaM). We show that CaM antagonists inhibit PI 3-kinase and PKB activation as well as motoneuron survival induced by GDNF. It has been reported that (PI 3-K) and its downstream target protein kinase B (PKB) play a central role in cell survival induced by neurotrophic factors; in fact, GDNF promotes neuronal survival through the activation of the PI 3-kinase/PKB pathway. We also demonstrate that endogenous calcium/CaM associates with the 85-kDa regulatory subunit of PI 3-kinase (p85). This interaction is neurotrophic factor-independent, but it can be abolished with calcium chelators like EGTA.

The second part of this work is focused on the analysis of proteins activated by calcium. We wanted to analyze the role of calcium and calmodulin-related kinase, CaMKIV in cultured motoneurons. This work allowed us to clone and characterize the *Gallus gallus* CaMKIV (gCaMKIV). We further demonstrate that the active form of gCaMKIV is able to phosphorylate PKB in the absence of neurotrophic factors and this activation can be blocked by PI3-kinase inhibitors. In addition, the active form of gCaMKIV promotes motoneuron survival in the absence of neurotrophic factors. Moreover, reduction of endogenous levels of CaMKIV by RNA interference results in a decrease of motoneuron survival

induced by GDNF. A physical interaction between CaMKIV and the PI3-kinase regulatory subunit has been demonstrated by pull-down experiments.

In conclusion, this study demonstrates that GDNF is able to promote increases in intracellular calcium concentration that leads to the activation of calmodulin thus regulating PI3-kinase pathway through interaction with p85 subunit. Moreover, CaMKIV is able to interact with calmodulin proposing a suitable model of cooperative effects in the regulation of motoneuron survival pathways.

Therefore, these results will contribute to the understanding of the molecular basis for the regulation of MNs survival, thus contributing to the knowledge for prevention of MNs associated neuropathologies.

ABREVIATURAS

III. ABREVIATURAS

[Ca ²⁺] _i	Concentración intracelular de calcio	ELA _E	Esclerosis Lateral Amiotrófica Esporádica.
AID	<i>Autoinhibitory Domain</i>	ELA _F	<i>Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis</i>
AIF	<i>Apoptosis Inducing Factor</i>	ERK1/2	<i>Extracellular Regulated Kinase</i>
ARTN	Artemina	FADD	<i>Fas Associated Death Domain</i>
BDNF	<i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i>	FAP	<i>Fas Associated Phosphatase</i>
BH	<i>Bcl-2 domain</i>	FasL	<i>Fas Ligand</i>
BMP	<i>Bone Marrow Protein</i>	FasR	<i>Fas Receptor</i>
CaM	Calmodulina	FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
CaMK	<i>Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase</i>	FKHRL1	<i>Forkhead Factor</i>
CARD	<i>Caspase Recruitment Domain</i>	FLIP	<i>FLICE Inhibitory protein</i>
CBD	<i>Calmodulin Binding Site</i>	FRS-2	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor Substrate-2</i>
GDNF	<i>Glial derived neurotrophic factor</i>	GDP	<i>Guanine di-phosphate</i>
CHK	<i>Csk Homologous Kinase</i>	GDF	<i>Growth/Diferentiation Factor</i>
Cit c	Citocromo c	GFLs	<i>GDNF Family Ligands</i>
CLC	<i>Cardiotrophin-1-Like-Citokine</i>	GFR	<i>Glial Family Receptor</i>
CLF	<i>Citokine Like Factor</i>	GGF	<i>Glial Growth Factor</i>
CNTF	<i>Ciliary Neurotrophic Factor</i>	GPA	<i>Growth Promoting Activation</i>
CRD	<i>Cysteine Rich Domain</i>	GPI	<i>Glicosilphosphatidilinositol</i>
COX2	Ciclooxigenasa 2	GTP	<i>Guanine triphosphate</i>
CT-1	<i>Cardiotrophin-1</i>	HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
DAG	Diacilglicerol	IAP	<i>Inhibitor of Apoptosis Protein</i>
DD	<i>Death Domain</i>	IGF-1	<i>Insulin Like Growth Factor</i>
DED	<i>Death Efector Domain</i>	IL	Interleuquina
DISC	<i>Death Inducing signalling Complexes</i>	Ins3PR	<i>Inositol-1-4-5-triphosphate</i>
DR	<i>Death Receptor</i>	IP3	<i>Inositol tri-phosphate</i>
DRG	<i>Dorsal Root Ganglia</i>	JAK	<i>Janus kinase</i>
DSL	<i>Dorsaline</i>	JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
EDAR	<i>Ectodyplasin A receptor</i>	K ⁺	Potasio
ELA	Eclerosis Lateral Amiotrófica	KO	<i>Knock out</i>
		NT-3	<i>Neurotrophin 3</i>
		LIF	<i>Leukemia Inhibitor Factor</i>

Abreviaturas

LIFR	<i>Leukemia Inhibitor Factor Receptor</i>	SHH	<i>Sonic Hedgehog</i>
LMC	<i>Lateral Medial Column</i>	SN	Sistema Nervioso
LRD	<i>Leucine Rich Domain</i>	SNC	Sistema Nervioso Central
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>	SNE	Sistema Nervioso Enterico
MEF	<i>Mouse Embryonic Fibroblast</i>	SNT	<i>Suc-associated neurotrophic factor induced tyrosine phosphorylated target</i>
MLCK	<i>Myosin Light Chain Kinase</i>	SOCS	<i>Supressor of Citokines Signalling</i>
MMC	<i>Motor Medial Column</i>	SOD	<i>Cu/Zn Superoxide Dismutase</i>
MNs	Motoneuronas	STAT	<i>Signal Transducer Activator Factor</i>
MOMP	<i>Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization</i>	SUMO	<i>Small Ubiquitin-like Modifier</i>
mTOR	<i>Mammalian target of Rampamycin</i>	TM	Transmembrana
NADE	<i>Neurotrophic Associated Cell Death Executor</i>	TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
ND	No determinado	TNFR	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor</i>
NF	Neurofilamento	TRAF	<i>TNRF-associated Factors</i>
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>	TRAIL	<i>TNF Related Apoptosis Inducing Ligand</i>
NGFR	<i>Nerve Growth Factor Receptor</i>	tBID	<i>Truncated Bid</i>
NO	Óxido Nítrico	TK	Tirosina quinasa
NOS	Óxido Nítrico Sintasa	Trk	<i>Tropomyosin-related Kinase</i>
NRAGE	<i>Neurotrophin Receptor Interacting MAGE homolog</i>	UV	Ultravioleta
Ret	<i>Rearranged during Transfection</i>	VEGF	<i>Vascular Endotelial Growth Factor</i>
RyR	<i>Ryanodine Receptor</i>		

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA), fue descrita por primera vez en 1874 por Jean-Martin Charcot. La ELA es comúnmente conocida en EEUU como la enfermedad de Lou Gehrig, famoso jugador de beisbol del New York Yankees, destacado por sus innumerables éxitos y que años más tarde, en 1936 murió como consecuencia de esta enfermedad. En la actualidad, se estima que un 0.05% de la población sufre ELA; se conocen unos 800.000 casos en España y unos 120.000 casos en Cataluña. La ELA se caracteriza por la degeneración y muerte de prácticamente todas las neuronas motoras (espinales, bulbares y corticales), excepto las oculomotoras y aquellas que inervan la vejiga. La degeneración progresiva de estas motoneuronas (MNs) genera espasmos, hiperreflexia, atrofia muscular y parálisis. En los últimos estadios de la enfermedad, provoca fallos en los músculos que participan en la respiración, y la muerte del enfermo. El origen de la enfermedad puede ser de tipo familiar (ocurre en aproximadamente un 5-10% de los casos) o esporádica (90% de los casos). La media de edad en la cual se manifiesta la enfermedad está entre 50-60 años, aunque se han observado algunos casos juveniles. La supervivencia de estos enfermos está entre 1-5 años desde que se diagnostican los síntomas.

1.1.1 ELA Familiar (ELA_F)

Un 10% de la ELA es familiar. En la última década, la posibilidad de estudiar modelos animales y modelos de ELA_F, nos ha permitido conocer mejor aquellos factores que intervienen en el desarrollo de la enfermedad. La ELA es una enfermedad muy heterogénea. En la siguiente tabla se resumen los tipos de mutaciones que dan lugar a los diferentes tipos de ELA (Bruijn, LI y col. 2004).

Enfermedad		Herencia	Cromosoma	Gene/Prot.	Edad
Familiar	ELA	Dominante	21q22.1	SOD-1	Adulto
			16	¿?	Adulto
			18	¿?	Adulto
			20	¿?	Adulto
	ELA con demencia	Dominante	9q21-22		Adulto
	ELA con demencia y Parkinsonismo	Dominante	17q21	Tau	Adulto
	ELA	Ligada a X	Xp11-Xq12	¿?	Adulto
	ELA juvenil tipo-1	Recesiva	15q15-22	¿?	Adolescente
	ELA juvenil tipo-3	Recesiva	2q33	ELA2	Adolescente
Juvenil	Dominante	9q34	¿?	Antes 25 años	
Esporadica	-	NO	NO	¿?	Adulto

Tabla1: **Esquema de los diferentes tipos de enfermedades de ELA** (Bruijn, LI y col. 2004).

Un 20% de los pacientes afectados con ELA_F tienen alteraciones en el locus cromosómico 21q22.1, que afecta a la proteína Cu/Zn superóxido dismutasa (*Cu/Zn Superoxide Dismutase 1*, SOD-1). La SOD-1 es un enzima homodimérico que se encuentra en el espacio intermembrana de la mitocondria. Para realizar su función, necesita un átomo de zinc y otro de cobre por cada monómero. Este enzima antioxidante, cataliza la conversión del ión superóxido O_2^- , producido como consecuencia de la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial, en O_2 y H_2O . Se conocen más de 100 mutaciones en la SOD-1 a lo largo de los cinco exones que forman la proteína (Bendotti, C y Carri, MT 2004). Como consecuencia de estas mutaciones, se producen fallos a distintos niveles que desencadenan la degeneración y muerte de estas neuronas. La utilización de modelos animales con mutaciones en la SOD nos ha facilitado el estudio de esta enfermedad y nos ha permitido conocer que alteraciones tienen lugar en las diferentes etapas de la ELA.

A nivel mitocondrial, tanto en MNs de pacientes con ELA como en modelos animales, se ha observado cambios morfológicos y funcionales en las mitocondrias. Por ejemplo, en los ratones mutantes de la SOD-1^{G93A} o SOD-1^{G37R}, se ha visto un incremento en el número de vacuolas en la mitocondrias, y una degeneración de las mismas. La formación de estas vacuolas se debe al proceso de *swelling* (del inglés, hinchazón) que sufre la mitocondria en el espacio intermembrana, produciéndose una expansión de la membrana interna, y externa (Xu, Z y col. 2004). Estas mitocondrias también sufren cambios funcionales. En modelos de ratones con mutaciones en la SOD-1 se observa una disfunción en la cadena respiratoria, y en particular, una disminución de la actividad en los complejos I y IV (Comi, GP y col. 1998). En etapas todavía tempranas de la enfermedad se observa una disminución en la capacidad de consumo de oxígeno y en la síntesis de ATP -revisado por (Manfredi, G y Xu, Z 2005)-. Esta baja actividad de la cadena respiratoria provoca cambios en el potencial de membrana, incrementándose los niveles de calcio citoplasmático, los cuales van asociados a una pérdida en la capacidad de tamponar calcio por parte de estas mitocondrias. A todos estos cambios producidos se le debe añadir el hecho que en el 20% de los casos, la SOD-1 se encuentra mutada, lo que provoca un aumento de radicales libres y la oxidación de algunas proteínas que participan en la homeostasia del calcio, como la calmodulina (CaM) o la calcineurina. Otra consecuencia de este estrés que sufre la célula, es la formación de poros en la membrana de la mitocondria (*Mitochondrial outer Membrane Permeabilization*, MOMP), lo que promueve la liberación de moléculas proapoptóticas como citocromo c (cit c) o el factor inductor de la apoptosis (AIF, del inglés *Apoptosis-inducing factor*) que activarán la cascada de muerte apoptótica (Danial, NN y Korsmeyer, SJ 2004).

Las motoneuronas poseen una elevada expresión de receptores ionotrópicos, como el AMPA y el receptor de kainato, en comparación con otros tipos celulares, lo que hace que sean especialmente sensibles al glutamato. La activación de estos receptores provoca la entrada de calcio desde el espacio extracelular al citoplasma. Los altos niveles de glutamato en el medio extracelular producidos por los fallos en los diferentes mecanimos, junto con el mal funcionamiento de la mitocondria, hacen que la MN no tenga sistemas para

regular la entrada masiva de calcio. En experimentos con ratones con mutaciones en la SOD-1, se ha demostrado que los antagonistas para estos receptores, especialmente para receptores AMPA, prolongan la vida de estos ratones –revisado por (Manfredi, G y Xu, Z 2005)-.

Estrés oxidativo. Como consecuencia de la disfunción mitocondrial y la mutación de la SOD-1 se producen elevadas cantidades de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) que no pueden ser eliminadas, las cuales afectan a la funcionalidad de proteínas y lípidos (Rao, SD y Weiss, JH 2004). La oxidación de proteínas provoca agregados en el citoplasma de las MNs. Estos agregados son proteínas que forman parte del citoesqueleto, lo que conlleva una desregulación en el transporte axonal.

Participación de células no neuronales. En muchos procesos biológicos existe una colaboración entre las MNs y las células de su alrededor, como la microglia o los astrocitos. Varios estudios han demostrado el papel que juegan estas células no neuronales en el desarrollo de la enfermedad (Barbeito, LH y col. 2004).

El estrés oxidativo producido en las MNs, provoca la activación de los astrocitos. Cuando éstos son activados segregan diversos factores neurotóxicos como el óxido nítrico (NO, del inglés *Nitric Oxide*) o el glutamato, agravando la degeneración de las MNs. La producción de NO por parte de los astrocitos promueve la nitrosilación de proteínas en las MNs. Por otra parte, el NO puede unirse al superóxido, formando un compuesto altamente reactivo, el peroxinitrito, afectando a proteínas como las conexinas u otras, dificultando la comunicación entre la MNs y los astrocitos. Experimentos *in vitro* utilizando cocultivos de astrocitos y neuronas demostraron que la producción de especies reactivas por parte de los astrocitos producían daño mitocondrial en las neuronas corticales e inducían apoptosis en MNs -revisado por (Barbeito, LH y col. 2004)-.

La microglia también produce una respuesta inflamatoria frente al estrés oxidativo. Esta respuesta tiene lugar antes de que se expresen marcadores apoptóticos en las MNs. Como respuesta inflamatoria, la microglia libera al medio $TNF\alpha$. Este $TNF\alpha$ puede afectar a los niveles de factores neurotróficos, así como, a los niveles de glutamato, monoaminas y otros factores que

afectarán directamente a la viabilidad de estas MNs -revisado por (Barbeito, LH y col. 2004)-.

Alteraciones en estructuras celulares (Neurofilamentos). La formación de agregados insolubles, en mutantes de la SOD-1, está considerado como un evento temprano en el desarrollo de la enfermedad. Existen numerosos estudios de sobreexpresión de neurofilamentos específicos, así como estudios realizados con ratones *knock out* (KO) para algunos neurofilamentos y su relación con la ELA. Se ha observado que la síntesis excesiva del neurofilamento de 200 kDa (NF-200 kDa) y el NF-160 kDa, provoca parálisis en las extremidades y debilidad en el músculo esquelético, fenotipo similar al observado en la ELA. La expresión de bajos niveles de la proteína mutante NF-160 kDa es suficiente para causar una acumulación anormal en los cuerpos celulares y en los axones proximales, produciendo la degeneración de estas neuronas. Esto sugiere que pequeñas acumulaciones de estas proteínas pueden ser la primera causa de la disfunción neuronal y su contribución en la progresión de la enfermedad (Rao, MV y Nixon, RA 2003). La desorganización del citoesqueleto observada en la patología de ELA, también se ha asociado a la acumulación de NF fosforilados (pNF, del inglés *Phosphorylated Neurofilament*). La fosforilación/desfosforilación de los neurofilamentos regula diversas funciones, como el transporte y el crecimiento axonal. El problema aparece cuando hay una hiperfosforilación de estos NF, debida a la desregulación de proteínas quinasas, como la MAPK, la ERK1/2 o la Cdk5, impidiendo así, el transporte axonal necesario para la viabilidad neuronal (Robertson, J y col. 2002).

En la siguiente figura se resumen todos los procesos que ayudan al desarrollo de la ELA y a la degeneración y muerte de la MNs.

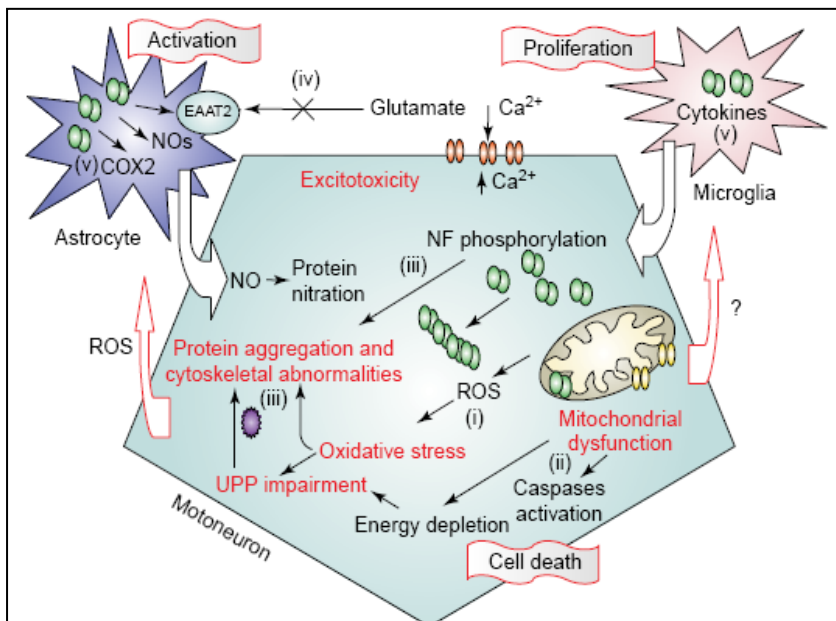


Figura 1: Esquema de los eventos que tienen lugar en las MNs, astrocitos y microglia durante la ELA. Las mutaciones en la SOD-1 provocan una producción elevada de ROS y estrés oxidativo (i), alterándose los lípidos y proteínas intracelulares. Esta producción de especies ROS provoca una alteración de la mitocondria tanto funcional (cambios en el potencial de membrana, disminución de la actividad respiratoria) como morfológica (formación de vacuolas). Estos fallos en la mitocondria provocan la salida del cit c y otras proteínas de la mitocondria al citoplasma, activando las caspasas y provocando la muerte celular (ii). También los radicales libres producidos, provocarán la agregación de proteínas en el citoplasma y procesos de ubiquitinación (iii). Las especies ROS también modifican las proteínas quinasas, produciéndose un aumento en la fosforilación de los NF, formándose agregados (iii). Por otro lado, el incremento de las concentraciones de glutamato en el espacio extracelular y la desregulación de los transportadores de glutamato en los astrocitos junto con la propia secreción por su parte, provocan una entrada masiva de calcio en el interior de la célula (iv). Estos incrementos de calcio en la MNs resultan neurotóxicos ya que no pueden ser regulados (iv). También los astrocitos pierden la regulación de la COX2 promoviendo la producción de NO que difundirá por la membrana y provocará la nitrosilación de proteínas en las MNs. La microglia participará mediando una respuesta inflamatoria, liberando citoquinas y otras sustancias al medio afectando a las MNs (Bendotti, C y Carri, MT 2004).

1.1.2 ELA Esporádica

Más de un 90% de los casos de ELA son debidos a causas esporádicas convirtiéndose así en la de mayor incidencia. Este tipo de ELA se manifiesta únicamente en adultos. Las causas son muy diversas y poco conocidas, pero afortunadamente la gran similitud entre la ELA_F y la ELA_S permite que se utilicen los mismos modelos animales basados en mutaciones de la SOD-1 para su

investigación. A igual que ocurre con la ELA_F, parece que existe una disfunción en el receptor de glutamato de los astrocitos y la formación de agregados de NF-200 kDa. También se ha observado que la actividad de COX2 está incrementada en muestras *postmortem* de médula espinal y fluido cerebroespinal de pacientes con ELA esporádica (Bruijn, LI y col. 2004).

Aunque nos hemos centrado en esta patología no es la única que se conoce. Así, en la enfermedad de Werdnig-Hoffmann también tiene lugar la degeneración de las células del asta anterior provocando parálisis y atrofia muscular (Spiegel, R y col. 1996).

Este trabajo tiene como finalidad el estudio de las vías implicadas en la supervivencia de las MNs. El conocimiento sobre estas vías y los mecanismos que las regulan nos permitirán avanzar en la comprensión y las posibles terapias para prevenir enfermedades en las que se produce una degeneración de estas células, y mejorar la calidad de vida de estos pacientes.

1.2. LA MOTONEURONA

Las neuronas espinales tienen básicamente dos funciones importantes: transmitir la información sensorial hacia el cerebro e integrar esta información llevando la respuesta hasta el sistema motor. Estas neuronas se organizan en circuitos, participando en movimientos automáticos, estereotipados, reflejos y voluntarios. Las MNs se definen como aquellas neuronas que establecen un contacto sináptico con las fibras musculares, llevando a cabo la contracción muscular. Las MNs de la médula presentan interacciones funcionales con las interneuronas. Este hecho permite que se realicen con facilidad movimientos rítmicos y automáticos propios de conductas complejas. Las MNs se localizan a lo largo de la médula espinal, formando columnas o cadenas. En la parte ventral de la médula espinal se localizan las MNs que participan en la transmisión de la información acerca de los movimientos voluntarios y la postura corporal, mientras que en la parte dorsal de la médula se localizan los circuitos de neuronas que procesan la información sensorial.

La formación del sistema nervioso de los vertebrados tienen lugar a partir de una capa epitelial, que al final del desarrollo dará lugar a los diferentes tipos neuronales (Cayuso, J y Marti, E 2005). Esta capa en su parte central sufrirá un engrosamiento dando lugar a la placa neural. Por debajo de ésta se localiza la notocorda, la cual mediante la expresión de diferentes moléculas, por ejemplo, los factores de crecimiento como el factor de crecimiento fibroblástico (FGF, del inglés *Fibroblast Growth Factor*), el ácido retinoico o las proteínas morfogénicas del hueso (BMPs, del inglés *Bone Morphogenetic Proteins*), participa activamente en la formación de los diferentes tipos celulares. La placa neural sufre una invaginación formando el tubo neural, que en etapas posteriores del desarrollo se distinguirán principalmente dos regiones: una región encefálica más voluminosa que dará lugar al encéfalo y una segunda región medular más estrecha y larga situada en el tronco del animal que dará lugar a la médula.

Durante la formación del tubo neural, las células están proliferando. Una vez formado el tubo neural, en la parte más ventral, próxima a la notocorda, se empieza a formar una capa de células más gruesa que recibe el nombre de placa del suelo (del inglés de *floor plate*), que se forma a partir de señales que recibe de la notocorda, que determinará la polaridad ventro-dorsal del tubo neural y las futuras influencias sobre la diferenciación de los precursores neuronales en los diferentes subtipos de neuronas. En la parte dorsal del tubo neural, empiezan a diferenciarse un tipo de células que se agrupan bajo el nombre de células de la cresta neural, que más tarde darán lugar a diferentes tipos celulares como los ganglios raquídeos, los ganglios simpáticos, parte de las meninges, las neuronas del ganglio dorsal (DRG, del inglés *Dorsal Root Ganglia*,) y los melanóforos. Al final de desarrollo de la médula espinal, distintos grupos de neuronas se encuentran correctamente localizadas en el eje rostro-caudal y ventro-dorsal de la médula (Jessell, TM 2000).

Las MNs se generan a partir de células progenitoras de la parte ventral del tubo neural. La señal inductora es una glicoproteína llamada Sonic Hedgehog (SHH), que es secretada en la notocorda por las células del mesodermo. El gradiente de esta proteína es lo que dará lugar a cinco subtipos neuronales, entre ellos, las MNs. SHH regula la cascada transcripcional que actúa sobre los progenitores neuronales especificando su diferenciación. En

concreto, SHH regula la acción de tres proteínas, Nkx6.1(Liu, R y col. 2003), Nkx2.2 y Irx3. Su acción combinada regula la generación de MNs. Estas proteínas poseen dominios que activan otras por debajo de ellas, como MNR2. MNR2 se expresa durante el final de la división de los progenitores de las MNs y su función es conferir la identidad de MN a estas células indiferenciadas. MNR2 induce la expresión de factores de transcripción de la familia de LIM (*LIM homeodomain transcription factor*) como Islet-1, Islet-2, Lim-3 y HB9.

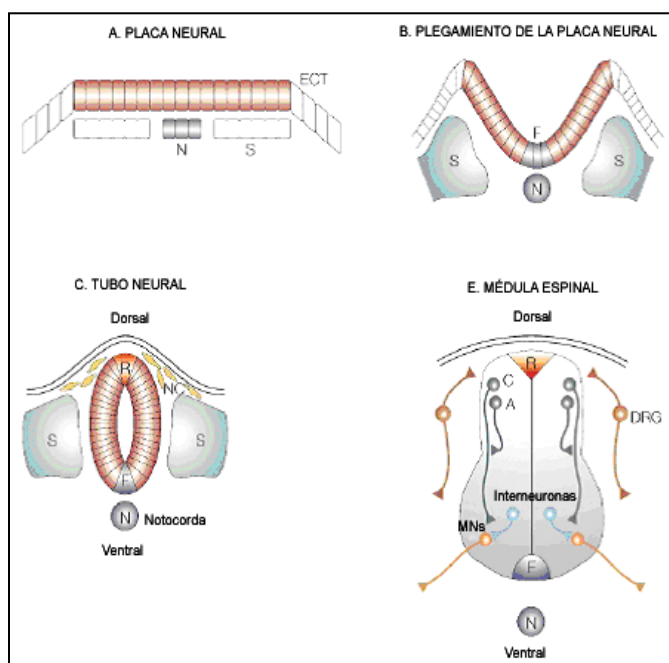


Figura 2: Esquema de la formación de la médula espinal. A: Formación de la placa neural a partir de las células del mesodermo. B: Invaginación de la placa neural que da lugar al tubo neural. C: Polarización ventro-dorsal del tubo neural. E: Localización ventro-dorsal de los distintos subtipos de neuronas que forman la médula espinal. (Jessell, TM 2000).

Hasta el momento del nacimiento, todas las MNs expresan Islet-1 y Islet-2, pero durante el desarrollo, los cuatro factores de transcripción de esta familia muestran un patrón de expresión diferente, definiendo las diferentes subclases funcionales de MNs. Las MNs que inervan los músculos axiales expresan Islet-1, Islet-2 y Lim-3, mientras que las que inervan los músculos ventrales de las extremidades y el tronco, expresan Islet-1 y Islet-2; y las MNs

que inervan los músculos dorsales de las extremidades, expresan Lim-1 y Islet-2. El patrón de inervación del músculo esquelético por las MNs espinales requiere un alto grado de organización espacial. La generación de estas subpoblaciones de MNs, tiene como consecuencia una organización topográfica de las proyecciones motoras.

Las subpoblaciones de MNs que expresan diferentes factores de transcripción, dirigen sus axones selectivamente hacia dianas diferentes y la posición de sus somas a lo largo de la medula espinal formando columnas (Jessell, TM 2000), como se muestra en la siguiente figura.

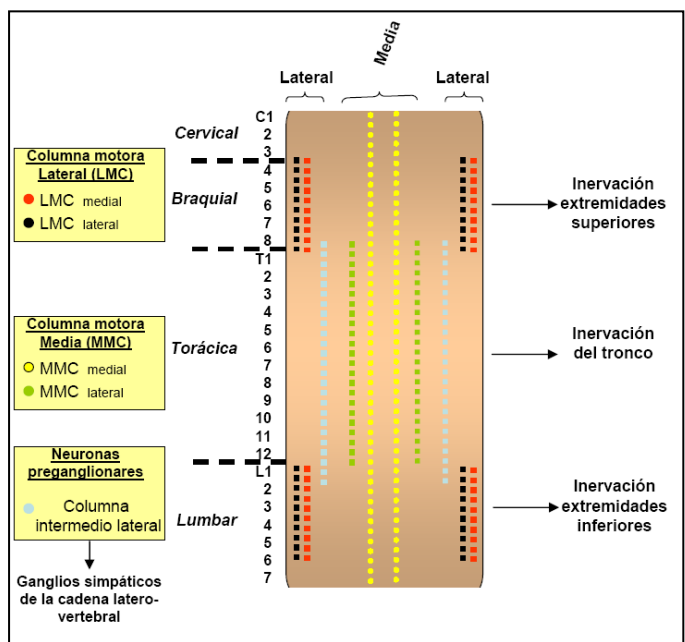


Figura 3: **Representación esquemática de la organización de las MNs en la médula espinal.** Diagrama de la posición individual de MNs en columnas a lo largo del eje rostro-caudal de la médula espinal. (Tsuchida, T y col. 1994).

Como hemos comentado anteriormente, los grupos de MNs están muy organizados. Así las MNs se dividen en la Columna media motora (MMC, del inglés *Medial Motor Column*) y en la Columna motora lateral (LMC del inglés *Lateral Motor Column*). Las MNs de la MMC, inervarán los músculos axiales; mientras que las de la LMC presentes a nivel braquial y sacrolumbar, inervarán

las extremidades. Entre la LMC y MMC se encuentran las neuronas preganglionares, que inervan los ganglios simpáticos de la cadena latero-vertebral (Jessell, TM 2000).

En la siguiente tabla se resumen las subpoblaciones de neuronas y sus dianas.

Tipo	Colonia		Diana
Somáticas	MMC	MMCm (cervical, torácica y sacra)	Musculatura axial
		MMC1(torácica)	Musculatura del tronco
	LMC	LMCm(branquial y lumbar)	Masa muscular ventral de las extremidades
		LMC1 (branquial y lumbar)	Masa muscular dorsal de las extremidades
	Otras poblaciones	MMC cervical	Diafragma
		Núcleo de Onuf	Esfínter anal y uretral
		MNs somáticas del control de la erección LMC lumbar	Músculo estriado del perineo
Visceromotora	Neuronas preganglionares simpáticas	Colonia intermedio-lateral, parte torácica de la medula	Ganglios simpáticos de la cadena latero-vertebral
	Neuronas preganglionares parasimpáticas sacra		Ganglios parasimpáticos intramurales del recto, de la vejiga y los órganos reproductores

Tabla 2: Resumen de los diferentes tipos de MNs, su localización y la diana de inervación.

1.3. MUERTE CELULAR PROGRAMADA (PCD, del inglés

Programmed Cell Death)

La PCD, como la proliferación y la diferenciación son importantes en la homeostasis y en la morfogénesis, formando parte importante del desarrollo (Vaux, DL y Korsmeyer, SJ 1999; Meier, P y col. 2000).

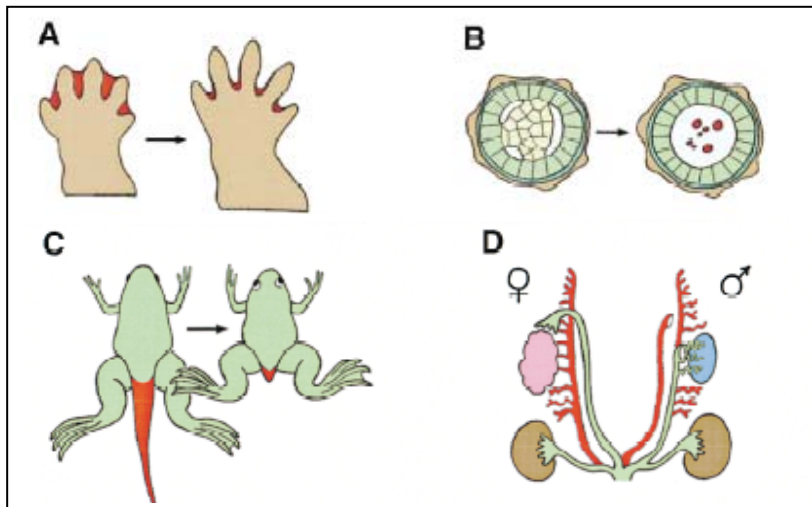


Figura 4: Algunas funciones de la PCD durante el desarrollo. A. Formación de los dedos en el embrión B. Formación de estructuras como el lumen del intestino. C. Durante la metamorfosis en anfibios D. Eliminación de estructuras en el desarrollo de órganos sexuales (Jacobson, MD y col. 1997).

La PCD tiene varias funciones en el desarrollo de los vertebrados, por ejemplo, establecer estructuras como la formación del lumen, el tubo neural o los dedos del embrión. Es responsable de eliminar estructuras innecesarias, como ocurre, en el caso de los anfibios, en los que se forman estructuras que más tarde desaparecerán. Actúa también eliminando células que se han formado en exceso, ajustando así el número correcto de células que finalmente formarán el órgano en el adulto (Jacobson, MD y col. 1997).

En el sistema nervioso (SN) de los vertebrados se produce un proceso de degeneración y muerte por el cual aproximadamente la mitad de las neuronas que se han originado mueren. Éste es crítico para el establecimiento definitivo del patrón neuronal (Oppenheim, RW 1991; Yeo, W y Gautier, J 2004). Este proceso se ha conservado a lo largo de la evolución, desde nematodos hasta vertebrados superiores, indicando su importancia para el desarrollo

adecuado de los organismos. Mucho de lo que hoy en día conocemos acerca de este fenómeno es gracias a los estudios que se realizaron en *Caenorhabditis elegans* (Yeo, W y Gautier, J 2004).

Localización espacio-temporal de la PCD temprana en neuronas durante la embriogénesis		
Organismo	Tiempo de la PCD durante la embriogénesis	Localización de la PCD
<i>Caenorhabditis elegans</i>	La mayoría de las células destinadas a morir lo hacen antes de la gastrulación (300-400 min después de la primera división celular)	La línea celular que dará lugar a las neuronas y a la hipodermis.
<i>Drosophila melanogaster</i>	En el estadio 12 durante la segregación del neuroblasto y la mitosis	En regiones que más tarde darán lugar al SNC.
<i>Dario rerio</i>	12 h después de la fertilización durante la formación del tubo neural.	Neuroectodermo dorsorostral
<i>Xenopus laevis</i>	Estadio 12-17 durante la 1ª neurogénesis	Neuroectodermo
<i>Gallus gallus</i>	Estadio 5-8 Durante la gastrulación y la neurogénesis	Zona ventricular y Motoneuronas de la parte ventral
	Estadio 17-19 durante la neurogénesis y la especificación regional del tubo neural	
<i>Mus musculus</i>	E6.5 durante la gastrulación	Epiblasto anterodistal que dará la placa neural
	E14-E16 durante el desarrollo del cortex	Precursores neuronales indiferenciados de la zona ventricular

Tabla 3: Localización espacio-temporal de la PCD temprana en neuronas durante la embriogénesis (Yeo, W y Gautier, J 2004).

Los primeros estudios de PCD en *C. elegans* fueron realizados por Brenner, Sulston y Horvitz. Durante el desarrollo de este nematodo son generadas 1090 células somáticas en el hemafrodita, de las cuales 131 células mueren de forma programada. De estas 131, 105 son neuronas (Sulston, JE y col. 1983). De esta manera, igual que ocurre en el desarrollo de vertebrados

superiores, inicialmente se generan más células de las que son necesarias y el exceso es eliminado por la PCD.

Una de las herramientas que nos ha permitido conocer mejor que elementos participan en la PCD, ha sido la utilización de ratones deficientes para proteínas implicadas en procesos apoptóticos. Por ejemplo, en el ratón deficiente para el receptor de fosfatidilserina, receptor que se expone en la superficie de las células apoptóticas para que sean fagocitadas por los macrófagos se ha observado una acumulación de células muertas en el cerebro, causando un crecimiento anormal del mismo (Li, MO y col. 2003) . En los ratones que carecen de algunas proteínas apoptóticas, como Apaf-1, caspasa-3 o caspasa-9 también presentan acumulación de células debido a que éstas no mueren por programas apoptóticos, lo que indica la participación de estas proteínas en la PCD. Su deficiencia o malfuncionamiento de una o algunas de ellas provocan un desarrollo inadecuado del embrión (Li, MO y col. 2003). La PCD es un fenómeno que afecta tanto al Sistema Nervioso Central (SNC) como al Sistema Nervioso Periférico (SNP) (Oppenheim, RW 1991; Burek, MJ y Oppenheim, RW 1996). La magnitud de la muerte está entre el 20 y el 80% de las neuronas generadas y la localización espacio-temporal en el desarrollo es variable en las distintas poblaciones neuronales (Oppenheim, RW 1991). La muerte masiva de las neuronas que tiene lugar durante la PCD no es un fenómeno inevitable y predeterminado genéticamente, sino que está regulado por una serie de señales epigenéticas derivadas principalmente de las interacciones célula-célula (Cowan, WM y col. 1984). Son muchas las proteínas que están regulando éste proceso, entre ellas la disponibilidad de factores neurotróficos de la diana de inervación. Aquellas neuronas que intervengan el tejido diana y obtienen los factores necesarios para su supervivencia, sobrevivirán, mientras que aquellas que no lo consigan morirán de forma programada (Hamburger, V 1980; Levi-Montalcini, R 1987; Barde, YA 1989; Oppenheim, RW 1989) -Ver capítulo La teoría Neurotrófica-

1.3.1. La PCD en poblaciones de MNs durante el desarrollo.

Las MNs de distintas especies sufren PCD a lo largo del desarrollo embrionario, por ejemplo:

- * En Rata: aproximadamente de todas las MNs generadas, el 50% muere de forma programada entre día embrionario 14 (E14) y día postnatal 3 (P3) (Lance-Jones, C 1982).
- * En ratón: se observa PCD desde E13-E18, con dos picos de muerte a E12.5 y E14.5 (Lance-Jones, C 1982; Oppenheim, RW y col. 1986).

En el embrión de pollo, objeto de nuestro estudio, de todas las MNs generadas en la parte lumbar, entre E2.5-E5.5, entre un 50-60% desaparecerán por la PCD entre E 5.5 y E12 –revisado por (Sun, W y col. 2005)–. También se observan dos picos de muerte, el mayor tiene lugar entre el día E6-E9 y va disminuyendo hacia los días E9-E12. En otras regiones de la médula espinal, la PCD ocurre a diferente día embrionario (Yamamoto, Y y Henderson, CE 1999), Por ejemplo, en la región cervical, existen dos picos de muerte, uno temprano que ocurre antes de establecerse el contacto con las dianas de inervación, y otro más tardío en el cual se mueren alrededor de un 85% de las MNs cervicales generadas inicialmente (Yaginuma, H y col. 1996). En la región braquial el periodo de muerte se da entre E8-E15, durante el cual se pierden alrededor del 65% (Laing, NG 1982).

En las MNs en general, la muerte tiene lugar cuando éstas están diferenciadas o ya tienen conexiones axonales (Landmesser, L y Morris, DG 1975; Bekoff, A 1976; Hollyday, M y Hamburger, V 1977; Chu-Wang, IW y Oppenheim, RW 1978), demostrando que el tejido de inervación es importante a la hora de regular la supervivencia de estas células. Los experimentos realizados por Hamburger y colaboradores (1980) en los que eliminaban el tejido diana, se observó un incremento del número de MNs que entraban en PCD. Por el contrario, cuando se añadía más tejido diana se reducía el número de células que morían. La idea de que el tejido diana (el músculo esquelético en el caso de las MNs) es el único factor que juega un papel importante en la regulación de la supervivencia de las MNs durante el desarrollo está cambiando. Estudios con el ratón deficiente en *erb-B3*, el receptor del factor

tráfico glial (*Glial Growth Factor*, GGF), muestra un severo déficit en el desarrollo de las células de Schwann y una significativa reducción en el número de MNs, alrededor de un 79% (Riethmacher, D y col. 1997). Este dato sugiere la importancia de las células de Schwann en el desarrollo de las MNs, ya que ofrecen parte del soporte trófico necesario para la supervivencia de estas células. De estos datos podemos deducir, que son los factores neurotróficos proporcionados por varias fuentes, lo que regula la supervivencia y la integridad funcional de las MNs durante el desarrollo (Davies, AM 1998).

1.3.2. La muerte apoptótica neuronal

La muerte que se observa durante el desarrollo de tejidos y órganos durante muchos procesos fisiológicos, posee unas características tanto morfológicas como bioquímicas, que hacen que reciba el nombre de apoptosis (Kerr, JF y col. 1972). Apoptosis y PCD no pueden utilizarse como sinónimos, ya que no se refieren a lo mismo. Definiremos PCD como aquella muerte celular que ocurre en un instante preciso del desarrollo (de ahí, el término “Programada”). Debido a que la mayoría de ejemplos de PCD ocurren por apoptosis, y la apoptosis parece ser un evento “programado” de la célula, ambos términos se usan con frecuencia indistintamente.

La Muerte Celular Programada (PCD) es el principal tipo de muerte celular implicado en procesos de desarrollo del SNC. La PCD tiene lugar en un tiempo concreto durante el desarrollo y además está controlada genéticamente (Hirata, M y Hall, BK 2000; Choi, C y Benveniste, EN 2004).

Apoptosis: El término apoptosis se refiere a un tipo de muerte que fue definido en un principio en base a parámetros morfológicos. Cuando una célula entra en apoptosis, tanto el citoplasma como el núcleo se condensan. Estos cambios provocan una fragmentación nuclear y citoplasmática, formando lo que recibe el nombre de cuerpos apoptóticos. Estos cuerpos son fragmentos de citoplasma y núcleo rodeados de membrana plasmática, que pueden ser rápidamente eliminados por células especializadas que los fagocitan (macrófagos), o bien, por la célula adyacente a la célula apoptótica. Como consecuencia final, al cabo de unas horas, la célula apoptótica ha desaparecido (Kerr, JF y col. 1972). En

cambio, cuando la célula muere por necrosis, sufre un hinchamiento de la mitocondria y aumento del retículo endoplasmático, provocando la rotura de la estructura de la membrana celular y expulsando todo el contenido de la célula al espacio intracelular. Este hecho conlleva una respuesta inflamatoria.

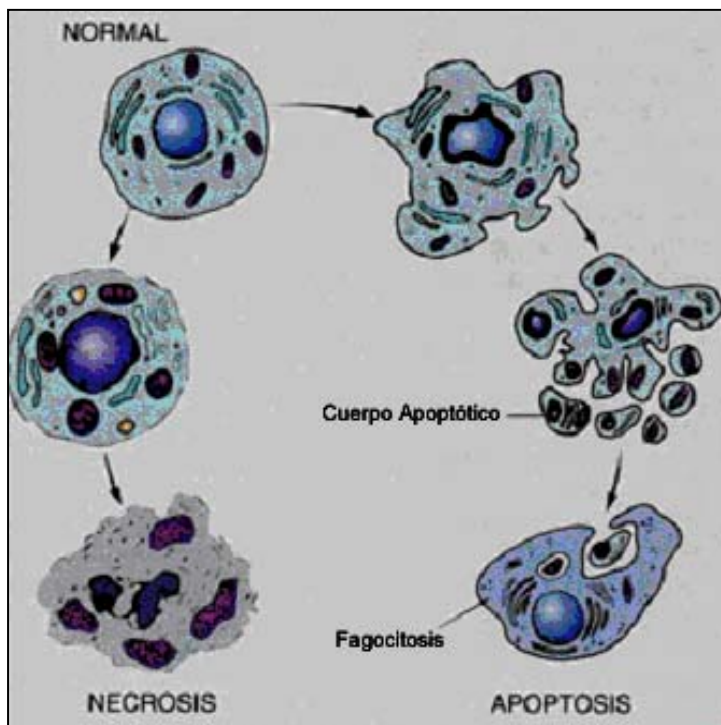


Figura 5: Esquema de la muerte por apoptosis de una célula versus necrosis.

Las células apoptóticas sufren cambios a diferentes niveles. A nivel de membrana plasmática, se exponen al exterior residuos de fosfatidilserina de la bicapa lipídica. A nivel de mitocondria cambiando el potencial de membrana. En el citoplasma ocurre una acidificación intracelular, producción de radicales y proteólisis selectiva de determinadas proteínas. En el núcleo se degrada la cromatina en fragmentos oligonucleosomales de alto y bajo peso molecular (Cryns, V y Yuan, J 1998). Estos cambios bioquímicos son un reflejo de la activación de una maquinaria intracelular específica que controla todo el proceso apoptótico y que da lugar, en última instancia, a los cambios

morfológicos citados anteriormente. Todos estos cambios tanto morfológicos como bioquímicos nos han servido como herramientas de trabajo para su posterior estudio y caracterización en nuestros modelos.

Las caspasas : Son proteasas ejecutoras de la apoptosis. El descubrimiento de estas proteínas se debió a análisis mutacionales en *C. elegans*, en los que se identificaron tres genes necesarios para la ejecución de la muerte celular: ced-3, ced-4 y uno encargado de inhibirla, ced-9 (Hengartner, MO y col. 1992; Yuan, J y Horvitz, HR 1992; Yuan, J y col. 1993; Joza, N y col. 2002). Con posterioridad se han identificado sus homólogos en otras especies. La familia de las caspasas son un conjunto de cisteín-proteasas con especificidad de corte en residuos de aspartato. Todas ellas tienen un pentapéptido conservado en el centro activo "QACXG" (Glut-Ala-Cys-X-Gly), donde X puede ser una Glu, Arg o Asp. Las caspasas se sintetizan en forma de zimógenos, cuya activación depende de su procesamiento proteolítico, que ejecutan otras caspasas (Shi, Y 2002). Todas las caspasas poseen una estructura similar; la zona N-terminal recibe el nombre de prodominio y el tamaño de esta zona va de 3-24 kDa; poseen una región central, subunidad grande, de peso aparente entre 17-21 kDa y en el extremo carboxi terminal se encuentra la subunidad pequeña de 10-13 kDa (Boatright, KM y col. 2003). Todas ellas pueden autoactivarse y activar a otras caspasas, formando heterodímeros con la subunidad p10 y p20; dos heterodímeros forman un heterotetrámero enzimáticamente activo (Walker, NP y col. 1994). Por tanto, la subunidad grande y la subunidad pequeña son necesarias para reconocer y procesar correctamente al sustrato (Salvesen, GS y Abrams, JM 2004). Las caspasas se han clasificado en tres grupos según su homología de secuencia y su función. Según su función, el primer grupo son aquellas caspasas que están implicadas en la respuesta inflamatoria (Los, M y col. 2003); en un segundo grupo, se engloban las llamadas caspasas iniciadoras, que son las que inician la cascada de activación de la apoptosis y activan a las caspasas ejecutoras (tercer grupo). Las caspasas ejecutoras tienen como diana diversos sustratos, como la actina, Gas2, PARP, ICAD, que participan en la fragmentación del DNA y otros procesos que al final llevarán a la muerte celular (Lavrik, I y col. 2005) -Ver tabla 4-.

Prodominio Largo	Caspasas
<i>Caspasas Iniciadoras</i>	Caspasa 2
	Caspasa 8
	Caspasa 9
	Caspasa 10
<i>Caspasas Inflamatorias</i>	Caspasa 1
	Caspasa 4
	Caspasa 5
	Caspasa 12
	Caspasa 14
Prodominio Corto	Caspasas
<i>Caspasas Efectoras</i>	Caspasa 3
	Caspasa 6
	Caspasa 7

Tabla 4: Esquema de los diferentes grupos de caspasas según su función.

Se han descrito dos vías principales de señalización intracelular que dan lugar a la muerte apoptótica: La vía extrínseca y la vía intrínseca.

La vía intrínseca. Se caracteriza por el papel fundamental que tiene la mitocondria en la cascada de señalización. Inicialmente la mitocondria fue considerada como un elemento pasivo en la muerte celular, pero más tarde se vio que tenía un papel fundamental y que uno de los miembros antiapoptóticos de la familia de Bcl-2, Bcl-2 está localizado en la membrana externa de la mitocondria (Krajewski, et al 1993). Las primeras hipótesis apuntaban que los ROS, generados por la actividad de la cadena respiratoria, podían generar un estímulo apoptótico, y que Bcl-2 podía funcionar como molécula antioxidante. Actualmente se sabe que la mitocondria contiene moléculas que son clave para determinar si la célula muere por apoptosis o sigue viviendo. Algunas de estas moléculas impedirán la formación de poros en la membrana de la mitocondria. En los eventos moleculares que activarán MOMP participan los miembros de la familia de Bcl-2. Una de las proteínas que participan en la activación de la apoptosis son Bak y Bax. En condiciones normales, Bak es una proteína

transmembrana situada en la membrana mitocondrial externa, mientras que Bax puede encontrarse en el citosol y en la periferia de la mitocondria. Bax se mantiene inactivo gracias a la interacción con factores que le mantienen retenido en el citoplasma. Tras un estímulo citotóxico, Bax y Bak sufren cambios conformacionales en su estructura, generalmente provocados por la interacción con miembros *BH3-only* como Bid o Puma (Letai A, *etal.*, 2004) activados transcripcional o post-traduccionalmente. Las proteínas proapoptóticas Bax y Bak parecen determinantes en la formación de aperturas en la membrana externa mitocondrial (Danial NN y Korsmeyer SJ, 2004).

Tras la permeabilización, proteínas del espacio intermembrana son liberadas al citosol. La liberación del cit c al citoplasma induce la formación del apoptosoma con Apaf-1 y caspasa 9. Es la caspasa 9 que una vez activa, procesará y activará a la caspasa 3 (Joza, N y col. 2002).

La activación de la caspasa 3 puede ser regulada por las moléculas inhibidoras de la apoptosis (IAP, del inglés *Inhibitor of Apoptotic Protein*). Las IAPs son moléculas antiapoptóticas que se unen e inhiben a la caspasa-3, -7 y -9. Cuando se desencadena la señal apoptótica, la liberación de smac/DIABLO al citoplasma provoca su activación y la unión a las IAPs, impidiendo que éstas bloqueen a las caspasas efectoras. El estudio con ratones nulos para proteínas implicadas en estas vías han permitido entender mejor los mecanismos que las controlan, pero todavía queda mucho por conocer ya que no sólo existe una única vía que participa en la muerte celular, sino que hay diversas vías y factores que interaccionan a la vez.

La vía extrínseca. Se activa por la unión de ligandos específicos a los llamados receptores de muerte (DR, del inglés *Death receptors*). Estos receptores pertenecen a la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF, del inglés *Tumor Necrosis Factor*) (Bhardwaj, A y Aggarwal, BB 2003). Estos receptores de muerte son los encargados de transmitir las señales apoptóticas iniciadas por los “ligandos de muerte” (Ashkenazi A y Dixit VM, 1998).

Aunque en algunos sistemas celulares concretos la vía extrínseca e intrínseca puedan actuar independientemente, en la mayoría de células hay una delicada coordinación e interacción entre ambas vías (Khosravi-Far R y Esposti MD,

2004). Tras la activación del receptor y el reclutamiento de las proteínas adaptadoras que forman un complejo de señalización inductor de muerte (DISC, del inglés *Death Inducing Signalling Complex*), varias moléculas de procaspasa 8 se unen al DISC resultando en una alta concentración de procaspasa 8. Ésta alta concentración hace que entre ellas se activen mediante proteólisis. Como resultado de este proceso se forman heterotetrámeros de caspasa 8, formados por dos subunidades grandes (p20) y dos subunidades pequeñas (p10). Estos heterotetrámeros son liberados al citosol donde continúan la cascada de señalización. La caspasa 8 activa en el citoplasma tendrá como sustrato a otras caspasas efectoras, como la caspasa 3. Por último, la activación de la caspasa 3 conlleva la proteólisis de diferentes proteínas, que como consecuencia final darán lugar a la fragmentación del DNA y la muerte celular por apoptosis. Una de las vías más estudiada a través de los DR ha sido la vía activada por Fas. En la señalización por Fas, se han descrito dos tipos de células: en las de tipo I, ocurre la formación del DISC, activación de la caspasa 8 y directamente caspasa 3. En las células de tipo II, los niveles de caspasa 8 activa no son suficientes para activar la caspasa 3 y requieren una amplificación de la señal que pasa por la mitocondria. En este caso, la caspasa 8 activa, procesa a Bid, formando Bid truncado (tBid, del inglés *truncated Bid*). tBid se transloca a la mitocondria, donde interacciona con Bax y/o Bak, donde darán lugar a la liberación de citocromo c (Brustovetsky N, *et al.*, 2003).

El sistema de muerte por Fas no parece importante en la muerte que tiene lugar durante el desarrollo del sistema nervioso (Kovac, AD y col. 2002). Este sistema, en un principio se implicó en la muerte por privación de soporte trófico en las MNs (Raoul, C y col. 1999), aunque, años más tarde, en ratones transgénicos para una forma dominante negativa de Daxx (proteína necesaria para la muerte por Fas), pudo comprobar un correcto desarrollo de la médula espinal, demostrando que Fas no participa en la muerte de las MNs durante el desarrollo en la médula espinal. (Raoul, C y col. 2005).

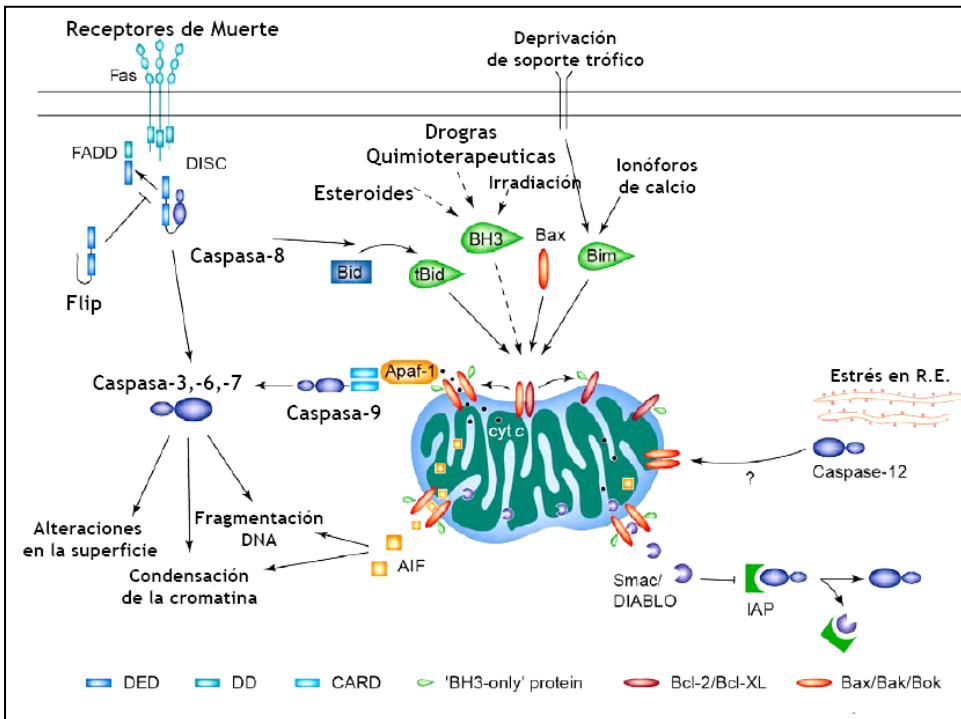


Figura 6: **Esquema de las vías de muerte.** (Joza, N y col. 2002)

1.3.3. La Teoría Neurotrófica

Los estudios que indicaban la importancia del tejido diana, a la hora de determinar qué células seguían viviendo, es lo que dio lugar a La Teoría Neurotrófica. Ésta postula que, los tejidos diana son capaces de sintetizar moléculas tróficas de manera limitante, por las cuales competirán las neuronas que proyectan hacia ellos. Sólo aquellas que acceden a una cantidad suficiente de estas moléculas pueden sobrevivir, ajustándose así el número de neuronas inervantes a la cantidad del tejido diana (Barde, YA 1989; Oppenheim, RW 1989). Esta hipótesis se confirmó con el descubrimiento del NGF “Nerve Growth Factor”, primera molécula que se aisló con actividad neurotrófica (Levi-Montalcini, R 1987). El NGF permite la supervivencia de distintas poblaciones neuronales, entre las que se encuentran las neuronas sensoriales y una población de neuronas colinérgicas (Levi-Montalcini, R 1987), de tal manera, que la eliminación de este factor (Gorin, PD y Johnson, EM 1979; Johnson, EM,

Jr. y col. 1980) o el bloqueo del transporte retrógrado (Johnson, EM, Jr. 1978) causa la muerte de estas células. Además, la adición de NGF exógeno disminuye la PCD de estas poblaciones neuronales *in vitro* (Oppenheim, RW y col. 1982). Estos resultados indican que el factor es producido en cantidades limitantes por los tejidos diana, así cuando se añade NGF exógeno, es mayor el número de células que lo captan y por tanto que sobreviven.

Pese a que la teoría neurotrófica explica de manera sencilla el fenómeno de la PCD. Son muchos los estudios que se han hecho para determinar los factores que intervienen en la regulación de la PCD y que determinarán el número final de neuronas que integrarán una población neuronal concreta. Hasta el momento, lo único que parece ser cierto es, que es un fenómeno complejo en el que participan múltiples factores. Algunos ejemplos son: primero, que la propia actividad eléctrica de la neurona en desarrollo está implicada en la supervivencia; segundo, no sólo los factores neurotróficos, sino también la presencia de determinadas proteínas inductoras de muerte regulan la PCD (algunas de estas proteínas son: proteínas de la familia de TNF, el ligando de Fas (FasL, del inglés *Fas ligand*) y TRAIL (del inglés *TNF related apoptosis inducing ligand*)(Nagata, S 1997), y finalmente es importante remarcar que no siempre los factores actúan promoviendo supervivencia sino que algunos de ellos como el NGF, cuando se unen al receptor p75^{NTR} pueden inducir muerte (Nykjaer, A y col. 2005).

1.4. LAS MOTONEURONAS Y FACTORES NEUROTRÓFICOS

Desde que se descubrió el NGF como prototipo de molécula trófica que regula la supervivencia de distintas subpoblaciones de neuronas, han sido identificados y caracterizados a nivel molecular otros factores (Ver tabla 7). En esta lista se incluyen la familia de las neurotrofinas, donde todos los miembros promueven la supervivencia de las MNs, excepto el NGF (Barde, YA 1990; Henderson, CE y col. 1993; Hughes, RA y col. 1993). Las MNs en cultivo también responden a todos los factores de la familia de ligandos del GDNF (GFLs, del inglés *GDNF Family Ligands*)(Airaksinen, MS y Saarma, M 2002). Todos estos ligandos mencionados hasta ahora se unen a receptores con

actividad tirosina quinasa intrínseca, pero también se han descubierto otros factores que promueven la supervivencia a través de otro tipo de receptores que no tienen esta actividad, como es el caso del receptor gp130 y LIFR β . A estos receptores se unen los factores neurotróficos de la familia de ligandos de la interleuquina 6 (IL-6, del inglés *Interleukine*), a la cual pertenecen los siguientes miembros: el factor neurotrófico ciliar (CNTF, del inglés *Ciliary Neurotrophic Factor*), *Leucemia Inhibitory Factor* (LIF), cardiotrofina 1 (CT-1, del inglés *Cardiotrophin-1*) y *Cardiotrophin-1-Like Cytokine* (CLC)(Nakashima, T y Hamashima, Y 1979; Arakawa, Y y col. 1990; Pennica, D y col. 1995).

Otros factores que promueven la supervivencia de las MNs son el factor de crecimiento de insulina (IGF-1, del inglés *Insulin-Like Growth Factor 1*); (IGF-2, del inglés *Insulin-Like Growth Factor 2*) (Arakawa, Y y col. 1990) (Neff, NT y col. 1993); el factor de crecimiento hepático (HGF, del inglés *Hepatocyte Growth Factor*) (Wong, V y col. 1997) (Ebens, A y col. 1996) y el factor endothelial vascular del crecimiento (VEGF, del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*)(Van Den Bosch, L y col. 2004).

Familia de Factores		Receptor en MNs
Familia de las neurotrofinas	<i>Brain derived Neurotrophic Factor</i> (BDNF)	TrkB p75 ^{NTR}
	Neurotrofina-3(NT-3)	TrkC p75 ^{NTR}
	<i>Neurotrofina-4/5 (NT-4/5)</i>	TrkB p75 ^{NTR}
Familia de ligandos del GDNF	<i>Glial-derived Neurotrophic Factor</i> (GDNF)	c-Ret/GFR α -1
	Neurturina (NRTN)	c-Ret/GFR α -2
	Artemina (ARTN)	c-Ret/GFR α -3
	Persefina (PSPN)	c-Ret/GFR α -4
Insulin Like Growth Factor	IGF-I	IGFR-I
	IGF-II	<i>IGFR-I Manose-6P receptor</i>
<i>Hepatocyte Growth Factor</i>	HGF	c-Met

Familia de Factores		Receptor en MNs
Related Growth Factor	VEGF	VEGFR1
	PLGF	VEGFR2
	VEGFB, VEGFC y VEGFD	NRP-1
Familia CNTF/LIF	<i>Ciliary Neurotrophic Factor</i> (CNTF)	CNTFR α LIFR β gp130
	<i>Leukemia inhibitor Factor</i> (LIF)	LIFR β gp130
	<i>Cardiotrophin-1</i> (CT-1)	LIFR β gp130
	<i>Cardiotrophin-1 like cytokine</i> (CLC)	LIFR β gp130

Tabla 5: Resumen de los factores neurotróficos que promueven supervivencia en MNs.

En cultivos primarios de MNs obtenidas a partir de la médula espinal de embriones de pollo, la supervivencia promovida por el IGF es relativamente baja en comparación a la observada con otros factores neurotróficos (Hughes, RA y col. 1993). Sin embargo, cuando el IGF es combinado con otros factores como el CNTF, se potencian sus efectos promoviendo una mayor supervivencia. (Arakawa, Y y col. 1990). Ésta fue la primera demostración del efecto potenciador de un factor neurotrófico con otro en la supervivencia de estas neuronas. Estos resultados sugieren que *in vivo* las MNs dependen de más de un factor trófico para su supervivencia (Arakawa, Y y col. 1990). El gran número de factores neurotróficos que pueden actuar sobre las MNs indica que la regulación de la supervivencia de estas células es un proceso altamente complejo en el que influyen muchos aspectos y en el cual existe una cooperación entre moléculas diferentes. Además algunas de estas moléculas sólo se expresan durante la edad postnatal, indicando que los requerimientos de estas MNs por estos factores va cambiando durante el desarrollo y la edad postnatal (Sendtner, M y col. 2000). Es ampliamente conocido que todos estos factores actúan de forma específica sobre ciertas propiedades de las MNs, como son : la regulación de la transmisión sináptica, el crecimiento axonal, la arborización dendrítica y la estabilidad sináptica (Sendtner, M 1998).

1.4.1. FAMILIA DE LIGANDOS DEL GDNF (GFLs)

Los GFLs son importantes para el desarrollo y el mantenimiento de distintas poblaciones neuronales del SNC y SNP. De esta familia son conocidos 4 miembros: el GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor), Neurturina (NRTN), Artemina (ARTN) y Persefina (PSPN). El GDNF fue el primer miembro descubierto de esta familia (Lin, LF y col. 1993); poco tiempo después se purificó el segundo miembro, NRTN (Kotzbauer, PT y col. 1996), y por último, utilizando técnicas de homología, se clonaron los restantes miembros, ARTN (Baloh, RH y col. 1998b) y PSPN (Milbrandt, J y col. 1998).

Al contrario de lo que cabría pensar, los GFLs difieren mucho en homología con otros miembros de las otras familias de factores neurotróficos, como las neurotrofinas. Los GFLs pertenecen a la familia TGF- β , a pesar de que su homología en secuencia con los miembros de esta familia es sólo de un 20%. El hecho que hace que se incluyan en la familia TGF- β son los siete residuos de cisteína que poseen en la misma posición que otros miembros de esta superfamilia (Lin, LF y col. 1993; Arenas, E y col. 1995; Maxwell, GD y col. 1996; Trupp, M y col. 1996). Dentro de la superfamilia TGF- β , son el TGF- β 2 y la BMP-7 (Bone Marrow Protein 7) (Eigenbrot, C y Gerber, N 1997) los que tienen mayor homología con los GFLs. Los GFLs forman dímeros para unirse al receptor gracias a los puentes disulfuro que se crean entre cisteínas; estos dímeros hacen que la proteína sea más estable (Ibanez, CF 1998).

Como otras proteínas, los GFLs se producen en forma de precursores (prepro-GFLs). Durante la secreción, el péptido señal es eliminado y para que se active el pro-GFL debe producirse una rotura proteolítica, quedando liberado el GFL activo. Las proteasas específicas que rompen y activan a los precursores no han sido todavía identificadas. Una vez que están activos, los GFLs se unen a las cadenas de heparán-sulfatos de los proteoglucanos de la matriz extracelular, regulando de esta forma su difusión, aumentando la concentración local del ligando y ejerciendo su efecto en la célula diana (Airaksinen, MS y Saarma, M 2002).

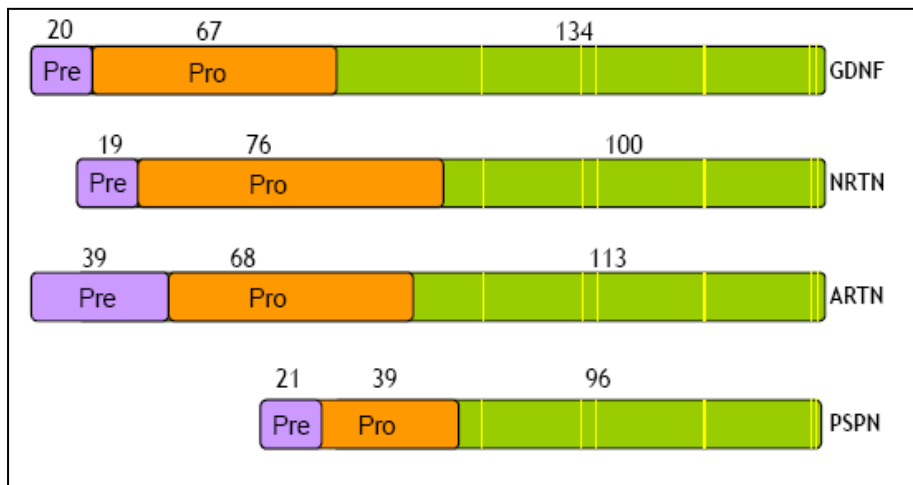


Figura 7: Estructura esquemática de los miembros de la familia del GDNF. Se muestra la longitud relativa de cada uno de ellos (como número de aminoácidos). La forma madura está representada en color verde, la secuencia que corresponde a la forma pro está en marrón y la forma precursora en violeta. En amarillo están las cisteínas conservadas.

Glial cell line-derived neurotrophic factor

El GDNF fue originariamente aislado, como un factor trófico para las neuronas dopaminérgicas (Lin, LF y col. 1993). Aunque actualmente se sabe que promueve la supervivencia de la mayoría de poblaciones del SNC, incluyendo a las MNs. Este factor también regula la diferenciación de neuronas del SNP, neuronas simpáticas, parasimpáticas, sensoriales y entéricas (revisado por (Sariola, H y Saarma, M 2003). En enfermedades neurodegenerativas, se ha observado que la administración exógena de GDNF tiene un efecto protector (Henderson, CE y col. 1994; Beck, KD y col. 1995; Olson, L 1997; Grondin, R y Gash, DM 1998). Pre-tratamientos con GDNF reducen la toxicidad debida al NMDA en neuronas corticales en cultivo (Nicole, O y col. 2001) y en cultivos organotípicos de cerebro (Bonde, C y col. 2000). *In vivo*, la oclusión de la arteria cerebral media y el posterior tratamiento con GDNF han demostrado su efecto protector (Abe, K y Hayashi, T 1997; Wang, Y y col. 2000). En animales adultos con daño neuronal, la administración de GDNF, disminuye los niveles de caspasa-3, incrementando la supervivencia

neuronal (Kilic, U y col. 2003). La administración intracraneal de GDNF reduce la severidad y el daño cerebral producido por isquemia en ratas neonatales (Ikeda, T y col. 2000). Inicialmente el GDNF fue considerado como un factor trófico con efectos neuroprotectores, protegía del daño producido por el kainato, por lesiones producidas en la médula espinal y por la isquemia, pero más tarde se vio que el GDNF tenía efectos en otros sistemas.

El GDNF ejerce también funciones participando en la nefrogénesis o en la diferenciación de las espermatogonias (Airaksinen, MS y Saarma, M 2002). La formación del riñón en el ratón ocurre a día embrionario E10.5, a partir del blastema metanéfrico enviando una señal que induce que el brote ureteral crezca insertándose dentro del blastema y se forme el riñón (Schedl, A y Hastie, ND 2000). El GDNF se expresa en altas concentraciones alrededor del blastema metanéfrico, la unión de este factor a su receptor activa distintas vías de señalización, que darán como resultado la nefrogénesis (Pachnis, V y col. 1993). Estudios *in vivo* también sugieren un papel del GDNF en la espermatogénesis (Kubota, H y col. 2004), participando en la maduración de las espermatogonias. GDNF normalmente es secretado por las células de Sertoli, que se localizan en los túbulos seminíferos. Estudios histológicos en ratones heterocigotos para GDNF, los cuales poseen una copia mutada de GDNF, muestran una espermatogénesis interrumpida y las espermátidas en posición anormal, demostrando que la falta de GDNF provoca alteraciones en el proceso de espermatogénesis (Kubota, H y col. 2004).

Neurturina (NRTN)

La NRTN fue el segundo factor identificado de esta familia (Kotzbauer, PT y col. 1996). Éste tiene una homología del 40% al GDNF y fue aislado a partir de células de ovario de hamster. NRTN tiene efectos similares a los del GDNF promoviendo la supervivencia de las neuronas simpáticas del ganglio cervical superior, neuronas sensoriales (Kotzbauer, PT y col. 1996; Baloh, RH y col. 1998a), neuronas dopaminérgicas (Henderson, CE y col. 1994) y MNs (Soler, RM y col. 1999). Junto con el GDNF, la NRTN también participa en la espermatogénesis. Ambas se expresan en las células de Sertoli (Widenfalk, J y col. 1997; Viglietto, G y col. 2000) y las dos promueven la proliferación

espermatogonial *in vitro* (Viglietto, G y col. 2000), aunque su función en la espermatogénesis *in vivo* todavía no esta muy clara.

Persefina (PSPN)

La PSPN, a igual que la NRTN, tiene un 40% de homología con el GDNF. Fue identificada mediante la técnica de PCR degenerada. La PSPN tiene su efecto sobre el sistema nervioso central y en MNs (Soler, RM y col. 1999) (Sariola, H y Saarma, M 2003), pero no en neuronas periféricas (Milbrandt, J y col. 1998).

Artemina (ARTN)

La ARTN ha sido el último miembro descubierto de esta familia. Al igual que la NRTN se ha encontrado por homología en la secuencia con los otros miembros de esta familia. ARTN presenta un grado de homología de un 45% con PSPN y NRTN, y de un 36% con el GDNF. Al igual que los otros miembros de esta familia, ARTN promueve la supervivencia de distintas poblaciones neuronales tanto del SNC como del SNP. Es capaz de mantener las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo, así como neuronas sensoriales del ganglio trigémico, nodoso, subpoblaciones de neuronas sensoriales de los ganglios espinales, neuronas simpáticas del ganglio superior y neuronas motoras. También se ha demostrado la capacidad de la ARTN para inducir diferenciación y proliferación de líneas celulares de neuroblastoma humano como las SH-SY5Y (Baloh, RH y col. 1998b).

1.4.1.1. Los receptores de la familia de ligandos del GDNF: Un complejo multiproteico

Los efectos biológicos de estos factores están mediados por la interacción y activación de receptores específicos de esta familia que se encuentran situados en la membrana plasmática de la célula. Estos receptores forman complejos multiproteicos formados por un receptor común que tiene un dominio transmembrana con actividad tirosina quinasa intrínseca, denominado Ret (*Rearranged during Transfection*) (Takahashi, M y col. 1988) y un miembro de la familia de receptores unidos a membrana a través de un enlace glicosil-

fosfatidil-inositol (*Glicosil-phosphatidil-inositol*, GPI) que carecen de dominio intracelular, llamado $GFR\alpha$ (*Glial Family Receptor α*) (Jing, S y col. 1992; Treanor, JJ y col. 1996). Existen hasta el momento cuatro co-receptores diferentes nombrados del 1 al 4; $GFR\alpha-1$, $GFR\alpha-2$, $GFR\alpha-3$ y $GFR\alpha-4$.

El Receptor Ret fue identificado por Takahashi y colaboradores (1985). Ret se expresa durante la embriogénesis en el sistema nervioso, en algunas zonas concretas del cerebro, en neuronas simpáticas, neuronas sensoriales, dopaminérgicas, noradrenalinérgicas (Pachnis, V y col. 1993) y en MNs (Soler, RM y col. 1999), sugiriendo un papel importante en la supervivencia y diferenciación de estas neuronas. También se observa expresión de Ret en el sistema excretor (Pachnis, V y col. 1993; Avantaggiato, V y col. 1994; Tsuzuki, T y col. 1995), concretamente en el riñón, participando en su formación. Algunos estudios han detectado Ret en células derivadas de tumores humanos de la cresta neural, en líneas de neuroblastoma, en células de feocromocitomas, así como en células provenientes de carcinomas de tiroides humanos y en los síndromes de neoplasia endocrina múltiple (MEN2A y MEN 2B) (Ikeda, I y col. 1990; Santoro, M y col. 1990). Mutaciones de este gen silenciosas o inactivantes son las que causan la enfermedad de Hirschsprung (Eng, C y col. 1996) (Pasini, B y col. 1996). El proto-oncogen ret codifica para un receptor con actividad tirosina quinasa en la parte intracelular. Se localiza en el cromosoma 10q11.2, en humanos y comprende 21 exones (Ishizaka, Y y col. 1989; Takahashi, M y col. 1991; Iwamoto, T y col. 1993). Ret es una proteína que se caracteriza porque en el extremo N-terminal (parte extracelular) tiene un dominio cadherina y una región rica en cisteínas. Posee un dominio transmembrana (TM), y en la parte intracelular, carboxi terminal, tiene dos dominios tirosina quinasa (TK) separados por 27 aminoácidos (Ver figura 9).

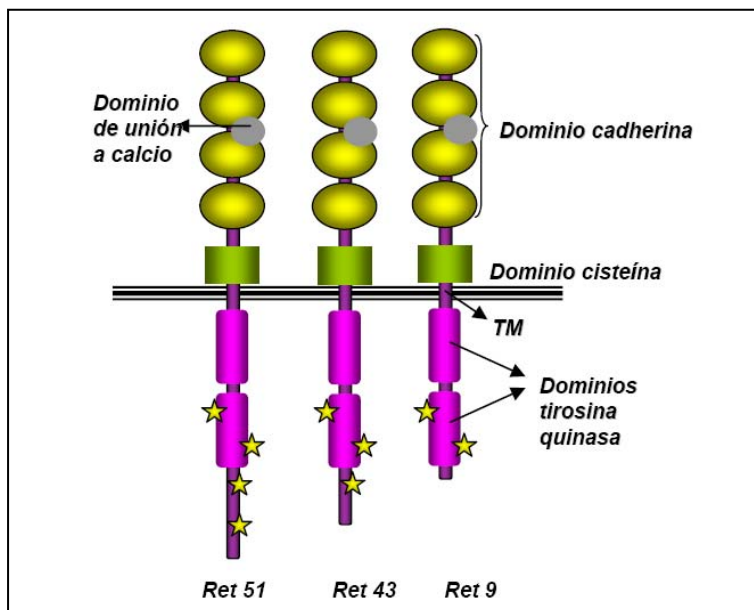


Figura 8: **Esquema de la estructura de Ret.** En la parte extracelular Ret contiene cuatro repeticiones de motivos cadherina y una región rica en cisteínas. En la parte intracelular contiene los dominios tirosina quinasa separados por 27 aminoácidos.

★ Lugar de fosforilación en tirosinas.

El dominio extracelular de Ret con sus cuatro repeticiones de dominios cadherina le confieren la posibilidad de unir iones calcio (Ca^{+2}). Esta capacidad hace que Ret difiera en estructura con otros receptores con actividad quinasa, como los de la familia de Trk. Algunos autores defienden la teoría de que Ret podría ser una recombinación de un gen ancestral de cadherinas con un gen tirosina quinasa (Anders, J y col. 2001). De los 28 residuos de cisteína que contiene en la parte extracelular, 27 de ellos están muy conservados entre las distintas especies, indicando la importancia de estas cisteínas en la correcta formación de los puentes disulfuro y en el plegamiento de la proteína (Ponder, BA 1999). En la parte extracelular Ret también contiene numerosos sitios de glicosilación (Takahashi, M y col. 1991). El estado de máxima glicosilación corresponde a una proteína madura de 170 kDa. También existe otra forma de maduración intermedia con un peso de 150 kDa, pero que sólo se encuentra en el retículo endoplasmático (Takahashi, M y col. 1993). En referencia al dominio intracelular de Ret existen tres isoformas diferentes (Ret51, Ret43 y Ret9) sintetizadas por *splicing* alternativo en la región 3' de la proteína (Tahira, T y col.

1990; Myers, SM y Mulligan, LM 2004). Estas isoformas difieren en el número de aminoácidos en la parte carboxi terminal (Fig. 10). Las dos formas mayoritarias son Ret51 y Ret9 (Carter, MT y col. 2001). Tanto Ret51 como Ret9 se asocian a complejos de señalización diferentes, lo que parece indicar un función fisiológica diferente (Borrello, MG y col. 2002) (Degl'Innocenti, D y col. 2004).

1.4.1.2. Señalización mediada por Ret

Ret es un receptor al cual se le unen los factores neurotróficos de la familia de los GFLs. Para que se desencadene la cascada de señalización intracelular, debe interaccionar el ligando con el receptor Ret y el co-receptor $GFR\alpha$. Como hemos mencionado anteriormente, estos co-receptores están unidos a membrana por un enlace GPI y no poseen un dominio intracelular. La estructura de todos los $GFR\alpha$ s es muy similar, compartiendo cerca de un 40% de homología en sus aminoácidos. La mayor afinidad de Ret por GDNF está mediada por el co-receptor $GFR\alpha-1$. La afinidad de la NRTN, ARTN y PSPN es, respectivamente, por el $GFR\alpha-2$, $GFR\alpha-3$ y $GFR\alpha-4$. (Airaksinen, MS y col. 1999; Baloh, RH y col. 2000; Saarma, M 2000). Sin embargo, *in vitro* se ha observado una interacción cruzada entre los factores neurotróficos de esta familia y los co-receptores (Jing, S y col. 1996; Baloh, RH y col. 1998a; Saarma, M 2000). Aunque estos factores tienen diferente afinidad por los diferentes $GFR\alpha$ s, el resultado final, es la activación de Ret, el cual, se fosforila en residuos de tirosina en su parte intracelular desencadenando toda la cascada de señalización.

Se ha descrito una interacción entre el receptor de las neurotrofinas, TrkA y Ret; parece que la unión de NGF a TrkA promueve la fosforilación de Ret51, pero no de Ret9. Esto pone en evidencia las interacciones cruzadas existentes entre los receptores de las neurotrofinas y otras familia de receptores (Sariola, H y Saarma, M 2003).

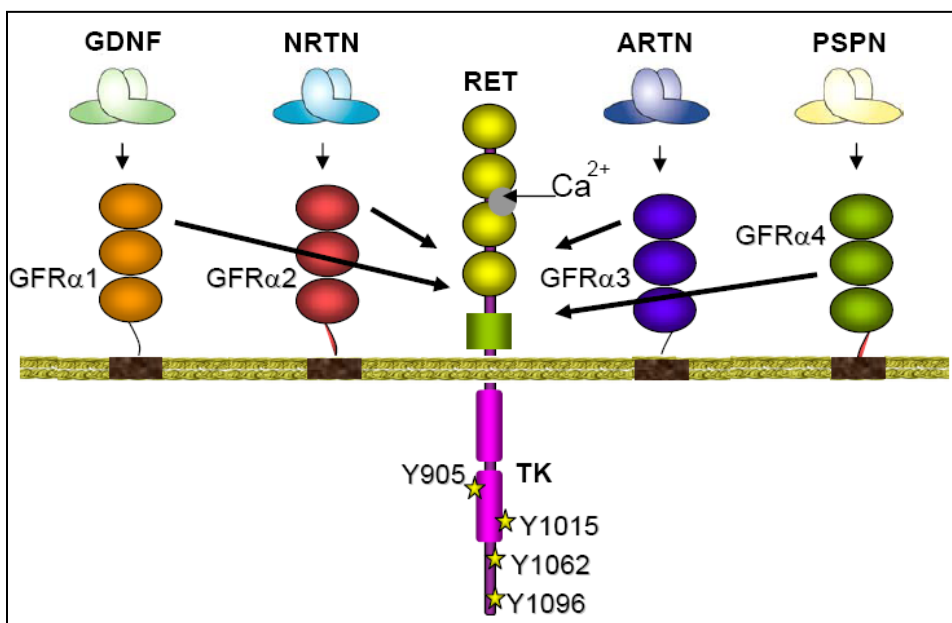


Figura 9: Todos los miembros de la familia del GDNF (GDNF, NRTN, ARTN y PSPN). En la figura aparece el receptor Ret, con actividad quinasa intrínseca y los co-receptores GFR α s (Airaksinen, MS y Saarma, M 2002).

La activación de Ret afecta a distintas proteínas adaptadoras en la cascada de señalización de este receptor. Estas proteínas se localizan tanto dentro como fuera de los dominios de membrana ricos en esfingolípidos y colesterol, que reciben el nombre de *lipid rafts*, del inglés “balsas de lípidos”. Los *lipid rafts* han sido propuestos por diferentes autores como microdominios de membrana, importantes para la señalización (Simons, K y Ikonen, E 1997). Estas regiones regulan la señalización intracelular. De la localización, tanto del receptor como del co-receptor, dependerá si se reclutan unas proteínas adaptadoras u otras. Por ejemplo, si la fosforilación de Ret tiene lugar en los *lipid rafts*, se recluta FRS2 (*Fibroblast Growth Factor Receptor Substrate-2*) activándose la vía de la Ras/MAPK; en cambio, si Ret se activa fuera de los *lipid rafts*, se recluta Shc activándose en esta ocasión la vía de la PI-3K/PKB. Algunos estudios han demostrado que los co-receptores GFR α s pueden localizarse en estos dominios en la membrana celular (Poteryaev, D y col. 1999).

1.4.1.2.1. Señalización mediada por Ret : *cis* y *trans*

Se han descrito dos formas de activación de Ret, una denominada de tipo *cis* y otra conocida con el nombre de *trans* (Figura 10). Estas dos formas de activar a Ret se describieron cuando, en algunos modelos estudiados se observó que había células que expresaban los GFR α s, y en cambio, no expresaban Ret, pero seguía habiendo señalización mediada por GDNF. Esto hizo que surgiera la idea de un tipo de señalización a la que se le denominó de tipo *trans*, en la cual los GFR α s están en forma soluble, unidos al factor neurotrófico. Este complejo GDNF/GFR α s soluble se une y activa a Ret (Yu, T y col. 1998).

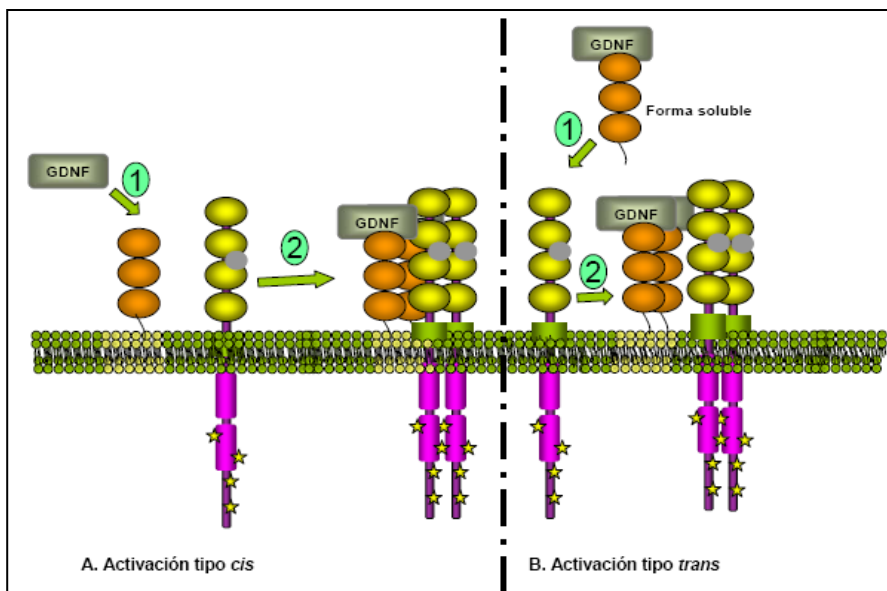


Figura 10: **Esquema de la activación de Ret tipo cis versus tipo trans.** A. Activación de tipo cis B.) Activación de tipo trans. (Trupp, M y col. 1997; Yu, T y col. 1998).

En cambio, en la señalización en *cis*, en primer lugar se forma un dímero entre el GDNF y GFR α , éste último localizado en los lipid rafts. Tras la unión se reclutan moléculas de Ret en los *lipid rafts* donde interaccionan con el complejo co-receptor/ligando y es entonces cuando el dímero de Ret se activa autofosforilándose en residuos de tirosina.

A partir de esta idea se han ido realizando estudios sobre los dos tipos de señalización y se ha visto que el tipo de señalización que hace cada una de ellas es bastante diferente. Por ejemplo, la activación tipo *trans* es más lenta y más sostenida en el tiempo en comparación con la tipo *cis*. Además, las vías de señalización activadas por cada uno de los tipos descritos anteriormente son diferentes. Aunque *in vitro* se han estudiado cada una por separado se ha observado que *in vivo* pueden darse los dos tipos de señalización a la vez (Airaksinen, MS y Saarma, M 2002).

1.4.1.2.2. Señalización por GDNF/GFR α dependiente de Ret

Ret activa distintas cascadas de señalización intracelular, las cuales regulan la supervivencia neuronal, la diferenciación, la proliferación, la migración, el crecimiento neurítico y la plasticidad sináptica. Existen 16 tirosinas susceptibles de ser fosforiladas en la parte intracelular de Ret 9, y 18 tirosinas en Ret 51, las tirosinas más estudiadas fosforiladas por la activación del receptor Ret son: la Y905, Y1015, Y1062 y la Y1096 (Coulpier, M y col. 2002). Todos estos residuos se han identificado como lugares de unión de diferentes proteínas intracelulares. En la siguiente tabla se muestra un resumen de los distintos residuos susceptibles de ser fosforilados de Ret, las proteínas adaptadoras que se unen y el tipo de señalización que median.

Como se observa en la tabla 6, dependiendo de la finalidad de la célula y del tipo de señal, se reclutarán unas proteínas u otras. Así, la fosforilación de Ret en la Y1015, promueve la activación de PLC- γ . Esta activación promueve la formación de inositol-3-fosfato (IP3 del inglés *Inositol-3-phosphate*) induciendo la salida de calcio desde los reservorios intracelulares y activando distintas proteínas que a su vez, activarán diferentes vías de señalización -revisado por (Saarma, M 2001)-. La fosforilación en la Y1062 permite la unión de varias proteínas adaptadoras como Shc y GAB1/2 activando la vía de la PI-3K/PKB, implicada en supervivencia. GAB1/2, también se asocia directamente a la subunidad reguladora de la PI-3K (subunidad p85) activando esta vía. La Y1062 también puede reclutar el complejo Shc/GRB2/SOS en este caso, se activa la vía Ras/MAPK (implicada en diferenciación) o la vía de la jun quinasa (*c-Jun N-terminal Kinase*, JNK)(Hayashi, H y col. 2000). Por debajo de estas vías se

activarán diferentes factores de transcripción que mediarán la supervivencia o la diferenciación de estas células

Residuo Fosforilado	Proteína Adaptadora	Señalización	Comentarios
Y687	Rac	Diferenciación lamedipodios	---
Y905	Grb7/10	---	---
Y1015	PLC γ	Supervivencia/Diferenciación	Salida de calcio desde los reservorios
Y1062	Enigma Shank3	Supervivencia/Diferenciación en Ret9	Vía Ras/MAPK Vía PI3/PKB
	IRS 1/2	---	---
	DOK4/5	---	---
	Shc/SHP2/Gab1/2	Supervivencia/Diferenciación	Vía Ras/MAPK Vía PI3/PKB
	FRS2/SHP2/Grb2	Diferenciación	Vía Ras/MAPK
	Otras	---	JNK/MAPK/ERK5
Y1096	Grb2	Diferenciación	Vía Ras/MAPK

Tabla 6: Resumen de la señalización mediada por Ret.

Algunos autores han descrito la importancia de la fosforilación en la Y1062 en procesos como la histogénesis del sistema nervioso entérico y la nefrogénesis (Jijiwa, M y col. 2004). En algunos casos, la unión de las proteínas adaptadoras al receptor depende de la fosforilación y de los dominios SH2, como ocurre con Shc, FRS2 e IRS1/2. En cambio, en otras ocasiones, estas proteínas adaptadoras como Enigma o Shank3 se unen al receptor, concretamente a la isoforma de Ret9, independientemente del estado de fosforilación (Schuetz, G y col. 2004).

Puede existir una señalización cruzada entre receptores de familias diferentes. Se ha descrito una interacción entre los receptores acoplados a proteínas G y Ret. Los receptores acoplados a proteínas G activan a la adenilato ciclasa incrementándose los niveles de cAMP. El cAMP es un segundo mensajero en la cascada de señalización de la PKA y participa en la regulación de la supervivencia neuronal, regeneración y remodelación del cono

de crecimiento axonal mediado por factores neurotróficos. Los niveles intracelulares de cAMP modulan la función de Ret a través de la fosforilación de la serina 696 (S696). Esta fosforilación regula la actividad de Rac y por tanto la formación de lamelipodios. Así, cuando la S696 de Ret se fosforila, inhibe la fosforilación de la tirosina 687 (Y687), induciendo la formación de lamelipodios. Los niveles de cAMP están regulados por el balance entre la adenilato ciclasa y la cAMP fosfodiesterasa. La regulación cruzada de estos dos receptores no está muy clara, pero se sabe que tienen un claro papel en la formación de estructuras del citoesqueleto.

No es el único sistema cruzado que se conoce entre Ret y otros receptores. Krieglstein y colaboradores demuestran tanto *in vivo* como *in vitro*, que el efecto neurotrófico del GDNF requiere TGF- β . Describen como TGF- β recluta a los GFR α s en los *lipid rafts* y éstos desencadenan la señalización junto con Ret.

Por último, Mildbrandt, Johnson y colaboradores han descrito una interacción entre TrkA y Ret independiente de los GFR α s (Tsui-Pierchala, BA y col. 2002).

Existen más tirosinas sensibles a fosforilación en Ret como son: la Y687, Y826 o Y1029, pero todavía no se conoce mucho acerca de las proteínas que activan. Sólo se ha descrito, que la fosforilación en los residuos de Y752 y Y928 son lugares de unión de STAT3 (Schuringa, JJ y col. 2001). A modo de resumen de la señalización mediada por Ret, se muestra la siguiente figura.

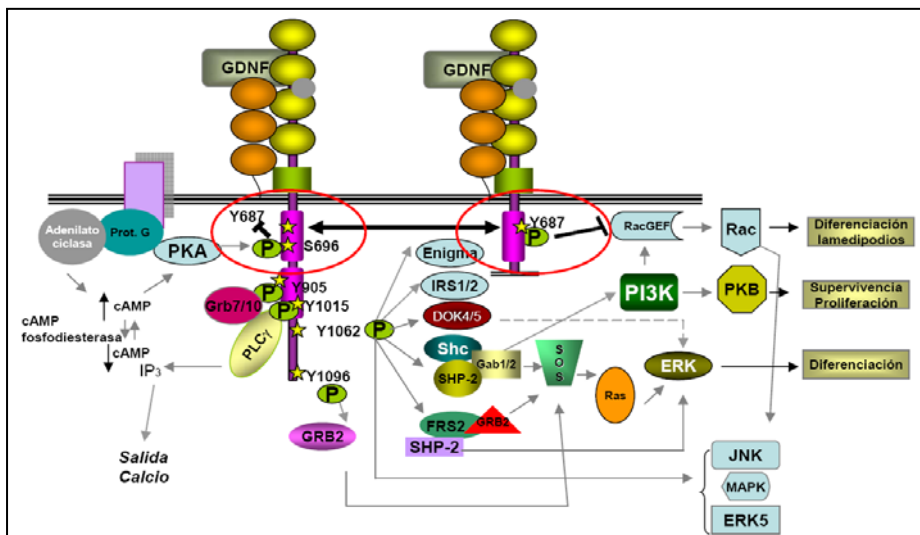


Figura 11: Proteínas adaptadoras unidas a residuos de Ret fosforilados.

1.4.1.2.3. Señalización por GDNF/GFRα independiente de Ret

En algunas áreas del sistema nervioso, GDNF puede activar diferentes vías independientemente de la unión a Ret (Trupp, M y col. 1997). En líneas celulares y en cultivos primarios de neuronas deficientes en Ret, GDNF es capaz de activar Shc y fosforilar a las MAPK, PLC-γ y activar los factores de transcripción CREB y fos. Estos resultados sugieren que existe una señal mediada por GFLs independiente de Ret, pero con la ayuda de otras proteínas transmembrana. Por otro lado, GDNF induce la fosforilación de Met en sistemas deficientes en Ret, pero que poseen GFRαs (Popsueva, A y col. 2003). También se ha descrito una posible señalización independiente de Ret que implica a la molécula de adhesión celular NCAM (Paratcha, G y col. 2003). Cuando GFRα-1 está unido a NCAM, GDNF se une con alta afinidad y activa en la parte citoplasmática a Fyn (proteína de la familia de Src) o a FAK (quinasa de adhesión focal). Si GDNF no está presente, la asociación de NCAM con GFRα-1 inhibe la adhesión celular (Paratcha, G y col. 2003). La habilidad de GFRα-1 para modular la adhesión celular modulada por NCAM en ausencia de GDNF sugiere un papel diferente por GFRα-1/NCAM y GDNF/ GFRα-1/NCAM.

1.4.1.3. *Knock out* para los ligandos y los receptores de los GFLs

Todos los estudios que se detallan a continuación con ratones deficientes KO para los receptores y ligandos de la familia de GFLs nos han permitido conocer mejor la señalización mediada por esta familia y su implicación en el desarrollo de algunas estructuras. En el análisis de estos ratones se ha observado que existen muchas similitudes entre el fenotipo KO del ligando y el co-receptor al cual se une. Los ratones KO para Ret, GDNF o GFR α -1 mueren antes de nacer, pero todos ellos comparten un fenotipo similar. En estos ratones se observa que no tienen una correcta formación del riñón y deficiencias en el número de neuronas parasimpáticas y neuronas entéricas debajo del estómago. Por el contrario, los ratones KO para NRTN o GFR α -2 son viables y fértiles. Pero, al igual que ocurre con los KO para GDNF o GFR α -1, también tienen déficits en las neuronas parasimpáticas y entéricas. Además, la inervación colinérgica está ausente en las glándulas salivar y lacrimal y reducida en la vejiga. En el ratón KO para GFR α -2, se observa un crecimiento más lento, mientras que el KO de NRTN crece con normalidad. Este retardo en el crecimiento puede deberse a la malnutrición del animal debida a las deficiencias que padece en la glándula salivar y a la disminución de la inervación en el tracto digestivo y páncreas. A modo de resumen, los fenotipos observados en los ratones KO para los co-receptores y ligandos de la familia de GFLs se muestran a continuación:

En Motoneuronas. Los factores neurotróficos producidos por el músculo y las células gliales actúan sinérgicamente como soporte en la supervivencia de las motoneuronas. Durante el desarrollo, el GDNF es producido por las células de Schwann y el tejido diana. Esto proporciona un entorno adecuado para la supervivencia de las MNs. En cambio, en el KO para GDNF y GFR α -1 hay una pérdida sustancial de motoneuronas tanto a nivel espinal como craneal, siendo entre un 20-40% dependiendo de la región.

Ratón KO		Ret	Gdnf	Gfra1	Nrtn	Gfra2
		Letal P0	Letal P0	Letal P0	Crecimiento normal Fértil	Ojos secos Crecimiento lento Fértil
SNS	Trigeminal	ND	NS	NS	Algunas neuronas	Algunas neuronas
	Nodoso	ND	Pérdida 40%	NS	NS	NS
	DRG	ND	Pérdida 23%	NS	Algunas neuronas	ND
SNA	Simpático	Pérdida 100%	Pérdida 35%	NS	NS	NS
	Para-simpático	Algunas neuronas	ND	ND	40% a P0 No fibras en lacrimal (adulto)	Pérdida 80% No fibras en lacrimal (adulto)
SNE	--	No neuronas en estómago y vejiga	No neuronas en estómago y vejiga	No neuronas en estómago y vejiga	Pérdida 40% en fibras del intestino	Pérdida 45% en fibras del intestino
SNC	Motor	ND	MNs 22-31%	MNs 24%	NS	NS
	Cerebro	No grandes defectos	NS	NS	NDef	NDef
Otros		No riñones	No riñones	No riñones	NDef	NDef

Tabla 7: **Resumen del fenotipo de los ratones KO para GFLs.** ND: No determinado, NS: No significativamente diferente, NDef.: No definido, SNS: Sist. Nervioso Sensorial, SNA: Sist. Nervioso Autonomo, SNE: Sistema Nervioso entérico, SNC: Sist. Nervioso central, DRG: Dorsal Root Ganglia (del inglés neuronas del ganglio dorsal).

Estos resultados demuestran la importancia tanto del GDNF como de GFR α -1 durante el desarrollo (Airaksinen, MS y Saarma, M 2002). También existe una pérdida de poblaciones de MNs en el ratón KO para Ret. Estudios *in vitro* con MNs procedentes del KO para Ret, han demostrado que la administración exógena de NRTN promueve la supervivencia de las MNs, indicando que GFR α -1 media la supervivencia de estas MNs. En el KO para GFR α -2, no hay una pérdida evidente en el número de MNs (Airaksinen, MS y Saarma, M 2002).

1.4.2. LA FAMILIA DE LAS NEUROTROFINAS

La familia de factores neurotróficos más estudiada es la familia de las neurotrofinas. El primer miembro de esta familia de factores descubierto fue el NGF. Se describió alrededor de los años 50 como la primera molécula soluble capaz de promover la supervivencia de distintas poblaciones neuronales (Purves, D y col. 1988; Oppenheim, RW 1991), como subpoblaciones de células simpáticas y neuronas sensoriales de los ganglios espinal y trigeminal (Levi-Montalcini, R 1987).

Actualmente se ha visto que son responsables de más funciones como la regulación del crecimiento neurítico, regulación de la sinapsis y el mantenimiento de la supervivencia (Lewin, GR y Barde, YA 1996). Después del descubrimiento del NGF, años más tarde y por homología estructural se identificaron 3 miembros más en el genoma de mamíferos. Actualmente esta familia está constituida por cuatro miembros: Factor de crecimiento nervioso (*Nerve Growth Factor*, NGF), factor neurotrófico derivado de cerebro (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*, BDNF), neurotrofina-3 (*Neurotrophin-3*, NT-3), neurotrofina-4/5 (*Neurotrophin 4/5*, NT4/5), y dos más que no se encuentran en todos los vertebrados, la neurotrofina-6 (*Neurotrophin 6*, NT-6) y neurotrofina-7 (*Neurotrophin 7*, NT-7). Estos factores neurotróficos ejercen su función uniéndose a dos tipos de receptores: Trk (*Tropomyosin-related kinase*) y p75^{NTR}. Éstos no comparten homología en su secuencia y además, activan diferentes vías de señalización. Frente a algunos estímulos Trk y p75^{NTR} pueden colaborar mediando los efectos de las neurotrofinas (Roux, PP y Barker, PA 2002).

Las Neurotrofinas

El **NGF**, es el factor neurotrófico mejor estudiado y el primero en ser descubierto. Con excepción de la NT4/5, que no se detecta en aves, todos los miembros de esta familia se encuentran altamente conservados en vertebrados. Sólo los genes nt-6 y nt-7 que codifican para las neurotrofina 6 (NT-6) y la neurotrofina 7 (NT-7), y que fueron identificados en peces, no se han encontrado sus ortólogos en mamíferos (Gotz, R y col. 1994; Nilsson, AS y col. 1998). NGF es sintetizado y secretado por los tejidos diana de las neuronas simpáticas y sensoriales, dando el soporte trófico necesario a todas aquellas

neuronas que con sus axones llegan hasta estos tejidos (Farinas, I y col. 1998) (Ringstedt, T y col. 1999) (Huang, EJ y Reichardt, LF 2001).

BDNF durante el desarrollo embrionario promueve la supervivencia de ciertas poblaciones neuronales en el SNC y en el SNP. En la edad adulta, BDNF modula la plasticidad sináptica (Mowla, SJ y col. 1999; Schinder, AF y Poo, M 2000). Los mecanismos de acción de este factor, pueden ser tanto autocrinos como paracrinos, al menos en modelos como las neuronas del ganglio dorsal (von Bartheld, CS y col. 1996). Experimentos *in vitro* han demostrado el papel protector, frente al daño neuronal, mediado por esta familia de factores. Por ejemplo, en neuronas hipocámpales despolarizadas por kainato (Zafra, F y col. 1990) o en procesos de isquemia (Lindvall, O y col. 1992) aumentan considerablemente la secreción de BDNF y de NGF. En otros tipos celulares como, las células de Schwann, los fibroblastos y los mastocitos activados, ante un estímulo dañino inducen la producción de citoquinas lo que hace que se incrementen los niveles de producción de neurotrofinas (Levi-Montalcini, R y col. 1996).

Las neurotrofinas inicialmente son sintetizadas como precursores inmaduros o pro-neurotrofinas, las cuales por rotura proteolítica se convierten en proteínas maduras de unos 12 kDa. Las furinas y las pro-conversinas son las proteasas encargadas de producir este corte dando lugar a la neurotrofina activa (Chao, MV 2003). Todas estas enzimas cortan después de un residuo básico (Arg-Arg, Lys-Arg), en una zona altamente conservada, liberando el extremo carboxi terminal que corresponde a la proteína madura (Lessmann, V y col. 2003). El dominio amino terminal o prodominio de la proneurotrofina, parece ser necesario para el correcto plegamiento de la proteína (Chao, MV 2003). En algunos modelos, se ha descrito que el pro-NGF puede ser biológicamente activo, mediando algunas vías intracelulares de señalización (Schor, NF 2005). Los péptidos maduros contienen regiones variables e invariables que definen las propiedades individuales de cada neurotrofina. A pesar de ser muy diferentes en su secuencia primaria, todos los miembros de esta familia poseen estructuras terciarias semejantes. Estas neurotrofinas maduras, se sintetizan como monómeros capaces de formar dímeros activos, gracias a las cisteínas que poseen en su secuencia (Chao, MV y Hempstead, BL 1995).

1.4.2.1. Los receptores de la familia de las neurotrofinas: Trk y p75^{NTR}.

Una vez formados estos dímeros activos, las neurotrofinas para producir su efecto se unen a sus receptores específicos.

Los receptores Trk. Existen diferentes Trk (TrkA, TrkB y TrkC), codificados por 3 genes diferentes. Además, cada una de estas formas sufre *splicing* alternativo dando lugar a más isoformas. Cada ligando de esta familia tiene mayor afinidad por un receptor en concreto. Así NGF se une a TrkA, BDNF y NT4/5 se unen a TrkB (Klein, R y col. 1990; Cordon-Cardo, C y col. 1991; Klein, R y col. 1991), mientras que NT-3 se une a TrkC (Barbacid, M 1995; Bothwell, M 1995), aunque puede haber una interacción cruzada, como ocurre con los GFLs. En algunas ocasiones, NT 4/5 pueden activar TrkA, así como, NT 3 puede activar TrkA y TrkB (Segal, RA y Greenberg, ME 1996). TrkA fue originariamente descrito como una proteína oncogénica fusionada a la tropomiosina no muscular en un carcinoma de colon humano. (Martin-Zanca, D y col. 1986). El aislamiento y la caracterización molecular de este oncogen quimérico permitió la posterior identificación del alelo normal, el protooncogen *trkA* (Martin-Zanca, D y col. 1989). Este protooncogen se vio que pertenecía a la familia de receptores transmembrana tirosina quinasa y se expresaba de forma discreta en poblaciones neuronales y era activado por neurotrofinas específicas (Martin-Zanca, D y col. 1989) (Ip, NY y Yancopoulos, GD 1994). La estructura de los Trk no difiere demasiado de otros receptores con actividad tirosina quinasa. Como proteínas maduras tienen un peso aproximado de 140 kDa. En su extremo más amino terminal, que corresponde a la parte extracelular, poseen dos dominios ricos en cisteínas (*Cystein Rich Domain*, CRD), interrumpidos por tres dominios ricos en leucinas (*Leucine Rich Domain*, LRD). El segundo LRD participaría en la modulación, posiblemente indirecta, de la interacción con el ligando (Wiesmann, C y col. 1999). Todavía en la región extracelular y a continuación de las estructuras descritas anteriormente, encontramos dos dominios de inmunoglobulinas (IgG) (Windisch, JM y col. 1995), al parecer responsables de la unión de la neurotrofina al receptor, sobretodo el dominio IgG más próximo a la membrana celular (Perez, P y col. 1995; Urfer, R y col. 1995; Urfer, R y col. 1998; Ultsch, MH y col. 1999). En la

parte intracelular encontramos el dominio tirosina quinasa que seguido de una corta extensión completa la proteína.

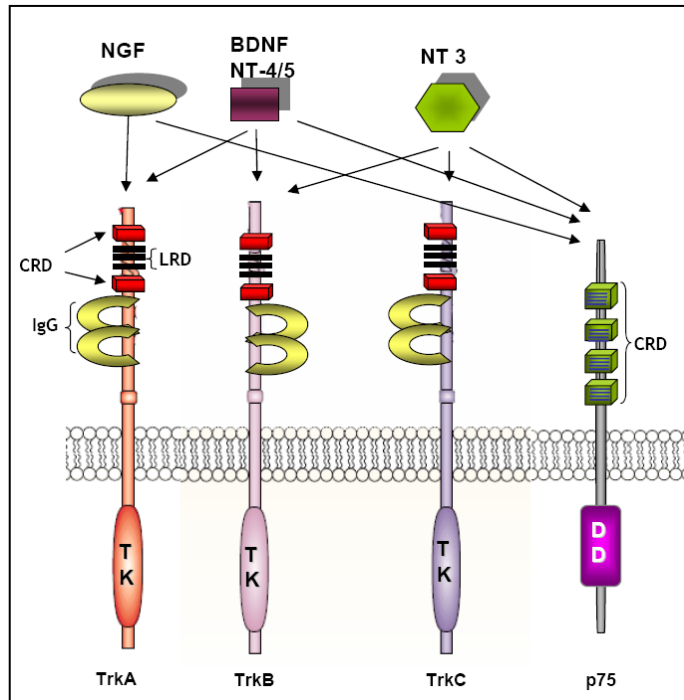


Figura 12: **Esquema de las neurotrofinas y sus receptores.** TK: Tirosina quinasa; IgG: Inmunoglobulinas; CRD: Dominio rico en cisteínas; LRD: Dominio rico en leucinas; DD: Dominio de muerte (adaptado de (Chao, MV 2003)).

La unión de homodímeros de las neurotrofinas al receptor produce la dimerización del mismo, y la autofosforilación en residuos de tirosina (Y) que se encuentran en la parte intracelular del receptor (Y490, Y670, Y674, Y675 y Y685, en el TrkA humano), seguido de la fosforilación adicional de siete residuos tirosina intracelulares. Una vez fosforilados estos residuos, se unen al receptor diferentes proteínas adaptadoras, que regularán la supervivencia a través de la vía Ras/MAPK, PI-3K/PKB o PLC γ (Segal, RA y Greenberg, ME 1996; Kaplan, DR y Miller, FD 2000) (Ver apartado señalización).

El receptor p75^{NTR}. Cuando fue clonado este receptor (Chao, MV y col. 1986; Johnson, D y col. 1986), se le atribuyó el nombre de receptor de baja afinidad para las neurotrofinas, pero hoy se sabe que la afinidad de las neurotrofinas a p75^{NTR} no depende únicamente del receptor sino que hay más

factores que lo determinan (Rodríguez-Tebar, A y col. 1990; Squinto, SP y col. 1991). p75^{NTR} fue el primer miembro identificado de la familia de los receptores del TNF; a esta familia actualmente pertenecen cerca de 25 receptores, entre los que se encuentran el TNFR1 (*Tumor Necrosis Factor Receptor1*), TNFR2 (*Tumor Necrosis Factor Receptor2*), FasR, RANK y CD40 (Baker, SJ y Reddy, EP 1998). Los receptores de esta familia contienen en la parte extracelular, distintos lugares de glicosilación y 4 repeticiones de seis cisteínas (Yan, H y Chao, MV 1991; Baldwin, AN y col. 1992). Cada uno de estos dominios cisteína (*Cistein Rich Domain*, CRD1-CRD4) contienen tres intracadenas de puentes disulfuro (Smith, CA y col. 1994). Aunque algunos modelos experimentales han sugerido que CDR3 es el responsable de la unión de la neurotrofina (Yan, H y Chao, MV 1991; Baldwin, AN y col. 1992). En la parte intracelular, p75 contiene varios motivos de interacción proteína-proteína. El más prominente de ellos es el dominio de muerte celular (*Death Domain*, DD) que se extiende unos 90 aminoácidos. Otros dominios en la fracción intracelular de p75 incluyen un dominio PDZ, definido por la presencia de una secuencia consenso de unión de proteínas de tipo PSD (*Postsynaptic Density Proteins*), un dominio de unión a proteínas G y un dominio de unión a proteínas de la familia de TRAF (*TNF Receptor Associated Factor*) (Ye, X y col. 1999) (Barker, PA 1998). También en la parte intracelular contiene lugares de palmitoilación (Grob, PM y col. 1985; Taniuchi, M y col. 1986; Barker, PA y Shooter, EM 1994) y lugares de fosforilación en serinas y treoninas (Grob, PM y col. 1985; Taniuchi, M y col. 1986).

1.4.2.2. Señalización por neurotrofinas mediada por Trk

La señalización mediada por neurotrofinas es muy similar a la que ocurre con otros receptores que poseen actividad tirosina quinasa. La unión del factor neurotrófico a su receptor específico promueve la dimerización del receptor. Este hecho induce actividad quinasa intrínseca del receptor, autofosforilándose en residuos de tirosina específicos (Weiss, A y Schlessinger, J 1998). Estos residuos fosforilados son sustrato para diferentes proteínas citoplasmáticas con funciones tanto adaptadoras como ejecutoras. Algunas de estas proteínas interactúan con el receptor gracias a los dominios SH2 (*Src*

homology domain 2), que reconocen tirosinas fosforiladas (Cohen, GB y col. 1995). Otras proteínas adaptadoras poseen dominios SH3 (*Src homology domain 3*), que también les ayuda a interactuar con el receptor u otras proteínas de la vía, gracias a que reconocen regiones aminoacídicas ricas en prolina. Las vías de señalización mediada por receptores con actividad tirosina quinasa han estado especialmente estudiadas con el modelo de las neurotrofinas y los receptores Trk. Así, sabemos que la interacción de NGF con TrkA promueve la autofosforilación del receptor en residuos tirosina en su parte intracelular. Trk A se fosforila en la tirosina 490 (Y490), Y670, Y674, Y675, y Y785 (McCarty, JH y Feinstein, SC 1998). La fosforilación en la Y490 es sustrato de unión para la proteína Shc y FRS-2. El dominio SH2 del receptor, es reconocido por la proteína Shc, el cual es fosforilado por la actividad quinasa del propio receptor. Una vez fosforilada es capaz de reclutar el complejo Grb2/Sos. La proteína Grb2, a igual que las proteínas mencionadas anteriormente, tiene un dominio SH2 que le permite interactuar con Shc fosforilado y un dominio SH3 que le permite interactuar con Sos (Rozakis-Adcock, M y col. 1992; Rozakis-Adcock, M y col. 1993; Cohen, GB y col. 1995). La función de Sos es hacer de intercambiador de nucleótidos de guanina (GDP/GTP) (Basu, T y col. 1994), activando a la proteína Ras. Esta pequeña proteína de unos 20 kDa se encuentra en la membrana gracias a que se encuentra farnesilada (Casey, PJ 1995). Por tanto, la activación de Shc, transloca al complejo Grb2/Sos a la membrana plasmática, donde Sos intercambiará GDP de Ras por GTP, promoviendo la activación de Ras (McCormick, F 1994). A partir de este complejo de proteínas formado, se desencadena la activación de la vía Ras/MAPK implicada en diferenciación. Por otra parte, Shc/Grb2 pueden unirse a IRS1/2-Gab1 y activar la vía PI-3K/PKB mediando la supervivencia de estas células. La fosforilación de la Y785, une la fosfolipasa C γ (PLC γ) y la quinasa homóloga a Csk (CHK, del inglés *Csk homologous kinase*) (Obermeier, A y col. 1993; Middlemas, DS y col. 1994; Kaplan, DR y Miller, FD 2000; Manie, S y col. 2001). La unión de PLC γ al receptor provoca la fosforilación y su activación (Vetter, ML y col. 1991; Obermeier, A y col. 1993). Una vez activada, PLC γ degrada fosfolípidos de membrana, para formar gliacilglicerol (DAG) e inositol-3-fosfato (IP3, del inglés

inositol-3-phosphate). IP₃ se une a unos receptores específicos del retículo endoplasmático promoviendo la salida de iones de calcio (Ca²⁺) desde el interior de los reservorios al espacio intracelular (Berninger, B y col. 1993). El DAG conjuntamente con el calcio, actúan como cofactores de la proteína quinasa C (PKC, del inglés *Protein kinase C*), (Berridge, MJ 1993). La activación de la vía PLC γ /PKC puede modular tanto la supervivencia como la diferenciación neuronal mediante la interacción directa o indirecta con los componentes de la vía de señalización de Ras (Downward, J y col. 1990; Thomas, SM y col. 1992; Wood, KW y col. 1992). A parte de estas proteínas existen algunas más que pueden unirse al receptor aunque se desconoce el lugar exacto de unión y su función en la señalización (Friedman, B y col. 1995).

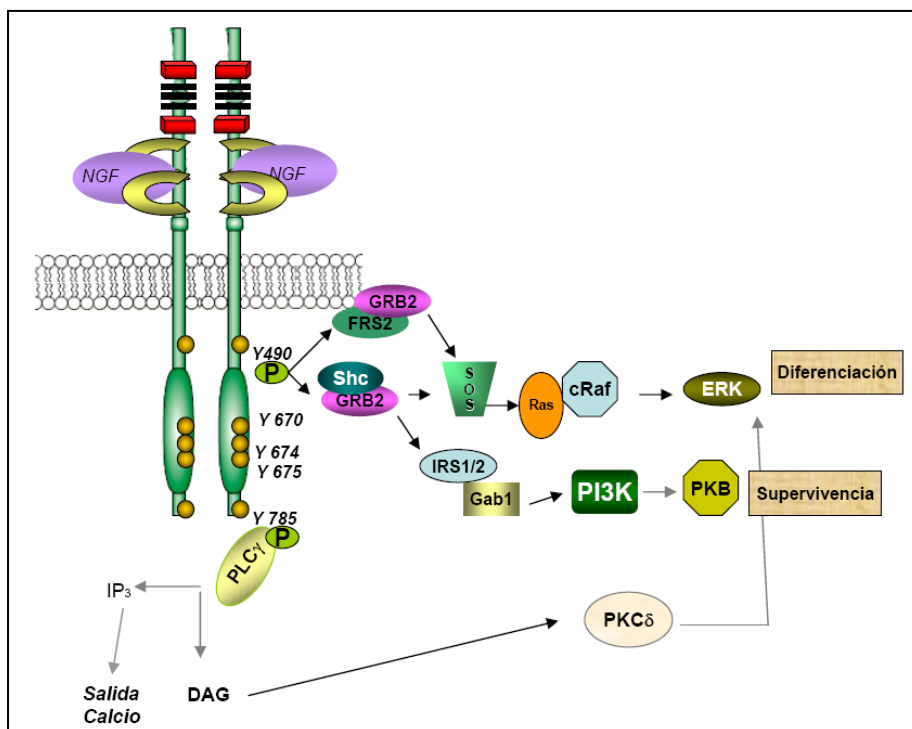


Figura 13: Dimerización y autofosforilación de los receptores Trk. Esquema del reclutamiento de diferentes proteínas adaptadoras y ejecutoras en la transducción de señal a través de receptores con actividad tirosina quinasa.

1.4.2.3. Señalización por neurotrofinas mediada por p75^{NTR}

La activación de p75^{NTR} por neurotrofinas propicia la unión de diferentes proteínas adaptadoras, promoviendo tanto vías de muerte como vías implicadas en supervivencia. A diferencia de lo que ocurre con los receptores Trk, la unión de la neurotrofina al receptor p75^{NTR} no provoca la dimerización del mismo. De esta forma un sólo monómero de p75^{NTR} es suficiente para desencadenar la señalización (He, XL y Garcia, KC 2004). Respecto a la señalización mediada por p75^{NTR} podemos distinguir tres modelos:

1. Cuando la neurotrofina se une únicamente a p75^{NTR}. Las neurotrofinas en su forma madura interacciona con p75^{NTR}. La unión de estos factores al receptor promueven vías implicadas en muerte. La unión de estas neurotrofinas hacen que en la parte intracelular del receptor se recluten diferentes proteínas adaptadoras como: NRIF1 (*Neurotrophic Receptor Interacting Factor1*), NRIF2 (*Neurotrophic Receptor Interacting Factor2*), NADE (*Neurotrophic associated cell death executor*), FAP1 (*Fas associated phosphatase 1*), TRAF (*TNF Receptor Associated Factor*), NRAGE (*Neurotrophin Receptor Interacting MAGE Homolog*), RhoA, ARMS (*Ankyrin Repeats Membrane Spanning Molecule*) y SC-1 (*Schwann Cell Factor*) entre otras. Algunas de ellas se unen al dominio de muerte (DD, del inglés *Death Domain*) de p75^{NTR} activando cascadas de señalización y provocando la muerte celular.

2. En otras ocasiones la co-expresión de p75^{NTR} con el receptor Trk parece silenciar vías de muerte a la vez que potencia vías de supervivencia mediadas por p75^{NTR}, como la vía NFκB. La expresión de los dos receptores también favorece la interacción entre ellos, actuando p75^{NTR} como co-receptor de Trk, y aumentando la especificidad de Trk por una neurotrofina en concreto. En esta situación p75^{NTR} también es capaz de interactuar con Shc y promover vías de supervivencia (Nykjaer, A y col. 2005).

3. La unión de la forma inmadura de NGF (proNGF) a p75^{NTR}. El descubrimiento de que proNGF se unía preferencialmente a p75^{NTR}, señalizando apoptosis en células que expresan tanto TrkA como p75^{NTR}, (Lee, R y col. 2001) planteó un nuevo escenario en la que la *ratio* proNGF/NGF maduro es un factor de regulación crítico para el mantenimiento del balance entre supervivencia y muerte neuronal (Chao, MV y Bothwell, M 2002).

Posteriormente, se ha comprobado que proNGF actúa a través de un complejo de dos receptores, p75^{NTR} y la proteína transmembrana tipo I sortilina (Nykjaer, A y col. 2005). La sortilina actúa como un co-receptor, imprescindible para la transmisión de señales proapoptóticas en respuesta a proneurotrofinas.

1.4.2.4. KO para las neurotrofinas y sus receptores

En los últimos años, los estudios de recombinación homóloga y los animales KO han permitido aproximar fisiológicamente la implicación de las diferentes neurotrofinas y sus receptores durante el desarrollo.

En la tabla 8 se muestran las anomalías que presentan los ratones deficientes en algunas neurotrofinas y sus receptores.

FENOTIPOS DE LOS RATONES KNOCK OUT PARA LAS NEUROTROFINAS Y RECEPTORES Trk			
Mutación	Comportamiento	SNP (% pérdida neuronal)	SNC(% pérdida neuronal)
NGF y TrkA	Pérdida de nocicepción: La mayoría mueren en un plazo de 3 semanas.	Ganglio cervical superior: 99% Ganglio espinal: 70-80% Ganglio nodoso: 0% Ganglio trigémico: 70%	Motoneuronas 0% Núcleos de la base encefálica: Atrofia neuronal Menor ramificación axonal
BDNF y TrkB	Dificultad para succionar Mueren a las 48h Los animales KO para BDNF presentan movimientos anómalos con la cabeza en la segunda semana.	Ganglio cervical superior: 0% Ganglio espinal: 30-50% Ganglio vestibular:>80% Ganglio nodoso: 45-65% Ganglio trigémico: 25-55%	Motoneuronas TrkB 35% BDNF 0%
NT-3 y TrkC	Pérdida de la propiocepción Algunos mueren al mes de vida	Ganglio cervical superior. NT-3: 55% Ganglio espinal. TrkC 20% NT-3 55% Ganglio nodoso: 50% Ganglio trigémico. NT-3: 65%	Motoneuronas TrkC 30% NT-3 0%

Tabla 8: **Características de los diferentes knock out para las neurotrofinas y Trk.** (Ernfors, P y col. 1994; Klein, R y col. 1994).

1.4.3. OTRAS FAMILIAS DE FACTORES NEUROTROFICOS

1.4.3.1. LA FAMILIA DE LAS CITOQUINAS

Las citoquinas constituyen una extensa familia de factores neurotróficos. Actúan a muy bajas concentraciones, nano o pico molar, regulando la supervivencia, el crecimiento neurítico o la diferenciación. También son fundamentales en la respuesta inmune. Las citoquinas a diferencia de otros factores neurotróficos son sintetizados rápidamente y secretados frente a un estímulo.

Dentro de la familia de citoquinas de la interleuquina-6 (IL-6, del inglés *interleukine-6*) encontramos los siguientes miembros: la IL-6, el factor neurotrófico ciliar (CNTF, del inglés *Ciliary Neurotrophic Factor*), la cardiotrofina-1 (CT-1, del inglés *Cardiotrophin-1*), la oncostatina M (OSM, del inglés *Oncostatin M*), el factor activador del crecimiento (GPA, del inglés *Growth Promoting Activation*), el factor inhibitorio de la leucemia (LIF, del inglés *leucemia inhibitory factor*), citoquina de la cardiotrofina (CLC, del inglés *Citokine Like Cardiotrophin*) y la interleuquina-11 (IL-11, del inglés *Interleukine-11*). Esta familia constituye un grupo de proteínas de alrededor de unos 20 kDa. Todas ellas, excepto CNTF, CT-1 y IL-6, contienen una secuencia señal para su secreción en su parte N-terminal. Respecto a su estructura terciaria, CNTF, LIF y CT-1 tienen cuatro hélices alfa unidas por plegamientos que le confieren una estructura característica (Heinrich, PC y col. 1998).

CNTF fue aislado como un factor neurotrófico capaz de promover la supervivencia en neuronas parasimpáticas del ganglio ciliar de embriones de pollo (Adler, R y col. 1979; Lin, LF y col. 1989; Stockli, KA y col. 1989; Leung, DW y col. 1992). Estudios con este factor han demostrado que inhibe la proliferación de los precursores de las neuronas simpáticas y promueve la diferenciación de estas células (Ernsberger, U y col. 1989; Saadat, S y col. 1989; Rao, MS y col. 1992; Symes, AJ y col. 1993). También se ha descrito su capacidad para mantener las neuronas sensoriales (Barbin, G y col. 1984; Thaler, CD y col. 1994) y preganglionares simpáticas (Blottner, D y col. 1989). Respecto a las motoneuronas, tanto *in vivo* como *in vitro*, CNTF tienen un papel trófico sobre ellas (Arakawa, Y y col. 1990; Oppenheim, RW y col. 1991; Martinou, JC y col. 1992) También se ha demostrado el efecto trófico del CNTF

sobre estas MNs tras una axotomía (Sendtner, M y col. 1990; Vejsada, R y col. 1995).

CT-1 fue identificada y clonada por su actividad hipertrófica en cardiomiocitos en cultivo. Este factor no posee ninguna secuencia señal para su secreción. *In vivo* se ha visto que se expresa en altas cantidades en el músculo esquelético embrionario. CT-1 promueve la supervivencia y maduración de diferentes tipos celulares en cultivo, como las neuronas de ganglio ciliar, neuronas simpáticas, las neuronas dopaminérgicas y MNs (Pennica, D y col. 1995).

A principios de esta década se descubrió un nuevo factor neurotrófico relacionado con esta familia, se le llamó **CNTF2** (Elson, GC y col. 2000). Este nuevo factor es un complejo heteromérico formado por CLC y el factor 1 de citoquinas (CLF-1, del inglés *Citokine Like Factor 1*)(Elson, GC y col. 2000). En condiciones normales, CLC no es secretado por la célula, tan sólo se secreta si es sintetizado con el CLF-1. Este complejo multimérico se une al mismo receptor que el CNTF, activándolo y estimulando las mismas vías de señalización (Elson, GC y col. 2000).

1.4.3.1.1. Receptores para las citoquinas: LIFR β y gp130

Los miembros de esta familia se unen a un complejo trimérico de receptores para activar la cascada de señalización, formado por los receptores: receptor del factor LIF (LIFR β , del inglés *Leukemia Inhibitory Factor Receptor*), gp130 y un tercer co-receptor unido a membrana mediante un enlace GPI, que en el caso del CNTF se ha llamado receptor del CNTF (CNTFR α , del inglés *Ciliary Neurotrophic Factor Receptor alfa*). Solamente LIFR β y gp130 tienen dominio intracelular. Unidos a los receptores en la parte intracelular se encuentran las proteínas que mediarán la señal y que reciben el nombre de Jak/Tyk quinasas (Hendry, L y John, S 2004). Tras la unión del ligando al trío de co-receptores, se activan las JAK debido a la proximidad entre ellas. Una vez activas y fosforiladas en residuos de tirosina, reclutan a otras proteínas activadoras de la transcripción y traductoras de la señal (STAT, del inglés *Signal Transducer Activator of Transcription*) (Stahl, N y Yancopoulos, GD 1994; Hendry, L y John, S 2004), que reconocen los dominios SH2 fosforilados de las

JAK. En algunos tipos celulares, estos receptores activan otras vías de señalización como la PI-3K/PKB y la Ras/MAPK, ya que componentes de estas vías como Shc, también reconocen los dominios SH2 (Giordano, V y col. 1997).

Cuando las STAT están fosforiladas reconocen sus dominios SH2 y dimerizan (Zhang, L y col. 1994). Una vez dimerizadas se dirigen hacia el núcleo donde se unen a diferentes regiones del DNA activando la expresión de distintos genes.

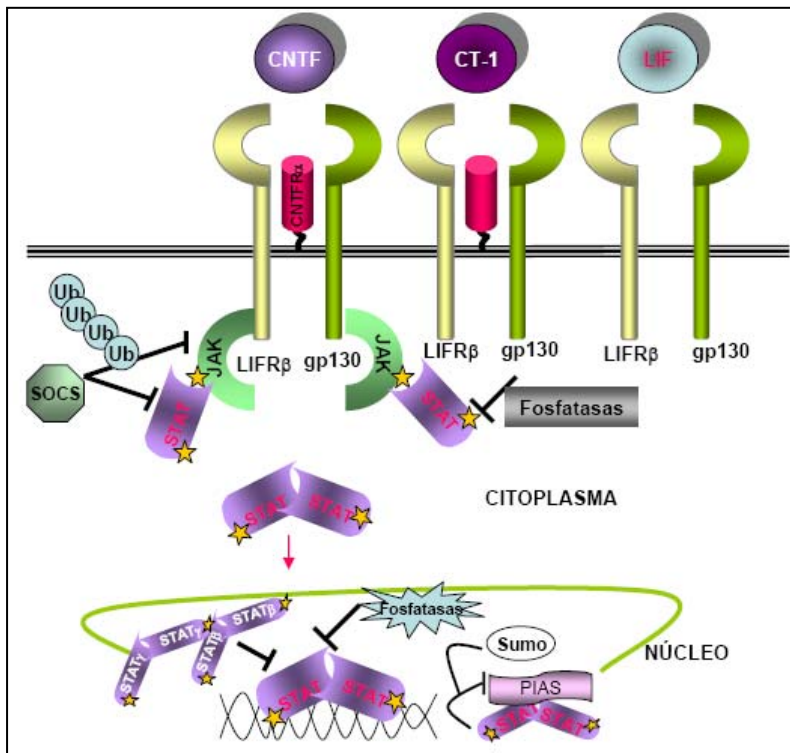


Figura 14: **Receptores y co-receptores para citoquinas y esquema de señalización.** SUMO- Small Ubiquitin-like modifier. (adaptado de (Hendry, L y John, S 2004).

La proteínas de señalización supresoras de citoquinas (SOCS, del inglés *Supressor of Citokines Signalling*,) participan en la vía JAK/STAT inhibiendola (Endo, TA y col. 1997; Starr, R y col. 1997). Éstas interaccionan con residuos fosfotirosina de las JAK inhibiendo su actividad quinasa (Endo, TA y col. 1997; Starr, R y col. 1997; Nicholson, SE y col. 1999). Existe otro punto de regulación negativa a nivel de núcleo, a través de las proteínas inhibitoras de la actividad de las STAT (PIAS, del inglés *Protein Inhibitor of Activated STAT*), fosforilando directamente las STAT e impidiendo su unión al DNA (Chung, J y

col. 1997). Por último, la fosfatasa SHP-2 inactiva las STAT a nivel de receptor (Yin, C y col. 1997).

1.4.3.1.2. Los ratones KO para citoquinas

Las citoquinas promueven la supervivencia de las MNs tanto *in vivo* como *in vitro*, participando en la supervivencia de estas células, en la edad embrionaria y el adulto. Hasta el momento se ha estudiado el KO para cada uno de los receptores, así como para CNTF, LIF y CT-1. En los últimos años también se ha conseguido el triple KO para CNTF/LIF/CT-1 que ha facilitado aún más el conocimiento de esta familia de factores y su papel en la edad embrionaria y en la edad postnatal. En la siguiente tabla se resume los fenotipos que se han encontrado para cada uno de los ratones KO estudiados:

Ratón KO		Fenotipo	Comentarios
Receptores	LIFR β	Pérdida de MNs durante el desarrollo (~ 40%)	Mueren al poco de nacer
	CNTFR α	Pérdida de MNs durante el desarrollo (~ 40%)	Mueren al poco de nacer
	gp130	Pérdida de MNs durante el desarrollo (~ 40%)	Mueren al poco de nacer
Ligandos	CT-1	Pérdida MNs en la edad postnatal Reducción nº MNs durante el desarrollo (parte lumbar).	---
	LIF	Reducción soma de las MNs	Reducción en fuerza la muscular
	CNTF	Pérdida postnatal MNs	---
	CLF	Pérdida MNs al nacer	---
	CNTF/LIF	Pérdida postnatal MNs	---
	CNTF/CT-1	Pérdida postnatal MNs	---
	CNTF/LIF/CT-1	Pérdida postnatal MNs	Agrupamiento de fibras musculares debido a la denervación/reinervación

Tabla 9: Resumen del fenotipo de los ratones KO para citoquinas y sus receptores.

De los resultados obtenidos con los ratones KO podemos concluir que, CT-1 es particularmente importante para las MNs durante el desarrollo, mientras que CNTF y LIF lo son en la edad postnatal. LIF es importante para el control del terminal sináptico y su déficit no es compensado con CNTF o CT-1. El triple KO, en comparación con el doble KO para CNTF/LIF y el KO para CT-1, muestra varios grados de agrupamiento en las fibras musculares y una reducción significativa en el movimiento voluntario, indicando la importancia de estos factores para la regulación de la supervivencia y función de estas MNs (Holtmann, B y col. 2005).

1.5. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN SUPERVIVENCIA Y DIFERENCIACIÓN

A pesar de la diversidad de señales que llegan a una célula y la multitud de efectos que producen los factores neurotróficos, muchos de ellos comparten las mismas vías intracelulares de señalización. Gracias a la utilización de inhibidores farmacológicos y a las mutaciones en receptores y proteínas implicadas en estas vías, nos han permitido conocer los mecanismos por los cuales actúan los factores neurotróficos. La activación de las vías intracelulares de señalización mediada por los distintos factores resulta en diferentes respuestas adaptativas por parte de la célula, tales como la supervivencia, diferenciación, plasticidad sináptica, migración o muerte celular.

1.5.1. Vía de la PI-3K/PKB

Como se ha descrito anteriormente, Grb2 (proteína adaptadora activada por receptores con actividad tirosina quinasa) posee dominios SH3, los cuales no sólo interaccionan con Sos, sino que también pueden interaccionar con otra proteína adaptadora Gab1 (Holgado-Madruga, M y col. 1996). Una vez translocada a membrana Gab1 se fosforila por la actividad tirosina quinasa del receptor, originándose centros SH2 que pueden ser reconocidos por la PI-3K (Holgado-Madruga, M y col. 1997). A pesar de que en algunos casos se ha detectado la fosforilación de la PI-3K por parte de la actividad tirosina quinasa del receptor (Hu, P y col. 1992) (Kazlauskas, A y Cooper, JA 1990), este hecho

no es crítico para regular su función. Lo que sí que parece importante para activar a la PI-3K, es la fosforilación en dos residuos tirosinas en los dominios SH2 de la subunidad p85. Esta fosforilación provoca un cambio conformacional en la subunidad p110, haciendo que se active el enzima (Rordorf-Nikolic, T y col. 1995). La subunidad catalítica de la PI-3K se ha descrito que puede interaccionar con la proteína Ras (Rodriguez-Viciano, P y col. 1994), aunque no se conoce la relevancia de esta interacción (Hallberg, B y col. 1998). Una vez activa, la PI-3K cataliza la fosforilación de un tipo de lípido de la membrana, los fosfatidil inositoles (PIPs), en la posición D3 de su anillo, generándose segundos mensajeros, los PIP₃. Los niveles de estos PIP₃s son regulados por la acción de distintas fosfatasas como PTEN (Simpson, L y Parsons, R 2001) Los dominios de homología a la pleckstrina (PH, *Pleckstrin domain*), de alrededor de unos 100 aminoácidos, en los PIPs, son los que regulan las interacciones lípido-proteína (Lemmon, MA y Ferguson, KM 2000). La PKB, proteína por debajo de la PI-3K en la cascada de señalización, posee dominios PH necesarios para reclutarla en la membrana plasmática, gracias a la alta afinidad que tiene por los PIP₃ formados por la PI-3K (Andjelkovic, M y col. 1997). Los PIP₃ no activan directamente a la PKB, sino lo que hacen es llevarla a la membrana plasmática para que sea fosforilada por la quinasa dependiente de fosfoinositoles (*Phosphoinositide-Dependent Kinase-1*, PDK-1) (Bayascas, JR y Alessi, DR 2005). Muchos de los estudios realizados sobre esta vía de señalización se han llevado a cabo con el receptor tirosina quinasa de la insulina (Alessi, DR y col. 1996a; Alessi, DR y col. 1996b; Shepherd, PR y col. 1998), pero esta vía no sólo se activa con los receptores de la insulina, sino que también se activa por la autofosforilación de los receptores con actividad tirosina quinasa mediada por interleuquinas, neurotrofinas o receptores ligados a proteínas G (Stephens, L y col. 1994). Los lugares de fosforilación de PKB son la serina 473 (S473) en el extremo c-terminal de la proteína y la treonina 308 (T308) en el dominio quinasa de la proteína (Alessi, DR y col. 1996a). La fosforilación en cualquiera de estos dos residuos activa parcialmente a la proteína, mientras que la fosforilación simultánea promueve una fuerte activación (Alessi, DR y col. 1996a). A mediados de los años noventa se identificó y se caracterizó la proteína quinasa que era la responsable de la fosforilación de la PKB en la T308, esta proteína

recibió el nombre de PDK1 (Alessi, DR y col. 1997b; Stokoe, D y col. 1997). *In vitro* la actividad de la PDK1 esta fuertemente estimulada por los PIP₃ (Alessi, DR y col. 1997a; Stokoe, D y col. 1997).

Respecto a la PDK1, su dominio PH parece importante para la activación de la PKB. La eliminación del dominio PH de PDK1, bloquea la fosforilación de PKB (Alessi, DR y col. 1997b). Por lo tanto parece que los PIPs juegan un papel importante en la activación de la PKB a través del control de la PDK1 (Bellacosa, A y col. 1998). También se ha descrito un efecto directo de estos PIP₃ sobre el dominio PH de la PKB, esta unión de la PKB a los PIP₃s, provocaría un cambio conformacional en la PKB, dejando expuesta la T308 para ser fosforilada por la PDK1 (Marte, BM y col. 1997; Alessi, DR y Cohen, P 1998; Downward, J 1998). Otros grupos han descrito además que la PKB puede ser fosforilada por PDK1, independientemente a los PIPs, estos resultados se concluyen a partir de experimentos con formas mutadas de la PKB a las que les falta el dominio PH (Alessi, DR y col. 1997a; Stokoe, D y col. 1997).

No ha sido hasta hace unos meses que se ha descubierto la proteína responsable de la fosforilación en la S473. Cuando se descubrió la proteína que fosforilaba la PKB en la T308, se pensó que posiblemente existía otra proteína, la PDK2, la cual sería la responsable de la fosforilación de S473, pero PDK2 nunca ha podido ser aislada. En el año 2005, se ha descrito la proteína encargada de fosforilar a la PKB en la S473. Esta proteína es mTOR (*mammalian target of rapamycin*)(Gao, T y col. 2005; Sarbassov, DD y col. 2005). mTOR a su vez está modulada por proteínas como raptor y rictor, que conjuntamente con GβL, regulan la actividad de mTOR. Se conocía que mTOR, cuando formaba un complejo con raptor y GβL, fosforilaba el motivo hidrofóbico de S6K (Hara, K y col. 2002; Kim, DH y col. 2002). Esta fosforilación se inhibe con rapamicina, la cual impide la formación del complejo mTOR-raptor-GβL. La fosforilación de PKB en la serina no se ve afectada por rapamicina. Este hecho hizo que en un primer momento, se pensara que mTOR no era el responsable de esta fosforilación. Sin embargo, recientemente se ha visto que el complejo mTOR-Rictor-GβL es insensible a la rapamicina (Sarbassov, DD y col. 2005), pero es el responsable de la fosforilación de la PKB. Hasta el momento se sabe que la fosfatasa PP2A (*protein phosphatase 2A*) es la responsable de

desfosforilar a la PKB en la T308 (Bayascas, JR y Alessi, DR 2005); mientras que la PHLPP (*PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase*) lo hace en la S473 (Gao, T y col. 2005).

1.5.1.1. La vía de la PI-3K/PKB: Supervivencia celular

La PI-3K fue descrita como el principal transductor de la señal de supervivencia mediada por factores neurotróficos. Algunos trabajos demostraron que cuando se inhibía la PI-3K se suprimía la supervivencia de la línea celular de PC12 estimulada con NGF (Yao, R y Cooper, GM 1995). En otros tipos celulares también se ha descrito la supervivencia mediada por la PI-3K. También promueve la supervivencia de las MNs en cultivo tras el tratamiento con neurotrofinas o GDNF (Dolcet, X y col. 1999; Soler, RM y col. 1999). Más tarde, cuando se descubrió a la PKB como sustrato por debajo de la PI-3K, se pensó que esta proteína podía ser importante como mediadora de la supervivencia. Estudios realizados con formas dominantes negativas de la PKB, previenen la supervivencia dependiente de PI-3K en neuronas granulares de cerebelo en cultivo (Dudek, H y col. 1997). Además, la transfección de formas activas, suprimen la muerte mediada por la ausencia de factores tróficos (Dudek, H y col. 1997; Kauffmann-Zeh, A y col. 1997). Algunos investigadores han analizado a que nivel de la vía apoptótica puede estar actuando la PKB. Uno de los componentes de la vía apoptótica en ser identificado como sustrato de la PKB fue Bad (miembro pro-apoptótico de la familia de Bcl-2) –revisado por (Kaplan, DR y Miller, FD 2000)-. Bad posee las S112 y S136 susceptibles de ser fosforiladas y parece que PKB fosforila preferentemente la S136. Una vez fosforilada, Bad es secuestrado por la proteína 14-3-3 impidiendo la unión y la inactivación de miembros antiapoptóticos de la familia de Bcl-2 y Bcl-X_L.

Otro punto de regulación de la PKB es a nivel de la caspasa-9. La PKB fosforila a la procaspasa-9, impidiendo su actividad proteolítica (Cardone, MH y col. 1998).

También se ha descrito una regulación de GSK3 β por parte de la PKB, modulando así su actividad catalítica (Cross, DA y col. 1995). Experimentos realizados por Pap y col. (1998) demostraron que la sobreexpresión de GSK3 β inducía apoptosis. Desde entonces, frente a

estímulos como la retirada de soporte trófico o el tratamiento con los inhibidores de la PI-3K, esta proteína promueve la muerte celular. La fosforilación de GSK3 β por PKB inhibe la función apoptótica de esta proteína.

La PKB también puede actuar a nivel de factores de transcripción, impidiendo la transcripción de genes implicados en la apoptosis, como es el factor forkhead (FKHRL1) (Brunet, A y col. 1999). Este factor es el encargado de activar la transcripción de genes proapoptóticos como el ligando de Fas (*Fas Ligand*, FasL).

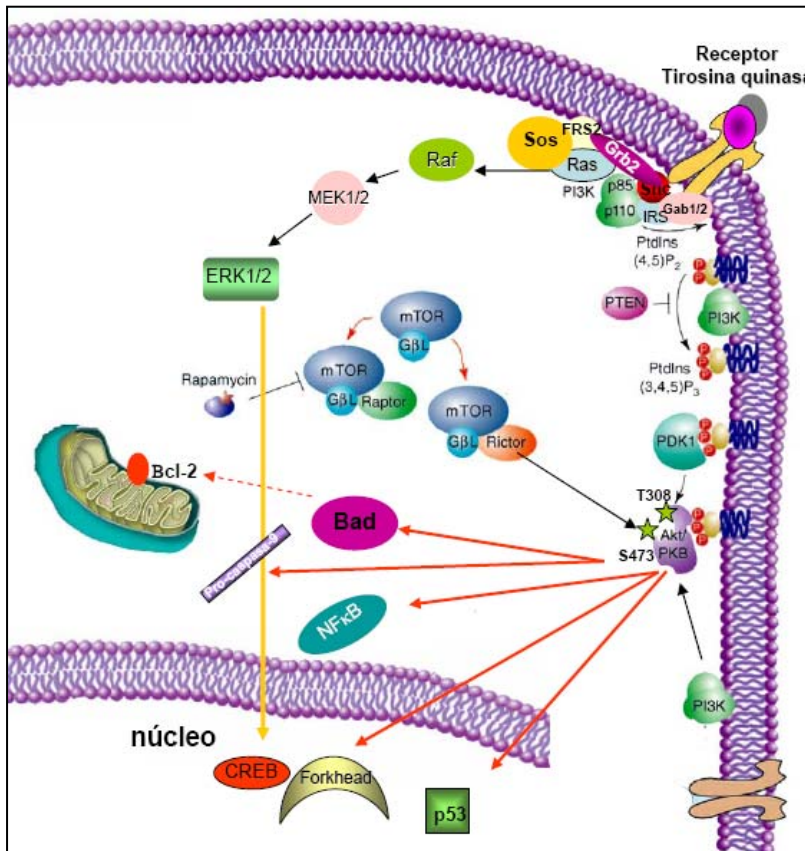


Figura 15: Esquema de las vías PI-3K/PKB y la vía Ras/MAPK. En la figura aparecen diferentes proteínas reguladas por la activación de la PKB (Adaptado de (Sarbasov, DD y col. 2005).

1.5.2. Vía de la PLC γ

La activación de PLC γ tiene lugar a través de los receptores con actividad tirosina quinasa, como Ret o Trk. PLC γ se une a tirosinas específicas en la parte intracelular del receptor gracias a los dominios SH2 (Obermeier, A y col. 1994). Esta unión provoca la fosforilación y la activación de la proteína. PLC γ se encarga de degradar fosfolípidos de la membrana, generando segundos mensajeros, como DAG o IP3. El DAG junto con el calcio actúa de cofactor de la proteína quinasa C (*Protein Kinase C*, PKC) (Berridge, MJ 1993). Por otro lado el IP3, se une a los receptores de inositol-1-4-5-trifosfato (*Inositol-1-4-5-triphosphate*, InsP₃R), provocando la salida de calcio desde el retículo endoplasmático (revisado por (LaFerla, FM 2002). Estos incrementos de calcio activan a su vez otras proteínas implicadas en la supervivencia y la diferenciación.

1.5.3. Vía de la RAS/MAPK: Diferenciación celular

La vía de Ras/MAPK se ha implicado en diferentes procesos como son la diferenciación, proliferación, estrés y apoptosis (Nishida, E y Gotoh, Y 1993), (Marshall, CJ 1995), (Davis, RJ 1994), (Ip, YT y Davis, RJ 1998). Esta vía de señalización puede activarse a partir de receptores tirosina quinasa, receptores de integrinas, receptores ligados a proteína G o segundos mensajeros, como el calcio (Inglese, J y col. 1995), (Kumar, CC 1998), (Dhanasekaran, N y Prasad, MV 1998), (Finkbeiner, S y Greenberg, ME 1996). La activación de Ras aparte de su función en la diferenciación, es importante para la supervivencia, ya que se ha demostrado que la inhibición de Ras, suprime la supervivencia inducida por factores neurotróficos (Borasio, GD y col. 1993; Nobes, CD y Tolkovsky, AM 1995). Otros experimentos han demostrado que mutaciones en Ras que activan selectivamente la vía de la PI-3K/PKB y no la vía de la Ras/MAPK promueven la supervivencia de neuronas simpáticas (Klesse, LJ y Parada, LF 1998; Mazzoni, IE y col. 1999) y esta supervivencia se bloquea con los inhibidores específicos de la PI-3K (Klesse, LJ y Parada, LF 1998; Mazzoni, IE y col. 1999), observándose un *cross-talk* entre las dos vías a través de Ras. Cuando se activa Ras, por intercambio de GDP por GTP, recluta en la membrana a la quinasa, denominada Raf (Marshall, CJ 1994). Ésta puede activar por debajo de

ella a diferentes proteínas, una de ellas es la MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) (Katz, ME y McCormick, F 1997). Existen diferentes isoformas de Raf: A-Raf, B-Raf y c-Raf-1. Parece ser que Ras activa a c-Raf-1, mientras que A-Raf y B-Raf son activadas por otro tipo de proteínas, como Rap1 (York, RD y col. 1998). Para la completa activación de Raf, además de translocarse a la membrana necesita ser fosforilada (Williams, NG y col. 1992), Una vez activada, Raf fosforila a la MAPKK, MEK1 y MEK2 en residuos de serina (Jaiswal, RK y col. 1994). La MEK 1/2 son proteínas con actividad serin/treonin quinasa. Sus substratos de fosforilación son la ERK1/2 (Crews, CM y col. 1992). Las ERKs fosforiladas en residuos de serina y activas se translocan al núcleo (Cheney, RE y Mooseker, MS 1992) donde activarán otras quinasas y factores de transcripción (Segal, RA y Greenberg, ME 1996) implicados en la supervivencia y diferenciación. Algunos de estos factores son: c-Myc, NF-IL6, Elk-1, ATF-2 o c-Jun entre otros. La ERK no solo está implicada en la regulación de factores de transcripción, sino que también puede regular otras proteínas quinasas p90^{msk} (Williamson, DL y col. 2006).

1.6. ACTIVIDAD ELÉCTRICA Y SUPERVIVENCIA NEURONAL

Como hemos descrito en apartados anteriores, la cascada de señalización se inicia en la membrana celular cuando el ligando interacciona con su receptor. Esta unión promueve la activación de PLC γ entre otras. Como consecuencia de esta activación se produce un incremento en las concentraciones de calcio intracelular, proveniente de los reservorios intracelulares. Por otro lado, como respuesta a la actividad eléctrica de las neuronas, se produce la despolarización de membrana, abriéndose los canales de calcio voltaje dependiente de tipo L, permitiendo la entrada de calcio desde el espacio extracelular (Collins, F y Lile, JD 1989; Franklin, JL y col. 1995). En ambos casos, el incremento moderado de las concentraciones de calcio en el interior de la célula activa distintas proteínas, las cuales inician cascadas de señalización esenciales para distintos procesos biológicos como la secreción, proliferación y diferenciación (Means, AR 2000). Estos incrementos de calcio son transitorios, llegando a alcanzar concentraciones del rango μ M. La difusión

de calcio en la célula está regulada por un gran número de proteínas capaces de unir calcio o de secuestrarlo. Las señales debidas al calcio intracelular son el resultado de la coordinación y secreción de distintos elementos en zonas determinadas de la célula donde se producen estos incrementos, en los llamados “puff de calcio” (Bootman, MD y col. 1997).

Diferentes estudios han permitido mantener *in vitro* algunas poblaciones neuronales en presencia de un incremento en los iones de potasio (K^+). La supervivencia de estas poblaciones se debe a la despolarización de membrana producida por el K^+ en el medio extracelular (Gallo, V y col. 1987). No sólo los factores neurotróficos promueven la supervivencia de distintas poblaciones neuronales, sino que incrementos moderados en los niveles de calcio también tienen los mismos efectos.

Para explicar la independencia de las neuronas a los factores neurotróficos se postuló la teoría del **reostato de calcio** (*calcium set-point hypothesis*) (Franklin, JL y Johnson, EM, Jr. 1992). Esta teoría postula que, en un primer nivel, cuando los niveles de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) son bajos, las neuronas mueren incluso en presencia de factores neurotróficos. En un segundo nivel, cuando los niveles de calcio no son los suficientemente altos, las neuronas dependerían únicamente de los factores neurotróficos. En un tercer nivel, los incrementos moderados en las $[Ca^{2+}]_i$ serían suficientes para mantener a las neuronas vivas en ausencia de soporte trófico. Por último, un cuarto nivel, con concentraciones de calcio superiores al umbral, provocan la muerte de las neuronas, incluso en presencia de factores neurotróficos. (Collins, F y Lile, JD 1989; Tolkovsky, AM y col. 1990).

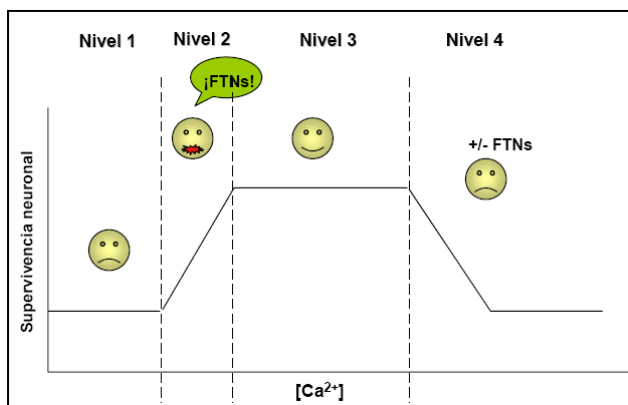


Figura 16: **Teoría del reostato de calcio** (Franklin, JL y Johnson, EM, Jr. 1992).

En condiciones normales, en el citoplasma de las neuronas hay niveles bajos de calcio entre 30-150 nM. La salida de calcio desde los reservorios intracelulares tienen lugar a partir de dos tipos de receptores: los receptores InsP_3R y los receptores de Rianodina (*Ryanodin Receptor*, RyR). La salida de calcio por los receptores InsP_3R requieren la activación de las proteína G en la membrana plasmática, que producirán DAG y Ins_3P activando éste último al receptor. Alternativamente también tiene lugar la liberación de calcio de los reservorios, por activación de los receptores tirosina quinasa (como Trk o Ret). La entrada de calcio desde el espacio extracelular también está muy regulada, y ocurre a través de los receptores de calcio voltage dependientes, éstos activados después de la despolarización de la membrana. Existen varios tipos de canales de calcio voltaje dependientes, los de tipo L, Q o N. Estos canales de calcio pueden bloquearse con la utilización de inhibidores específicos como el amiloride, Nifedipina, Nipodipina, etc. Cada inhibidor bloquea un tipo de canal en concreto.

1.7. SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR CaMKs Y CALMODULINA

Uno de los principales efectores del incremento en la concentración de calcio intracelular es la calmodulina (CaM). La CaM está altamente conservada entre las diferentes especies; tiene 148 aminoácidos y un peso molecular de aproximadamente 16.6 kDa (Draetta, G y Klee, CB 1988; Crivici, A y Ikura, M 1995).

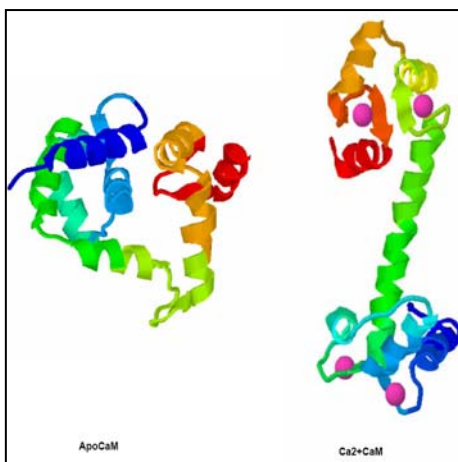


Figura 16: Representación tridimensional de la CaM. En la figura se representa la Apo-CaM que ha sido obtenida de la base de datos PDB (Protein data bank, 1qx5) y la CaM unida a 4 átomos de calcio (PDB , 1osa). Estas secuencias han sido representadas en 3D utilizando el programa Protein Explorer versión 2.45. El extremo N-terminal se representa en azul y el extremo C-terminal en rojo. En color rosado están representados los átomos de calcio. En la figura también se representa las estructuras de hélice α y las de lámina β .

Aproximadamente la mitad de la CaM está asociada a membrana y la otra mitad está repartida entre el citoplasma y el núcleo (Santella, L y Carafoli, E 1997; Toutenhoofd, SL y Strehler, EE 2000).

La estructura tridimensional de la CaM es similar a la troponina C. Posee dos dominios globulares con estructura *EF-hands*, donde tiene lugar la unión a dos átomos de calcio; esto se repite en cada dominio globular de la proteína (Strynadka, NC y James, MN 1989). Dos iones de calcio se unen al dominio globular del extremo N-terminal, que está separado por una alfa-hélice flexible del otro dominio globular. En el extremo C-terminal también existen dos dominios donde se unen los otros dos iones de calcio. Los dominios I y II del extremo N-terminal tienen 10 veces menor afinidad por unión a calcio ($K_d 10^{-5}$ M), que los dominios III y IV ($K_d 10^{-6}$ M) en la parte C-terminal. En presencia de calcio cada dominio globular adopta una conformación abierta, exponiendo el bolsillo hidrofóbico que le permite la unión a las secuencias dianas de otras proteínas (Ver figura 16).

Entre las proteínas reguladas por la CaM encontramos a canales iónicos, proteínas relacionadas con el ciclo celular, elementos implicados en la organización del citoesqueleto, adenilato ciclasa, fosfodiesterasas, ATPasas y proteínas quinasas (como las *Calcium-calmodulin dependent kinases*, CaMKs) (Kakiuchi, S y Yamazaki, R 1970; Uzunov, P y Weiss, B 1972; Brostrom, CO y col. 1975; Cheung, WY y col. 1975; Sobue, K y col. 1979; Kennedy, MB y Greengard, P 1981; Rasmussen, CD y Means, AR 1989). CaM se encuentra ampliamente distribuida por el cerebro (Zhou, LW y col. 1985). (Zhou, LW y col. 1985). En el sistema nervioso CaM se ha implicado en varios procesos como la biosíntesis de neurotransmisores (Griffith, LC y Schulman, H 1988), la transducción de la señal de calcio, la secreción de neurotransmisores (Manalan, AS y Klee, CB 1984), la extensión neurítica (Liu, YC y Storm, DR 1990) y el acoplamiento de elementos del citoesqueleto (Wang, JH y col. 1985; Vallano, ML y Beaman-Hall, CM 1989). Para el estudio de la CaM y su implicación en vías de señalización se han desarrollado drogas específicas que bloquean su función. Así tenemos como inhibidores farmacológicos de la CaM al W12, W13, W5 y W7 (Hidaka, H y col. 1981), (Hidaka, H y Tanaka, T 1983), así como otros inhibidores con estructura diferente, como la trifluoperazina (TFP). La familia de

inhibidores del W13 interfieren en la unión de la CaM a su substratos, sin impedir la unión del calcio. El W13 es análogo al W12, como el W7 es análogo al W5, La única diferencia con sus análogos, es un átomo de cloro en su estructura química que los hace más potentes como inhibidores de la CaM (Greenberg, DA y col. 1987). Los inhibidores W5 y W12 nos sirven como controles de la inhibición inespecifica del W13 y W7.

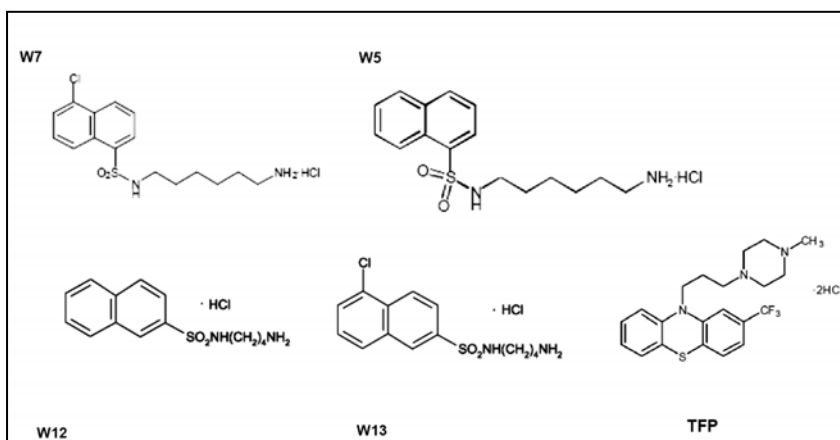


Figura 17: Estructura química de los inhibidores de la CaM y sus análogos.

Como resultado de la activación de los complejos $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ se activan un grupo de enzimas con actividad Serina-Treonina quinasa llamadas, CaMKs, las cuales juegan un importante papel en la señalización mediada por calcio (Nairn, AC y Picciotto, MR 1994; Soderling, TR 1999; Fujisawa, H 2001; Hook, SS y Means, AR 2001). Este grupo de CaMKs se clasifica en dos categorías principales: las CaMKs multifuncionales con varios substratos específicos y las CaMKs restrictivas con un número restringido de substratos específicos. A este subgrupo pertenece la CaMKIII o eEF-2K y la *Myosin Light Chain Kinases*, MLCK. Dentro del subgrupo de CaMKs multifuncionales encontramos la CaMKI, CaMKII, CaMKIV y la CaMKK. Las propiedades tanto bioquímicas como fisiológicas de estas CaMKs se muestran en la tabla 12.

A la CaMKII se le conoce un amplio abanico de substratos. Esta proteína es importante en el SNC ya que regula la síntesis, la secreción y la señalización mediada por neurotransmisores (Braun, AP y Schulman, H 1995; Soderling, TR y col. 2001; Hudmon, A y Schulman, H 2002a; 2002b). Gracias a los experimentos de comportamiento, usando animales transgénicos se ha

podido ampliar el conocimiento sobre las funciones de la CaMKII (Matynia, A y col. 2002).

	CaMKII	CaMKIV	CaMKI
Estructura	Oligomérica (≈550kDa) subunidad 50-60 kDa	Monomérica 60 kDa	Monomérica 40 kDa
Distribución tisular	Ubiqua	Cerebro y timo	Ubiqua
Substratos	Tirosina hidroxilasa sinapsina I, GluR1, MAP2...	Sinapsina, MAP2, mielina, Rap-1b, CREB, SRF, MEF2D,...	Sinapsina 1, CFTR, CREB,...
Efectos fisiológicos	Metabolismo carbohidratos Transcripción Organización citoesqueleto LTP (Long Term Potential) Memoria Funciones cardíacas	Transcripción Espermatogénesis LTP Memoria Biogénesis mitocondrial	Transcripción?
Knock out	---	Deficiencia en las neuronas hipocámpales Déficit en la espermatogénesis	---
Inhibidores específicos	KN-62, KN-93, AIP, PEP- 19	KN-62	KN-62
Mecanismo de activación	Autofosforilación en la T286	Por fosforilación de la CaMKK en la T196 en el <i>loop</i> de activación	Por fosforilación de la CaMKK en la T177 en el <i>loop</i> de activación
Proteínas que las desfosforilan: Fosfatasa	PP1, PP2A, PP2C, CaMKP	PP1, PP2A, PP2B, PP2C, Mg ²⁺ Proteína fosfatasa, CaMKP	PP2A, CaMKP

Tabla 12: Propiedades bioquímicas y fisiológicas de la CaMKI, CaMKII y CaMKIV de ratón.

La CaMKII se distribuye por diferentes tejidos, incluyendo el cerebro y muestra una similitud en especificidad de sustrato como la CaMKIV, aunque su

papel fisiológico todavía no está del todo determinado (Picciotto, MR y col. 1996; Hook, SS y Means, AR 2001).

La CaMKIV participa en la expresión de diferentes genes regulados por calcio, a través de la fosforilación de diferentes factores de transcripción como ATF-1 o CREB (Hook, SS y Means, AR 2001). Especialmente, la fosforilación del factor CREB juega un papel importante en la regulación de la memoria y la plasticidad sináptica (Kang, H y col. 2001). La CaMKIV también se expresa en los testículos y participa en la espermatogénesis (Wu, JY y col. 2000). Utilizando construcciones de la CaMKIV constitutivamente activa se ha visto su papel en hipertrofia cardíaca (Passier, R y col. 2000) y en la biogénesis de las mitocondrias del músculo esquelético (Wu, H y col. 2002).

Estructura de las CaMKs

Todas ellas tienen un dominio catalítico, seguido de un dominio de unión a CaM (denominado *calmodulin binding domain*, CBD) y solapando a este último dominio, el dominio autoinhibitorio (*autoinhibitory domain*, AID).

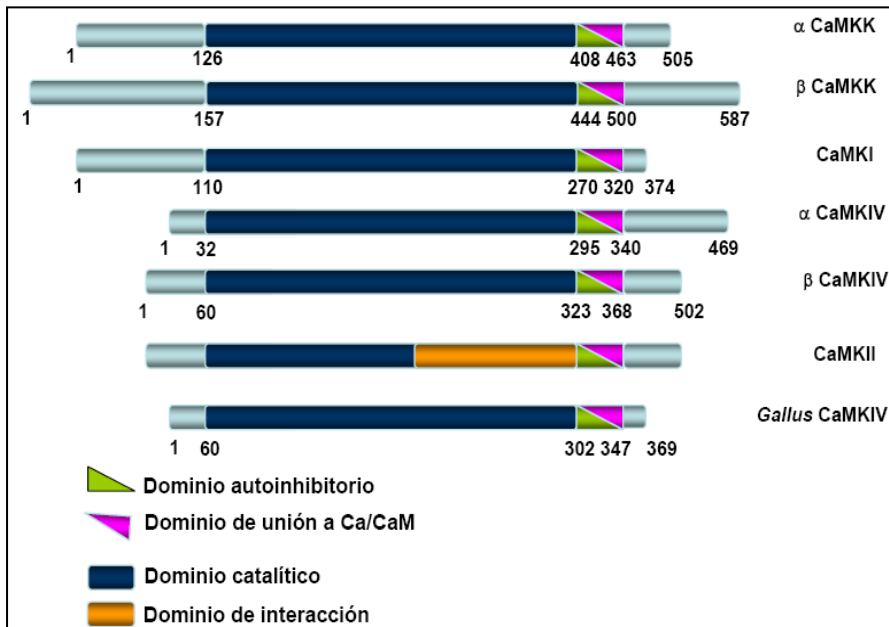


Figura 18: Estructura de las CaMKs.

Todas las CaMKs comparten esta estructura, excepto la CaMKII que en la parte c-terminal tiene un dominio de asociación, que le permite la unión con otras CaMKII para activarse.

De la CaMKK se conocen dos isoformas la α y la β . Como las otras CaMKs tiene un AID que interacciona con el CBD. El dominio catalítico tiene dos propiedades peculiares: la primera, es la ausencia de residuos ácidos conservados en su dominio catalítico; que en otras quinasas reconocen a los residuos básicos en su sustrato, facilitando su interacción. En segundo lugar, posee regiones ricas en arginina y prolina (*RP-insert*). La ausencia de residuos ácidos sugiere que la CaMKK no reconoce los residuos básicos alrededor de los lugares de fosforilación en el lugar de activación, tanto de la CaMKI como de la CaMKIV, pero se ha demostrado que las secuencias ricas en arginina y prolina son importantes para este reconocimiento, ya que la delección de estas secuencias impiden la activación de la CaMKIV y la CaMKI por la CaMKK (Tokumitsu, H y col. 1997). Cuando se produce un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, se activa la CaMKK, activando a su vez a la CaMKIV y la CaMKI. La CaMKK está regulada negativamente por la *c-AMP-dependent protein kinase* (PKA) que puede fosforilar a la CaMKK inhibiendo su actividad (Wayman, GA y col. 1997), (Matsushita, M y Nairn, AC 1999).

La CaMKI está codificada por tres genes que dan lugar a diferentes isoformas α , β y γ . La isoforma β tiene a su vez *splicing* alternativo dando lugar a la $\beta 1$ y la $\beta 2$ (Picciotto, MR y col. 1993), (Naito, Y y col. 1997). En ausencia de calcio el AID interacciona con el CBD, cuando los niveles de calcio incrementan, activan a la CaM.

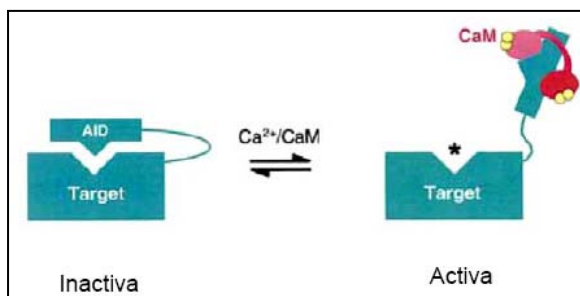


Figura 19. **Representación esquemática de la regulación de la CaMKI por calcio y la CaM.** (Hoeflich, KP y Ikura, M 2002).

La CaMKI sufre un cambio conformacional dejando que se una el complejo Ca/CaM al CBD y dejando expuesta la Thr 177 para que sea fosforilada por la CaMKK.

La CaMKIV Existen dos isoformas la α y la β . La isoforma α se expresa ampliamente en tejidos neuronales, células T y testículos (Soderling, TR 1999), (Means, AR 2000). La isoforma β contiene 28 residuos adicionales en el extremo N-terminal, esta isoforma se expresa diferencialmente durante el desarrollo y se ha detectado altos niveles de expresión en las células granulares de cerebelo maduras, de rata (Sakagami, H y Kondo, H 1993). CaMKIV se encuentra tanto en el citoplasma como en el núcleo. Igual que ocurre con la CaMKI, el complejo Ca/CaM se une al dominio CBD, haciendo que la CaMKIV cambie de conformación; es entonces cuando expone la Thr 196 (de ratón) para que sea fosforilada por la CaMKK. En esta situación, la CaMK está activa parcialmente y para que alcance el mayor grado de activación, la CaMKIV se autofosforila en el dominio N-terminal en residuos de serina (Soderling, TR 1999; Fujisawa, H 2001; Hook, SS y Means, AR 2001). No está muy claro la fosfatasa que desfosforila a la CaMKIV. Algunos autores demuestran que es la fosfatasa PP2A (Tokumitsu, H y col. 1994), (Park, IK y Soderling, TR 1995), mientras otros dicen que es la PP1 (Kasahara, J y col. 1999). La discrepancia entre estos autores parece radicar en las diferentes isoformas de PP1 que se utilizaron. La desfosforilación de la CaMKIV no solo es llevada a cabo por la fosfatasa PP1, sino también por la PP2A, PP2B y PP2C (Ishida, A y col. 2003). En cultivos de neuronas hipocámpales, en la que se veía una fosforilación de la CaMKIV debida al tratamiento con glutamato y ciclosporina A y utilizando un inhibidor específico de la fosfatasa PP2A, se observó que esta participaba en la regulación negativa de la CaMKIV *in vivo* (Kasahara, J y col. 1999). La fosfatasa PP2A forma un complejo con la CaMKIV a través de su dominio catalítico. Esta fosfatasa participa en la desactivación rápida de la CaMKIV después de la estimulación (Westphal, RS y col. 1998). La formación de este complejo, también se ha visto en otras proteínas como son la JAK2, Raf-1 y CaMKII (Millward, TA y col. 1999; Price, NE y Mumby, MC 1999; Zhang, T y col. 2002).

La CaMKIV es un potente inductor de la expresión génica, mediada por calcio, debido a la habilidad de fosforilar y activar factores de transcripción. Uno de los factores más conocidos regulados por CaMKIV es CREB. CaMKIV reconoce el motivo R-X-X-S de CREB, fosforilando la serina 133 de este motivo (White, RR y col. 1998). También se ha descrito la fosforilación de SRF (del inglés *Serum Response Factor*) en la serina 103 por la CaMKIV induciendo la expresión del factor de transcripción c-fos (Misra, RP y col. 1994). Otras dianas de CaMKIV son la sinapsina I (Miyano, O y col. 1992), Rap1-b (*Ras related protein*) y la oncoproteína 18 (Melander Gradin, H y col. 1997) entre otras.

La CaMKII esta codificada por 4 genes, dando lugar a las isoformas α , β , γ y δ , las cuales también tienen *splicing alternativo* dando lugar a un número mayor de isoformas. Las isoformas γ y δ se expresan en la mayoría de tejidos, mientras que la α y β se expresan en sistema nervioso. La diferencia con las otras CaMKs es su dominio de asociación en el extremo N-terminal. El holoenzima es una proteína oligomérica formada por 12 unidades de 50-60 kDa. Los dominios C-terminales que contiene los dominios de asociación forma la parte central del anillo, dejando expuesto hacia el exterior los extremos N-terminales. En ausencia de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ la CaMKII se mantiene en una conformación inactiva, ya que el AID interacciona con el dominio catalítico. A diferencia de las otras CaMKs, la CaMKII no tiene residuos sensibles a fosforilación, ni es activada por la CaMKK. Cuando se activa por unión de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, se autofosforila en residuos de Thr, esta autofosforilación ocurre en el complejo oligomérico. Las isoformas α, δ y γ de la CaMKII contienen una señal de localización nuclear (NLS) en su secuencia. La CaMKII en el núcleo participa en la regulación de la expresión de genes regulados por calcio, esta regulación la lleva a cabo fosforilando factores de transcripción como C/EBP. La CaMKII regula importantes funciones neuronales como la síntesis y secreción de neurotransmisores, la modulación de la actividad de canales iónicos, el transporte celular, la extensión neurítica, la plasticidad, el aprendizaje y la memoria. Por ejemplo, en la regulación del citoesqueleto, CaMKII puede fosforilar proteínas como Tau o MAP2 regulando las proteínas que forman el citoesqueleto y modulando el tráfico intracelular y el crecimiento neurítico. La

demostración de que la CaMKII regulaba el crecimiento neurítico se realizó en las líneas Neuro2a y NG108, donde se sobreexpresaron las isoformas alfa y beta mutadas de la CaMKII (Yamauchi, T 2005).

Ratones *knock out* para las CAMKIV

En la actualidad se han generado ratones KO para la CaMKIV en dos laboratorios diferentes.

1. Ratón *KO* de la *CaMKIV* realizado en el laboratorio del Dr. R. Means (2000): Carece de los exones I y II, los cuales contienen las regiones promotoras y el codón de inicio ATG. La disrupción de estos exones bloqueaba la expresión de las dos isoformas de la CaMKIV tanto la α como la β . Tras el análisis de diferentes poblaciones celulares del cerebro se encontraron los distintos déficits: A nivel comportamental: temblores, falta de equilibrio y pérdida en el control motor. A nivel morfológico encontraron déficit en las células de Purkinje tanto en número como en tamaño. Este déficit explicaba los efectos comportamentales observados y, por último, en el análisis electrofisiológico, mostraba defectos en la transmisión sináptica.

2. Ratón *KO* de la *CaMKIV* (Ho, N y col. 2000). La disrupción de este exón, igual que ocurre con el otro *KO*, bloquea la expresión de las isoformas α y β de la proteína. Con el estudio de este *KO*, se observaron alteraciones en los niveles de fosforilación de CREB y alteraciones en los registros electrofisiológicos indicándonos disfunciones a nivel de la plasticidad sináptica.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

La supervivencia de las motoneuronas durante el desarrollo embrionario y la edad adulta está controlada por una serie de fenómenos, entre los que destacan los factores neurotróficos y la despolarización de membrana. En los últimos años se ha profundizado en el conocimiento de los mecanismos moleculares que rigen esta supervivencia. Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron la implicación de la CaM, proteína regulada por calcio, en la supervivencia neuronal mediada por neurotrofinas a través de la vía PI-3K/PKB. Tras estos resultados nos planteamos los siguientes objetivos:

OBJETIVO 1: Estudio de la regulación por calcio/CaM de la vía PI-3K/PKB y de la supervivencia de las motoneuronas tratadas con GDNF.

- A) Analizar los incrementos de calcio tras el tratamiento con el factor neurotrófico GDNF en cultivos de MNs.
- B) Caracterizar la implicación del calcio y la CaM sobre la activación de la vía PI-3K/PKB inducida por GDNF.
- C) Regulación por calcio y CaM de la supervivencia de las MNs en cultivo tratadas con GDNF.

OBJETIVO 2: Clonaje de la quinasa regulada por calcio y CaM, CaMKIV de *Gallus gallus* y su contribución a la supervivencia de las motoneuronas en cultivo.

- A) Clonaje de la CaMKIV de *Gallus gallus* y generación de la forma constitutivamente activa de esta proteína.
- B) Analizar la regulación de la actividad por calcio/CaM de la CaMKIV.
- C) Evaluar la implicación de la CaMKIV en la activación de las vías de señalización intracelular y la supervivencia de las MNs en cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 REACTIVOS Y ENZIMAS DE RESTRICCIÓN UTILIZADOS

Todos los reactivos fueron adquiridos a (SIGMA-ALDRICH, Quimica S.A. Madrid), excepto si se indica lo contrario.

Los enzimas de restricción utilizados para los clonajes y subclonajes aparecen resumidos en la siguiente tabla:

<i>Enzima de restricción</i>	<i>Secuencia de corte</i>	<i>Casa comercial</i>
<i>Bam</i> HI	5' -G [^] A G A T C C-3' 3' -C C T A G [^] A G-5'	Roche
<i>Afl</i> I	5' -C [^] A T T A A G-3' 3' -G A A T T [^] A C-5'	Amersham
<i>Xba</i> I	5' -T [^] A C T A G A-3' 3' -A G A T C [^] A T-5'	Roche
<i>Cla</i> I	5' -A T [^] A C G A T-3' 3' -T A G C [^] A T A-5'	Roche
<i>Eco</i> RV	5' -G A T [^] A T C-3' 3' -C T A [^] T A G-5'	Roche
<i>Eco</i> RI	5' -G [^] A A T T C-3' 3' -C T T A A [^] G-5'	Roche

Tabla 10: Resumen de los enzimas de restricción utilizados.

3.2 VECTORES

Para la mejor comprensión de las técnicas que se describen a continuación, y dado que en algunas de ellas se han utilizado distintos plásmidos, se describen a continuación cada uno de los vectores utilizados, así como la generación del vector pcDNA3-FLAG-gCaMKIV que forma parte de los resultados obtenidos.

3.2.1 Vectores Lentivirales

Los vectores lentivirales utilizados se muestran en la tabla 12.

Vector	Promotor	Observaciones
pLVTHM	H1	Cedidos amablemente por el Dr. Trono del <i>Laboratory of Virology and Genetics en la School of Life Science</i> del <i>Swiss Institute of Technology Lausanne</i> (Suiza)
psPAX2	CMV	
pM2G	CMV	

Tabla 12: **Plásmidos lentivirales utilizados.**

Cada uno de los vectores codifica para distintos componentes lentivirales, que se indican a continuación:

- pLVTHM: Plásmido utilizado para la expresión del material genético que se desea expresar en la célula infectada.
- psPAX2: Es el vector que contiene todas las proteínas necesarias para el empaquetamiento del virus. Tiene un promotor (CAG) muy potente que dará lugar a una alta transcripción de los genes de empaquetamiento, entre las que destacan la proteína TAT, una DNA polimerasa y la Transcriptasa Reversa.
- pM2G: Es el vector que codifica para la cápside del virus. La proteína vírica es del virus estomatitis vesicular (VSV), permitiendo la infección de una amplia variedad de tejidos y líneas celulares.

Estos vectores fueron utilizados para expresar lentivirus que contenían la secuencia del RNA de interferencia (RNAi) de la gCaMKIV. Estas secuencias diseñaron utilizando herramientas bioinformáticas. Como RNAi control, se utilizaron los mismos nucleótidos del RNAi específico, pero ordenados al azar. A esta secuencia le denominamos *scrambled* –del inglés, desordenados-. En un principio, estas secuencias fueron diseñadas para clonaras en el vector de expresión pSUPER.retro puro. Pero para poder expresarlas en lentivirus fue necesaria la realización de un subclonaje en el vector lentiviral pLVTHM. Este subclonaje se realizó utilizando las dianas *EcoRI* y *ClaI*, las cuales nos permitía

obtener, a partir del vector pSUPER.retro puro, la secuencia del RNAi unida a su promotor H1 y subclonarla en el vector pLVTHM.

Las secuencias de RNAi utilizadas se muestran en la siguiente tabla:

	<i>Forward:</i>
RNAi-1	GATCCCCGAAAGGGACCCAGAAACATTTCAAGAGAATGTTTCTGGGTCCCTTTCTTTTT
gCaMKIV	<i>Reverse:</i>
	AGATAAAAAGAAAGGGACCCAGAAACATTTCTTGAATGTTTCTGGGTCCCTTTCTGGG
	<i>Forward:</i>
RNAi-SC	GATCCCCGGGAGATCAGTACATATATTTCAAGAGAATATATGTA CTGATCTCCCTTTTT
gCaMKIV	<i>Reverse:</i>
	AGCTAAAAGGGAGATCAGTACATATATTTCTTGAATATATGTA CTGATCTCCCGGG

Tabla 13: Secuencia de los RNAi utilizados para bloquear la expresión de la gCaMKIV. Las secuencias están expresadas en sentido 5'-3'.

3.2.2 Vectores de expresión para células eucariotas.

Para el análisis de la implicación de las diferentes CaMKs constitutivamente activas murinas, se utilizó el vector de expresión pRSV con el promotor del citomegalovirus. En este vector estaban clonadas las distintas CaMKs. Todos estos vectores fueron cedidos amablemente por el Dr. RA Maurer.

El vector pEGFP, que codifica para una proteína fluorescente nos permitió realizar los experimentos de valoración de la supervivencia en cultivos de MNs, utilizando el microscopio de fluorescencia.

El vector pSUPER.retro.puro sirvió para clonar las secuencias de RNA de interferencia y expresarlas en MNs.

Tanto el vector de la forma mutada de la PKB como el vector de la PI-3K con la secuencia que la lleva a la membrana plasmática se utilizaron en experimentos donde se valoraba la supervivencia de las MNs, frente a distintos estímulos.

El vector pcDNA3-FLAG que se utilizó para el clonaje de la gCaMKIV y su forma constitutivamente activa.

Vector	Promotor	Casa comercial	Observaciones
pcDNA3	CMV	Invitrogen Corporation	
pRSV	SV40	Clontech	
pEGFP	CMV	Clontech	
pSUPER.retro puro	H1		
pCMV-HA-PKB ^{T308D/S473D}	CMV		Cedido amablemente por el Dario Alessi
pRSV-110CAAX- PI-3K	CMV		Cedido amablemente por el Dr. J Donward
pcDNA3-FLAG	CMV	---	Modificado del pcDNA3
pcDNA3-FLAG-gCaMKIV	CMV		
pcDNA3-FLAG-gCaMKIV _{CA}	CMV		
pRSV-CaMKI _{CA}	SV40	---	
pRSV-CaMKII _{CA}	SV40	---	Cedido amablemente por el Dr. RA Maurer
pRSV-CaMKIV _{CA}	SV40	---	
pRSV-CaMKK _{CA}	SV40	---	---

Tabla 14: Resumen de los plásmidos de expresión de células eucariotas. CMV (Citomegalovirus)

3.2.3 Generación del vector pcDNA3-FLAG-gCaMKIV

En este apartado se explica ampliamente como se obtuvo la secuencia de la CaMKIV de *Gallus gallus* y la estrategia seguida para el clonaje.

Obtención de la secuencia de la CaMKIV de *Gallus gallus* (gCaMKIV)

Tras la publicación recientemente del genoma de *Gallus gallus*, el primer paso para la obtención de la secuencia fue la búsqueda en las bases de datos públicas de *Gallus gallus* (*GenBank*), secuencias parecidas a la CaMKIV de otras especies, como la humana (hCaMKIV), la de ratón (mCaMKIV) o la de rata (rCaMKIV). A través de herramientas bioinformáticas (BLAST) se hallaron dos clones EST de *Gallus gallus*, que contenían secuencias homólogas en un

porcentaje alto a la hCaMKIV . Estos clones eran: *ChEST49p9* (número de acceso Pubmed: BU213725) y *ChEST99m17* (número de acceso Pubmed: BU111632).

Amplificación de los fragmentos que forman la gCaMKIV por PCR

La secuencias que codificaban para la gCaMKIV fueron amplificadas por PCR utilizando primers específicos. La peculiaridad de estos primers es que en sus extremos se les introdujo dianas de restricción, útiles para posteriormente introducir el inserto amplificado en el vector pcDNA3-FLAG. Por un lado, se amplificó la secuencia que se encontraba en el clon *ChEST49p9*, la cual correspondía prácticamente a toda la secuencia de la gCaMKIV. Para este clon se diseñaron los siguientes *primers* de clonaje: *Forward*: 5' **CGGGATCC**ATGCCCTCCACCTCTGCC 3' *Reverse*: 5' **GCCTTAAG**TTTACGCCG GGC 3' (en color violeta está marcada la diana *Bam*HI y en gris la diana *Afl*II). Por otro lado se diseñaron otros *primers* para amplificar la pequeña parte c-terminal de la gCaMKIV que se encontraba en el clon *ChEST99m17*. *Forward*: 5' GAAAC**CTTAAG**GCTGCCATG 3' *Reverse*: 5' **CGTCTAGA**TGCCGCTGGGAGCCGG GCACC 3' (igual que en el inserto anterior, en gris está indicada la diana para *Afl*II y en rojo la diana para *Xba*I). La diana *Afl*II se encontraba en la secuencia que compartían los dos clones, lo cual nos permitía la unión de ambos insertos. Se amplificaron por PCR y se separaron las bandas amplificadas en un gel de agarosa. Separada la banda amplificada, se cortó y posteriormente se extrajo el fragmento del gel utilizando un *kit* comercial (*Gel extraction Kit*, Quiagen). Los fragmentos obtenidos, se digirieron durante 1h a 37°C con los enzimas correspondientes en cada caso y se pasaron por columnas comerciales para eliminar las impurezas de la digestión (*Kit Clean up*, Quiagen). Por último, se cuantificó la cantidad de DNA obtenido, en un gel de agarosa.

Inserción y ligación de los insertos en el vector pcDNA3

Para que la probabilidad de éxito fuera mayor, dada la complejidad del clonaje, se decidió hacer el clonaje en dos pasos. Un primer paso consistía en la inserción del inserto que correspondía al principio de la proteína en el vector pcDNA3-FLAG, obteniéndose así, un primer subclonaje. Y en un segundo paso, en el que se

introduciría el segundo inserto que faltaba para completar la secuencia de la gCaMKIV (de aproximadamente 200 pb). El fragmento amplificado del clon ChEST49p9, se digirió con el enzima *Bam*HI para después introducirlo en pauta con la proteína FLAG en el extremo 3'. El vector pcDNA3-FLAG también se digirió con *Bam*HI y *Eco*RV (enzima que proporcionaba un extremo romo). Para introducir el fragmento, se desfosforiló el vector utilizando la fosfatasa, durante 1h a 37 °C. Para la ligación, se consideró el tamaño del vector respecto al tamaño del inserto, y teniendo en cuenta esta relación se pusieron 50 ng de vector y 3 veces más de inserto (relación vector-inserto 1:3). La ligación se realizó toda la noche a 16°C utilizando la ligasa T4 (*T4 DNA ligasa*, Biolabs). El resultado de la ligación se transformó en bacterias competentes DH5 α y las colonias obtenidas se testaron mediante digestiones con diferentes enzimas de restricción. Una segunda fase, fue introducir la secuencia del clon *ChEST99m17* que faltaba para completar la secuencia de la gCaMKIV. La secuencia amplificada se digirió con los enzimas *Afl*II y *Xba*I e igualmente se hizo con el subclonaje ya obtenido anteriormente. Tal como se había hecho con el primer subclonaje, el resultado de esta ligación se transformó en bacterias DH5 α y las colonias obtenidas se comprobaron mediante digestiones con enzimas de restricción. Para asegurarnos que el clon seleccionado contenía el plásmido con la gCaMKIV completa se secuenció.

3.2.4 Generación del vector pcDNA3-FLAG-gCaMKIV_{CA}

La forma constitutivamente activa (gCaMKIV_{CA}). Esta forma carece del dominio de unión a calcio/CaM y del dominio autoinhibitorio. La secuencia de la gCaMKIV_{CA} se obtuvo a partir del clon *ChEST49p9*, utilizando los siguientes *primers*: 5' CG **GGATCC** ATGCCCTCCACCTCTGCC 3' reverse 5' C **GAATTC** AAAGC TTCTTTTGTGCGTTGTCCAT 3' (en violeta está indicada la diana *Bam*HI y en azul la diana *Eco*RI). El clonaje se realizó siguiendo los mismos pasos que para la forma nativa de gCaMKIV.

3.3 RT-PCR

El análisis de la expresión de la CaMKIV en cultivos primarios de motoneuronas se determinó por la retrotranscripción-PCR (RT-PCR). Se obtuvo RNA a partir

de cultivos de motoneuronas y se retrotranscribió a cDNA, y obtenido éste se realizó una reacción de PCR utilizando los primers que se usaron para llevar a cabo el clonaje. Estos *primers* fueron: *Forward*: 5' CGGGATCCATGCCCTCCACCTCTGCC 3' *Reverse*: 5' CGTCTAGATGCCGCTGGG AGCCGGGCACC 3'. Obteniéndose aproximadamente un fragmento de 1100 pb. Como control se utilizó la secuencia para el gen ribosomal L27 fue la siguiente: *Forward* 5' AGCTGTCATCGTGAAGAA 3' *Reverse* 5' CTTGGCGATCTTCTTCTTGCC 3'.

3.4 CULTIVOS CELULARES.

Como modelo de estudio se ha utilizado el cultivo primario de MNs de embrión de pollo. Para experimentos en los que se ha precisado un mayor número de células, se han usado las líneas celulares PC12 y HEK293T.

3.4.1 Cultivo primario de motoneuronas

Para la obtención de MNs espinales se utilizaron embriones de pollo de 5.5 días (E5.5). Una vez extraído el embrión del huevo, se obtiene por disección la médula espinal. Tras una disociación mecánica y una separación de las células utilizando un gradiente de densidad, obtenemos las MNs purificadas. Se obtienen entre aproximadamente entre $2.5 \cdot 10^5$ - $3 \cdot 10^5$ MNs por cada médula.

Disección del embrión: En primer lugar, los huevos se esterilizaron vaporizándolos con etanol al 70%. A través de un pequeño orificio en la parte superior se extrae el embrión (Fig. 19). Una vez extraído se coloca en una placa con solución salina, GHEBS (137 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 25 mM glucosa, 25 mM Hepes, 100 unidades/ml de Streptomycin, 100 µg/ml de penicilina). Se eliminan las membranas que lo cubren y se corta la cabeza, para su mejor manipulación.

Para la extracción de la médula, se dispone al embrión boca-abajo en una placa de silicona y se fija por las extremidades, con la ayuda de unas pequeñas agujas.

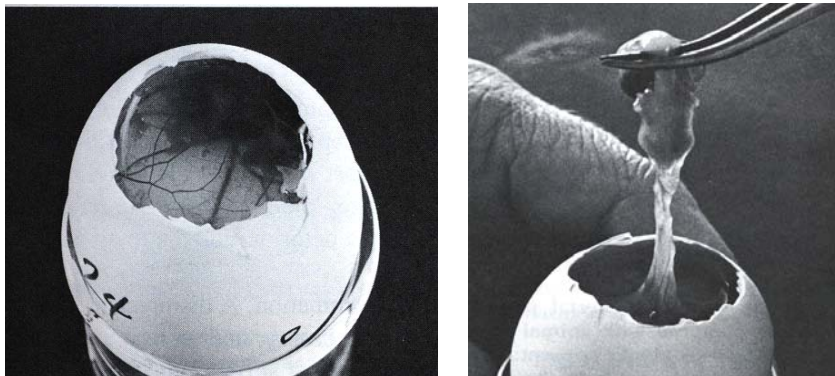


Figura 19: Obtención del embrión. A. Orificio en la parte superior del huevo para extraer el embrión. B. Extracción del embrión.

Una vez fijado, se realizan dos cortes longitudinales paralelos a la médula espinal y se retira la capa de piel que la cubre, permitiéndonos la extracción de la médula. Una vez obtenida, se limpió de las meninges y se dispuso en un tubo con GHEBS.

Purificación de las motoneuronas a partir de médulas espinales: Una vez obtenidas todas las médulas se lavaron tres veces con la solución de GHEBS, para eliminar sangre y pequeños trozos de embrión y posteriormente se incuban a 37°C durante 13 minutos en presencia de GHEBS y 0.5 g/l Tripsina (Tripsina 1X (2.5 g/l). , Ref.: T4424). Tras la digestión enzimática, las médulas se colocan en un tubo con medio L15 (Ref.: L4386) que contiene un 10% de suero de caballo (*Horse Serum*, HS)(L15_H) y se realizan 3 lavados con este medio. Para conseguir separar y disgregar las células que forman la médula, no es suficiente con la digestión enzimática y se necesita realizar una disociación mecánica en presencia de L15_H, 0.2 mg/ml de DNase (Roche Ref.: 104159) y 2 mM de piruvato (Fluka Ref.: 15980). Las células se pasan por una punta de pipeta de diámetro $\varnothing = 13''/16''$ varias veces. Después, la solución de células se pasa por una malla de nylon, para eliminar los grumos grandes de células y se centrifugan utilizando un gradiente con suero bovino (*Bovine Serum Albumine*, BSA) al 3.5% (Ref.: A8412), durante 5 minutos (min.) a 178 xg. Por último, para separar las MNs del resto de células que componen la medula, se realiza

un gradiente de densidad con Optiprep (Axis-Shield Ref.: 10330061). Se prepara una relación de optiprep al 30% iodixanol en GHEBS y se centrifuga durante 10 min. a 520xg, obteniéndose una banda que corresponde a las MNs (Fig. 20).

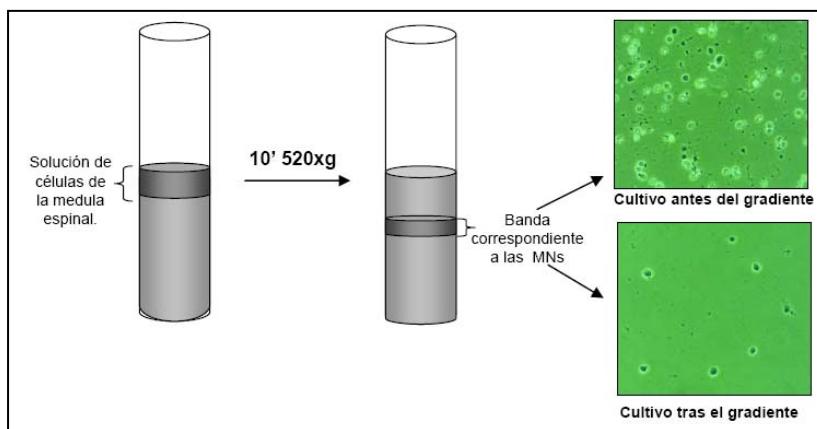


Figura 20: **Esquema del gradiente de densidad.**

Recuento y siembra de la MNs: Para el recuento de las MNs obtenidas se utiliza la cámara de Burker o de Neubauer. Las MNs se siembran en placas de cultivo (Falcon o NUNC) previamente tratadas con 35 $\mu\text{g/ml}$ ¹poliornitina (Ref.: P8638) en tampón Bórico-Borato y con 3.8 $\mu\text{g/ml}$ de laminina (Invitrogen, Ref.: 23017-015).

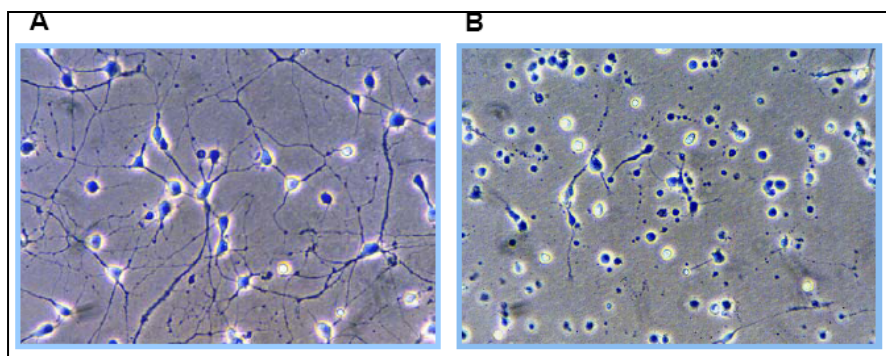


Figura 21: **Cultivo de MNs.** A. MNs en cultivo en presencia de extracto muscular (MEX). B. MNs en ausencia de soporte trófico.

Una vez purificadas, las MNs se mantuvieron *in vitro* en presencia de 300 $\mu\text{g/ml}$ de extracto muscular ²(MEX), que contiene todo el soporte trófico que necesitan

estas neuronas o en presencia de factores tróficos a una concentración de 10 µg/ml, excepto el BDNF que se utiliza a 1µg/ml . Las neuronas se mantienen entre 4-7 días en cultivo.

¹Preparación de las placas con poliornitina/laminina

Se prepara el volumen necesario de poliornitina a 35 µg/ml en tampón Bórico-Borato y se cubre la base de las placas. Éstas se dejan 4h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, evitando en todo momento que se sequen, se lavan con agua miliQ estéril para eliminar el exceso de sales y la formación de precipitados. Por último, se cubren las placas con laminina preparada en medio L15. Las placas con laminina se dejan en el incubador a 37°C durante 12h. Justo antes de sembrar las células se retira la laminina y se pone la solución de células.

²Preparación del Extracto muscular (MEX)

Se obtiene a partir de las extremidades de pollos recién nacidos (P0). Se sacrifican l y se extraen las extremidades inferiores, a las cuales se les retira la piel y el tejido adiposo. Se separa el músculo y se trocea. Una vez troceado, se pone en PBS 1X estéril (PBS 10X: 80 g/l NaCl, 2 g/l KCl, 2 g/l H₂PO₄K, 11.5 g/l Na₂HPO₄·7H₂O) y se lavan, para eliminar los restos de sangre. Una vez obtenido todo el tejido muscular, éste debe pesarse para poder calcular la cantidad de solución que se debe poner para disgregar el tejido. Una vez pesado el tejido se deja a 4°C y se le añade PBS-IP (1mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM Benzamidina, 0.1 mM PMSF, 1 mM NEM) un volumen igual a 3 veces el peso del tejido y se disgrega el tejido utilizando el politrón. La solución obtenida, se centrifuga durante 1h a 10000xg a 4°C. Se recoge el sobrenadante (SS) y se congela a -80°C durante una noche. Transcurrido este tiempo, se descongela lentamente a 4°C, se vuelve a centrifugar a 10000xg durante 1h a 4°C y se recoge el SS. Por último, se cuantifica la cantidad de proteína obtenida utilizando el Método de Bradford (Bio-Rad) o el Método Lowry (Bio-Rad).

3.4.2. Líneas celulares

Dentro de este bloque se explican todas las líneas celulares utilizadas, su mantenimiento y el tipo de experimento para el cual fueron utilizadas.

3.4.2.1 Línea PC12

Esta línea celular se obtuvo de la *American Type Culture Collection* (ATCC, n° de catálogo: CRL-1721). Es una línea celular proveniente de un feocromocitoma de rata. Esta línea fue mantenida con medio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, GIBCO Invitrogen Corp.), suplementado con 6% de suero de caballo (*Horse Serum*, HS), 6% de suero bovino fetal (*Fetal Bovine Serum*, FBS), 10 mM Hepes, 15 µg/ml de estreptomycin y penicilina, a 37°C y un 5% de CO₂.

Mantenimiento de la línea: Estas células se mantuvieron en cultivo en placas (sin necesidad de ser tratadas) de 100x20 mm de diámetro (P100) (Falcon). Esta línea celular se ha utilizado para experimentos de inmunoprecipitación y para comprobar la efectividad del RNAi utilizando los lentivirus.

Siembra de las células: El número de células utilizadas para cada uno de los experimentos realizados se muestra a continuación:

- Para los experimentos de infección con lentivirus: Se sembraron aproximadamente $3 \cdot 10^6$ células en placas P100, previamente tratadas con poliornitina (35 µg/ml) durante 1h. Las células antes de ser infectadas se dejaron en el incubador durante 12h para que se engancharan a la placa.
- Para los experimentos de inmunoprecipitación: A partir de placas confluentes de PC12, fueron transfectadas por electroporación y se sembraron en placas P100 tratadas con poliornitina (35 µg/ml). Antes de realizar los tratamientos se dejaron dos días en cultivo para que expresasen los vectores transfectados. Las condiciones de cada experimento están indicadas en el pie de figura correspondiente, en el apartado de resultados.

3.4.2.2. Línea celular HEK293T (*Human Embryonic Kidney*)

Las células HEK293T provienen de riñón embrionario humano y fue cedida por el Dr. Eduardo Soriano del grupo de Neurobiología del desarrollo y

regeneración neuronal del Parc Científic (Barcelona). Estas células se mantienen en medio de cultivo DMEM suplementado con un 10% de FBS, 10% de aminoácidos no esenciales y 2 mM de L-glutamina, a 37°C y 5% de CO₂.

Mantenimiento de la línea: Para el pase de las HEK293T, las células se lavan con PBS 1X a 37°C y se dejan con 2.5 g/l de tripsina-0.38 g/l EDTA 1X (GIBCO Invitrogen Corp.) durante ~2 minutos a 37 °C. Transcurrido este tiempo se inactiva la tripsina añadiendo medio de cultivo y se diluyen 1/10. Finalmente se dejan a 37 °C y 5% de CO₂.

Plaqueo de la línea celular: Para los experimentos de *actividad quinasa*, se plaquearon aproximadamente $3 \cdot 10^6$ células en placas P100 (tratadas con gelatina al 0.1% durante 30 min.) y se transfectaron utilizando Lipofectamine™2000. Tras dos días en cultivo se realizaron los distintos tratamientos.

Para la producción de lentivirus las células se plaquearon a una densidad de $3 \cdot 10^6$ células/placa en P100, también tratadas con gelatina al 0.1% y se transfectaron con los componentes víricos.

3.5 MÉTODOS DE TRANSFECCIÓN

La transfección es una herramienta que nos ayuda a la expresión de proteínas concretas en nuestro modelo de estudio, permitiéndonos así el análisis de la implicación de determinadas proteínas en las vías de supervivencia.

3.5.1 Lípidos catiónicos

Este método de transfección consiste en la utilización de lípidos catiónicos, los cuales encapsulan el DNA y, por interacción con la membrana plasmática de la célula, entran en su interior. Existen diferentes tipos de lípidos catiónicos pero en este trabajo se utilizó básicamente la *Lipofectamine™ 2000*. Este producto es idóneo para la transfección de cultivos primarios, por su baja toxicidad.

Transfección de las MNs con Lipofectamine™2000: Una vez obtenidas las MNs, éstas se sembraron en placas (previamente tratadas con poliornitina/laminina) de cuatro pocillos (NUNC) de 1.88 cm² (P4) a una densidad de 7.5·10⁴ células por pocillo. Entre 30 min y 2h después de sembrarlas se transfectaron. Las MNs se transfectaron con 1 µg de DNA total que contenía el plásmido a estudiar y el plásmido(pEGFP, Clontech), que codificaba para una proteína fluorescente (*Green Fluorescence Protein*, GFP). La GFP nos permite detectar aquellas células que han sido transfectadas, gracias a la fluorescencia que emite y que puede ser detectada utilizando un microscopio de fluorescencia. La relación entre los DNAs a transfectar es de 1:3, es decir, se utiliza tres veces más del plásmido a analizar que de proteína fluorescente. De esta manera, por probabilidad, nos aseguramos la transfección del plásmido problema. Para la transfección de las MNs, se utilizó 1 µg/µl de *Lipofectamine™2000*, que se incubó con el DNA a temperatura ambiente durante 20 min, tiempo suficiente para que se formen las micelas de lípidos encapsulando el DNA. Transcurrido este tiempo se puso la solución sobre las células y se dejó en contacto con las células entre unas 10-12 h. en su medio de cultivo.

3.5.2 Electroporación

Este método de transfección se utilizó con la línea celular PC12. Es un método bastante agresivo en el que hay un alto porcentaje de muerte celular, aún así, sigue siendo un buen método para transfectar líneas celulares. El porcentaje de transfección es variable y depende de cada línea celular, pero se puede llegar a obtener hasta un 40-50% de eficiencia de transfección.

Para llevar a cabo la electroporación las PC12 (de una placa P100 con aproximadamente entre 8-10·10⁶ células) se desenganchan y se centrifugan a 800xg durante 3 min. El pellet se resuspende en 750 µl de PBS 1X frío. Para la transfección se utilizaron 14 µg de DNA total: 4 µg de proteína fluorescente (pEGFP) y 10 µg de la proteína de interés. Se pusieron en contacto las células con el DNA total y se dejaron 10 min. en hielo. Transcurrido este tiempo se introdujeron en la cubeta de electroporación (Cell project 4 mm, Ref.: EP-104) y rápidamente se electroporaron (*GenePulser Xcell*, Bio-Rad).

Las condiciones de la electroporación fueron:

- Voltaje: 320 V
- Capacitancia: 975 μ F
- Resistencia $\infty \Omega$
- Pulso progresivo

En el menor tiempo posible, las células se pusieron en una placa con medio de cultivo (previamente tratada con poliornitina) y se dejaron a 37°C y 5% de CO₂. Tras 12h se cambió su medio por medio de cultivo fresco.

3.5.3 Fosfato Cálcico

La tranfección con fosfato de cálcico consiste en la formación de precipitados insolubles que contienen el DNA que se desea transfectar. Estos precipitados son endocitados por las células. Es un método de transfección bastante agresivo, por lo que no se aconseja su utilización en cultivos primarios.

Las soluciones necesarias para la transfección fueron:

- Cloruro cálcico 2.5 M
- Hepes 1M pH=7.3
- HBS 2X (281 mM CaCl₂, 100 mM HEPES, 1.5 mM Na₂HPO₄) a pH= 7.10-7.13

Para la transfección de las HEK293T, se preparan dos soluciones: la solución 1 contiene 0.25 M de CaCl₂, 2.5 mM de Hepes pH= 7.3 y el ³DNA necesario para la transfección. La solución 2 contiene el mismo volumen de HBS 2X. Gota a gota y sobre el vortex se vierte la solución que contiene el DNA sobre el HBS para formar los precipitados, y lo dejamos 30 min a temperatura ambiente. Trascurrido este tiempo, los precipitados formados se pusieron gota a gota sobre las células. Entre 6 y 12h después de la transfección se debe cambiar el medio de cultivo ya que si se dejan los precipitados un tiempo prolongado son tóxicos para las células.

En este caso se utilizó 40 μ g de DNA total. La relación fue de 3:2:1, repartida en la siguiente proporción, 20 μ g de vector de expresión (pLVTHM-

RNAi); 13 µg de vector que codifica para la proteína de la cápside (psPAX2) y 7 µg del vector de las proteínas de la envuelta (pM2G).

3.5.4 Infección con Lentivirus

La infección con lentivirus es un método que presenta algunas ventajas respecto a los anteriores. Una de estas ventajas es la capacidad de clonaje de los vectores y su integración en el cromosoma del huésped consiguiendo una expresión a largo plazo. En nuestro modelo hemos utilizado esta estrategia para la comprobación de la efectividad de los RNA de interferencia (RNAi) en la línea celular PC12. Esta técnica consiste en la infección de las células mediante el uso de virus que en su interior contienen la secuencia de DNA que nos interesa introducir.

Obtención de virus: Los lentivirus se obtuvieron transfectando la línea celular HEK293T con todos los elementos que constituyen el virus (pLVTHM, pM2G y psPAX2). 12h después de la transfección con fosfato de calcio se cambió el medio de cultivo de las células y se añadió medio fresco. Se dejaron 3 días *in vitro* (3 DIV) a 37 °C para que produjeran los virus, y, pasado este tiempo, se recogió el sobrenadante que contiene los virus y se centrifugó durante 5 min. a 1110 xg, para eliminar las células muertas. El sobrenadante se pasó por un filtro de 45 µm. Para concentrar los virus en un volumen más pequeño, se ultracentrifugó a 50.000 xg. durante 1.5h. Tras la centrifugación, los virus se resuspendieron en una solución de BSA al 2% en PBSy se guardaron a -80 °C hasta su posterior utilización.

3.6 TÉCNICAS BIOQUÍMICAS.

Las técnicas bioquímicas nos han facilitado la separación de proteínas, el análisis *in vitro* de la actividad quinasa y las interacciones entre dos proteínas.

3.6.1 Tratamientos y tipos de lisados celulares

Tratamiento de las células: De forma generalizada, tras la siembra de las células y su transfección (si era necesaria) se dejaban 2 DIV.

Posteriormente, se deprivaban de suero durante toda la noche, en medio mínimo, L15 para las MNs, DMEM para las líneas celulares. Tras la deprivación, las células se trataban con las condiciones experimentales específicas para cada experimento. Cuando fue preciso el uso de inhibidores de proteínas específicas, las células se preincubaban con el inhibidor durante 40 min.-1h antes de la estimulación con el factor neurotrófico. El tratamiento con el factor (entre 5-7 min.) se realizaba en presencia del inhibidor. Las concentraciones de cada inhibidor, así como del factor neurotrófico se indican en el pie de figura de cada resultado.

Obtención de los lisados celulares: Tras el tratamiento, las células se lisaban para la obtención de la proteína total. Dependiendo de la finalidad del experimento el tampón de lisado era diferente.

- Para lisados totales en *condiciones desnaturalizantes*.

- ✚ **Tampón de lisado 1:** Contiene 2% SDS y 125 mM Tris pH=6.8. Se utiliza para muestras que después se analizan con anticuerpos específicos, utilizando la técnica de *western blot*. Las células, tras el tratamiento, se lavaron con PBS 1X frío, para detener la reacción, y se añadió el tampón 1 sobre la placa. El lisado se dejó a 95°C durante 5 minutos. Posteriormente, las muestras se sonicaron, para romper bien todas las estructuras celulares y obtener todas las proteínas en solución. Por último, se cuantificó la proteína por el método de Lowry.

- Obtención de lisados totales en *condiciones no desnaturalizantes*.

Para obtener las proteínas sin desnaturalizar, se utilizan tampones más suaves. Los tampones de lisado utilizados se describen a continuación:

- ✚ **Tampón de lisado NP40:** Se utilizó para el ensayo de la PI-3K y gCaMKIV *in vitro*, y para los experimentos de inmunoprecipitación.

Este tampón contiene: 20 mM Tris-HCl pH=7.4, 1% NP40, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, inhibidores de proteasas (1mM PMSF, 20 µg/ml Leupeptina, 10 µg/ml de Aprotinina, 2 mM Benzidamida), inhibidores de fosfatasas (1 mM ortovanadato, 25 mM NaF, 50 mM β-glicerofosfato) y 10% glicerol.

Para la actividad de la gCaMKIV *in vitro* se utilizó una concentración diferente de Tris, 50 mM de Tris-HCl a pH=7.5 y en lugar de los inhibidores de proteasas, se utilizó un coctel comercial libre de EDTA que inhibe un amplio espectro de serina-cisteina proteasas (complete, EDTA-free, Roche, Ref. 1873580).

- ✚ **Tampón de lisado Tritón-X100:** Utilizado para determinar la actividad PKB *in vitro*. Los componentes de este tampon fueron: 1% Tritón-X100, 50 mM Tris-HCl pH=7.4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 150 mM NaCl, 0.5% NP40 y los mismos inhibidores de fosfatasas y proteasas que en el tampón anterior.

Tras la estimulación, las células se lavaron con PBS 1X frío en presencia de ortovanadato, se aspiró el PBS 1X y se añadió el tampón de lisado. Para evitar la degradación y la desfosforilación de las proteínas, en todo momento el lisado celular se mantuvo a 4 °C. Los lisados se pasaron a un tubo de 1.5 ml y se dejaron en el agitador orbital durante aproximadamente 20 minutos a 4°C. Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron durante 20 minutos a 16100 xg. Se recogieron los sobrenadantes y se pasaron a otro tubo. Por último, igual que en el caso anterior, la proteína se cuantificó por el método de Lowry.

3.6.2 Western Blot

La técnica de *western blot* nos permite la separación de proteínas en un gel de acrilamida y el posterior análisis utilizando anticuerpos específicos.

En la tabla 13, se han recogido todos los anticuerpos utilizados, así como la dilución usada y la casa comercial de la cual se han obtenido.

Anticuerpo	Casa Comercial	Dilución	Tipo	Nº catálogo
α -phospho-PKB (Ser473)	Cell Signalling	1: 1000	Policlonal	#9271
α - phospho-PKB (Thr 308)	Cell Signalling	1:1000	Policlonal	#9275
α -PKB (C20)	Santa Cruz	1:5000	Policlonal	DB059
α -phospho-ERK(Thr202/Thr204)	Cell Signalling	1:10000	Policlonal	#9101
α -pan ERK	BD Transduction Laboratories	1:5000	Monoclonal	610124
α -tubulina	SIGMA	1:40000	Monoclonal	T5168
α -PI-3K (p85)	BD Transduction Laboratories	1:1000 WB 1 μ g IP	Monoclonal	610046
α -CaM	UPSTATE	1:2000	Monoclonal	# 05-173
α -Flag-M2	SIGMA	1:5000	Monoclonal	F3165
α -Flag	Affinity Bioreagents	1:3000	Policlonal	PA1-984A
α -CaMKIV	BD Transduction Laboratories	1:5000	Monoclonal	610276
α -Caspasa 3 activa	Cell Signalling	1:1000	Monoclonal	#9661
α -phospho-CREB (Ser133)	Cell Signalling	1:1000	Policlonal	#9191
α -CREB	Cell Signaling	1:1000	Policlonal	
EZviewTMRed α -FLAG M2	SIGMA	20 (l (v/v)	Monoclonal	F2426
α -phosphotirosina 4G10	UPSTATE	1 (g IP	Policlonal	#05-321
Rhodamine RedTM-X-conjugated α -Mouse IgG	Jackson Immunoresearch	1:500 ICQ	Monoclonal	715-295-150
α -Mouse IgG-HRP	SIGMA	1:10000	Monoclonal	A 9917
α -Rabbit IgG-HRP	SIGMA	1:10000	Policlonal	A0545

Tabla 11: Resumen de los anticuerpos utilizados y diluciones usadas para cada uno de ellos.

Electroforesis: Para separar las proteínas se ha utilizado geles de acrilamida en condiciones desnaturizantes (*PolyAcrylamide Gel Electroforesis*, PAGE). Los geles se prepararon a partir de 30% de acrilamida y 0.8% de bis-acrilamida (Amresco).

La acrilamida es un compuesto de bajo peso molecular que forma largas cadenas lineales ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$), para unir estas cadenas se utiliza otro compuesto la bisacrilamida ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$). En función a la concentración de estos compuestos se obtienen los entramados más o menos densos, obteniendo un tamaño de poro diferente. Dependiendo de las proteínas que se quiera separar utilizamos un porcentaje de la mezcla acrilamida:bisacrilamida. La polimerización de estas moléculas se lleva a cabo utilizando catalizadores que aceleran el proceso de gelificación. El catalizador utilizado es el persulfato amónico. El anión persulfato tiene una elevada tendencia a descomponerse espontáneamente, formando radicales sulfato que son poco estables y tienden a recombinarse. Por ello se necesita de la adición de TEMED, que forma radicales libres estables en presencia de persulfato, contribuyendo a que la reacción de polimerización se propague más deprisa.

Para cargar las muestras en el gel, se les añadió el tampón de carga (*loading buffer*, LB) (LB 5X: 250 mM Tris/HCl pH=6.8, 10% SDS, 25% β -Mercaptoetanol, 0.005% azul de bromofenol y 50% glicerol) y se pusieron a 95°C durante 5 minutos, y seguidamente se cargaron en el gel.

El tampón de electroforesis en el que se separaron las proteínas estaba compuesto por 14 g/l de glicina, 3 g/l Tris-HCl y 1 g/l SDS. La separación de las proteínas se realiza a amperaje constante, 25 mA/gel.

Electrotransferencia: . Separadas las proteínas, éstas fueron transferidas a una membrana de PVDF (*ImmobilonTM-P*, Millipore) de tamaño de poro 0.45 μm . Estas membranas para ser utilizadas deben hidratarse previamente con metanol 100% durante 5 minutos en agitación, se eliminaron los restos de metanol. Se eliminaron los restos de etanol y se equilibró con el tampón de transferencia (*Transfer Buffer* 10X: 3.75 g/l SDS, 58.1 g/l Tris-HCl y 29.3 g/l glicina. La transferencia semiseca (Hoeffer), se realizó a amperaje constante 0.8 mA/cm² durante 1h (Ver figura 23).

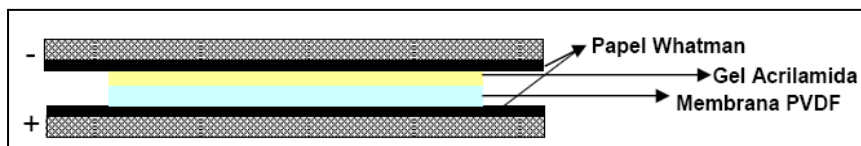


Figura 23: Esquema de la transferencia en “Sistema semidry” (Hoeffer).

Incubación con el anticuerpo primario: Transferidas las proteínas a la membrana de PVDF, se bloqueó con un 5% de leche en polvo libre de grasas, para evitar las uniones inespecíficas del anticuerpo primario, durante 1h a temperatura ambiente. Para eliminar el exceso de leche, la membrana se lavó varias veces con el tampón de lavado TBS-T (2.4 g/l Tris-HCl, 8.8 g/l NaCl y 0.1% Tween-20). El anticuerpo primario se preparó en la misma solución, a la que se le añadió un 0.02% de azida. La incubación se realizó durante toda la noche a 4°C.

Incubación con el anticuerpo secundario: Una vez retirado el anticuerpo primario se realizan varios lavados con TBS-T para eliminar el exceso de anticuerpo. Tras los lavados, la membrana se incubó durante 1h con el anticuerpo secundario (este anticuerpo se preparó en TBS-T y 5% leche en polvo). Tras la incubación se realizaron varios lavados con TBS-T y se procedió al revelado.

Revelado de la señal: El anticuerpo secundario tiene unida la peroxidasa, que en presencia de agua oxigenada reacciona dando lugar a una señal luminosa, que es la que utilizamos para obtener la señal. La señal se expuso en un film, SuperRX (Fuji Medical X Ray Film, Fujifilm). Para desencadenar la reacción quimioluminiscente se utilizaron distintos reactivos (EZ-ECL, Biological Industries; Super Signal, Pierce o ECL-Advanced, Amersham Bioscience). Algunas membranas se incubaron con más de un anticuerpo primario. Para eliminar los anticuerpos incubados con anterioridad, las membranas se trataron con una solución (de Stripping), del inglés despojar, que contenía 100 mM β -Mercaptoetanol, 2% SDS y 62.5 mM Tris pH=6.8 durante 20 min. a 65 °C. Después la membrana debe incubarse de nuevo con leche al 5% y el anticuerpo primario que se desee.

Tinción de la membrana: Como control de carga, la membrana se tiñó con 0.1% de Naftol (*Naphtol Blue Black*), 10% metanol y 2% ácido acético, durante 5 minutos, después se decoloró con 50% de metanol y 7% de ácido acético.

3.6.3 Ensayo de actividad quinasa *in vitro*

A continuación se explican las técnicas de actividad quinasa *in vitro* que se realizaron para cada una de las proteínas que hemos estudiado. En general, en todas ellas se ha estudiado la capacidad *in vitro* de fosforilar substratos conocidos frente a diferentes condiciones.

3.6.3.1 Actividad PI-3K

La activación de receptores con actividad tirosina quinasa, como TrK o Ret, activan la vía de la PI-3K/PKB, mediando la supervivencia de la célula. La PI-3K es una proteína de esta vía que se encarga de la fosforilación de los fosfatidiles inositoles presentes en la membrana celular. Como consecuencia de esta fosforilación se activan proteínas por debajo de la PI-3K en la cascada de señalización como la PKB promoviendo la supervivencia celular.

Los experimentos de actividad *in vitro* nos permitieron determinar la capacidad de fosforilación de la PI-3K, en presencia de ATP marcado radiactivamente con fósforo 32 y su sustrato de fosforilación, micelas formadas por fosfatidilserina (PS, del inglés *Phosphatidylserine*) y el fosfatidilinositol (PI, del inglés *Phosphatidylinositol*) en presencia de distintas condiciones experimentales.

La actividad PI-3K se realizó en cultivos primarios de MNs. Para cada condición de estudio se utilizaron aproximadamente $3 \cdot 10^6$ MNs. Las células se preincubaron durante 30 minutos con los inhibidores de la CaM (W13 y W12) o con el inhibidor de la PI-3K (LY244002). Más tarde, se estimularon con GDNF (100 ng/ml) juntamente con las drogas correspondientes en cada caso. Para detener la reacción, las células se lavaron con PBS1X frío, en presencia de ortovanadato (para evitar la degradación de las proteínas) y se obtuvieron los lisados celulares. Para este experimento se utilizaron 150-250 μ g de proteína total por condición. Los lisados celulares se inmunoprecipitaron toda la noche con 1 μ g de α -fosfotirosina (4G10) por condición, a 4°C en el agitador orbital.

Por otro lado, la proteína A unida a bolas de sefarosa (*Sepharose-A protein*), previamente lavada con PBS1X y equilibrada con el tampón de lisado, se incubó durante toda la noche a 4°C con α -ratón (40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ por 100 μl de proteína A) (, *Ref. M-6024*). Para eliminar el exceso de anticuerpo, la proteína A se lavó con tampón de lisado 10 veces y se dejó un 50% (v/v) de tampón de lisis y bolas de sefarosa. A los inmunoprecipitados se le añadió 80 μl (v/v) de la proteína A y se dejaron 2h a 4°C en el agitador orbital. Transcurrido este tiempo, los inmunocomplejos se lavaron 2 veces con **tampón de lisado**; 3 veces con **tampón de LiCl** (100 mM Tris-HCl pH=7.5, 500 mM LiCl, 1mM EDTA, 1mM ortovanadato) y por último 3 veces más, con el **tampón TNE** (25 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1mM EDTA y 1mM ortovanadato) para equilibrar las muestras para el ensayo.

Como sustrato de fosforilación de la PI-3K, se utilizó una mezcla de fosfolípidos: PS (*Ref. P-5660*) y PI(*Ref. P-8443*). Para cada condición se necesitaron 30 μg de lípidos totales (15 μg de PS y 15 μg de PI). Estos lípidos comercialmente, se encuentran disueltos en cloroformo para evitar su oxidación, por lo que antes de utilizarlos se debe evaporar el cloroformo. Una vez evaporado el cloroformo, los lípidos se resuspenden en el **tampón HE** (25 mM Hepes pH=7.5, 1 mM EDTA). Antes de empezar el ensayo se deben formar las micelas de lípidos, para conseguirlo, la mezcla de lípidos se sonicó a intervalos de 1 min. dos veces. Este proceso debe realizarse en hielo. El **tampón de la reacción** contenía: 12.5 mM Hepes pH=7.5, 10 mM MgCl_2 , 0.5 mM EGTA, 40 μM de ATP y 10 μCi γ -ATP³² (*Amersham Bioscience*). A los inmunocomplejos se les añadió el tampón de reacción y el sustrato y se dejó durante 20 min. a 30 °C.

Extracción lipídica: Para la obtención de los lípidos marcados radioactivamente se realizó una extracción lipídica. En los tubos donde se había llevado a cabo la fosforilación, se añadió una solución que contenía: cloroformo-metanol-37% ácido clorhídrico (en la siguiente proporción 2:4:0,06). Se mezcló bien y se centrifugó para separar bien todas las fases. A la fase lipídica se le añadió: metanol-100 mM HCl-EDTA (en la proporción 2,5:2,5:0,025), y se repitió el paso anterior. Al final se consiguió la fase lipídica libre de otros componentes y se

dejó evaporar el solvente utilizado para la extracción. Finalmente, resuspendimos los lípidos en cloroformo para poderlos separar por cromatografía de capa fina (placas de cromatografía TLC, MERK Ref. OB050026). Para separarlos, se utilizó una fase líquida compuesta por N-propanol-agua-ácido acético (en la proporción 66:33:2). La capa fina se introdujo en una cubeta donde está la fase líquida y se dejó 2h a que migrasen los lípidos. Al final del proceso, se extrajo la capa fina y se secó a temperatura ambiente. La capa fina con los lípidos fosforilados se expuso en placas radiosensibles y se analizó la radioactividad cuantificándola en el Fuji BAS 1000 Phosphoimager, utilizando el programa PCBAS 2.0 Software (Fuji Photo Film CoLtd).

3 6.3.2. Actividad PKB

La PKB es una proteína quinasa que está por debajo de la PI-3K en la cascada de señalización. La PKB una vez fosforilada en la S473 y en la T308 se activa, activando a su vez distintas proteínas que como consecuencia, llevan a la supervivencia de la célula. Esta técnica nos permitió analizar la capacidad de fosforilación *in vitro* de la PKB utilizando como substrato la histona 2B. La actividad se realizó utilizando los cultivos de MNs, los cuales fueron tratados con los inhibidores de la CaM, el inhibidor de la PI-3K y con el factor neurotrófico GDNF.

Las células se lisaron con el tampón Tritón-X100 y se lavaron con PBS 1X frío y ortovanadato. Los lisados totales se incubaron con 2-4 µg de anticuerpo primario α-PKB (C20) (Santa Cruz) por condición y se dejaron toda la noche a 4°C en el agitador orbital. Para inmunoprecipitar los complejos se utilizó la proteína G unida a bolas de sefrosa, durante 2h a 4°C. Los inmunocomplejos se lavaron 2 veces con **tampón de lisado**, con el **tampón de lavado 1** (50 mM Tris-HC pH=7.5, 100 mM NaCl, 1% Triton-X100 y 1 mM EDTA); dos lavados más con el **tampón de LiCl** (0.5 M LiCl, 100 mM Tris pH=8 y 1 mM EDTA) y para equilibrar la muestra, un último lavado con el **tampón 2** que contenía: 50 mM Tris pH=7.5 y 10 mM de Mg₂Cl. Para la reacción de fosforilación se utilizó la siguiente solución: 50 mM Tris pH=7.5, 10 mM Mg₂Cl, 1 mM DTT, 2.5 mg/ml de Histona 2B, 42 µM de ATP y 3 µCi γ-ATP³². El ensayo se llevo a cabo a

temperatura ambiente y durante 30 min. en esta solución. Para detener la reacción a cada una de las muestras se les añadió tampón LB. Las proteínas se separaron en un gel de acrilamida y se cuantificó el marcaje radioactivo utilizando el Fuji BAS 1000 Phosphoimager, utilizando el programa PCBAS 2.0 Software (Fuji Photo Film CoLtd).

3.6.3.3 Actividad CaMKIV

La CaMKIV es una quinasa regulada por calcio y CaM, para su activación requiere ser fosforilada por la CaMKK y alcanza su máxima actividad cuando se autofosforila en el extremo amino terminal. Como substrato conocido tiene CREB. La actividad quinasa de la CaMKIV se evaluó en la línea celular HEK293T. Para determinar la actividad, se transfectó esta línea con la proteína nativa de gCaMKIV y la forma constitutivamente activa, gCaMKIV_{CA}. Las HEK293T se transfectaron utilizando Lipofectamine™2000 y se dejaron durante 2 DIV. Trascorrido este tiempo, las células se lisaron utilizando el **tampón NP40**. Se obtubieron los lisados celulares y se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo α -Flag (Ref. F3165) unido a bolas de agarosa (previamente equilibradas con el tampón de lisado). Pasado este tiempo, los complejos se lavaron con el **tampón de lavado** (50 mM Tris pH=7.4, 0.2% Tween-20, 20 mM MgCl₂, 2mM *CaCl₂ o 2mM *EGTA y 0.5 mM DTT)

* Dependiendo de la condición (presencia de calcio o ausencia de calcio).

Tras estos lavados, la reacción de fosforilación se realizó a 30 °C durante 20 minutos en presencia del **tampón de reacción**, que contenía: 50 mM Tris pH=7.4, 0.2% Tween-20, 20 mM MgCl₂, 2mM *CaCl₂ o 2mM *EGTA, 0.5 mM DTT, 25 μ M de ATP, 2.68 μ g/ μ l de CaM, 10 μ Ci γ -ATP³² y 0.2 μ g de CREB recombinante.

Para detener la reacción se añadió tampón LB (sin β -Mercaptoetanol). Las proteínas se separaron en un gel de acrilamida, se transfirieron a una membrana de PVDF. El marcaje radioactivo se analizó como en los casos anteriores. Esta misma membrana fue utilizada para la incubación con los anticuerpos, α -fosfo-CREB y α -CREB.

3.6.4 Experimentos de *pull-down*

Este tipo de experimentos nos permite el estudio *in vitro* de las interacciones proteína-proteína. Utilizando esta técnica se ha analizado la interacción entre la CaM y la subunidad reguladora de la PI-3K (p85) y la interacción entre la gCaMKIV y la PI-3K (p85).

3.6.4.1. Análisis de la interacción entre la CaM y la PI-3K (p85)

A partir de 600 µg proteína total, obtenida a partir de cultivos de MNs, cada una de las condiciones se incubó durante toda la noche a 4 °C en presencia de α -CaM-sefarosa (*α -CaM-sepharose 4B beads*, Amersham Biosciences). Las bolas de sefarosa que tienen unido el anticuerpo, se bloquearon previamente con BSA al 1%, para evitar las uniones inespecíficas. Como control negativo del experimento se utilizaron bolas de sefarosa las cuales no tenían unido ningún anticuerpo. Tras la inmunoprecipitación, los complejos se lavaron con el tampón utilizado para el lisado de las células. Se realizó un último lavado con Tris-HCl a pH=6.8, para equilibrar las muestras con el pH de la electroforesis y por último se añadió a cada una de las condiciones tampón LB. Las proteínas se separaron en un gel de acrilamida, se transfirieron a una membrana de PVDF y se analizó la interacción incubando la membrana con el anticuerpo α -PI-3K (p85). Para corroborar estos resultados, se realizó la inmunoprecipitación en sentido contrario, es decir, inmunoprecipitando p85 y detectando CaM.

3.6.4.2. Análisis de interacción entre la CaMKIV y la PI-3K (p85).

Estos experimentos se realizaron a partir de 1 mg de proteína total obtenidos a partir de lisados celulares de PC12 y HEK293T transfectadas con las distintas construcciones de la gCaMKIV. Cada condición de experimentación se incubó toda la noche con bolas de sefarosa que tenían unidas el anticuerpo, α -FlagM2, a 4°C. Tras la inmunoprecipitación, los complejos se lavaron con el tampón de lisado y se les añadió tampón LB (sin β -Mercaptoetanol). Las muestras se incubaron con el anticuerpo α -PI-3K (p85). Al igual que en el experimento anterior, se repitió la inmunoprecipitación utilizando en esta

ocasión el anticuerpo α -PI-3K (p85) y analizando después la presencia de α -Flag en la membrana. Como control de carga se tiñió la membrana con Naftol y también se utilizó el anticuerpo usado en la inmunoprecipitación, el α -PI3K (p85).

3.7. ESTUDIO DE LA VIABILIDAD CELULAR

3.7.1 Valoración de la supervivencia

Las MNs se cultivaron en presencia de MEX (300 μ g/ml) o de factores neurotróficos, a la concentración de 10 ng/ml, durante 48 h a 37 °C y 5% de CO₂. Pasado este tiempo las células se lavaron con L15_H y se añadieron los diferentes tratamientos (especificados en el apartado de resultados). La evaluación de la supervivencia se realizó en dos tipos de experimentos:

* Aquellos en los que las células se trataron con las distintas condiciones del experimento y se evaluó la supervivencia a las 24h después del tratamiento. Se utilizó el microscopio invertido de contraste de fase, y se contaron aquellas células que tenían neuritas igual a dos veces el tamaño del soma.

* Otro tipo de experimentos fueron aquellos en los que se transfectaron las células con diferentes plásmidos. En estas ocasiones se utilizó el microscopio de fluorescencia, ya que uno de los plásmidos transfectados era la proteína fluorescente. Las MNs se mantenían 2 DIV para que se expresarán las proteínas transfectadas, y tras este tiempo, se trataban los cultivos con las diferentes condiciones de experimentación. Para realizar el recuento, se contaban sólo aquellas células que expresaban la proteína GFP, e igual que en el caso anterior, se consideraba como célula viva, aquella MN que tenía un tamaño de neurita dos veces el tamaño del soma. El valor obtenido a este tiempo se consideraba el 100% de la supervivencia. Transcurridas 24-48 h después del tratamiento, se realizaba un segundo contaje de los mismos pocillos. El porcentaje de supervivencia se obtenía como la relación entre las células contadas al final del tratamiento, respecto a las contadas al inicio.

3.7.2 Valoración de la muerte celular

3.7.2.1 Tinción con bis-benzimida de Hoescht 33258

La bis-benzimida es un colorante que tinte núcleos celulares y nos permite valorar el estado de la célula según la morfología nuclear que presenta. Este compuesto es permeable a la membrana celular y podemos detectarlo excitando la muestra en el rango del ultravioleta (UV). Con este tipo de tinción conseguimos cuantificar aquellos núcleos que tienen una morfología apoptótica por condensación o fragmentación nuclear. Para estos experimentos, las MNs se mantuvieron en cultivo 2 DIV, en presencia de MEX o de factores neurotróficos. Las células se lavaron con L15_H y se trataron con las diferentes condiciones de experimentación. Tras 18h de tratamiento, las MNs se fijaron con paraformaldehído al 4% (Fluka, Neu Ulm) durante 20 minutos, se lavaron con PBS 1X y se tiñeron con bis-benzimida a una concentración de 2 µg/ml, durante 30 minutos. Por último, las células se lavaron con PBS 1X. El porcentaje de muerte se evaluó contando aquellas células con un núcleo apoptótico respecto a aquellas con un núcleo normal.

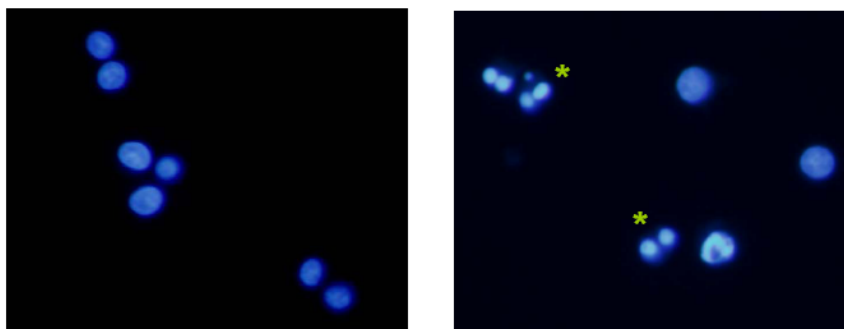


Figura 24: Tinción nuclear con Hoescht 33258. A. Núcleo de MNs teñido con morfología normal. B. Núcleos de MNs tratados con el inhibidor de la CaM, el W13. Los asteriscos representan núcleos con morfología apoptótica.

3.7.2.2 Inmunocitoquímica con caspasa-3 activa

Después de 18 h de tratamiento, las MNs se fijaron con paraformaldehído al 4% (Fluka, Neu Ulm) durante 20 min., se lavaron con PBS 1X y se bloquearon durante 1h con PBS1X-0.1%TritónX-100 y 5% de FBS. El anticuerpo primario se preparó en la solución de bloqueo a una dilución 1:50 y se dejó toda la noche

a 4 °C. Para eliminar el exceso de anticuerpo, las MNs se lavaron con PBS1X-0.1%Tritón-X100 y se incubaron con el anticuerpo secundario (*RRX-conjugated donkey anti-rabbit*, Jackson ImmunoResearch) durante 1h a temperatura ambiente. Junto con el anticuerpo secundario, las células se incubaron con bis-benzimida. Por último, las MNs se lavaron con PBS1X y se analizó el resultado en el microscopio de fluorescencia.

3.7.2.3 Recuento de células apoptóticas (*Blebbing*)

Otro parámetro utilizado para evaluar la muerte neuronal es lo que se denomina *Blebbing*, término del inglés para definir la aparición de protuberancias en la membrana plasmática de las células apoptóticas (ver figura 25). Después de sembrar las MNs se transfectaron con los diferentes plásmidos a estudiar, utilizando *Lipofectamine™2000*. Para eliminar los restos de *Lipofectamine™2000*, 12h después de la transfección las células se lavaron con L15_H y se trataron. Para cuantificar el porcentaje de muerte, se consideraron como MNs muertas aquellas positivas para la GFP que presentaban una morfología de *blebbing* y como vivas, las MNs que tenían neuritas de una longitud dos veces igual al tamaño del soma (Ver figura 45).

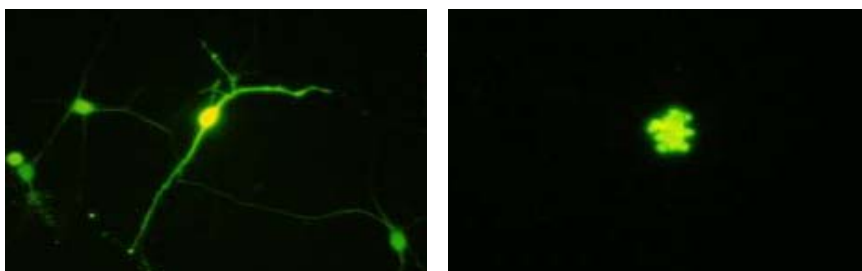


Figura 25: Representación del blebbing en una MN. A. Célula viva (20X). B. Célula muerta con la morfología característica del blebbing (40X).

3.8. HIBRIDACIÓN *IN SITU*

Este bloque de experimentos se realizó en el laboratorio INSERM 382, *Developmental Biology Institute of Marseille, CNRS-INSERM-Univ. Mediterranee, Campus de Luminy, Case 907, Marseille, France*, en colaboración con la Dra. Odile deLapeyriere.

3.8.1 Preparación de la sonda

Todas las sondas se obtuvieron a partir de DNA plasmídico, el cual se digirió con el enzima de restricción adecuado para linealizarlo, y se usó el promotor T3 o T7, dependiendo del vector, para transcribirlo a RNA. El RNA obtenido se utilizó como sonda.

3.8.2 Hibridación *in situ whole mount*

Para este tipo de experimentos se utilizaron sondas que marcaban poblaciones de MNs. La hibridación se realizó en medulas de ratón E12 o E18 utilizando ratones de la cepa salvaje y ratones KO para LIFR β (receptor de citoquinas).

Fijación de las médulas: Se extrajeron las médulas de los ratones y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4%, preparado con PBST (PBS1X:0.1% Tween20), durante toda la noche en agitación. Las médulas se lavaron con PBST y se deshidrataron en presencia de PBT-etanol. Para la deshidratación se empezó con un lavado de 10 min. en PBT-25%etanol y progresivamente se fue aumentando la concentración de etanol hasta que el último lavado se realizó en PBT-100%etanol. En este paso las médulas pueden congelarse a -20 °C durante varias semanas, hasta ser procesadas.

Hibridación: Las médulas se rehidrataron progresivamente disminuyendo la concentración de etanol, siguiendo los pasos inversos a la deshidratación. Cuando ya estaban hidratadas, se lavaron 5 min con PBT y se trataron con proteinasa K a 10 μ g/ml. El tiempo de actuación de la proteasa, depende del tamaño del embrión. Así, para medulas de E12 se deja durante 10 min; en cambio, para médulas de E18 se incrementa la concentración de proteinasa K hasta 20 μ g/ml y se deja actuar durante 30-60 min. Posteriormente, las médulas se lavaron con PBT para detener la acción de la proteasa y se fijaron nuevamente con PBT:4%PFA:0.1% glutaraldehído, durante 20 min para E12 y 30 min para E18. Tras la fijación, se lavaron con PBT y se prepararon para la hibridación con la sonda:

-En primer lugar se preparó una solución 1:1 de PBT y tampón de hibridación (50% Formamida, 1.3X SSC (Tampón SSC 20X: 3M Cloruro de sodio, 0.3M citrato de sodio pH=7.0), 5 mM EDTA, 50µg/ml de RNA de levadura, 2% Tween-20 y 0.5% CHAPS) y se lavaron las médulas durante 10 min.

-Seguidamente, un lavado con tampón de hibridación a temperatura ambiente, durante 10 min.

Antes de hibridar con la sonda, se hizo una pre-hibridación que consistía en dejar las médulas con el tampón de hibridación entre 1-1.30h a 70 °C para E12 y 2-2,30 h para E18. Por último, las médulas se incubaron con el tampón de hibridación y la sonda marcada con digoxigenina, toda la noche a 70 °C.

Lavados de la sonda: Los lavados que se realizaron fueron los siguientes:

- 1- Dos lavados de 10 min. con el tampón de hibridación a 70 °C.
- 2- Dos lavados de 30 min. con el tampón de hibridación a 70 °C.
- 3- Un lavado con una solución 1:1 de tampón de hibridación y TST (500 mM NaCl, 10 mM Tris pH=7.5, 0.1% Tween-20) también a 70 °C.
- 4- Un lavado con tampón TST a temperatura ambiente.
- 5- Otro lavado con tampón de hibridación a temperatura ambiente.
- 6- Seguidamente, se incubaron con el tampón de hibridación a 65 °C 10 min.
- 7- Un lavado con una solución 1:1 de tampón de hibridación y MABT (MABT 5X: 58 g/l maleato, 44 g/l NaCl y Tween 0.5% a pH=7.5) durante 10 min.
- 8- Tras estos lavados se realizó otro lavado con MABT durante 10 min.
- 9- Las médulas se dejaron 1h a temperatura ambiente en este mismo tampón.

Para bloquearlas se utilizó suero de oveja (*sheep serum*) durante 1h a temperatura ambiente. Por último, las médulas se incubaron toda la noche a 4 °C en presencia del anticuerpo secundario, anti-digoxigenina (DIG) unido a la fosfatasa alcalina. Este anticuerpo se preparó en solución de MABT y un 2% de suero de oveja.

Revelado: Las médulas se lavaron con MABT varias veces para eliminar el exceso de anticuerpo secundario. Para equilibrar el pH para proceder al revelado, las médulas se lavaron con tampón B3 a pH=9.5, (100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂ y 100 mM Tris). Tras estos lavados, se incubaron con la solución de revelado (1.4 µl/ml NBT y 1.1 µl/ml BCIP) a temperatura ambiente, sin agitación y en la oscuridad. Para detener la reacción, las médulas se pusieron en PBT. Antes de montarlas en el portaobjetos, las médulas se volvieron a fijar en PFA al 4% y se montaron utilizando PFA al 4% y 75% de glicerol.

3.8.3 Hibridación *in situ* (Slices)

Los embriones se fijan en PFA al 4% durante toda la noche a 4 °C en agitación. Después de la fijación los embriones se pusieron en presencia de sacarosa al 15%, preparada en PBS1X hasta que los embriones se sumergieron en el fondo del tubo. La incubación con sacarosa se realizó a 4 °C.

Inclusión del embrión en OCT (OCT Compound Tissue-Tek 4583, Sakura): Se dispusieron los embriones en hielo para proceder a la inclusión. Para la inclusión se utilizó OCT. El componente OCT es un producto comercial parecido a la gelatina, con la ventaja que es manipulable a temperatura ambiente. En cambio la gelatina debe calentarse para ser líquida. Para proceder a la inclusión del embrión, se colocó una pequeña capa de OCT en la base de la caja y se depositó el embrión encima, indicando su posición rostro-caudal. Una vez colocado, el embrión se cubrió completamente con OCT. Para congelar el bloque, se utilizó isopentano y nitrógeno líquido que mantuvo la temperatura entre -60 °C y -80 °C. Una vez congelado, rápidamente se colocó a -80 °C hasta que se procediera al corte en el criostato.

Obtención de los cortes: El bloque de OCT se colocó en el soporte del criostato y se cortó en forma de pentágono, con ayuda de una cuchilla, dejando el embrión en el centro. Una vez seleccionado el grosor del corte y la orientación se procedió al corte del embrión en segmentos transversales. Los cortes obtenidos se fueron colocando en portaobjetos (*Menzel-Glaser, Microscope Slides 76x26 mm*). En cada portaobjetos se colocaron aproximadamente entre 6

y 8 cortes. Los portaobjetos con los cortes se guardaron a -20 °C hasta que se procesaron las muestras.

Hibridación con la sonda: Las muestras procedentes de -20 °C, se dejaron atemperar durante 30-45 min. a temperatura ambiente. La sonda de hibridación se diluyó en el tampón de hibridación previamente calentado a 70 °C. Se puso la solución con la sonda sobre las muestras y se colocó un cubre para que no se evaporara la solución. Además se colocaron en una caja con papeles Watman empapados en 1X SSC y formamida al 50%. Los portaobjetos se dejaron durante toda la noche a 70 °C y en la oscuridad. Una vez realizada la hibridación, se retiró el cubre con mucho cuidado y se lavaron las muestras durante 15 min a 65 °C con el tampón de lavado (1X SSC: 50% formamida: 0.1% Tween-20). Tras este lavado se realizaron dos más, durante 30 min con el mismo tampón, y por último, dos lavados con MABT a temperatura ambiente.

Bloqueo de la sonda: Las muestras se bloquearon con una solución que contenía: MABT, agente bloqueante al 2% y de suero de oveja al 20% y se dejaron a temperatura ambiente durante 1h. En la misma solución de bloqueo se añadió el anticuerpo primario (anti-DIG) dilución 1:2000 y se dejó toda la noche a temperatura ambiente.

Revelado: Se lavó la muestra con MABT a temperatura ambiente para quitar el exceso de anticuerpo y se equilibró con el tampón B3 para poder revelarlo con NBT/BCIP.

3.9. OTRAS TÉCNICAS

3.9.1 Análisis del incremento de calcio intracelular utilizando el Método de Fluo-4.

El Método del fluo-4 utiliza la fluorescencia para el análisis de los incrementos de calcio intracelular. El Fluo-4, es una molécula que tiene unida una secuencia acetoximetil ester (AM) que le permite fusionarse a la membrana celular y entrar en el interior de la célula. Los incrementos de calcio intracelular se miden como incrementos en la fluorescencia emitida. Para determinar estos incrementos, las MNs se plaquearon en cubreobjetos, previamente tratados con

poliornitina (35 $\mu\text{g/ml}$) y laminina (3.8 $\mu\text{g/ml}$). Los cubreobjetos con las células sembradas, se lavaron con la solución de KREBS (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 10 mM Hepes y 11 mM Glucosa a $\text{pH}=7.5$) y se incubaron con 5 μM de Fluo-4-AM (*Molecular Probes*) durante 1h a 37 °C. El cubre se montó en un adaptador específico para el microscopio invertido Nikon TE-200 y se realizaron cada uno de los tratamientos. Al mismo tiempo, se analizaron mediante la estimulación de las muestras con el laser a la longitud de excitación 488 nm (Melles Griot, Calsbad, CA) y emisión a 535 nm. La concentración de calcio se calculó según (Kao, JP y col. 1989). Se utilizó como K_d del Fluo-4, 400 nm. La $F_{\text{máx.}}$ se evaluó en presencia de 50 μM de ionomicina y la $F_{\text{min.}}$ se determinó después de añadir 15 mM de EGTA. Para estos estudios se tomaron imágenes cada 1 μm en toda la célula que se analizaba, utilizando el microscopio confocal y el módulo Ultraview del confocal (PerkinElmer Life Sciences). Las imágenes se grabaron cada 4 segundos y finalmente se analizaron utilizando el software (Life Sciences Ltd.).

SOLUCIÓN	COMPOSICIÓN
HBSS 2X	281 mM CaCl_2 , 100 mM HEPES, 1.5 mM Na_2HPO_4 pH= 7.10-7.13
Medio HEK293 _T	MEM + 10% FBS
Medio LB	10 g/l Triptona, 5 g/l extracto de levadura, 5 g/l cloruro de sodio, 15 g/l agar bacteriológico pH=7.0
Medio PC12	RPMI 1640, 10% FBS, 15% HS
PBS 10X	80 g/l NaCl, 2 g/l KCl, 2 g/l $\text{H}_2\text{PO}_4\text{K}$, 11.5 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
PBS-IP	1mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM Benzamidina, 0.1 mM PMSF, 1 mM NEM
Sol. Transfección Fosfato Cálculo	0.25 M de CaCl_2 , 2.5 mM de Hepes pH= 7.3 y , X μg de DNA
Solución de GHEBS	137 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 25 mM glucosa, 25 mM Hepes, 100 unidades/ml de Streptomocina, 100 $\mu\text{g/ml}$ de penicilina
Solución de KREBS	145 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 10 mM Hepes y 11 mM Glucosa a $\text{pH}=7.5$
Solución de <i>Strepping</i>	100 mM β -Mercaptoetanol, 2% SDS y 62.5 mM Tris pH=6.8.

SOLUCIÓN	COMPOSICIÓN
Solución ensayo PI3K	12.5 mM Hepes pH=7.5, 10 mM MgCl ₂ , 0.5 mM EGTA, 40 μM de ATP y 10 μCi γ-ATP ³²
Solución ensayo CaMKIV	50 mM Tris pH=7.4, 0.2% Tween-20, 20 mM MgCl ₂ , 2mM *CaCl ₂ ó 2mM *EGTA, 0.5 mM DTT, 25 μM de ATP, 2.68 μg/μl de CaM, 10 μCi γ-ATP ³² y 0.2 μg de CREB recombinante.
Solución ensayo PKB	50 mM Tris pH=7.5, 10 mM Mg ₂ Cl, 1 mM DTT, 2.5 mg/ml de Histona 2B, 42 μM de ATP y 3 μCi γ-ATP ³²
Solución Fase Líquida (Cromatografía)	N-propanol-agua-Ácido acético (66:33:2)
Tampón 1 de lavado (ensayo PKB)	50 mM Tris-HC pH=7.5, 100 mM NaCl, 1% Triton-X100 y 1 mM EDTA
Tampón de carga 5X (LB)	250 mM Tris/HCl ph=6.8, 10% SDS, 25% β-Mercaptoetanol, 0.005% azul de bromofenol y 50% glicerol
Tampón de electroforesis (<i>Running Buffer</i>)	14 g/l de glicina, 3 g/l Tris-HCl y 1 g/l SDS
Tampón de lavado LiCl (ensayo PKB)	0.5 M LiCl, 100 mM Tris pH=8 y 1 mM EDTA
Tampón de transferencia 10X (<i>Transfer Buffer</i>)	3.75 g/l SDS, 58.1 g/l Tris-HCl y 29.3 g/l glicina, justo antes de utilizar añadir entre un 10%-20% de metanol
Tampón desnaturizante de lisis	2% SDS, 125 mM Tris pH=6.8
Tampón HE (ensayo PI3K)	25 mM Hepes pH=7.5, 1 mM EDTA
Tampón lavado (ensayo CaMKIV)	50 mM Tris pH=7.4, 0.2% Tween-20, 20 mM MgCl ₂ , 2mM *CaCl ₂ ó 2mM *EGTA y 0.5 mM DTT
Tampón LiCl (ensayo PI3K)	100 mM Tris-HCl pH=7.5, 500 mM LiCl, 1mM EDTA, 1mM ortovanadato
Tampón NP40	20 mM Tris-HCl pH=7.4, 1% NP40, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, inhibidores de proteasas (1mM PMSF, 20 μg/ml Leupeptina, 10 μg/ml de Aprotinina, 2 mM Benzidamida), inhibidores de fosfatasas (1 mM ortovanadato, 25 mM NaF, 50 mM β-glicerofosfato) y 10% glicerol.
Tampón TNE (ensayo PI3K)	25 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1mM EDTA y 1mM ortovanadato
Tampón Tritón-X100	1% Tritón-X100, 50 mM Tris-HCl pH=7.4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 150 mM NaCl, 0.5% NP40, inhibidores de proteasas (1mM PMSF, 20 μg/ml Leupeptina, 10 μg/ml de Aprotinina, 2 mM Benzidamida), inhibidores de fosfatasas (1 mM ortovanadato, 25 mM NaF, 50 mM β-glicerofosfato).
TBS-T	2.4 g/l Tris-HCl, 8.8 g/l NaCl y 0.1% Tween-20

Tabla 12. resumen de las soluciones utilizadas

RESULTS

Glial Cell Line Derived Neurotrophic Factor Increases Intracellular Calcium Concentration.

Role of calcium/Calmodulin in the activation of the phosphatidylinositol 3-Kinase pathway. (2004) Published, **JBC**, Vol. 279; 6132-6142.

4. RESULTS

4.1 GLIAL CELL LINE DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR INCREASES INTRACELLULAR CALCIUM CONCENTRATION. Role of calcium/Calmodulin in the activation of the phosphatidylinositol 3-Kinase pathway

4.1.1 GDNF Increases Intracellular Calcium Concentration

It has previously been reported that the stimulation of receptors with intrinsic tyrosine kinase activity, such as TrkA, induces intracellular Ca^{2+} mobilization (Pandiella-Alonso, A y col. 1986; De Bernardi, MA y col. 1996). In order to analyze whether GDNF-treatment and the consequent Ret activation are able to induce changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, MNs were loaded with Fluo-4 and the resultant changes in intracellular fluorescence levels measured in individual cell bodies. Increases in Ca^{2+} were expressed as changes in fluorescence intensity above basal levels (F_G-F).

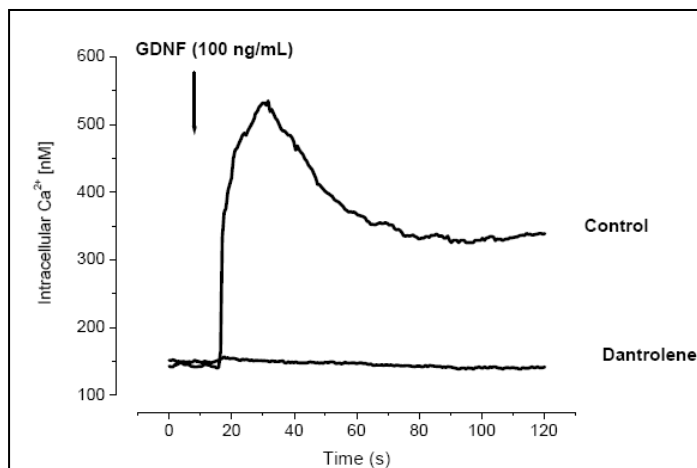


Figure 26: **Effect of GDNF on intracellular calcium levels.** MNs were loaded with Fluo-4 for 1 h, and changes of intracellular fluorescence levels were measured microscopically in individual cell bodies treated with different conditions. Effect of GDNF (100 ng/ml) on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in isolated MNs. The effect of dantrolene ($40\mu\text{M}$) on GDNF-induced increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ can also be observed.

When cells were treated with 100 ng/ml of GDNF, intracellular fluorescence increased (~ 180 Arbitrary Fluorescence Units, AFU) with respect to the basal level (~ 70 AFU) ($F_G - F = 67.3 \pm 6.8$ AFU, mean \pm SEM of 78 cells from three different cultures). This indicated that $[Ca^{2+}]_i$ increases after GDNF treatment. This Ca^{2+} response to GDNF typically began immediately after the application of the factor and remained elevated (~ 135 AFU) above the basal levels (~ 70 AFU) for at least 2 minutes (See Fig. 26).

To investigate whether the GDNF-evoked $[Ca^{2+}]_i$ increase was of intracellular or extracellular origin, cells were stimulated with 100 ng/ml of GDNF in the presence, or absence, of the non-selective voltage-dependent Ca^{2+} channel blocker Cd^{2+} . When the cells were pre-treated with 250 μM Cd^{2+} for 15 min and then exposed to GDNF in the presence of Cd^{2+} , the peak of intracellular fluorescence was minimally affected (from an average of $F_G - F = 67.3 \pm 6.8$ AFU in the absence of Cd^{2+} to $F_G - F = 76.3 \pm 11.2$ AFU in the presence of Cd^{2+} , Fig. 26). These data indicate that the GDNF-evoked $[Ca^{2+}]_i$ rise primarily involved the mobilization of Ca^{2+} from intracellular stores, rather than Ca^{2+} influx through voltage-dependent Ca^{2+} channels.

To further analyze this hypothesis, we used two different pharmacological approaches: depletion of Ca^{2+} from internal stores using the microsomal Ca^{2+} -ATPase inhibitor thapsigargin (TG) (Egea, J y col. 2000) or blockade of Ca^{2+} release from the stores with dantrolene, a muscle relaxant used as an inhibitor of intracellular Ca^{2+} mobilization (Thastrup, O y col. 1990). Cells were pre-treated for 30 min with 1 μM TG, then stimulated with GDNF (100 ng/ml) with an identical dose of TG, changes in intracellular fluorescence were then measured. In the presence of TG only a slight increase in intracellular fluorescence ($F_G - F = 19.7 \pm 5.1$ AFU) was observed when compared with only GDNF-stimulated MNs ($F_G - F = 67.3 \pm 6.8$ AFU) (Fig. 27) indicating that post TG treatment, the $[Ca^{2+}]_i$ increase was 3.4-fold smaller than GDNF-treated cells.

On the other hand, when MNs were pre-treated for 30 min with 40 μM dantrolene and then stimulated with GDNF (100ng/ml) plus dantrolene, no increase in $[Ca^{2+}]_i$ was observed ($F_G - F = 4.9 \pm 1.2$ AFU) (Fig. 27A and B).

Together, these results provide strong evidence that GDNF increases $[Ca^{2+}]_i$ by mobilizing the cation from the intracellular stores, rather than

promoting Ca^{2+} influx from the extracellular compartment. Moreover, confocal images of intracellular fluorescence distribution after GDNF-stimulation clearly indicated a moderate increase in the fluorescence intensity distributed in compartments along the MN soma and neurites (Fig. 27B).

This is in clear contrast with the diffuse fluorescence pattern observed after MN depolarization using high K^+ medium (data not shown). Thus, these results suggest that GDNF stimulation of cultured MNs induces an increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and that the intracellular Ca^{2+} stores are the main source for the peak response to this neurotrophic factor.

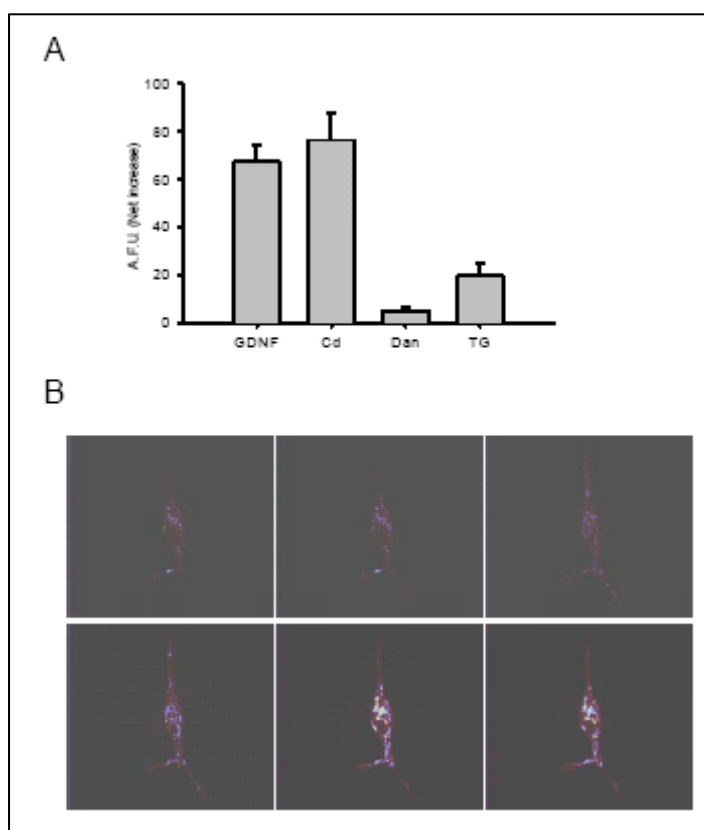


Figure 27: Effect of GDNF on intracellular calcium levels. A, Net intracellular calcium increase in response to GDNF (100 ng/ml) in the absence and presence of Cd^{2+} (250 μM), dantrolene (40 μM), or thapsigargin (1 μM). Data values are the mean \pm S.E. of 20-78 MNs. B, Confocal microscopy images showing the increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in a single MN.

4.1.2 Calcium and Calmodulin Are Involved In GDNF-induced PKB Activation

GDNF and its GFLs relatives induce *in vitro* neuronal survival through a mechanism involving PI 3-kinase and PKB activation (Soler, RM y col. 1999), (Besset, V y col. 2000). PKB is a well known downstream PI 3-kinase effector and its activation is mainly induced by the phosphorylation of residues Ser 473 or Thr 308 (Alessi, DR y col. 1996a). Because of the role of PKB in neuronal survival, and the involvement of Ca^{2+} and CaM in the activation of PKB induced by the neurotrophins (Egea, J y col. 2001), we wanted to analyze the involvement of Ca^{2+} and CaM in GDNF-induced PKB activation and neuronal survival. To this end, cells were treated with different calcium chelators (EGTA and BAPTA-AM) and CaM antagonists (W13, W7 and trifluoperazine dimaleate, TFP), and after GDNF stimulation the PKB phosphorylation was analyzed. MNs were cultured for 48 hr in the presence of muscle extract (MEX), and these cells were then serum- and MEX-deprived for 12 hr and pre-incubated for 30 min with 2.5 mM EGTA or 25 μ M BAPTA-AM in order to chelate either extracellular or intracellular Ca^{2+} , respectively. Cells were then washed and stimulated for 7 min with 100 ng/ml GDNF in the presence of identical doses of EGTA or BAPTA-AM. MNs were lysed and cell lysates analyzed by immunoblotting using anti-phospho-Ser 473 (α -P-Ser473) or anti-phospho-Thr 308 (α -P-Thr308) antibodies.

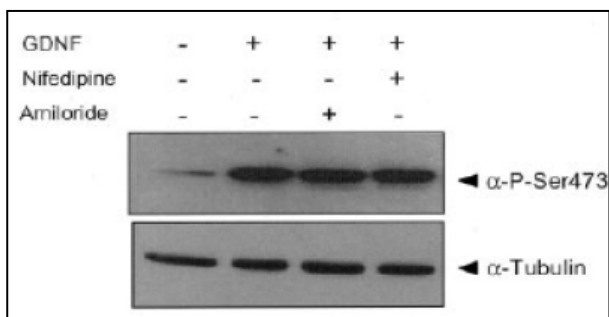


Figure 28: Effect of calcium voltage-gated Ca^{2+} channels chelators on GDNF-induced PKB phosphorylation. Protein extracts from MNs treated with 10 μ M of Nifedipine or 10 μ M of amiloride and then stimulated for 7 min. with GDNF (100 ng/ml) in the presence of the same doses of drugs, were analyzed by western blot with anti-phospho PKB

In order to exclude the possibility that extracellular Ca^{2+} , required for PKB activation, was entering the cell through voltage-gated Ca^{2+} channels, nifedipine or amiloride (L-type and T-type voltage-gated Ca^{2+} channel antagonists, respectively) were used and the PKB phosphorylation subsequently analyzed. The presence of these antagonists did not affect Ser 473 (Fig. 28) or Thr 308 phosphorylation (data not shown) after GDNF stimulation

However, similar doses of nifedipine, but not amiloride, did block the ERK MAP kinase phosphorylation after membrane depolarization using a high K^+ medium as expected due to previous results published by our laboratory (Soler, RM y col. 1998) (Fig. 29).

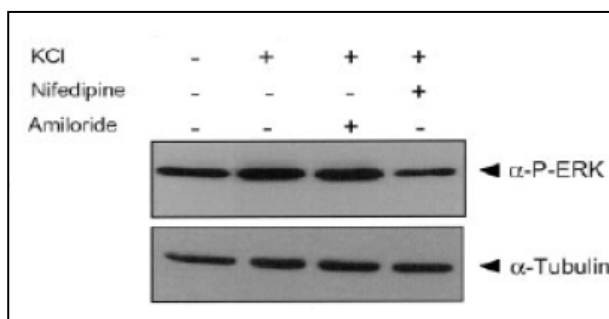


Figure 29: Effect of calcium voltage-gated Ca^{2+} channels chelators on GDNF-induced ERK phosphorylation. Protein extracts from MNs treated with $10 \mu\text{M}$ of Nifedipine or $10 \mu\text{M}$ of amiloride and then stimulated for KCl (30 mM) in the presence of the same doses of drugs, were analyzed by western blot with anti-phospho ERK

Thus the requirement of the extracellular Ca^{2+} for PKB phosphorylation is probably due to the presence of a cadherin-like domain motif in the Ret extracellular domain as reported previously (Nozaki, C y col. 1998; Anders, J y col. 2001). The Ca^{2+} measurements described above also reinforce the hypothesis that Ret activation does not require Ca^{2+} influx from the extracellular space through Ca^{2+} channels. An increase in Ser 473 and Thr 308 phosphorylation in GDNF-stimulated cells were observed when directly compared to non-stimulated cells. However, when cultures were pre-treated and stimulated in the presence of Ca^{2+} chelators, the level of PKB phosphorylation was similar to the non-stimulated cultures (Fig. 30).

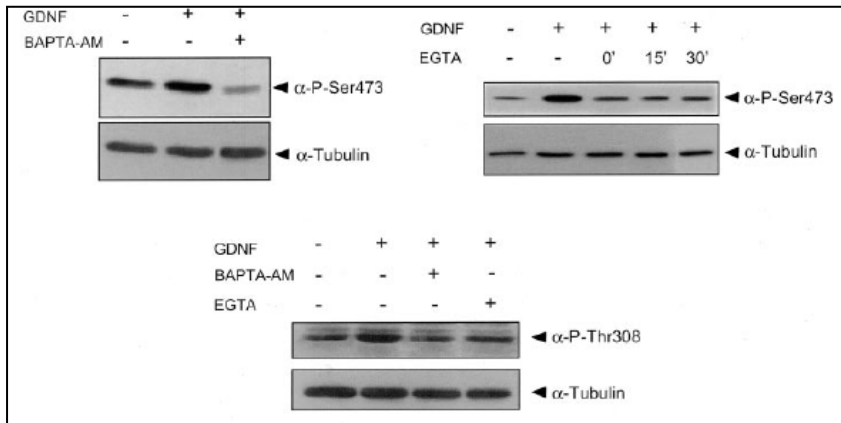


Figure 30. Effects of intracellular and extracellular calcium chelators on GDNF induced PKB phosphorylation. MNs were cultured for 48 h in the presence of MEX, deprived 12 h, pre-incubated with 25 μ M of BAPTA-AM for 30 min or 2,5 mM EGTA for 0, 15 and 30 min, and then stimulated for 7 min with 100 ng/ml GDNF in the presence of the same doses of EGTA or BAPTA-AM. After treatment, cells were lysed and protein extracts were obtained and analyzed by Western Blot with anti-Phospho-PKB specific antibody.

In order to determine whether CaM was mediating the Ca²⁺ effect on PKB phosphorylation, cells were treated with different CaM antagonists. MNs were cultured under similar conditions as described above, except that they were pre-treated with 7 μ M of W13, or an identical dose of W12, its less active structural analogue (W13 IC₅₀= 68 μ M versus W12 IC₅₀= 260 μ M) as a control of the non-specific effects of W13 (Besset, V y col. 2000). After this, cells were stimulated with 100 ng/ml GDNF for 7 min in the presence of the same doses of W13 or W12, PKB phosphorylation was then analyzed. GDNF induced an increase in Ser 473 and Thr 308 phosphorylation with respect to the non-stimulated cultures; however W13, but not W12, prevented PKB phosphorylation (Fig. 31). This suggests that CaM is required for this effect. We also analyzed other CaM antagonists such as W7 and its less active structural analogue W5 (W7 IC₅₀= 28 μ M versus W5 IC₅₀= 240 μ M), and a CaM antagonist structurally unrelated to W13 and W7, called TFP. Figure 31 shows that the presence of 10 μ M W7, or Figure 7 5 μ M TFP, inhibited Ser 473 and Thr 308 phosphorylation induced by GDNF. However, 10 μ M of W5 did not significantly inhibit this phosphorylation, which indicates the specific effect of W7. Thus these

results, obtained using different CaM antagonists that exert their effects through different molecular mechanisms (Besset, V y col. 2000), strongly suggests that CaM is required for PKB phosphorylation after GDNF stimulation of cultured spinal cord MNs.

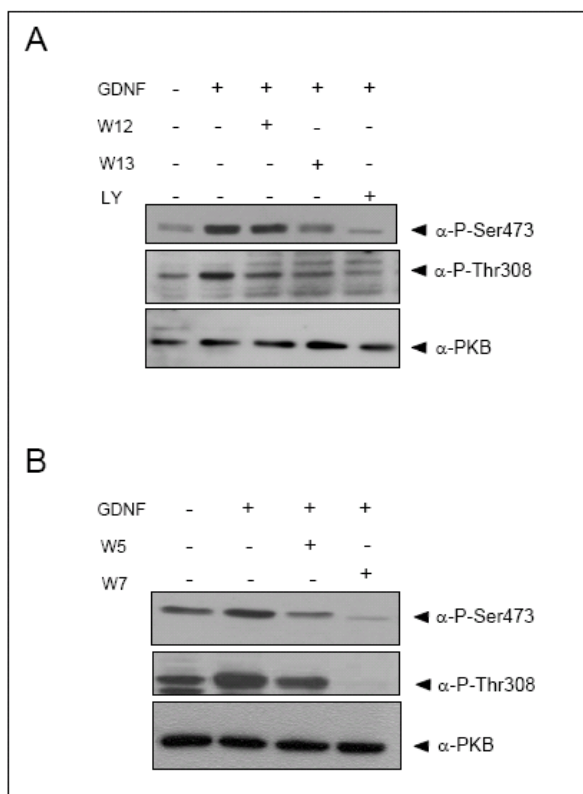


Figure 31: Effect of CaM antagonist on PKB phosphorylation and activation. MNs were treated with 7 μ M of CaM antagonist W12 or W13 (A); 10 μ M of W5 or W7 (B); or the PI3Kinase inhibitor LY294002 (50 μ M) and then stimulated for 7 min. with GDNF (100 ng/ml). Protein extracts were analyzed by western blot using anti-phospho-PKB antibodies, and re-probed with anti-PKB (C20).

To further analyze the effect of Ca²⁺ and CaM on GDNF-induced PKB activation, kinase activity assays were performed in PKB immunoprecipitates from MNs treated with Ca²⁺ chelators or CaM antagonists. In accordance with the results described above, GDNF-induced PKB kinase activity was prevented by the Ca²⁺ chelators BAPTA-AM or EGTA, as well as by CaM antagonist W13 or the PI 3-kinase inhibitor LY 294002 (50 μ M) (Fig.32).

These results indicate that GDNF promotes PKB phosphorylation and activation in cultured MNs through a mechanism involving both Ca²⁺ and CaM.

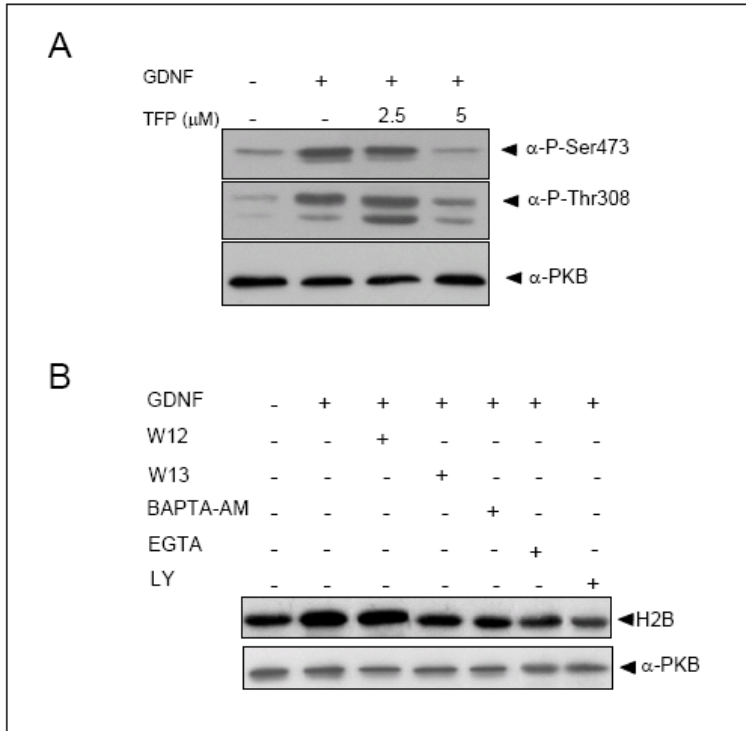


Figure 32: Effect of CaM antagonist on PKB phosphorylation and activation. MNs were treated with CaM antagonist TFP (2.5 μM or 5 μM); or the PI3Kinase inhibitor LY294002 (50 μM) and then stimulated for 7 min. with GDNF (100 ng/ml). Protein extracts were analyzed by western blot using anti-phospho-PKB antibodies, and re-probed with anti-PKB (C20). **B.** MNs were treated with calcium chelators BAPTA-AM (25 μM) or EGTA (2.5 mM); CaM antagonist W12 or W13 (7μM); or PI3kinase inhibitor LY294002 (50 μM) and stimulated for 7 min. with GDNF (100 ng/ml). PKB was immunoprecipitated and kinase activity assayed with H2B as substrate. Efficiency of PKB immunoprecipitation in the different conditions was checked by western blot using a specific PKB antibody.

4.1.3. CaM Antagonist W13 Prevented GDNF-induced MN Survival

GDNF induces *in vitro* MN survival through the activation of the PI 3-kinase/PKB pathway. It is known that the PI 3-kinase inhibitor LY 294002 blocks GDNF-induced PKB activation and MN survival (Soler, RM y col. 1999). In order to further analyze whether PKB inhibition, induced by CaM antagonists, had any effect on MN survival, MNs were cultured in the presence of MEX for 48 hr, cells

were then washed and the different conditions established. Cell survival was then evaluated 24 hr later as the percentage of surviving cells with respect to the total cell number present in the same microscopic field at the beginning of the experiment. Isolated MNs survive in culture in the presence of saturating concentrations of MEX (~100%), however in the absence of this extract (NE) 40-50% of cells were found to die after 24 hr. In the presence of a medium containing 10 ng/ml GDNF, ~80% of the MNs remained alive during a similar period of time, however when 7 μ M of W13 was added to the medium the level of MN survival was similar to that of NE-treated cells (~50%) (Fig. 33). The same dose of W12 had no effect on GDNF-induced MN survival.

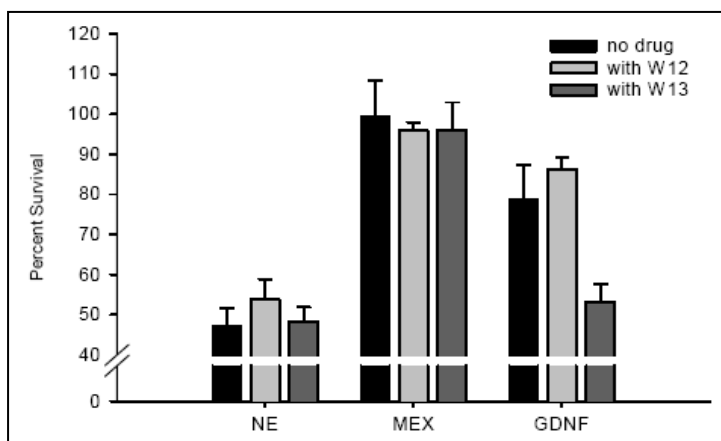


Figura 33: Effect of CaM antagonist W13 on GDNF-induced MN survival. Percentages of MNs survival after 24 h of treatment with CaM antagonist W12 or W13 (7 μ M) in NE or MEX (300 μ g/ml) or GDNF (10 ng/ml) treated cultured. Values are the mean \pm S.E. of eight wells from a representative experiment that was repeated at least twice with comparable results. Asterisks indicate significant differences ($p < 0.001$) when treated cultures were compared with untreated as determined by the Student t Test.

In order to determine whether CaM antagonists suppress GDNF-induced survival through an apoptotic cell death process, as observed after trophic factor withdrawal, the percentage of apoptotic MNs was quantified. Experiments were performed with the DNA binding dye Hoechst 33258 and cells displaying apoptotic morphology (highly condensed DNA, fragmented into two or more chromatin aggregates) were counted. In cultures, grown in the presence of GDNF, the percentage of cells displaying this feature was < 5%. However, after

GDNF deprivation, or after 7 μ M W13 or 50 μ M LY 294002 treatment, the percentage of apoptotic cells was significantly increased ($> 10\%$) (Fig. 33). Similar results were obtained using an antibody directed against fragmented caspase-3 (which is an indication of an apoptotic process) (Fig. 34). The percentage of fragmented caspase-3 positive cells increased after W13 or LY 294002 treatments when compared to GDNF-supplemented cultures (data not shown). Both parameters indicate that CaM inhibition of GDNF-treated cultures induces an apoptotic MN cell death process at the same dose that blocks PKB phosphorylation.

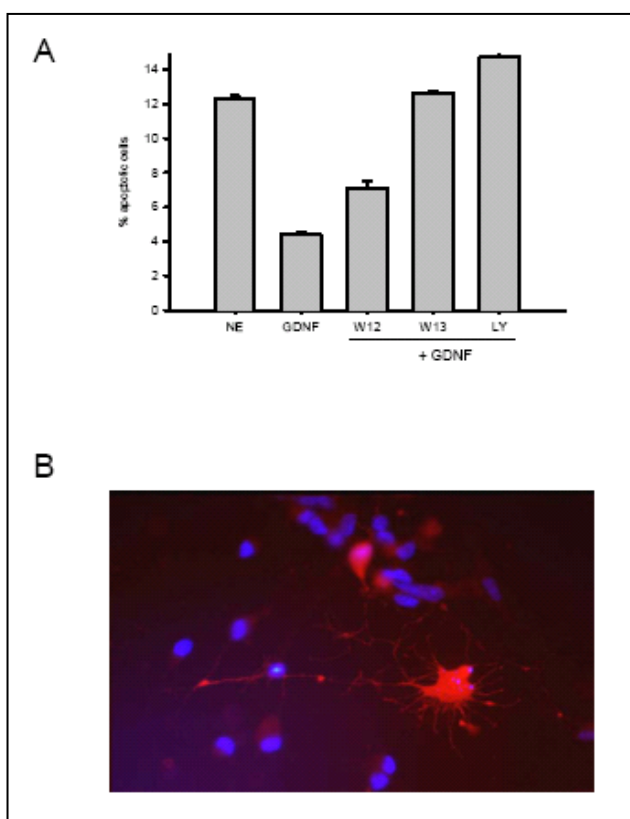


Figura 34: Effect of CaM antagonist W13 on GDNF-induced MN survival. A, Percentage of apoptotic cells of untreated (NE) cultures or GDNF (10 ng/ml) or GDNF plus W12, W13 (7 μ M), or LY294002 (50 μ M), were quantified using the Hoechst 33258 dye. Values are the mean \pm S.E. of three independent experiments. Asterisks indicate significant differences ($p < 0.001$) when treated cultures were compared with untreated as determined by the Student t Test. B, Representative image of apoptotic MN using an anti-caspase 3 activated antibody (red) and Hoechst 332 (blue).

4.1.4. Constitutively Active Forms of PKB Prevent the Cell Death Induced by CaM Antagonists

In the present work we suggest a correlation between PKB inhibition and prevention of MN survival induced by CaM antagonists. In order to test whether the inhibition of neuronal survival induced by these antagonists was due to the blockade of PKB activation, we transfected MNs with the constitutively active form PKB^{T308D/S473D}, a PKB that carries a mutational acidic charge, which increases its activity 20-fold in non-stimulated cells, in addition to its main regulatory phosphorylation sites (Alessi, DR y col. 1996a). MNs were then co-transfected with pEGFP and PKB^{T308D/S473D} or the empty vector 30 min after plating. Cells were washed 48 hr after transfection, the culture medium replaced, and the different experimental conditions established.

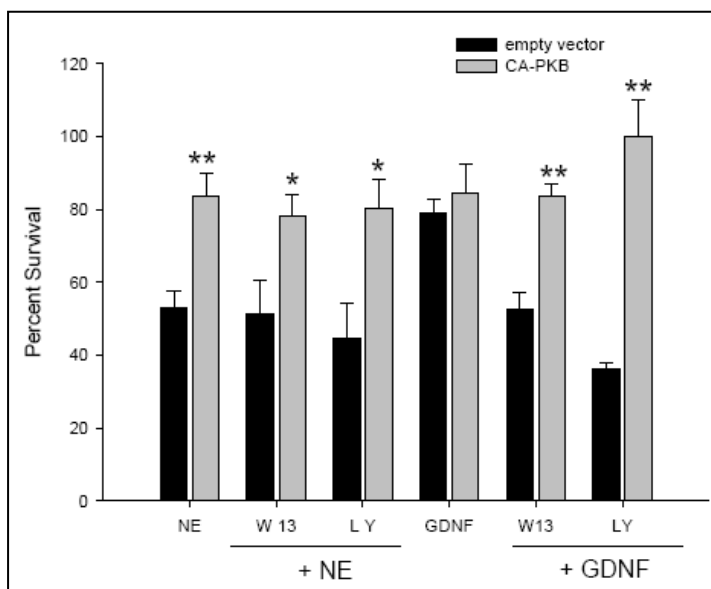


Figure 35: The constitutively active form of PKB prevents the cell death induced by CaM antagonists. MNs were transiently cotransfected with pEGFP and PKB^{T308D/S473D} or the empty vector. MNs were treated with GDNF (10 ng/ml), W13 (7 μ M), LY294002 (50 μ M), or left untreated (NE) as indicated. Survival was expressed as the percentage of EGFP positive cells after 24 h of treatment with respect to EGFP-positive cells at the beginning of the treatment. Asterisks indicate significant differences between cultures transfected with empty vector or PKB^{T308D/S473D} using t Student test (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.001$).

Cell survival was evaluated 24 h after treatment as the percentage of fluorescent cells remaining in the culture well with respect to the fluorescent cells present at treatment initiation. Results showed that PKB^{T308D/S473D} protected MNs from the cell death induced after neurotrophic factor withdrawal (Fig. 35).

Twenty four hours after neurotrophic factor deprivation, cultures transfected with the empty vector showed ~50% of surviving cells, however when cells were transfected with PKB^{T308D/S473D} the percentage of surviving cells after a similar period of deprivation was ~80%. On the other hand, 7 μ M W13 caused 50% of cell death in GDNF-treated MNs transfected with the empty vector, whereas the same treatment on PKB^{T308D/S473D} transfected cultures was unable to reduce cell survival (~78%). These results indicate that PKB^{T308D/S473D} protects MNs from the cell death induced by W13, which further suggests that CaM antagonists block GDNF-promoted MN survival through the inhibition of PKB activation.

4.1.5. Ca²⁺ and CaM are Involved in GDNF-induced PI 3-Kinase activation

The results presented above indicate that Ca²⁺ and CaM could regulate an upstream event involved in the phosphorylation and activation of PKB. Because PI 3-kinase is one of the main upstream activators of PKB (Hidaka, H y Tanaka, T 1983), we analyzed whether PI 3-kinase activation by GDNF also required Ca²⁺ and CaM. MNs were pretreated with Ca²⁺ chelators (2.5 mM EGTA or 25 μ M BAPTA-AM) or CaM antagonists (7 μ M W13 or 7 μ M W12) and then stimulated for 7 min with GDNF in the presence of the drugs. PI 3-kinase activity was measured in antiphosphotyrosine (anti-P-Tyr) immunoprecipitates as described in (Kao, JP y col. 1989). GDNF stimulation induced PI 3-kinase activation (6.25-fold induction); however when cells were exposed and stimulated in the presence of Ca²⁺ chelators or the CaM antagonist W13, PI 3-kinase activity was significantly reduced to the same level as non-stimulated cultures or those treated with the PI 3-kinase inhibitor LY 294002 (50 μ M) (Fig. 36).

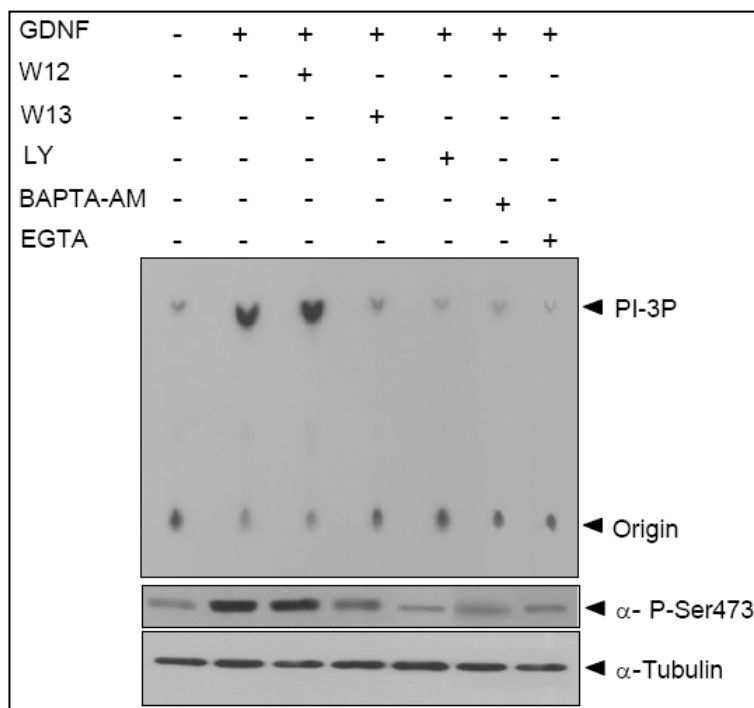


Figure 36: Calcium and Calmodulin are involved in GDNF-induced PI3K activation. MNs were treated with 7 μ M W12 or W13, 2.5 mM EGTA, 25 mM BAPTA-AM, or 50 μ M LY294002 and then stimulated for 7 min. with GDNF (100 ng/ml). PI3K activity was assayed in P-Tyr immunoprecipitates using L- α -phosphatidylinositol as substrate (top panel). Radiolabeled spots were quantified, and kinase activity was expressed as fold induction over basal. The arrow labeled "Origin" indicates the point of sample application. The arrow labeled "PI-3P" indicates the position of PI-3P generated as the consequence of PI3 kinase activity. The same cell extracts were analyzed by western blot using the anti-phospho-serine 473 and re-probed with α -tubulin.

W12 did not significantly prevent PI 3-kinase activity after GDNF stimulation. In the same cell lysates Ca^{2+} chelators and CaM antagonist W13, but not W12, was also found to block PKB phosphorylation (Fig. 37). These results suggest that GDNF induces PI 3-kinase activation and neuronal survival through a mechanism involving Ca^{2+} and CaM.

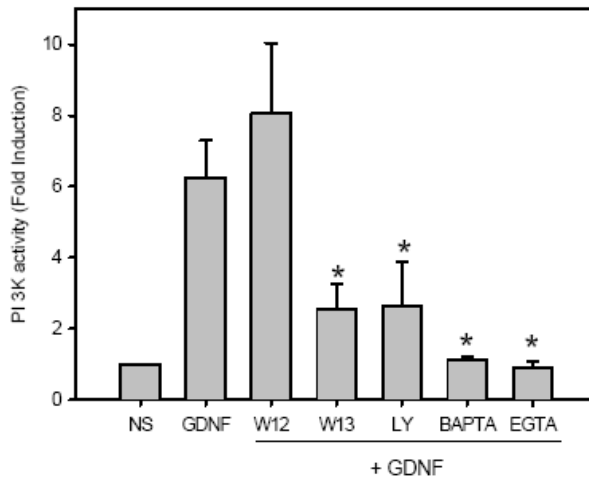


Figure 37: Calcium and Calmodulin are involved in GDNF-induced PI3K activation. The graph represent the quantification of PI3 kinase activity.

4.1.6. CaM associates with the 85-kDa regulatory subunit of PI-3 kinase

To support the hypothesis of a physiological regulation of PI 3-kinase activation by CaM we evaluated the possible endogenous interaction between these two proteins in MN cell lysates. MNs were cultured 48 hr in the presence of MEX, then washed and deprived of both serum and MEX for 12 hr. The cultures were then either stimulated with 100 ng/ml of GDNF or left untreated. Cell lysates were incubated with CaM-sepharose in order to coprecipitate PI 3-kinase. To detect this protein in the CaM-sepharose pull-down we analyzed them by Western blot using a specific monoclonal antibody against the 85-kDa regulatory subunit of the PI 3-kinase (p85) (Burgering, BM y Coffey, PJ 1995), (Otsu, M y col. 1991). We found that p85 was able to co-precipitate with CaM-sepharose but not with sepharose beads without CaM. Moreover, this interaction was only present when the cell lysates were supplemented with Ca^{2+} , and binding was abolished when the Ca^{2+} of the cell lysates was chelated with EGTA, thus indicating that CaM and p85 interaction is Ca^{2+} dependent (Fig.38). Interestingly, GDNF-stimulation did not modify the interaction between CaM and p85.

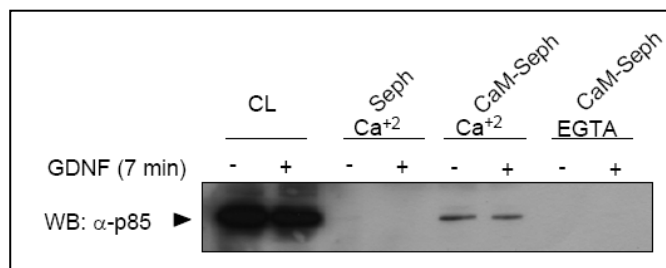


Figure 38: CaM binds to p85 regulatory subunit of PI 3-Kinase. A. Total lysates from no stimulated or GDNF (100 ng/ml) stimulated MNs were incubated with Sepharose (Seph.) or CaM-Sepharose (CaM-Seph) in the presence of 0.1 mM CaCl₂ or 2 mM EGTA. Complexes were analyzed by western blot with an anti-p85 antibody (α-p85). CL, indicates total cell lysates.

We also analyzed the endogenous association of CaM and p85 using a co-immunoprecipitation strategy. MNs were cultured under similar conditions as described above and cell lysates immunoprecipitated with the anti-p85 antibody. The immunoprecipitates were analyzed by Western blot and the immunoblots probed with an anti-CaM antibody. CaM was found to co-immunoprecipitate with p85 in both non-stimulated and GDNF-stimulated MNs, thus indicating the endogenous association of both proteins independently of PI 3-kinase activation. As previously observed in the pull-down experiments, CaM and p85 interaction was found to be Ca²⁺ dependent (Fig. 39).

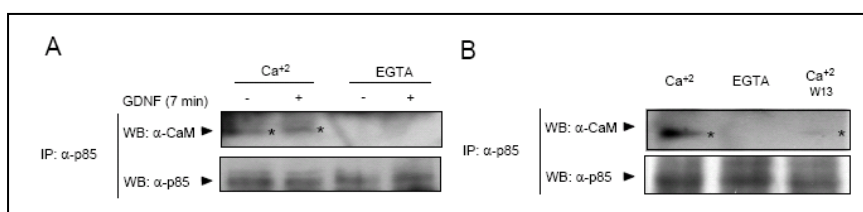


Figure 39: CaM binds to p85 regulatory subunit of PI 3-Kinase. MNs left untreated, or with GDNF (100 ng/ml), were lysed, and equal amounts of protein were immunoprecipitated with the α-p85 in the presence of 0.1 mM CaCl₂ or 2 mM EGTA or 0.1 mM CaCl₂ plus 7 μM W13. Immunocomplexes were analyzed by western blot with an anti-calmodulin antibody (α-CaM). Efficiency or p85 immunoprecipitation in the different conditions was checked by reprobing the membranes using α-p85. Asterisks indicated the reactive band.

CaMKIV regulates chicken motoneurons survival through the activation of protein kinase B.

Submitted J. Neurochem.

4.2 CAMKIV REGULATES CHICKEN MOTONEURONS SURVIVAL THROUGH THE ACTIVATION OF PROTEIN KINASE B

4.2.1. Constitutively active forms of CaMKIV prevent cell death induced by trophic factor deprivation.

We first investigated the involvement of calmodulin regulated kinases (CaMKs) in the control of MN survival *in vitro*. To test whether the activation of CaMKs mediates neuronal survival, we first transfected MNs with constitutively active forms of CaMKK¹⁻⁴¹³ (Enslin, H y col. 1996), or CaMKI¹⁻²⁹⁵, or CaMKII¹⁻²⁹⁰ (kindly provided by R.A. Maurer) or CaMKIV¹⁻³¹³ (kindly provided by R.A. Maurer), and MN survival was analyzed. These truncated forms of CaMKs lack the autoinhibitory-regulatory region and results constitutively active protein kinases which no longer require Ca²⁺ and CaM for activity. MNs purified from E5.5 (embryonic day 5.5) chicken spinal cord, were then co-transfected with pEGFP and CaMKK¹⁻⁴¹³ or CaMKI¹⁻²⁹⁵ or CaMKII¹⁻²⁹⁰ or CaMKIV¹⁻³¹³ or the empty vector 30 min after plating. Cells were washed 24 h after transfection, the culture medium was replaced and the different experimental conditions were established. MNs survival was evaluated 24 h after treatment as the percentage of “blebbing” morphology cells with respect to the total number of fluorescent cells present in the culture well (Fig. 40). It has been described before that 24 hr after neurotrophic factor withdrawal neurons show a marked blebbing of the plasma membrane, typical of apoptotic cell death that occurs after neurotrophic factor deprivation, whereas healthy neurons are smooth and have long neurites (Edwards, SN y Tolkovsky, AM 1994). Thus, we decided to take advantage of these morphological features to evaluate the effect of the constitutively active forms of CaMKs on MN survival. Cultures transfected with the empty vector after 24 hr of neurotrophic factor deprivation (NS condition) showed 56.5±2.5 % of apoptotic cells. However, in the presence of 10 ng/mL BDNF or 30 mM KCl (30K) the percentage of blebbing cells was significantly reduced (40.5±2.1 and 31.6±4.9 %, respectively). When the blebbing cells were counted in the culture wells transfected with constitutively active forms of the different CaMKs, only CaMKIV¹⁻³¹³ (41.7±2.3 %) was able to reduce significantly the number of these cells to the same level of trophic control cultures (BDNF or 30K), whereas

Results

CaMKK¹⁻⁴¹³ (64.7±7 %) or CaMKI¹⁻²⁹⁵ (53.6±5.4 %) or CaMKII¹⁻²⁹⁰ (60.5±8.4 %) where not able to reduce the number of dying MNs (Fig. 40). These results indicate that CaMKIV¹⁻³¹³ protects from the cell death induced by the absence of neurotrophic support in cultured chicken spinal cord MNs.

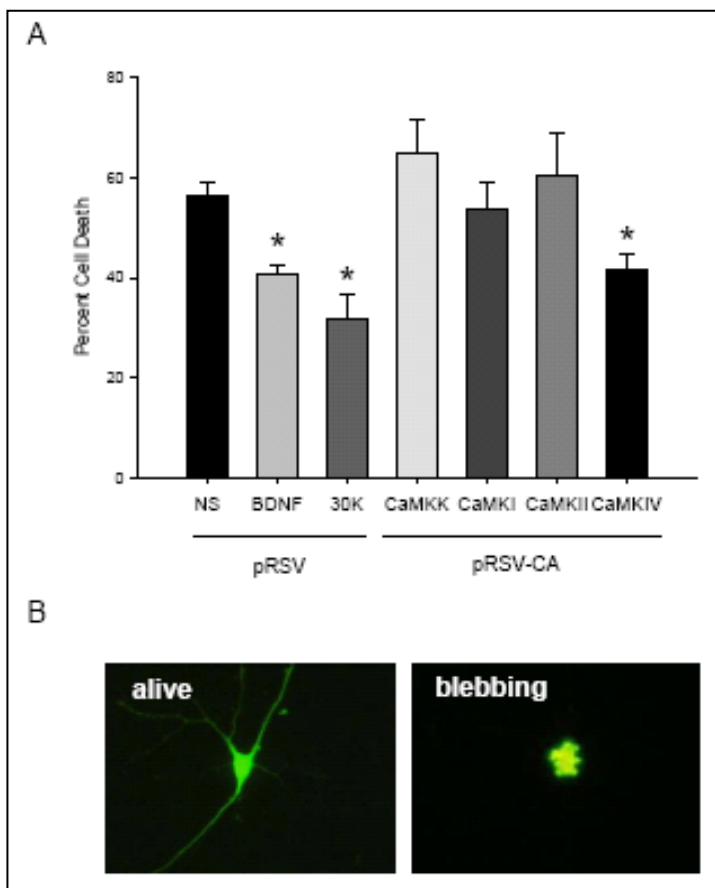


Figure 40: The constitutively active form of CaMKIV, but not constitutively active forms of CaMKI, CaMKII or CaMKK, prevents MN cell death induced by neurotrophic factor deprivation. A, MNs were transiently cotransfected with pEGFP and constitutive active forms of CaMKI or CaMKII or CaMKK or CaMKIV or CaMKK or the empty vector, and grown in a non-supplemented medium (NS). Control cultures were treated with BDNF (30 ng/ml), 30mM medium (30K) or NS medium as indicated. Values are the mean ± S.E. of three wells from a representative experiment that was repeated at least twice with comparable results. Cell death was expressed as the percentage of cells with “blebbing” morphology respect to the total EGFP-positive MNs present in the culture dish after 24 hr of treatment. B, Representative pictures of non-apoptotic MN morphology (left) and blebbing/apoptotic MN morphology (right). Asterisk significant differences ($p < 0.05$) of CaMKIV-CA transfected cultures respect to the empty vector transfected cultures grown in NS medium

4.2.2. Molecular cloning of *Gallus gallus* CaMKIV

Our previous studies demonstrated that Ca^{2+} and CaM activation regulates *in vitro* MN survival induced by either membrane depolarization (Soler et al. 1998) or neurotrophic factor stimulation (Egea et al. 2001; Perez-Garcia et al. 2004). Because CaMKs appear to be good candidates for mediating this effect (See et al. 2001; Hansen et al. 2003), we decided to analyze the role of CaMKIV in the Ca^{2+} /CaM-mediated neuronal survival. To understand better the role of endogenous CaMKIV on chicken MN survival, we cloned chicken CaMKIV by PCR. By searching public available EST chicken databases (GenBank, NCBI) we found two different clones ChEST49p9 (GenBank accession no. BX934362) and ChEST993m17 (GenBank accession no. BU210024), that contained partial cDNA sequences of CaMKIV identified by homology with CaMKIV cDNA from other species. The first clone contained the cDNA encoding the amino terminus (nucleotide 1-938) and the second the carboxyl terminus (nucleotide 927-1112) of CaMKIV protein (see Materials and Methods). The cloned *Gallus gallus* sequence is available in GeneBank/EMBL/DDBJ under the accession no. NM_001034813. After the full length fragment was obtained and sequenced, we decided to analyze some general features of CaMKIVs. Fig. 41 compares the CaMKIV sequences from *Gallus gallus* with *Mus musculus* (GenPept accession no. NP033923), *Rattus norvegicus* (GenPept accession no. NP036859) and *Homo sapiens* (GenPept accession no. NP001735). Alignment of *Gallus gallus* CaMKIV sequence shows 76% of homology with *Rattus norvegicus* and *Mus musculus*, and 77% of homology when compared to *Homo sapiens* (Table1). The carboxyl terminus of *Gallus gallus* CaMKIV sequence shows less homology (from amino acid 326) compared to the mammalian species. In fact, the entire

Results

coding region of cloned CaMKIV encodes a protein with 372 amino acids, whereas CaMKIV amino-acid sequences from other species are longer (mouse is 469 amino acids; rat is 502 amino acids, and human is 473 amino acids). Fig. 43B shows a Western blot using an anti-CaMKIV primary antibody (generated against the amino terminal region of human CaMKIV from amino acid 1 to 241) that recognizes a ~ 40 kDa band in the chicken MN protein extract, whereas in mouse MN protein extract the antibody recognizes a ~ 60 kDa band. According to expected size deduced from bioinformatics approaches that the estimated molecular mass of chicken CaMKIV is 41.3 kDa and the isoelectric point 8.28 (Bjellqvist et al. 1993).

	<i>M. musculus</i>	<i>R. norvegicus</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>Gallus gallus</i>
<i>M. musculus</i>	-	90	81	76
<i>R. norvegicus</i>	90	-	79	76
<i>H. sapiens</i>	81	79	-	77
<i>G. gallus</i>	76	76	77	-

Table 13. **Percentage of identity in a pairwise alignment between different species.**

Using *in silico* approaches, we also determined the protein kinase domain of cloned CaMKIV from amino acid 31 to 285; the ATP binding site located at Lys⁶⁰ (Hulo et al. 2006) and the Calcium Binding Domain (CBD) (Yap et al. 2000). We observed the presence of a subclass of 1-14 motif, the basic 1-8-14 motif, at position 308 - 327. Compared to CaMKIV sequences from other species, all of them have the same basic 1-8-14 motif at the carboxyl terminus of the protein (mouse: position 319; human: position 323; rat: position 347), indicating that chicken CaMKIV also contains the CBD although its protein sequence is shorter in length (Fig. 42).

M. Musculus	1	-----MLKVTVPSCPSSPC	SSV	IAS	TEN	-----LV	PDY
R.	1	MSCAGNDQAAAAGSSSSGGIFRSPAAMKLVTPSCPSSPC	SSV	IAS	TEN	-----LV	PDY
Novergicus	1	-----MLKVTVPSCPSSPC	SSV	IAS	TEN	-----LV	PDY
H. Sapiens	1	-----MLKVTVPSCPSSPC	SSV	IAS	AA	PGTASL	VPDY
G.gallus	1	-----MPS	IAS	AGS	AGLP	----	APDY
M. Musculus	29	WIDGSNRDPLGDFE	VESELGRGATSIVYRC	KQKGTQK	PYAL	KVLLKKT	VDKKIVRTEIGV
R.	57	WIDGSNRDPLSDFE	VESELGRGATSIVYRC	KQKGTQK	PYAL	KVLLKKT	VDKKIVRTEIGV
Novergicus	33	WIDGSNRDPLSDFE	VESELGRGATSIVYRC	KQKGTQK	PYAL	KVLLKKT	VDKKIVRTEIGV
H. Sapiens	18	WIDGSNRDPLTHFDL	ESELGRGATSIVYRC	KQKGTQK	PYAL	KVLLKKT	VDKKIVRTEIGV
G.gallus	18	WIDGSNRDPLTHFDL	ESELGRGATSIVYRC	KQKGTQK	PYAL	KVLLKKT	VDKKIVRTEIGV
M. Musculus	89	LLRLSHPNI IKLKEIFETPT	EISL	VLELVTGGEL	FDRI	VEKGYYSERDA	RO
R.	117	LLRLSHPNI IKLKEIFETPT	EISL	VLELVTGGEL	FDRI	VEKGYYSERDA	AD
Novergicus	93	LLRLSHPNI IKLKEIFETPT	EISL	VLELVTGGEL	FDRI	VEKGYYSERDA	AD
H. Sapiens	93	LLRLSHPNI IKLKEIFETPT	EISL	VLELVTGGEL	FDRI	VEKGYYSERDA	AD
G.gallus	78	LLRLSHPNI IKLKEIFETPT	EISL	VLELVTGGEL	FDRI	VEKGYYSERDA	AD
M. Musculus	149	AYLHENGIVHRDLKPENLLYATPAPDAPLKIADFGLSKIVE	HOV	LMK	TV	CGT	PGYCAPEI
R.	177	AYLHENGIVHRDLKPENLLYATPAPDAPLKIADFGLSKIVE	HOV	LMK	TV	CGT	PGYCAPEI
Novergicus	153	AYLHENGIVHRDLKPENLLYATPAPDAPLKIADFGLSKIVE	HOV	LMK	TV	CGT	PGYCAPEI
H. Sapiens	138	AYLHANGIVHRDLKPENLLYATPAPDAPLKIADFGLSKIVE	DOV	LMK	TV	CGT	PGYCAPEI
G.gallus	138	AYLHANGIVHRDLKPENLLYATPAPDAPLKIADFGLSKIVE	DOV	LMK	TV	CGT	PGYCAPEI
M. Musculus	209	LRGCAYGPEVDMWS	VGI	I	T	Y	ILLCGFEPFYDERGDO
R.	237	LRGCAYGPEVDMWS	VGI	I	T	Y	ILLCGFEPFYDERGDO
Novergicus	213	LRGCAYGPEVDMWS	VGI	I	T	Y	ILLCGFEPFYDERGDO
H. Sapiens	198	LRGCAYGPEVDMWS	VGI	I	T	Y	ILLCGFEPFYDERGDO
G.gallus	198	LRGCAYGPEVDMWS	VGI	I	T	Y	ILLCGFEPFYDERGDO
M. Musculus	269	AKDLVKKLIVLDPKKRLTTF	QALQHPWVTGKAANF	VHMD	IAQ	KLQEFNARRKL	KAAVKA
R.	297	AKDLVKKLIVLDPKKRLTTF	QALQHPWVTGKAANF	VHMD	IAQ	KLQEFNARRKL	KAAVKA
Novergicus	273	AKDLVKKLIVLDPKKRLTTF	QALQHPWVTGKAANF	VHMD	IAQ	KLQEFNARRKL	KAAVKA
H. Sapiens	258	AKDLVKKLIVLDPKKRLTTF	QALQHPWVTGKAANF	VHMD	IAQ	KLQEFNARRKL	KAAVKA
G.gallus	258	AKDLVKKLIVLDPKKRLTTF	QALQHPWVTGKAANF	VHMD	IAQ	KLQEFNARRKL	KAAVKA
M. Musculus	329	VVASSRLGSASSSHTSIQENHKASS	PP	STQD	PK	ST	DLGKKMQEEDQEEDQVEAEAS
R.	357	VVASSRLGSASSSHTNIQESNKASS	EA	QPAQD	PK	KT	DPLENKMQAG ---DHEAAKAA
Novergicus	333	VVASSRLGSASSSHGSIQESHKASR	DP	SP	IQD	EN	DMKAIPEGEKI IQG ---DGAQAAVK
H. Sapiens	318	VVASSRLGNHGHDCSRSRGGPRGR	ET	TEATS	RS	SE	ELEAFPVAVPTVP -----VNGA
G.gallus	318	VVASSRLGNHGHDCSRSRGGPRGR	ET	TEATS	RS	SE	ELEAFPVAVPTVP -----VNGA
M. Musculus	389	DEMRLQSEEEVEKDAGVKE	-----	EET	SS	MVP	QDPEDELETTDDPEMKR -DSEELKLS
R.	413	DETMKLQSEEEVEEGVKEEEEEEEEEETS	RM	VP	QEP	EDR	LETDDQEMKR -NSEETLKS
Novergicus	390	AQAEMLKVKQALEKVKGADIN	----	ABE	AP	MVP	KAVEDGIKVADLELEBLEAEKLT
H. Sapiens	369	SCRS	-----				
G.gallus	369	SCRS	-----				
M. Musculus	440	VEEEMDPMTTEEEAPDAGLGV	-	QDA	I	QPEY	
R.	472	VEEEMDPKAEAAAAGLGV	P	Q	D	A	I
Novergicus	444	VEEAAAAPREGQSSAVGFV	-	QD	V	I	L
H. Sapiens	444	VEEAAAAPREGQSSAVGFV	-	QD	V	I	L
G.gallus	444	VEEAAAAPREGQSSAVGFV	-	QD	V	I	L

Figure 41: **Aligned amino acid sequences of mouse (*Mus musculus*), rat (*Rattus Novergicus*), human (*Homo sapiens*) and cloned chicken CaMKIV (*Gallus gallus*).** Comparison of CaMKIV protein sequences from mouse, rat, human and chicken. Amino acids identical in all species are shaded in black, whereas those with conservative changes are shaded in grey. Mouse, rat and human protein sequences are available in GenBank/EMBL/DDBJ under accession number: see results. Cloned chicken sequence is now available with accession number: NM_001034813.

```

1  MPSTSASGSA GLPAPDYWID GSNKDTLTHY FDLESELGRG ATSIYVRCRQ  50
51 KGTQKH*YAIK KLKKTIDKKI VRTEIGVLLR LSHPNIIK*LK EIFETPTDIS 100
101 LVLELV*TGGE LFDRIVEKGY YSERDAADAV KQILEAVAYL HANGIVHRDL 150
151 KPENLLYATP APDAPLKIAD FGLSKIVEDQ VTMK*TVCGTP GYCAPEILRG 200
201 CAYGPEVDMW SLGIITYILL CGFEPFYDER GDQYIYKRTL NCEYDFVSPW 250
251 WDDVSLNAKD LVKKLIVLDP KKRLTTLQAL QHPWVTGKAA NFAHMDNAQK 300
301 KLQEFNARRK LKAAMKAVVA SSRLGNHGH*H DCSRSRGGPR GRESTEATSA 350
351 SEELEAFPAV PTPVNVGASC RS 400

```

Figure 42: Amino acid sequences of cloned chicken CaMKIV (gCaMKIV). Using PFAM software, we determined the protein kinase domain of cloned CaMKIV from amino acid 31 to 285 and the ATP binding site located in Lys⁶⁰. The Calcium Binding Domain (CBD) was present in our CaMKIV. Through the CaM target database program we determined that cloned chicken CaMKIV contains a subclass of 1-14 motif, the basic 1-8-14 motif, at position 308 - 327. Comparing mouse and chicken sequences, we found the same sequence described for mouse minimum AID located between Gln³⁰³ and Lys³¹² residues of chicken sequence. In chicken CaMKIV this specific threonine residue, that is phosphorylated by CaMKK, is located in position 185.

We attempted to map the autoinhibitory domain (AID) in chicken CaMKIV. It has previously been described that the carboxyl-terminal region after Leu³¹³ contains the AID of CaMKIV (Tokumitsu et al. 1994). Tokumitsu et al (2004) expressed and purified a series of carboxyl terminus truncation mutants to map a minimum autoinhibitory sequence of mouse CaMKIV. They concluded that the location of this sequence is between residues Gln³¹⁴ and Lys³²¹. The truncated mutant at Lys³²¹ is completely inactive in either the presence or the absence of Ca²⁺/CaM, indicating the presence of a functional autoinhibitory sequence. However, the truncated mutant at Leu³¹³ generated a constitutively active form of the enzyme. Thus, comparing mouse and chicken CaMKIV, we found the same sequence described for mouse minimum AID located between Gln³⁰³ and Lys³¹² residues of chicken sequence (Fig. 42).

After Ca²⁺/CaM binding to CaMKIV, it can then be phosphorylated on a specific Thr residue (Thr²⁰⁰ in human and Thr¹⁹⁶ in mouse) by the Ca²⁺/CaM-

dependent kinase kinase (CaMKK). This event is associated with a marked increase in the total activity of CaMKIV, and the generation of a Ca^{2+} /CaM-independent and autonomous kinase activity required for its role in transcription (Chow et al. 2005). In chicken CaMKIV this specific Thr residue is located in position 185 (Fig. 42). Thus, cloned chicken CaMKIV is shorter in length, recognized by the same antibody than mouse and contains most of the characteristics of this protein in other species.

4.2.3. Cloned CaMKIV is expressed in purified and cultured spinal cord MNs

To demonstrate that cloned chicken CaMKIV is expressed in chicken spinal cord MNs, RT-PCR assay was used to analyze the presence of mRNA in these cells. MNs from E5.5 chicken embryos were purified using a density gradient (see Experimental Procedures), and RNA was extracted from freshly isolated cells or from 24 hr cultured cells (1DIV), in the presence of 10 ng/mL of BDNF in the culture medium.

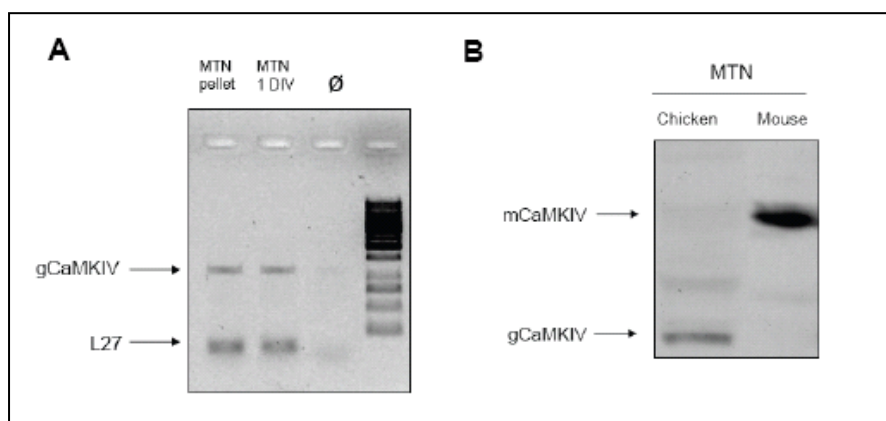


Figure 43: CaMKIV is expressed in chicken spinal cord MNs. **A.** Agarose gel showing the RT-PCR products using cloning primers for chicken CaMKIV in E5.5 purified spinal cord MNs (PF) or 24 hr cultured MNs (1DIV). Coamplification of the L27 mRNA (bottom band in each line) serves as an internal control. Control reactions performed without reverse transcriptase (no RT) show that there was no detectable contamination from genomic DNA. **B.** Immunoblot analysis comparing: chicken and mouse bands corresponding to gCaMKIV (45 kDa) and mCaMKIV (60 kDa).

After semiquantitative RT-PCR analysis with the specific primers used for the amplification of the complete sequence of gCaMKIV from EST clones, we show the presence of gCaMKIV transcripts in dissociated and cultured MNs (Fig. 43A). To further confirm CaMKIV protein expression in mice and chicken MNs cultures, we performed an immunoblot in cultured MNs cell lysates. Immunoblot analysis revealed that CaMKIV was expressed either in chicken or mouse MNs giving a band of the expected molecular size according to primary structure, being 45 kDa for gCaMKIV and 60 kDa for mCaMKIV (Fig 43B). Moreover, gCaMKIV immunocytochemistry showed a diffuse cytosolic distribution, confirming previously described localization predictions (Fig.44).



Figure 44. Immunocytochemistry against CaMKIV in chicken spinal cord MNs. Representative image of CaMKIV expression in MNs using anti-CaMKIV antibody (red), Hoechst 33258 (blue) and on phase.

4.2.4. Chicken CaMKIV activation is Ca²⁺/CaM dependent and its constitutively active form induces MN survival

One of the characteristic features of CaMKs is the Ca²⁺ and CaM dependence for their activation. Binding of Ca²⁺/CaM to the CBD alters the conformation of the kinase and induces therefore its activation (reviewed by Soderling, 1999). Once activated, CaMKIV is responsible for the physiological Ca²⁺-dependent stimulation of transcription through the phosphorylation of several transcription factors, including CREB at Ser133 (Enslin et al. 1994). In this context, we decided to analyze the Ca²⁺/CaM dependence of cloned CaMKIV for its kinase activity and for CREB phosphorylation. pcDNA3-FLAG-CaMKIV was overexpressed in HEK293T cells and protein extracts were immunoprecipitated using an anti-FLAG-agarose antibody. CaMKIV activity was assayed in those immunoprecipitates using recombinant CREB as a substrate

(Fig. 45). We also analyzed the Ca^{2+} /CaM dependence of a constitutively active form of chicken CaMKIV (CaMKIV_{CA}). This form is a truncated mutant at Leu³⁰², as it was predicted by homology with mouse CaMKIV truncated at Leu³¹³, which generates a constitutively active and Ca^{2+} /CaM-independent protein (see above).

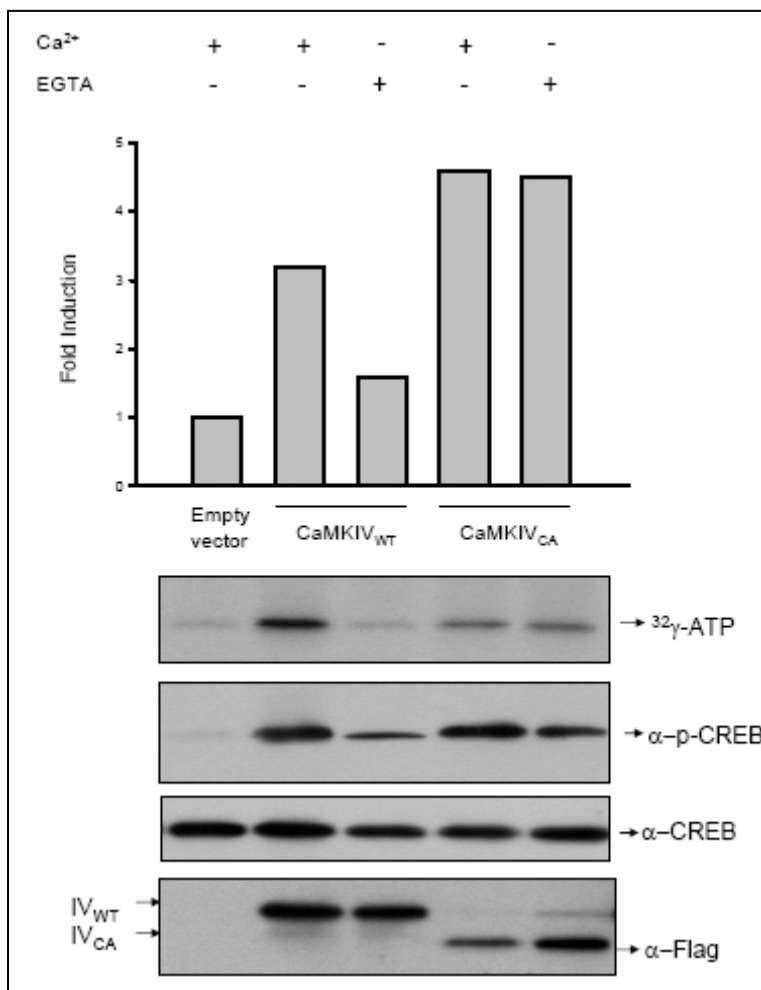


Figure 45: Cloned chicken CaMKIV activity is calcium dependent. HEK293T cells were transfected with Flag-pcDNA3 or Flag-gCaMKIV_{WT} or Flag-gCaMKIV_{CA} forms, immunoprecipitated with an anti-Flag antibody and activity was determined in a 20-minute assay using CREB as a substrate in the presence (Ca^{2+}) or absence (EGTA) of calcium. Top panel) ^{32}P incorporation to the substrate CREB is shown in a SDS-10% polyacrylamide gel (top panel), the same extracts were used for a Western Blot analysis of phosphorylated CREB using a specific antibody (middle panel). Efficiency of immunoprecipitation was checked by Western Blot using specific Flag antibody (bottom panels). Upper panel) The graph represents the quantification of ^{32}P incorporation.

As shown in Fig. 45, immunoprecipitates containing the CaMKIV_{CA} induce kinase activity (100%) and CREB phosphorylation. Both effects were not affected by the presence of the Ca²⁺ chelator EGTA, indicating that CaMKIV_{CA} is Ca²⁺/CaM-independent. On the other hand, the presence of 2 mM CaCl₂ plus 1 μM CaM in the kinase assay buffer induced ~70% activation of CaMKIV compared to CaMKIV_{CA} immunoprecipitates. However, when 2 mM of the Ca²⁺ chelator EGTA was added the activation was reduced to ~20%, indicating that CaMKIV is Ca²⁺/CaM-dependent. Using an anti-phospho-CREB antibody we also observed that chicken CaMKIV induces Ser133 phosphorylation in the presence of Ca²⁺ and CaM (Fig. 45). However, in the presence of EGTA, CREB phosphorylation was less evident compared to the immunoprecipitates containing Ca²⁺, although the level of CREB protein was similar in both lanes (phospho-CREB/CREB: 9.4 and 16, EGTA and Ca²⁺ respectively).

To determine whether chicken CaMKIV_{CA} induces MN survival in the absence of neurotrophic support, we co-transfected MN cultures with pEGFP and CaMKIV_{CA} or the empty vector in order to analyze cell survival. After 24 h cells were washed and treated with 10 ng/ml BDNF or 30 mM KCl (30K, to induce membrane depolarization) or left untreated (non-supplemented, NS). Cell survival and cell death were evaluated 24 h later as the percentage of fluorescent cells remaining in the culture well with respect to the fluorescent cells at treatment initiation, and the percentage of cells with blebbing morphology respect to the total fluorescent cells in the culture well, respectively. It has been described that 24 h after neurotrophic factor withdrawal, apoptotic dying neurons show a marked blebbing of the plasma membrane, whereas healthy neurons are smooth and have long neurites (Edwards and Tolkovsky 1994). Results show

that CaMKIV_{CA} protected MN from the cell death induced after neurotrophic factor or high potassium withdrawal (Fig. 46). After 24 h of deprivation, CaMKIV_{CA}-transfected MN showed ~100% of surviving cells with respect to the EGFP-positive cells present at the beginning of the treatment, whereas empty vector-transfected cells in the same culture conditions showed ~50% of surviving cells (Fig. 46).

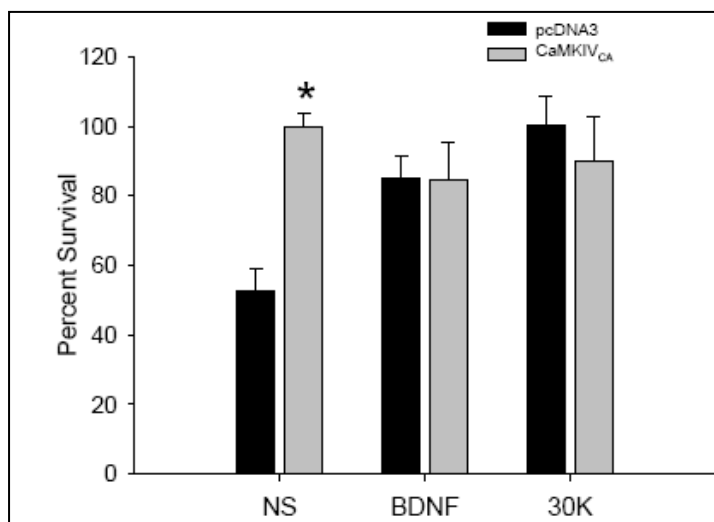


Figure 46. Effect of CaMKIV constitutively active form on MN survival in vitro. Thirty minutes after plating, MNs were transiently cotransfected with pEGFP and pcDNA3-Flag-CaMKIV_{CA} or the empty vector. Twenty four hours later, cells were washed and treated with 10 ng/ml BDNF or 30 mM KCl medium (30K) or left untreated (NS) as indicated. Survival was expressed as the percentage of EGFP-positive cells after 24 hr of treatment with respect to the EGFP-positive cells present in the culture surface at the beginning of the treatment. Asterisks indicate $p < 0.001$.

Otherwise, the percentage of blebbing cells in CaMKIV_{CA}-transfected MNs was reduced (~17%) when compared to the empty vector-transfected cultures (~35%) in the absence of any trophic support (Fig. 47). Together, these results indicate that chicken CaMKIV has Ca²⁺/CaM-dependent kinase activity and the

truncated form in Leu³¹³ generates a constitutively active form that protects MNs from the cell death induced by neurotrophic factor or high potassium deprivation.

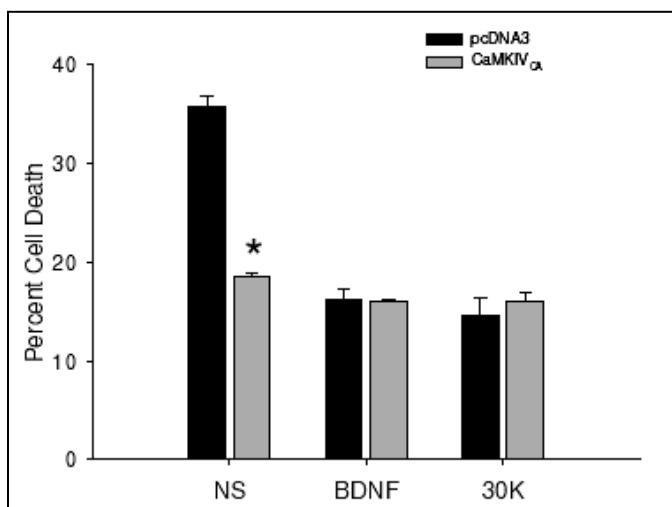


Figure 47: Effect of CaMKIV active forms on MN dye in vitro. Cell death was expressed as the percentage of cells with “blebbing” morphology respect to the total EGFP-positive MNs present in the culture dish after 24 hr of treatment. Values are the mean \pm S.E. of three wells from a representative experiment that was repeated at least two more times. Asterisks indicate significant differences between pcDNA3-Flag-gCaMKIV_{CA} and the empty vector transfected cells in NS medium in A, or BDNF or 30K medium in B, using the Student *t* test (*, $p < 0.001$).

4.2.5. Endogenous CaMKIV mediates MN survival.

To ascertain the role of endogenous CaMKIV in MN survival, we generated two RNA interference: RNAi, targeting a specific site of CaMKIV sequence (see Materials and Methods); and RNAic, targeting an unspecific RNA sequence, used as a control of the experiment. To check the ability of RNA interference constructs to knockdown CaMKIV expression, we used PC12 cells because the number of transfected MNs with standard methods is not enough for the analysis

by Western blot of protein expression. For the same reason, we also used PC12 cells in the signaling experiments described later. PC12 cells do not express CaMKIV (Llovera et al. 2004) and for the experiment we induced chicken CaMKIV overexpression in these cells. Using Lipofectamine we transiently co-transfected PC12 cells with pEGFP and pcDNA3-FLAG-CaMKIV_{CA} form. Twelve h later, cells were infected with lentivirus containing the sequence encoding RNAi or the control RNAic or the lentiviral empty construct. RNAi, but not RNAic, dramatically decreased the level of ectopically expressed CaMKIV protein in PC12 cells (Fig. 48).

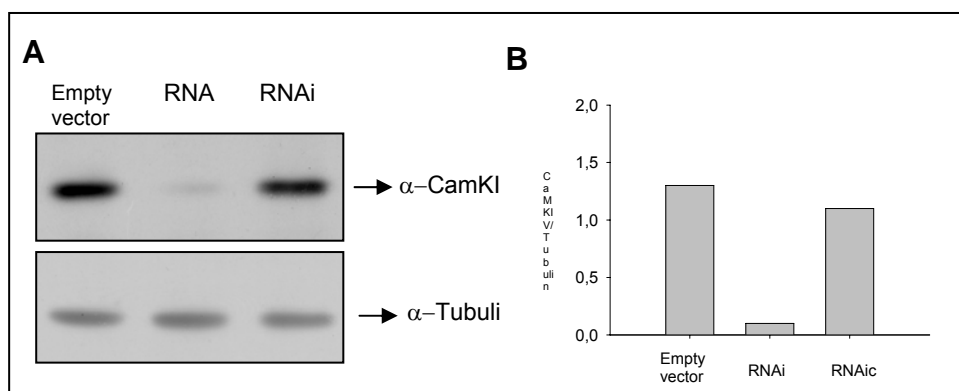


Figure 48. Endogenous CaMKIV is necessary for MN survival in vitro. (A) PC12 cells were transiently transfected with pcDNA3-FLAG-CaMKIV_{CA}. After 4 h cells were infected with lentivirus containing a sequence encoding RNAi against CaMKIV (RNAi) or an RNAi against an unspecific RNA sequence (RNAic) or the empty vector. Protein extracts were probed with the anti-CaMKIV antibody by Western blot analysis. Membranes were re-probed with an antibody against α -Tubulin, used as a loading control. (B) Purified MNs were co-transfected using Lipofectamine with pEGFP and pSUPER.retro.puro containing sequences encoding RNAi or RNAic or the empty vector. After 24 h cultures were washed and medium changed with the different conditions: non-supplemented (NS) or 10 ng/ml BDNF or 30 mM KCl (30K). Survival was evaluated after 72 h as the percentage of remaining fluorescent cells, respect to the fluorescent cells present at the beginning of the treatment. Values are the mean \pm SEM of three wells from a representative experiment that was repeated at least twice with comparable results. Asterisks indicate significant differences between RNAi and empty vector transfected cultures in BDNF or 30K medium using the Student *t* test (*, $p < 0.001$).

To analyze the effect of RNAi on MN survival, cultured MNs were co-transfected using Lipofectamine with pEGFP and either RNAi or RNAic or the

empty vector. After 24 h cultures were washed and the medium was changed with the different treatments: non-supplemented (NS) or 10 ng/ml BDNF or 30K. Survival was evaluated 72 h later as the percentage of remaining fluorescent cells in the culture dish with respect to the fluorescent cells present at the beginning of the treatment. Fig. 6B shows that RNAi, but not RNAic, blocked the survival effect induced by BDNF or by 30K medium. This effect on cell survival with the RNAi construct demonstrate that endogenous CaMKIV plays a role in regulating MN survival in both experimental paradigms, neurotrophic factor- or membrane depolarization-induced chicken MN survival.

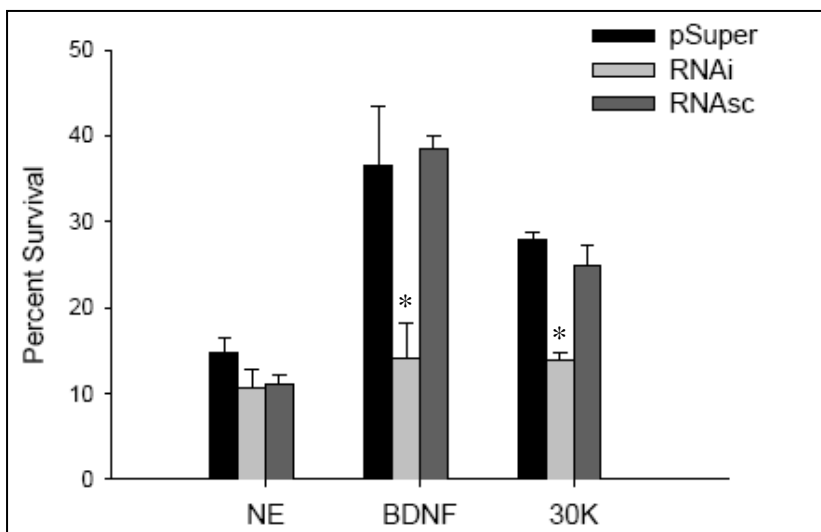


Figure 49. Endogenous CaMKIV is necessary for MN survival in vitro. Purified MNs were co-transfected using Lipofectamine²⁰⁰⁰ with pEGFP and pSUPER containing sequences encoding RNAi against CaMKIV or scrambled RNAi or the empty vector. After 24 hrs cultures were washed and medium changed with the different conditions: no supplemented (NS) or 10 ng/ml BDNF or 30 mM KCl (30K). Survival was evaluated after 72 hr as the percentage of remaining fluorescent cells respect to the fluorescent cells present at the beginning of the treatment. Values are the mean \pm S.E. of tree wells from a representative experiment that was repeated at least twice with comparable results.

4.2.6. Constitutively active form of chicken CaMKIV induce PKB phosphorylation

It is well known that the activation of the PI 3-kinase/PKB pathway induces neuronal survival on different neuronal populations (Crowder and Freeman 1998), including spinal cord MNs (Dolcet et al. 1999; Soler et al. 1999). Our previous work described that Ca^{2+} /CaM has a role in both the activation of the intracellular pathway PI 3-kinase and MN survival induced by GDNF (Perez-Garcia et al. 2004). GDNF stimulation induces a moderate increase of intracellular Ca^{2+} concentration, and this increase is involved in MN survival through CaM activation and association to PI 3-kinase and the subsequent PKB activation. In this context, we wanted to analyze whether the survival promoting effect of CaMKIV was also mediated by the activation of PI 3-kinase/PKB pathway. PC12 cells were transiently co-transfected with pEGFP and the pcDNA3-FLAG-CaMKIV_{CA} or a constitutively active form of PI 3-kinase (pRSV-PI 3-K_{CA}) or the empty vector (Fig. 50). After 48 h, cells were washed and then stimulated 5 min with different culture conditions: non-supplemented or 100 ng/ml NGF or 70 mM KCl, with or without the PI 3-kinase antagonist LY294002 (50 μM). Cell lysates were analyzed by Western blot using specific antibodies against phospho-PKB (Ser 473) or phospho-ERK (Thr 202 and Tyr 204), to check the phosphorylation of both proteins as representative steps of activated PI 3-kinase/PKB and ERK MAP kinase pathways, respectively. Cells transfected with CaMKIV_{CA} or PI 3-K_{CA} (Fig. 50, lanes 6 and 8, respectively) showed an increased level of PKB phosphorylation compared to the cultures transfected with the empty vector (Fig. 50, lane 1). In both conditions PKB phosphorylation was inhibited by the presence of the PI 3-kinase inhibitor LY294002, indicating that PI 3-kinase activation is mediating this process (Fig. 50, lanes 7 and 9).

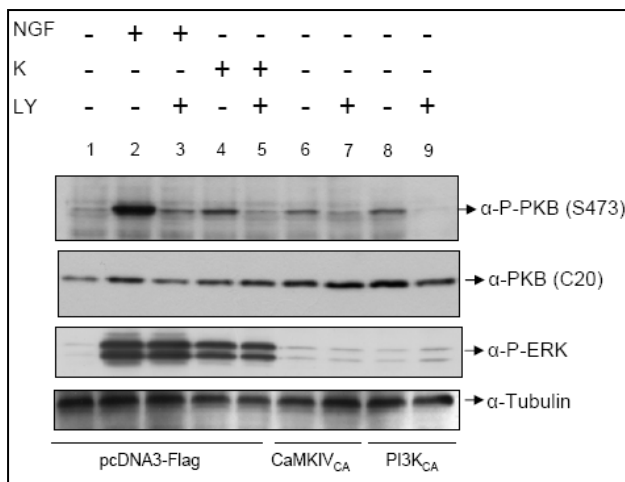


Figure 50.: CaMKIV_{CA} induces PKB phosphorylation. PC12 cells were transfected with pcDNA3-Flag or pcDNA3-Flag-CaMKIV or pcDNA3-PI3K_{CA}. Two days later the cells were treated with PI3K inhibitor LY294002 (50 μm) and then stimulated for 5 min with NGF (100 ng/ml) or potassium (70 mM). Protein extracts were analyzed by western blot using anti phospho-PKB (α-P-Ser-473), anti phospho-ERK. Protein loading was checked by reprobing the filters with anti-tubulin or anti-PKB (C20).

However, ERK phosphorylation was not increased in the same extracts, suggesting that neither CaMKIV_{CA} nor PI 3-K_{CA} are able to activate ERK MAP kinase pathway in these experimental conditions. Control cultures treated with NGF or high potassium medium induced an increase of PKB phosphorylation (lanes 2 and 4) that was blocked by LY294002 (lanes 3 and 5). In both cases, the same treatment induced ERK phosphorylation that was not inhibited by LY294002, as expected (Fig. 50).

All these results suggest that in PC12 cells, neurotrophic factors and high potassium medium exert their biological effects activating both the PI 3-kinase and ERK MAP kinase pathway. Nevertheless, CaMKIV_{CA} induces PKB phosphorylation, but not ERK phosphorylation, indicating the involvement of the PI 3-kinase pathway, but not the ERK MAP kinase pathway, in its survival promoting effect.

4.2.7. CaMKIV associates with the 85-kDa regulatory subunit of PI 3-kinase.

To analyze a physiological regulation of PI 3-kinase activation by CaMKIV we evaluated the possible interaction between these two proteins using a co-immunoprecipitation strategy. To this end, PC12 cells were co-transfected with pEGFP and the empty vector (Fig. 51, lane 1) or pcDNA3-FLAG-CaMKIV (Fig. 51, lanes 2-8). Two days later cultures were washed and stimulated with different culture conditions: non-supplemented; or 100 ng/mL NGF or 70 mM KCl, with or without 50 μ M BAPTA-AM (intracellular calcium chelator) or 50 μ M LY294002, then cells were lysed and immunoprecipitated with a specific monoclonal antibody against the 85-kDa regulatory subunit of the PI 3-kinase (p85).

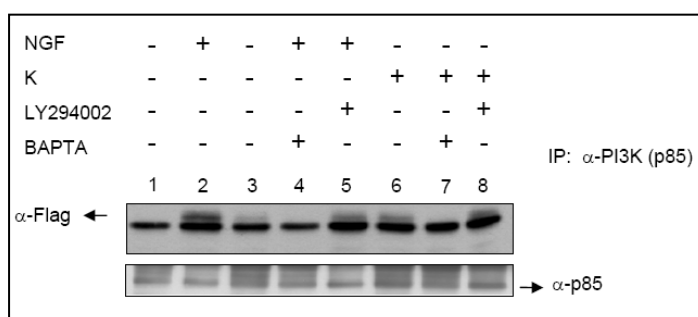


Figure 51: CaMKIV associates with the 85-kDa regulatory subunit of PI 3-kinase. PC12 cells were treated with LY294002 (50 μ M) or BAPTA-AM (50 μ M), then were stimulated with NGF (100 ng/ml) or potassium (70 mM) during 5 min. PC12 were incubated with anti-PI3K (p85) antibody and then with protein G-sepharose during 2 hours. Complexes were analyzed by western blot with an anti-FlagM2. Efficiency of p85 immunoprecipitation in the different conditions was checked by reprobating the membranes using the α -p85.

Western blot analysis of immunoprecipitates probed with an anti-FLAG antibody showed that CaMKIV co-immunoprecipitate with p85 (Fig. 51, lane 3). When cultures were treated with NGF (Fig. 51, lane 2) or high potassium (Fig. 51, lane 6) the level of co-immunoprecipitation increased with respect to the non-stimulated cells (lane 3). In both cases (lane 5 for NGF; lane 8 for high potassium) treatment with LY204002 did not prevent the association induced by

Results

both treatments, indicating that this association is independent of PI 3-kinase activation. However, when intracellular Ca^{2+} was chelated with BAPTA-AM the co-immunoprecipitation was abolished, demonstrating the Ca^{2+} dependence of the association (lane 4 for NGF; lane 7 for high potassium). Together these results suggest that CaMKIV interacts with p85 in a Ca^{2+} -dependent and PI 3-kinase activity-independent manner and the interaction increases when cells are stimulated with neurotrophic factors or membrane depolarization.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Diversos factores neurotróficos son capaces de mantener las MNs tanto *in vivo* como *in vitro*. Tanto las neurotrofinas, BDNF, NT-3, NT4/5 (Henderson, CE y col. 1993) a través de la activación de los receptores de la familia de Trk, como los GFLs, GDNF, NRTN, PSPN y ARTN a través de Ret y los co-receptores GFR α , promueven la supervivencia de esta población de neuronas *in vitro* (Sariola, H y Saarma, M 2003). Las MNs en cultivo también sobreviven en presencia de otros factores como son las citoquinas, CNTF (Arakawa, Y y col. 1990), LIF (Hughes, RA y col. 1993), CLC (Shi, Y y col. 1999) y CT-1 (Pennica, D y col. 1995) activando los receptores gp130 y LIFR β (Nakashima, K y Taga, T 1998). Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que tanto las neurotrofinas, los GFLs, y las citoquinas protegen de la muerte apoptótica tras la retirada de soporte trófico a las MNs en cultivo activando vías de señalización implicadas en supervivencia (Dolcet, X y col. 1999; Soler, RM y col. 1999; Dolcet, X y col. 2001).

El trabajo que se presenta, se ha llevado a cabo principalmente, utilizando como modelo el cultivo primario de MNs de embrión de pollo de 5.5 días. La purificación de estas células se ha realizado siguiendo el protocolo establecido previamente en nuestro laboratorio (Comella, JX y col. 1994). Las MNs se obtienen a partir de la médula espinal de estos embriones que, tras su extracción y disociación mecánica, son purificadas mediante un gradiente de densidad. Esta técnica de separación nos permite aislar las MNs del resto de células que forman la médula, gracias a que, en esta edad embrionaria, las MNs tienen menor densidad y mayor tamaño que el resto de células de la médula (Dohrmann, U y col. 1986).

El cultivo de MNs, y en general los cultivos primarios, proporcionan un buen modelo para el estudio y el análisis de las proteínas que regulan la supervivencia de estas células. En los experimentos que aquí se presentan, las MNs se encuentran aisladas de las influencias y de las relaciones con otras células, cosa que no ocurre *in vivo*. A pesar de ello, este cultivo representa un sistema muy útil para los estudios que se han llevado a cabo, disponiendo de un

sistema controlable y reproducible, en el cual se pueden analizar los efectos de nuestros tratamientos.

Los cultivos de MNs se han mantenido *in vitro* en presencia de extracto muscular, que contiene todos los requerimientos necesarios para la supervivencia de estas neuronas (Neff, NT y col. 1993). En algunas ocasiones también se han mantenido en presencia de factores neurotróficos. Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que *in vitro*, BDNF activa vías intracelulares de señalización implicadas en supervivencia, como la vía de la PI-3K/PKB (Dolcet, X y col. 1999). Estos estudios con BDNF demostraron que las MNs respondían a este factor neurotrófico después de 48h en cultivo, correlacionándose con la expresión de su receptor específico TrKB (Becker, E y col. 1998). También en experimentos con ratones *KO* para las neurotrofinas y sus receptores se observa entre un 20-35% de muerte de las MNs, que nos indica la importancia de este factor neurotrófico durante el desarrollo y la maduración de estas MNs (Ernfors, P y col. 1994; Klein, R y col. 1994). Otra familia de factores estudiada en nuestro laboratorio ha sido los GFLs. Tanto GDNF como NRTN y PSPN promueven la supervivencia de las MNs en cultivo de manera dependiente de la concentración. Además el tratamiento a concentraciones subóptimas, combinando más de un factor presenta un efecto aditivo. Esto explica la respuesta diferencial de las poblaciones de MNs a los distintos factores neurotróficos. Dependiendo del momento del desarrollo, las poblaciones de MNs pueden expresar en su membrana distintos receptores, determinando su supervivencia en función a los factores presentes, es decir, el tratamiento con un único factor tan solo rescata aquellas poblaciones que expresan el receptor para dicho factor. Estudios *in vivo*, utilizando ratones transgénicos sobreexpresores de GDNF, han demostrado la importancia de este factor en la supervivencia de la MNs durante el desarrollo, así como en MNs postnatales, tras una axotomía (Zhao, Z y col. 2004). Las citoquinas, al igual que los factores citados hasta el momento, también promueven la supervivencia de estas neuronas en cultivo, aunque en menor grado que los anteriores. Esto puede indicar que tan sólo algunas subpoblaciones de MNs sobreviven en presencia de CT-1 o CNTF (Dolcet, X y col. 2001). Sin embargo,

estudios con los ratones KO por las citoquinas y su receptores muestran hasta un 40% de muerte en la población de MNs, demostrando la importancia de esta familia de factores para el desarrollo de las MNs *in vivo*. Los experimentos llevados a cabo por Dolcet y colaboradores, demostraron que la supervivencia mediada por neurotrofinas y GFLs implicaba la activación de la vía PI-3K/PKB, ya que el tratamiento con inhibidores específicos de proteínas de esta vía revertían la supervivencia inducida por estos factores (Dolcet, X y col. 1999; Dolcet, X y col. 2001).

Uno de los aspectos más complejos del trabajo con cultivos primarios de MNs es la dificultad a la hora de realizar algunas de las técnicas aquí descritas. Un factor importante a tener en cuenta, es el número de células obtenidas por embrión, el cual no es muy alto. Se consiguen alrededor de $1,5 \cdot 10^5$ MNs por cada embrión. Este número de células obtenidas es bastante bajo en números absolutos, aunque supone recuperar un porcentaje elevado del número total de MNs de la médula espinal. Para experimentos de bioquímica se necesitan un gran número de embriones. Todavía se complica más, si necesitamos realizar experimentos de ensayos quinasa *in vitro*, pues en este tipo de experimentos se requieren entre 500 μg y 1 mg de proteína.

La transfección de cultivos primarios siempre ha sido compleja, hasta hace pocos años era bastante difícil conseguir que se transfectaran, de todas formas la aparición de nuevos reactivos diseñados para esta finalidad nos ha facilitado bastante el camino. Algunas de las técnicas de transfección son bastantes agresivas para ser utilizadas con las MNs. En los experimentos que se muestran, las MNs han sido transfectadas con Lipofectamine™2000, que es un método bastante eficaz para la transfección de cultivos primarios en presencia de suero, aunque con esta técnica se consiguen porcentajes muy discretos de transfección. Sin embargo, estos porcentajes han sido suficientes para evaluar la supervivencia o muerte de estas células en cultivo, pero insuficientes para experimentos bioquímicos, en los que se inmunoprecipitaban proteínas transfectadas. Este problema ha hecho, que en determinados experimentos, se hayan utilizado líneas, como la línea PC12 o la línea HEK293T. Estas líneas celulares nos han permitido utilizar diferentes técnicas

de transfección (lentivirales, electroporación, fosfato cálcico) adecuándolas a cada experimento y obteniendo una eficiencia de transfección más elevada que la obtenida en cultivos primarios. Igualmente, estas líneas nos ofrecen la ventaja de tener una alta capacidad de expresión de proteínas transfectadas facilitándonos la realización de experimentos. Sin embargo, los efectos biológicos (supervivencia o muerte) de las proteínas analizadas siempre se han validado en cultivos primarios de MNs.

5.1. REGULACIÓN DE LA VÍA PI3K/PKB MEDIADA POR CALCIO/CAM Y SU IMPLICACIÓN EN LA SUPERVIVENCIA DE LAS MOTONEURONAS EN CULTIVO TRATADAS CON GDNF.

GDNF, en cultivos primarios de MNs, promueve la salida de calcio de los reservorios intracelulares, activando la CaM. Esta proteína, regulada por calcio, modula la vía PI-3K/PKB, responsable de la supervivencia de estas MNs en cultivo.

5.1.1. Diferentes factores neurotróficos promueven incrementos intracelulares de calcio a partir de los reservorios intracelulares.

En este trabajo se demuestra por primera vez, que la estimulación de las MNs con GDNF produce incrementos moderados del calcio intracelular posiblemente a través de su unión a Ret, receptor del GDNF.

Cuando estas MNs se tratan con GDNF a 100 ng/ml los niveles intracelulares de calcio se elevan hasta 620 ± 101 nM respecto a los niveles basales (142 ± 14 nM). Es conocido que estos cambios son suficientes para activar la CaM. Los experimentos realizados han permitido demostrar que estos incrementos en los niveles de calcio se producen por la salida de calcio de los reservorios intracelulares. El tratamiento con inhibidores que bloquean la salida de calcio desde estos reservorios al citoplasma, como el dantroleno o la tapsigargina (que vacía los depósitos) bloquea el incremento en la concentración de calcio tras el tratamiento con GDNF. En cambio, el tratamiento

con cadmio, bloqueante no selectivo de canales de calcio voltage dependientes, no previene este incremento. Estos resultados son similares a los obtenidos por De Benardi y colaboradores (1996), en los que en la línea de glioma C6-2B, el tratamiento con NGF provoca la salida de calcio desde los reservorios intracelulares y el tratamiento con EGTA (quelante extracelular de calcio) no tiene ningún efecto sobre el incremento en la concentración de calcio. Sin embargo, en otros estudios se ha descrito que el calcio extracelular es necesario para producir incrementos moderados de calcio intracelular. En la línea PC12 y en las células cromafines analizadas con la técnica de Fura-2, se observa un incremento del calcio intracelular, después del tratamiento con NGF, debido en parte, por la entrada de calcio desde el espacio extracelular, ya que el EGTA bloquea parcialmente el incremento observado, y en parte por la liberación de calcio desde los reservorios intracelulares (Pandiella-Alonso, A y col. 1986). En nuestro modelo de MNs, EGTA también bloquea el incremento de calcio. En este caso, es Ret quien requiere calcio extracelular para activarse, ya que posee un dominio de unión a calcio en la parte extracelular (Nozaki, C y col. 1998). Por lo tanto, el tratamiento con EGTA previene la unión de GDNF al receptor y su posterior activación. Si la activación de Ret se bloquea, toda la señalización mediada por el receptor también queda bloqueada y como consecuencia, no se produce un incremento en los niveles de calcio intracelular. El tratamiento de los cultivos de MNs con EGTA, bloquea la activación tanto de la PI-3K como de la PKB, demostrando que el calcio es necesario para la activación del receptor. En cambio, el tratamiento con antagonistas de canales de calcio, no previene la fosforilación de la PKB, indicando que los canales de calcio voltage dependientes no están implicados en la activación de la PKB mediada por este factor. Por último, los inhibidores de la salida de calcio de los reservorios intracelulares afectan bloquean la fosforilación de la PKB. En conclusion, el calcio extracelular es necesario para la activación de vías intracelulares mediadas por GDNF/Ret, ya que el calcio es necesario para mediar la unión del ligando a su receptor. Tras la estimulación con GDNF el calcio extracelular ya no se requiere puesto que el tratamiento con bloqueantes de canales de calcio o antagonistas de estos canales no afectan a la activación de la PKB.

Los factores neurotróficos, en otros modelos se ha demostrado que la unión de NGF a Trk promueve pequeños incrementos en la concentración de calcio intracelular y estos cambios promueven la supervivencia celular (Pandiella-Alonso, A y col. 1986). En las células NIH3T3 sobreexpresoras de TrkA y carentes de p75, NGF incrementa la concentración de calcio intracelular (De Bernardi, MA y col. 1996).

Los incrementos de calcio intracelular en neuronas no sólo son debidos al efecto de los factores neurotróficos sino que la despolarización de membrana también incrementa estos niveles, aunque la procedencia del calcio en ambos casos es diferente. En el caso de la despolarización de membrana, se produce una entrada de calcio desde el espacio extracelular. Este incremento de calcio activa diferentes vías intracelulares de señalización. Los incrementos en la concentración de calcio intracelular producidos promueven la supervivencia en diferentes modelos neuronales (Franklin, JL y Johnson, EM, Jr. 1992). Las MNs en cultivo, en presencia de potasio, también sobreviven en ausencia de factores neurotróficos (Soler, RM y col. 1998). El tratamiento de las MNs con potasio promueve la despolarización y la activación de los canales de calcio voltage dependientes de tipo L, produciéndose la entrada de calcio desde el espacio extracelular al citoplasma de la célula. Antagonistas de estos canales revierten el efecto provocado por el potasio. El efecto de supervivencia es suprimido cuando se tratan los cultivos con inhibidores de la CaM, proteína regulada por calcio, como el W13 (Soler, RM y col. 1998).

El incremento de calcio intracelular promueve la activación de proteínas reguladas por calcio y, a su vez, estas moléculas activan diferentes vías intracelulares de señalización implicadas en supervivencia, como la vía PI-3K/PKB (Egea, J y col. 2001). En este trabajo, demostramos que el GDNF induce incrementos moderados de calcio intracelular y activa proteínas como la CaM, regulando así, la vía de supervivencia de la PI-3K. La adición al medio de antagonistas de la CaM, como el W13 y otros inhibidores con estructura química diferente, como la trifluoperacina (TFP), bloquean la fosforilación y la activación de la PKB en cultivos de MNs tratados con GDNF. De forma similar, el tratamiento con quelantes de calcio intracelular como el BAPTA-AM, disminuyen la actividad de la PKB. Por tanto, los antagonistas de la CaM y los quelantes de

calcio, tanto extracelulares como intracelulares, bloquean la activación de la PKB tras el tratamiento con GDNF.

Para demostrar a que nivel de la vía PKB estaba interaccionando la CaM en nuestros cultivos, se analizó la existencia de una unión física entre la subunidad reguladora, de la PI-3K, p85 y la CaM por inmunoprecipitación. Los resultados obtenidos *in vitro* utilizando CaM recombinante demuestran que esta unión es posible y dependiente de calcio, ya que el tratamiento con EGTA la bloquea. Además, cuando inmunoprecipitamos utilizando el anticuerpo contra la subunidad reguladora de la PI-3K, se observa que esta unión es independiente de la presencia de GDNF, pues la CaM se mantiene unida a la p85 en presencia y en ausencia de este factor neurotrófico.

Estudios realizados por Joyal y colaboradores (1997) en cultivos celulares de la línea Sf9, demostraron una interacción entre los dominios SH2 (*Src homology 2*) de la subunidad reguladora de la PI-3K y la CaM, es posible que la interacción observada en nuestro modelo sea a través de estos dominios. Otros autores también han descrito una interacción entre la subunidad catalítica de la PI-3K (p110) y la CaM de forma dependiente de calcio (Fischer, R y col. 1998). Estos resultados junto con los nuestros, demuestran una regulación compleja de la PI-3K por parte de la CaM.

Esta demostrado que el tratamiento con neurotrofinas activa la vía PI-3K/PKB. Trabajos realizados por Egea y colaboradores (2001) describen que la inhibición de la CaM en cultivos tratados con NGF afectan a la regulación de esta vía. En este sistema, la CaM no actúa directamente sobre la PI-3K sino que lo hace mediando la formación y estabilidad de los fosfatidiles inositoles que se generan. Esta conclusión se obtiene a partir de los resultados en que los inhibidores de la CaM no son capaces de bloquear totalmente la actividad PI-3K *in vitro*. En cambio, cuando se analiza la actividad de proteínas por debajo de la PI-3K en la cascada de señalización, como la PKB, sí que se observa una disminución en su actividad *in vitro*.

Por otra parte, nosotros demostramos que cuando las MNs son tratadas con GDNF, también se produce una activación de la CaM, pero a diferencia de lo que ocurre en el caso de las neurotrofinas la regulación se produce en la PI-3K. Estos resultados quedan confirmados porque tras el tratamiento con

inhibidores de la CaM, se bloquea la actividad PI-3K *in vitro*. Por tanto, la CaM puede regular esta vía a diferentes niveles, ya sea directamente sobre la actividad de la PI-3K o indirectamente ayudando a la formación y estabilización de los fosfatidil-inositoles.

Los efectos de supervivencia observados por incrementos de calcio intracelular debido a la despolarización no se regulan igual que los debidos a la unión de factores neurotróficos. Cuando tiene lugar la despolarización de membrana, se produce entrada de calcio a través de los canales de calcio y éste promueve la supervivencia a través de la CaM sin afectar la vía PI-3K/PKB, puesto que el inhibidor LY294002 de la PI-3K no bloquea esta supervivencia (Soler, RM y col. 1998). En cambio, los incrementos moderados de calcio debido a la unión de factores neurotróficos a su receptores, activan la CaM y, en este caso, a diferencia de lo que ocurre con la despolarización, la CaM sí modula la vía PI-3K/PKB.

5.1.2. El calcio y la CaM están implicados en la activación de PKB mediada por GDNF

El tratamiento de las MNs con antagonistas de la CaM, como W13, disminuyen el porcentaje de supervivencia de estas células en cultivo. En aquellas MNs tratadas con GDNF obtenemos un porcentaje de supervivencia de alrededor de un 80%, en cambio, en las tratadas con el factor más el antagonista de la CaM, la supervivencia observada tan solo es de 55%. Estos resultados se corroboraron con el recuento de células apoptóticas en las mismas condiciones experimentales, utilizando la tinción de Hoescht 33258 y obteniendo resultados complementarios.

La transfección de la forma constitutivamente activa de la PKB, revierte la muerte producida por los antagonistas de la CaM, demostrando la implicación de la vía PI-3K/PKB en la supervivencia regulada por la CaM. En otros modelos celulares, como las PC12, también se ha demostrado que formas activas de la PKB previenen la muerte producida por los inhibidores de la CaM, así como en cultivos de MNs tratados con BDNF (Egea, J y col. 2001).

A modo de resumen de este primer trabajo, podemos concluir que el tratamiento de las MNs con GDNF induce un incremento moderado en la concentración de calcio intracelular. Este incremento de calcio se produce por la salida desde los reservorios intracelulares. Aunque la unión del factor a Ret promueva salida de calcio desde los reservorios intracelulares, el calcio extracelular es necesario para la activación de este receptor. Ret, a diferencia de otros receptores con actividad tirosina quinasa, requiere la unión de calcio en su dominio extracelular para que sea activo.

Una de las dianas que se activan por los incrementos en la concentración de calcio intracelular, es la CaM. La CaM en nuestro modelo esta unida a PI-3K, en ausencia de factor neurotrófico, probablemente mediante los dominios SH2. La PI-3K es una proteína que se encuentra en la cascada de señalización de la vía PI-3K/PKB y esta vía se ha implicado con fenómenos de supervivencia. Por lo tanto, la activación de la CaM y su regulación de la PI-3K, conlleva a la activación de la PKB y a la supervivencia de estas células. *In vitro*, el tratamiento con quelantes de calcio, como el EGTA, bloquean la unión de la CaM a la PI-3K. Por tanto, esta unión es dependiente de calcio pero independiente de factor neurotrófico. El bloqueo de la CaM con los inhibidores W13 o TFP, se traduce en la muerte de estas células.

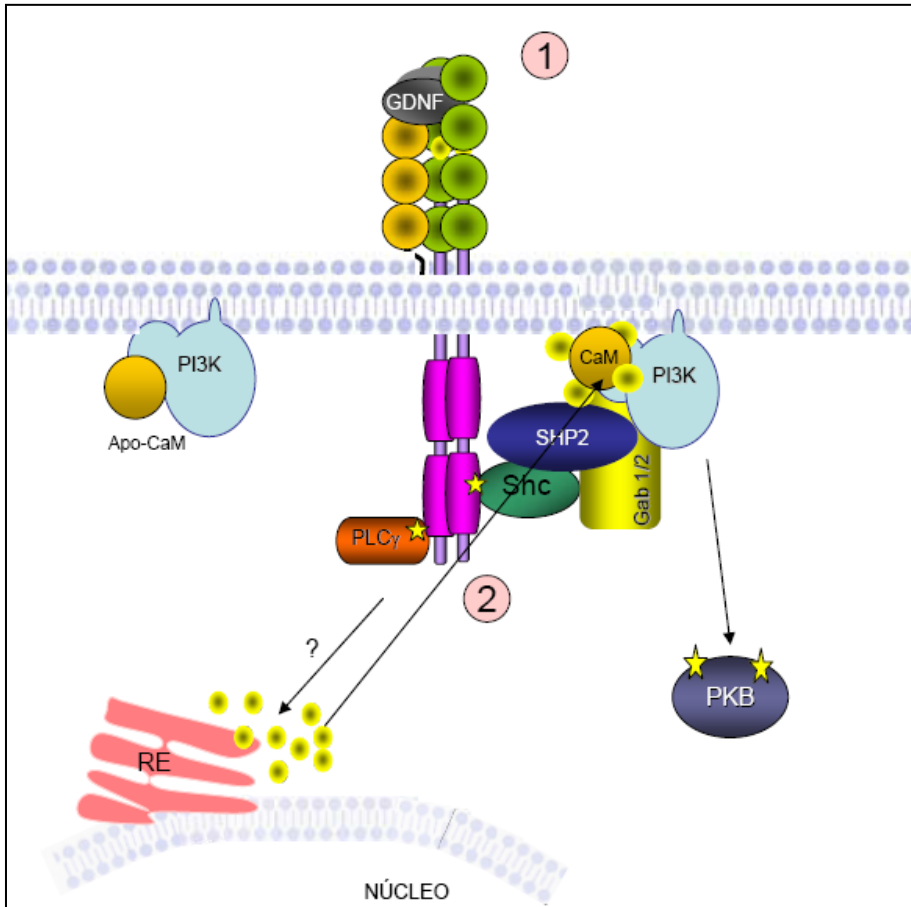


Figura 26: **Resumen de la activación de Ret tras la unión de GDNF.** 1. En condiciones basales, CaM se encuentra unida a la PI-3K por los dominios SH2. 2. Tras la activación del receptor se produce la salida de calcio desde los reservorios intracelulares, activándose la CaM. Esta CaM activa modula la vía PI3K/PKB, implicada en fenómenos de supervivencia.

5.2. CLONAJE DE LA CaMKIV DE *Gallus gallus*. IMPLICACIÓN EN CULTIVOS PRIMARIOS DE MOTONEURONAS.

La implicación de la CaM en las vías de supervivencia neuronal, nos hizo pensar que las CaMKs estarían regulando conjuntamente con la CaM estas vías. En este segundo trabajo se ha clonado y caracterizado la CaMKIV de *Gallus gallus* (gCaMKIV). Una vez obtenida, se ha analizado su implicación en la supervivencia de las MNs en cultivo, observándose que gCaMKIV es importante en la regulación de la supervivencia de estas células a través de la activación de la vía PI-3K/PKB.

5.2.1. Clonaje y caracterización de la CaMKIV

La CaMKIV es una proteína que pertenece a una familia de proteínas reguladas por calcio y CaM. Experimentos de fosforilación *in vitro*, han demostrado su papel en la protección de la muerte, activando NF κ B en la línea celular HeLa (Bae, JS y col. 2003). Seé y colaboradores (2001) también le atribuyen un papel protector en neuronas granulares de cerebelo frente a la muerte apoptótica tras la privación de potasio.

Estudios preliminares mostraron que la transfección de cultivos de MNs con la forma constitutivamente activa de la CaMKIV de ratón (mCaMKIV_{CA}), protege a las MNs de la muerte por la retirada de soporte trófico. Este efecto no se obtenía con las formas constitutivamente activas de CaMKI (mCaMKI_{CA}), CaMKII (mCaMKII_{CA}) o CaMKK (mCaMKK_{CA}). Sin embargo, diversos autores han relacionado a estas otras quinasas con la regulación de la supervivencia en distintos modelos celulares. Así, Ikegami y colaboradores (2000) implican a la CaMKII y la vía PI-3K/PKB en la supervivencia de las neuronas simpáticas tras la despolarización de membrana. Otros autores confirman estos resultados en neuronas del ganglio espiral (Hansen, MR y col. 2003) o en células granulares de cerebelo (Borodinsky, LN y col. 2002). Yano y colaboradores (1998) describen como la CaMKK fosforila directamente la PKB, regulando de esta forma la supervivencia de las células de la línea celular NG108.

La secuencia de la gCaMKIV se obtuvo en una búsqueda por comparación de la secuencia de la CaMKIV humana (hCaMKIV) con secuencias disponibles en bases de datos públicas (GenBank, NCBI, ENSEMBL).

Una vez obtenida la secuencia y utilizando herramientas bioinformáticas (*Clustalw*) se comparó la gCaMKIV, con las distintas secuencias de la CaMKIV de distintas especies como la de ratón (mCaMKIV), de rata (rCaMKIV), y humano (hCaMKIV). Tras el análisis se observa que todas ellas presentan una elevada homología en sus secuencias primarias, siendo de un 77% entre la gCaMKIV y las ya clonadas mCaMKIV, rCaMKIV y hCaMKIV.

En un análisis más detallado de la secuencia primaria de la gCaMKIV, se demuestra que la mayor homología es en sus 300 primeros aminoácidos. Las mayores divergencias son en su extremo c-terminal, siendo éste más corto en la gCaMKIV. De hecho, la secuencia aminoacídica de la gCaMKIV contiene 372 aminoácidos, mientras que la hCaMKIV posee 473 aminoácidos, 469 aminoácidos la de mCaMKIV y 502 aminoácidos rCaMKIV.

Se ha descrito que para que la CaMKIV adquiera su máxima actividad, debe tener lugar una autofosforilación en el extremo amino terminal. En el caso de la hCaMKIV, esta fosforilación tiene lugar en la Ser12 y en la Ser13, en el motivo -VPSCSA**SSC**SSV- (Melander Gradin, H y col. 1997). En la secuencia primaria de la gCaMKIV, en su extremo amino terminal, también posee un motivo semejante al encontrado en la hCaMKIV y susceptible de autofosforilación -PSTSA**SGS**-. Aunque los aminoácidos no sean exactamente los mismos, sí poseen la misma carga, indicándonos que posiblemente, al igual que ocurre en las CaMKIV de otras especies, la gCaMKIV también sufre autofosforilación en el extremo amino terminal.

Un análisis de los distintos motivos presentes en la gCaMKIV (PFAM), revela un dominio tirosina quinasa entre el aminoácido 31 y el 285. Este mismo dominio también se encuentra presente en las mCaMKIV, hCaMKIV y rCaMKIV. Dentro de este dominio quinasa se encuentra el lugar de unión a ATP, en la gCaMKIV este dominio de unión se encuentra localizado en la Lys60.

Siguiendo con el estudio de los dominios, se ha descrito que la unión de calcio/CaM altera la conformación de la CaMKIV induciendo su activación (Soderling, TR y col. 2001). Para determinar los dominios de unión a calcio/CaM

(CBD, del inglés *calcium binding domain*) se utilizó el *calmodulin target database program* y se obtuvo que la gCaMKIV posee el motivo 1-14 y un motivo básico 1-8-14 en la posición 308-327. Estos mismos motivos se encuentran en las CaMKIV de otras especies. Así, en rCaMKIV se encuentra en la posición 319-338, en hCaMKIV en la 323-342 y en rCaMKIV en la 347-366. La presencia de estos dominios en la gCaMKIV indican, una modulación por parte del calcio y la CaM en la regulación de su actividad. Esta predicción se corrobora con los resultados obtenidos en el ensayo *in vitro*, donde la ausencia de calcio bloquea la actividad de la gCaMKIV.

Otro dominio importante en la regulación de la CaMKIV es el dominio autoinhibitorio (AID del inglés, *Autoinhibitory Domain*). Este dominio se encuentra en la región carboxi terminal después de la Leu313 en la mCaMKIV (Tokumitsu, H y col. 1994). Experimentos con diferentes mutantes de esta región en la mCaMKIV, determinaron la secuencia mínima de autoinhibición, concluyéndose que ésta se encontraba entre la Gln314 y la Lys321 (Tokumitsu, H et al. 2004). La forma mutada en la Lys321 es completamente inactiva, en presencia o en ausencia de calcio/CaM, indicando la presencia de una secuencia autoinhibitoria funcional (Tokumitsu, H y col. 1994). En cambio, la mutación en la Leu313 genera una forma constitutivamente activa del enzima (Sun, P y col. 1994). La gCaMKIV clonada también posee esta secuencia autoinhibitoria entre los aminoácidos Gln303 y la Lys312.

Se ha descrito una fosforilación de la CaMKIV por parte de la CaMKK. Esta fosforilación en treoninas por esta proteína (Thr200 en la humana, Thr196 en la de ratón, Thr224 en rata) incrementa la actividad de la CaMKIV y la generación de una actividad de la CaMKIV independiente de calcio (Chow, FA y col. 2005). En la gCaMKIV esta treonina se encuentra en la posición 185 y a igual que ocurre con las otras CaMKIV, la CaMKK puede regular la actividad de la gCaMKIV por fosforilación en residuos de treonina.

Analizando otros motivos en la estructura primaria (*Motif Scan program*) encontramos dominios SH2 y SH3. Se predice la existencia de un dominio SH2 en la posición 30 de la proteína que corresponde a una tirosina, la secuencia aminoacídica de este dominio es -NKDTLTHYFDLESEL- y podría ser lugar de interacción con otras proteínas que se unieran a este tipo de dominios. Por

ejemplo, podría darse una posible interacción entre este dominio de la gCaMKIV y el dominio SH2 de la PI-3K. Reforzando esta hipótesis, la predicción de *NetPhos* indica que la PI-3K puede ser sustrato de fosforilación con una alta probabilidad de la CaMKIV en la Ser151 –LYRTQ**S**-, en la Ser361 –LVRD**A**S-, y en las Ser231 –LIRSP**S**- y Ser 654 –LVRESS**S**-. Todas estas regiones pertenecen a secuencias de la subunidad reguladora de la PI-3K (Corcoran, EE y col. 2003). Por tanto, tras la interacción a través de los dominios SH2 podría producirse la fosforilación y la activación de la PI-3K por la gCaMKIV. Este dominio SH2 de la gCaMKIV no es el único que aparece en la predicción, sino que aparecen otros en lugares más internos de la proteína en las posiciones Tyr157 y en la Tyr217, así como un dominio SH3 en la Pro361.

Cuando se analiza el extremo carboxi terminal de la gCaMKIV, se observa que difiere en secuencia y longitud al resto de CaMKIVs. El *software* de análisis de la estructura secundaria *GOR* (Garnier, J y col. 1996) predice 3 hélices alfa en el extremo carboxi terminal en hCaMKIV, mCaMKIV y rCaMKIV. En cambio, en la gCaMKIV se predicen tan solo 2 hélices alfa, posiblemente debido a su extremo carboxi terminal más corto. En las secuencias que separan las alfa hélices, se encuentran regiones superenrolladas sin estructura definida que podrían actuar como regiones flexibles en las interacciones con otras proteínas.

La utilización del programa *PSORT*, de análisis de localización celular, el cual predice señales de localización, no mostró ninguna secuencias de señalización que la dirigiera o localizara en un compartimento específico de la célula, al igual que las otras CaMKIV analizadas. Al analizar la probabilidad de su sublocalización celular en diferentes compartimentos de la célula y obtuvimos resultados similares entre la gCaMKIV y las otras quinasas. Todas ellas tienen entre un 72-76% de probabilidad de encontrarse en el citoplasma. Esta localización citoplasmática ayuda a explicar las funciones que se describen en este trabajo. No es la primera vez que se describe una función citoplasmática de la CaMKIV. Así, Gradin y colaboradores (1997) demostraron que la CaMKIV fosforilaba a la oncoproteína 18, en células Jurkat estimulando el receptor CD3. La fosforilación de esta proteína por la CaMKIV en la Ser16 inhibe su interacción con la tubulina, regulando negativamente el ensamblaje de

los microtúbulos regulando el transporte intracelular y la exposición de receptores en la membrana plasmática.

En conclusión, a pesar de esta diferencia en la secuencia primaria de la gCaMKIV respecto a sus ortólogas en humano, ratón o rata, mantiene todos los dominios importantes descritos en otras especies, como el AID y el CBD. Además, esta secuencia más corta en el extremo c-terminal podría funcionar contrarrestando estas pequeñas cargas diferentes que se encuentran a lo largo de la secuencia aminoacídica, y que difiere de las otras CaMKIV, estabilizando la proteína y realizando las mismas funciones que la CaMKIV de otras especies.

Otra herramienta importante para el desarrollo de en este trabajo ha sido el clonaje de la forma constitutivamente activa de la gCaMKIV (gCaMKIV_{CA}). Esta proteína sólo contiene los primeros 302 aminoácidos, lo que significa que carece del dominio autoinhibitorio y el dominio de unión a calcio/CaM. Precisamente este hecho es lo que hace que sea constitutivamente activa, tal como se había descrito anteriormente en ratón (Sun, P y col. 1994). Experimentos de actividad quinasa *in vitro* con esta forma activa de la CaMKIV, demostraron una independencia al calcio, observándose actividad *in vitro* tanto en presencia como en ausencia de calcio. Esta forma constitutivamente activa de la gCaMKIV nos ha permitido el estudio de los efectos biológicos de esta proteína en la supervivencia de las MNs.

5.2.2 La gCaMKIV tiene actividad dependiente de calcio y la forma activa induce la supervivencia de las motoneuronas

La gCaMKIV contiene todos los dominios de regulación que presentan la CaMKIV de otras especies. Para comprobar que la regulación es igual a las otras CaMKIV, se han realizado experimentos de actividad quinasa *in vitro* y su dependencia de calcio y CaM.

Los resultados obtenidos demuestran que la actividad en presencia de calcio es tres veces superior al nivel basal (células transfectadas con el vector vacío). La adición de EGTA durante el ensayo disminuye a la mitad la actividad de la gCaMKIV. De estos resultados se concluye que la gCaMKIV tiene

actividad dependiente de calcio, al igual que ocurre con la CaMKIV de otras especies.

Nuestros resultados demuestran que la forma constitutivamente activa de la gCaMKIV, es independiente de calcio para su actividad quinasa, puesto que los niveles de actividad, valorados como la fosforilación de CREB, son iguales en presencia o ausencia de calcio. Así mismo, los niveles de fosforilación obtenidos con la forma constitutivamente activa son semejantes a los obtenidos con la forma nativa de la proteína. Para la realización de estos experimentos hemos seleccionado CREB como sustrato de la CaMKIV, ya que existe evidencias experimentales que demuestran que CaMKIV puede fosforilar CREB en la Ser133, modulando la transcripción de distintos genes (Anderson, KA y Kane, CD 1998).

Con los experimentos de actividad quinasa queda demostrada la funcionalidad de estas construcciones permitiéndonos el uso de las mismas para experimentos posteriores para el análisis de los efectos biológicos de la gCaMKIV. Para demostrar que la gCaMKIV_{CA} tiene el mismo efecto que el observado con las formas activas murinas, se transfectaron los cultivos de MNs con la gCaMKIV_{CA}, y se analizaron los porcentajes de muerte y supervivencia. Los resultados obtenidos concluyeron que la gCaMKIV_{CA} protege a las MNs en cultivo de la muerte por retirada del soporte trófico, al igual que se había observado con la forma murina.

Para comprobar que los efectos observados con la sobreexpresión de la gCaMKIV no eran artefactuales, se analizó la supervivencia bloqueando la CaMKIV endógena en las MNs. Para ello, utilizamos la transfección con un RNA de interferencia (RNAi) contra la gCaMKIV y se analizaron las consecuencias de este bloqueo en presencia de BDNF y potasio. La transfección con RNAi demostró una disminución de la supervivencia de las MNs tras la transfección con el RNAi y en presencia de BDNF y potasio. Estos resultados indican que la actividad de la CaMKIV es suficiente para promover la supervivencia de las MNs, así como se ha descrito anteriormente en neuronas del ganglio espiral (Hansen, MR y col. 2003) y en neuronas granulares de cerebelo (See, V y col. 2001). En esta tesis se describe por primera vez que un miembro de la familia de las CaMKs promueve la supervivencia en cultivos de MNs, reforzando los

resultados que implican a estas quinasas en la activación de cascadas de señalización intracelulares relacionadas con la supervivencia neuronal. El bloqueo de la supervivencia frente a ambos estímulos hace pensar que tanto BDNF como potasio convergen para promover la supervivencia de las MNs, mediante la activación de la CaMKIV.

Tanto los factores neurotróficos como el potasio son esenciales para la supervivencia y diferenciación de las neuronas (Gallo, V y col. 1987; Franklin, JL y Johnson, EM, Jr. 1992). Ambos tratamientos inducen la activación de distintas vías de señalización, pero los mecanismos que comparten ambos estímulos están aún por descubrir. Respecto a los factores neurotróficos existen distintos trabajos que describen vías que se activan en los fenómenos de supervivencia neuronal (Crowder, RJ y Freeman, RS 1998). En cambio, hay menos estudios sobre las vías que están implicadas en la supervivencia por la despolarización de la membrana. Yano y colaboradores (1998) describieron que en la línea NG108, la despolarización por potasio activaba a la CaMKK y ésta, fosforilaba a la PKB por un mecanismo independiente de PI-3K. Recientemente, se ha descrito que los incrementos de calcio en las neuronas granulares de cerebelo producen la activación de la PKB, protegiendo a estas células de la muerte apoptótica. En este caso, es a través de la activación de proteínas efectoras por debajo de Rac, Cdc42 o PAK-1 (Johnson, K y col. 2005). Sin embargo, en neuronas simpáticas, se ha descrito que la despolarización y los factores neurotróficos convergen en la activación de la PI-3K y sinérgicamente promueven la supervivencia neuronal (Vaillant, AR y col. 1999). Resultados previos de nuestro laboratorio en MNs demostraban que, tanto la despolarización como los factores neurotróficos, activan la CaM (Soler, RM y col. 1998), y sus antagonistas bloquean la supervivencia en estas células. Así, en general las neuronas activan diferentes vías de señalización tras la despolarización dependiendo del modelo neuronal estudiado. Por ejemplo, en esta tesis se muestra como en PC12, tras la estimulación durante 5 min con potasio se produce una fosforilación de la PKB, inhibible por LY294002. En cambio, resultados previos demostraron que ni el LY294002 ni la wortmanina, bloquean la supervivencia tras la despolarización de membrana, sugiriendo que la PI-3K no está implicada en este proceso. Sin embargo, en cultivos de MNs

tratados con potasio no se observa una fosforilación rápida de la PKB. A pesar de ello, nuestros resultados muestran que, cuando se bloquea la CaMKIV en presencia de potasio, disminuye la supervivencia de las MNs en cultivo. Una posible explicación de estos resultados, es la activación de diferentes vías intracelulares por despolarización, y que se requiera tanto de CaM como de CaMKIV para su activación. De hecho, se ha descrito recientemente que la fosforilación del activador de NF κ B es necesaria para la mediación de la supervivencia por despolarización en neuronas granulares de cerebelo. Esta fosforilación probablemente tenga lugar a través de receptores diferentes a los tirosina quinasa (Liu, L y D'Mello, SR 2006).

Los datos aquí presentados sugieren que la despolarización de membrana provoca la entrada de calcio desde el espacio extracelular, activando diferentes cascadas de señalización y como consecuencia promueve la supervivencia neuronal. Una de estas vías posiblemente se module por calcio/CaM y CaMKIV, activando a su vez proteínas efectoras, las cuales todavía no se conocen.

5.2.3. La forma activa de la gCaMKIV se une a la subunidad reguladora de la PI-3K e induce la fosforilación de la PKB

La CaM media la supervivencia de las MNs a través de la vía PI-3K/PKB. CaM una vez activa se une a la CaMKIV cambiando su conformación y permitiendo su fosforilación por la CaMKK. Con estos datos, se analizó si la CaMKIV regulaba la vía de la PI-3K utilizando el modelo de PC12. Las células se transfectaron con la forma constitutivamente activa de la gCaMKIV y se analizó la fosforilación de la PKB en la serina 473. El tratamiento de las PC12 con NGF resulta en la fosforilación de la PKB, mientras que el inhibidor de la PI-3K, LY294002, bloquea esta fosforilación. En cambio, el LY294002 no tiene ningún efecto sobre la fosforilación de la ERK, indicando que a estas concentraciones hay un efecto específico sobre la PI-3K. La forma activa de la CaMKIV, en ausencia de factor neurotrófico, fosforila la PKB, bloqueándose por el tratamiento con LY294002. Estos resultados permiten concluir que la gCaMKIV fosforila a la PKB por un mecanismo dependiente de PI-3K.

Por otra parte, una de las vías que se activa tras la despolarización de membrana en distintos modelos celulares, es la vía Ras/MAPK, cuya actividad puede monitorizarse a través del estado de fosforilación de la ERK. La transfección de la forma constitutivamente activa de la gCaMKIV, no tiene ningún efecto sobre la fosforilación de la ERK en ausencia de soporte trófico, indicándonos que la CaMKIV no regula esta vía de señalización. En otros modelos celulares, como la línea celular NG108 también se ha descrito que la CaMKIV no fosforila ERK2 en ausencia de estímulo (Schmitt, JM y col. 2004).

Con los resultados obtenidos hasta el momento y sabiendo que la forma activa de la gCaMKIV fosforila la PKB decidimos analizar a que nivel la gCaMKIV modula la vía PI-3K/PKB. Previamente demostramos una interacción *in vitro* entre la CaM y la PI-3K. Por lo tanto, con estos datos y conociendo que la CaMKIV es sustrato de la CaM, decidimos analizar si la gCaMKIV se unía a la PI-3K *in vitro*. Para ello, realizamos experimentos de pull-down en los que se analizaba si la gCaMKIV inmunoprecipitaba con la subunidad reguladora de la PI-3K (p85).

Los resultados obtenidos demostraron una asociación entre la gCaMKIV y la subunidad p85 de la PI-3K. Esta asociación depende de factor neurotrófico y calcio, ya que el tratamiento con quelantes de calcio intracelular, BAPTA-AM, bloquean esta unión, así como ocurre en ausencia de soporte trófico. En cambio, el tratamiento con el inhibidor de la PI-3K no impedía esta unión. Por tanto, se concluye que el tratamiento con el inhibidor de la PI-3K no afecta a la conformación de la proteína, impidiendo la unión de la gCaMKIV.

Respecto a la unión de la gCaMKIV a la PI-3K, podría tener lugar de dos formas: directamente a la PI-3K o uniéndose a la PI-3K mediante la CaM. Respecto a la primera opción, la predicción de dominios SH2 y SH3 en la CaMKIV sugiere que estos podrían mediar esta interacción. Esto es tan sólo una predicción, ya que al no disponer de la estructura cristalizada de la proteína no sabemos si estos dominios estarían accesibles para su interacción con otras proteínas. Tras la unión, CaMKIV podría fosforilar a la PI-3K en residuos descritos anteriormente, regulando así su actividad. Una segunda posibilidad es que la unión se realice a través de la CaM. Como demuestran los resultados

aquí presentados, la CaM se encuentra unida a la PI-3K, tanto en ausencia como en presencia de factor neurotrófico. Esta CaM, una vez activa tras la unión del calcio, cambiaría de conformación (Yang, C y col. 2004), permitiendo la unión de la gCaMKIV que, conjuntamente con la CaM regularían esta vía mediando la supervivencia de las MNs.

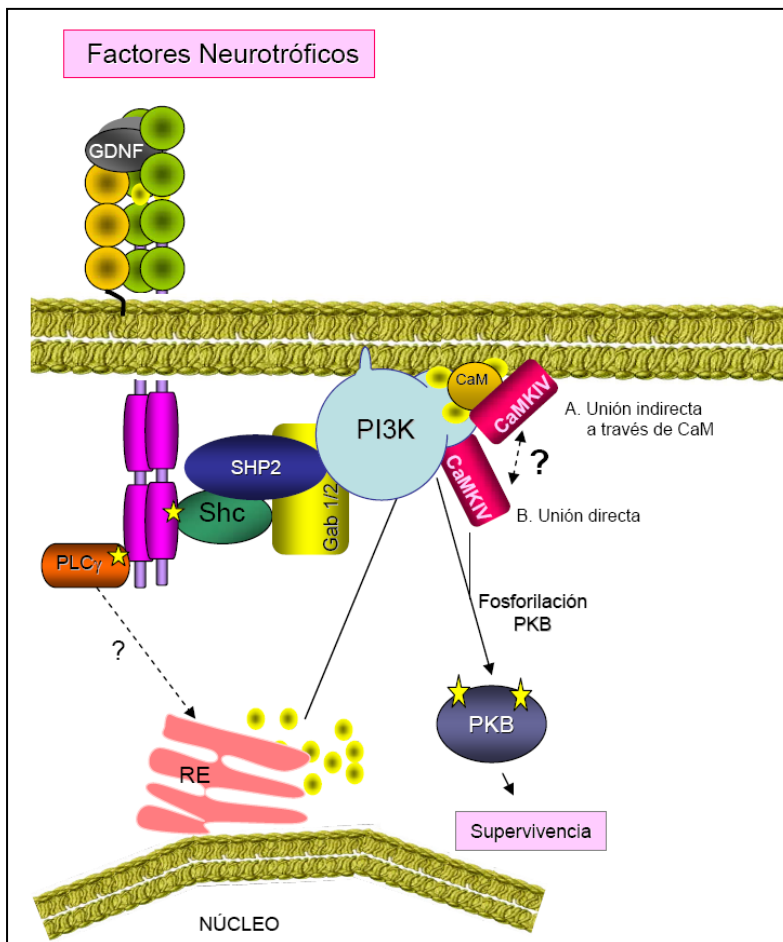


Figura 52. Esquema propuesto para la regulación por CaMKIV en la supervivencia mediada por factores neurotróficos en MNs.

Resumiendo los dos bloques podemos hipotetizar que en las MNs cultivadas, tras el tratamiento con factores neurotróficos, tanto la CaM como la CaMKIV regulan directamente la activación de la PI-3K de manera calcio dependiente (ver figura 52). Esta compleja regulación de la PI-3K por proteínas

activadas por calcio se ve reforzada por los resultados previos obtenidos con la familia de las neurotrofinas (Egea, J y col. 2001).

Además, gCaMKIV esta regulando la supervivencia mediada por despolarización de la membrana en las MNs, ya que la inhibición de la forma endógena bloquea la supervivencia mediada por potasio. La vía por la cual CaMKIV modula la supervivencia mediada por potasio en este tipo celular todavía no se conoce, siendo uno de los objetivos futuros de nuestro laboratorio (ver figura 53).

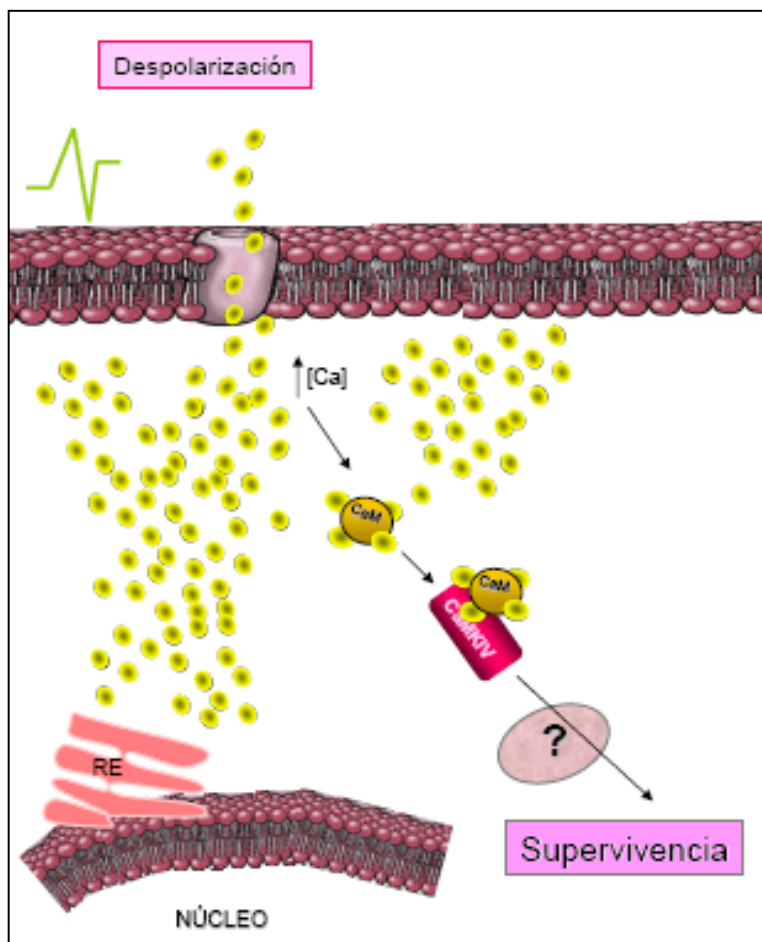


Figura 53. Esquema propuesto para la regulación por CaMKIV de la supervivencia por despolarización de membrana en MNs.

5.2.4 El fenotipo de los ratones nulos para la CaMKIV.

En dos laboratorios distintos se han generado los KO para la CaMKIV. En el laboratorio del Dr. R. Means diseñaron un tipo de estos KO, eliminando el exón I y II, que contienen las regiones promotoras y el codón de inicio ATG. La disrupción de estos exones bloquea la expresión de las dos isoformas de la CaMKIV, tanto la alfa como la beta (Ribar, TJ y col. 2000).

Tras el análisis de diferentes poblaciones celulares del cerebro encontraron déficits a diferentes niveles. Estos animales presentaban temblores, falta de equilibrio y problemas motores. Además, a nivel morfológico, este animal no presenta diferencias ni en el tamaño, ni número de las tres capas del cortex, en comparación con el animal *wild type*. Sin embargo, el número y tamaño de las células de Purkinje del cerebelo es menor. Estas células también presentan un menor marcaje de calbindina D28k, indicando una morfología inmadura. Experimentos de *Western blot* muestran a partir de extractos de cerebelo una disminución en la fosforilación de CREB. Por último, en estos ratones se observa un déficit en la transmisión sináptica en el cerebelo. Con todos estos resultados Means y colaboradores concluyen que la CaMKIV es importante en la diferenciación de las células de Purkinje, participando activamente en la función y desarrollo del cerebelo.

El otro ratón nulo para CaMKIV fue diseñado en el laboratorio de Dr.T.A. Chatila (Ho, N y col. 2000). A diferencia del anterior, carece del exón III. La disrupción de este exón también bloquea la expresión de las dos isoformas de la proteína. En este segundo *KO* se han analizado más en detalle aquellos aspectos relacionados con la plasticidad sináptica, como la *Long-Term Potentiation (LTP)* y la *Long-Term Depression (LTD)*. De este estudio se concluye que el ratón *KO* para la CaMKIV, presenta deficiencias en la fosforilación de CREB y en la LTP en las neuronas hipocámpales de la CA1 y deficiencias en la LTD tardía en las células de Purkinje del cerebelo. Sin embargo, no tiene deficiencias en la memoria ni en el aprendizaje.

En este trabajo se describe la importancia de la CaMKIV como mediadora de la supervivencia en el modelo de MNs en cultivo por la despolarización de membrana o los factores neurotróficos. Sin embargo, en el fenotipo del ratón deficiente en la CaMKIV no se aprecia ninguna deficiencia

que justifique una disminución del número de MNs. Sin embargo debemos considerar, en primer lugar, en el ratón *KO* para la CaMKIV tan sólo se han analizado poblaciones de células del cerebro y no existe hasta el momento un estudio realizado con la población de MNs de la médula espinal. Por lo tanto, debería estudiarse el número de MNs que presentan estos animales y compararlos con los *wild type* y también podría analizarse el grado de diferenciación de las MNs, utilizando marcadores como los factores de transcripción de la familia LIM (Islet 1, HB9). Segundo, se ha descrito una deficiencia en la población de células de Purkinje que pueden explicar algunos de los efectos observados en el ratón *KO*. Sin embargo, podría ser que estos ratones también tuvieran un déficit parcial de estas MNs y que los efectos por la carencia de estas células o de su actividad estuvieran enmascarados por los producidos por la falta de células de Purkinje. Así mismo, que no se observen graves deficiencias relacionadas con la ausencia o inactividad de las MNs en estos ratones puede deberse a que otras proteínas de la misma familia como la CaMKII o la CaMKK pudieran contrarrestar el déficit de la CaMKIV.

Todos los estudios realizados hasta el momento sobre los mecanismos implicados en la supervivencia de las MNs, han mostrado la complejidad de la regulación de esta población del SN. Los estudios realizados con esta población de células *in vitro* han demostrado que algunos factores neurotróficos son esenciales para mantenerlas en cultivo. Sin embargo, los estudios realizados con los ratones nulos para algunos de estos factores o sus receptores no han aclarado la importancia de los mismos, ya que en algunos estos ratones *KO* tan solo se muere entre un 20-35% de las MNs. A nivel intracelular, la activación de la vía PI-3K/PKB promueve la supervivencia de estas células, contrariamente la vía Ras/MAPK no parece que produzca el mismo efecto, pero tampoco se conoce las consecuencias de la activación de la misma. El análisis de la activación de esta vía, en la población de MNs, podría ser un objetivo para realizar en el futuro. Esta tesis ha aportado nuevos conocimientos acerca de la regulación a nivel intracelular de la supervivencia de las MNs. Por un lado, se ha mostrado como cambios en la concentración de calcio intracelular por factores neurotróficos y por despolarización modulan a través de la CaM y de la

CaMKIV la supervivencia de estas células. Por otro lado, esta regulación tiene lugar a través de la activación de la vía de la PI-3K/PKB en el modelo de los factores neurotróficos.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

Primera: El tratamiento con GDNF de motoneuronas de embrión de pollo en cultivo resulta en un incremento moderado en la concentración de calcio intracelular procedente de los reservorios intracelulares.

Segunda: CaM es necesaria para la supervivencia de las motoneuronas en cultivo tratadas con GDNF.

Tercera: La activación de la vía PI-3K/PKB mediada por GDNF requiere calcio y CaM en las motoneuronas.

Cuarta: Existe una unión directa entre la subunidad reguladora de la PI-3K y CaM, dependiente de calcio, pero independiente de factor trófico, en cultivo de motoneuronas.

Quinta: La proteína quinasa dependiente de calcio y CaM de *Gallus gallus* clonada en este trabajo es la homóloga a la CaMKIV de rata, ratón y humana.

Sexta: La forma constitutivamente activa de la CaMKIV de *Gallus gallus* (gCaMKIV) protege a las motoneuronas en cultivo de la muerte por ausencia de soporte trófico.

Séptima: La disminución de la expresión endógena de la gCaMKIV por RNA de interferencia, evidencia que es necesaria para la supervivencia de las motoneuronas mediada por BDNF y por despolarización de membrana.

Octava: La sobreexpresión de la forma constitutivamente activa de gCaMKIV en la línea celular de PC12, promueve la fosforilación de PKB a través de PI-3K, en ausencia de soporte trófico.

Conclusiones

Novena: Existe una interacción dependiente de factor neurotrófico y de calcio entre la subunidad reguladora de la PI-3K y la CaMKIV.

*PARTICIPACIÓN EN
CONGRESOS*

7. PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS

Autores: M.Jose. Perez-Garcia, Y. de Pablo, S. Lopez-Moreno, Joan X Comella and Rosa M. Soler

Título: *La CAMKIV regula la supervivencia de las motoneuronas de embrión de pollo en cultivo*

Tipo de participación: Oral

Congreso: V Simposi de Neurobiologia

Lugar de celebración: Barcelona (ESPAÑA) **Año:** 2005

Autores: M.Jose. Perez-Garcia, Y. de Pablo, S. Lopez-Moreno, Joan X Comella and Rosa M. Soler

Título: *Clonaje y caracterización de la CaMKIV Gallus gallus: Regulación e implicación en la supervivencia neuronal*

Tipo de participación: Oral

Congreso: XI Congreso de la Sociedad Española de Neurociencia

Lugar de celebración: Málaga (ESPAÑA) **Año:** 2005

Autores: M.Jose. Perez-Garcia, Y. de Pablo, S. Lopez-Moreno, Joan X Comella and Rosa M. Soler

Título: *Clonaje y caracterización de la CaMKIV Gallus gallus: Regulación e implicación en la supervivencia neuronal*

Tipo de participación: Oral

Congreso: XI Congreso de la Sociedad Española de Neurociencia

Lugar de celebración: Málaga (ESPAÑA) **Año:** 2005

Autores: M.Jose. Perez-Garcia, V. Ceña, Y. de Pablo, M. Llovera, Joan X Comella and Rosa M. Soler

Título: *La activación de la PI-3K mediada por GDNF requiere de calcio intracelular y CaM.*

Tipo de participación: Oral

Congreso: Reunion de Muerte Celular

Lugar de celebración: Sant Feliu de Guixols, Girona (ESPAÑA) **Año:** 2003

Autores: M.Jose. Perez-García, V. Ceña, Y. de Pablo, M. Llovera, Joan X Comella and Rosa M.

Título: *La activación de la PI-3K mediada por GDNF requiere de calcio intracelular y CaM: Implicación en la supervivencia neuronal*

Tipo de participación: Oral

Congreso: X Congreso de la Sociedad Española de Neurociencia

Lugar de celebración: Lleida (ESPAÑA) **Año:** 2003

Autores: M. Jose. Perez-García, V. Ceña, Y. de Pablo, M. Llovera, Joan X Comella and Rosa M.

Título: *Implicació del calci i la CaM en l'activació de la via PI-3K/PKB en motoneurons tractades amb GDNF*

Tipo de participación: Oral

Congreso: IV Simposi de Neurobiologia Experimental

Lugar de celebración: Barcelona (ESPAÑA) **Año:** 2002

Autores: M. Jose. Perez-García, Y. de Pablo, M. Llovera, Joan X Comella and Rosa M. Soler.

Título: *Implicación del calcio y la CaM en la activación de la vía PI3K/PKB en cultivos primarios de motoneuronas estimuladas con GDNF*

Tipo de participación: Oral

Congreso: X Seminari conjunt de biologia molecular i del desenvolupament

Lugar de celebración: Canet de Mar Barcelona (ESPAÑA) **Año:** 2002

Autores: Y. de Pablo, M Jose Perez-Garcia, M Llovera, Joan X Comella, Rosa M Soler

Título: *Implication of CaMKIV α on PI-3K survival promoting pathways*

Tipo de participación: Oral

Congreso: Signalling for death and survival in motoneurons Convention

Lugar de celebración: Carry le Rouet (France) **Año:** 2002

Autores: M Jose Perez-Garcia Y. de Pablo, , M Llovera, Joan X Comella, Rosa M Soler

Título: *Intracellular calcium and calmodulin are required to induce PI-3K activation after GDNF stimulation: role on motoneuron survival*

Tipo de participación: Oral

Congreso: Signalling for death and survival in motoneurons Convention

Lugar de celebración: Carry le Rouet (France) **Año:** 2002

Autores: M Jose Perez-Garcia, J Egea, Joan X Comella and Rosa M Soler.

Título: *Regulación por calcio/CaM de la activación de la PI3K/PKB y de la supervivencia de motoneuronas inducidas por GDNF*

Tipo de participación: Oral

Congreso: XXII Reunión del grupo español de neurotransmision

Lugar de celebración: Vielha (ESPAÑA) **Año:** 2001

Autores: M Jose Perez-Garcia, J Egea, Joan X Comella and Rosa M Soler.

Título: *Regulation of GDNF induced motoneuron survival and PI3K/PKB activation by calcium/calmodulin.*

Tipo de participación: Oral

Congreso: Signalling for death and survival in motoneurons Convention

Lugar de celebración: Marseille (France) **Año:** 2001

Autores: M JosePerez-Garcia, X Dolcet, Joan X Comella and Rosa M Soler.

Título: *La AKT/PKB constitutivamente activa promueve la supervivencia en motoneuronas espinales en cultivo*

Tipo de participación: Poster

Congreso: IX Congreso de la sociedad Española de neurociencia

Lugar de celebración: Santiago de Compostela (ESPAÑA) **Año:** 2001

Autores: Rosa M Soler, M Jose Perez-Garcia, X Dolcet and Joan X Comella

Título: *Cytokines promote motoneuron survival through JAK/STAT pathway*

Tipo de participación: Oral

Congreso: EU Life/Death Signal: 2^{on} meeting Convention

Lugar de celebración: Sitges, Barcelona (ESPAÑA) **Año:** 2001

PUBLICACIONES

8. PUBLICACIONES

M. Jose. Perez-Garcia, V. Ceña, Y. de Pablo, M. Llovera, Joan X. Comella and Rosa M. Soler. 2004. *Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor Increases Intracellular Calcium Concentration. Role of calcium/calmodulin in the activation of the phosphatidylinositol 3-Kinase pathway.*

JBC,2004, Feb;279 (7):6132-6142.

M. Jose. Perez-Garcia, Y. de Pablo, M. Llovera, Joan X. Comella and Rosa M. Soler.2006

CaMKIV regulates chicken motoneurons survival through the activation of protein kinase B.

Submitted to JBC.

Carme Sole, **M. José Pérez-García**, Humberto Gutierrez, Rosa M. Soler, Raffaella Gozzelino, Miguel F. Segura, Xavier Dolcet, Victor J. Yuste, Alun M. Davies and Joan X. Comella.2006. *Role of Fas antagonist Flip in nervous system differentiation.*

Manuscript in preparation

Y. de Pablo, **M. Jose. Perez-Garcia**, N Lindqvist, MV Georgieva, Rosa M. Soler, Joan X. Comella and. M Llovera.2006. *Phosphorylation of TrkA receptor on Tyr 701 is an inhibitory event that completely blocks NGF-induced cell differentiation of PC12 cells.*

Manuscript in preparation.

ANEXO

A. Estudio de las subpoblaciones de MNs mediante la técnica de hibridación in situ en los ratones Knock out para LIFR β .

This work was done in INSERM U.382, Developmental Biology Institute of Marseille, CNRS-INSERM-Univ. Mediterranee, Campus de Luminy, Case 907, Marseille, France.

9. ANEXO

LIM/Homeodomain proteins are classically considered as major transcriptional regulators which, in cooperation with other transcription factors, play critical role in the developing nervous system. Among LIM/HD proteins, Islet 1 is the earliest known marker of motoneurons differentiation and has been extensively studied in this context.

In chick embryo, islet 1 is expressed in motoneurons of the embryonic spinal cord soon after their final mitosis, even before the appearance of other differentiated properties. Islet 1 is a member of a family of homeobox genes found in vertebrates and invertebrates that encode proteins with a homeodomain and cysteine-histidine-rich LIM domains (Way, JC y Chalfie, M 1988). Subsequent studies of LIM/HD proteins in embryonic motoneurons have led to the identification of a combinatorial code of several LIM/HD proteins, including islet 1, Islet 2, Lim 3 and Lim 4, that controls some features of motoneurons identity (Tsuchida, T y col. 1994).

The Medial motor column (MMCm) extends along the entire rostrocaudal length of the spinal cord, although at lumbar levels the number of motoneurons in the MMCm decreases markedly. In MMC, Islet 1, Islet 2 and Lim 3 were expressed uniformly within the MMCm. By contrast, the MMC expressed islet 1 and islet 2 but not Lim 3. Thus, motoneurons in the MMCm and MMC are distinguished by the expression of Lim 3. The lateral media column (LMC) is confined to brachial and lumbar levels of the spinal cord and is subdivided into medial (LMCm) and lateral (LMCl). Islet-1 was expressed in LMCm and Lim 3 was not expressed in the LMC.

The following work we present allowed us to analyze the different pattern of expression of these specific motoneurons markers in wild type and LIFR β *knock out* mouse.

This work was done in collaboration with INSERM U.382, Developmental Biology Institute of Marseille, CNRS-INSERM-Univ. Mediterranee, under supervision of Dr. Odile deLapeyrière.

In situ hibridation with Islet 1 probe

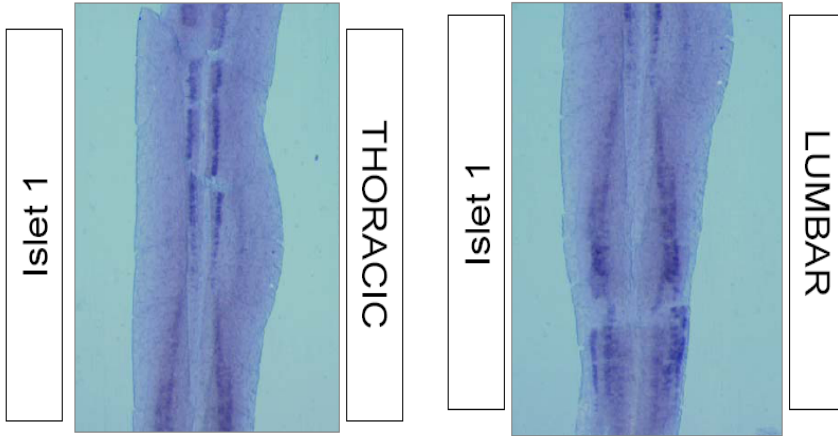


Figure A1: Expression of Islet 1 in thoracic and lumbar part of spinal cord in E14 wild type mouse. *In situ hybridation on E14 dissected spinal cord flat mounted in an open book configuration.*

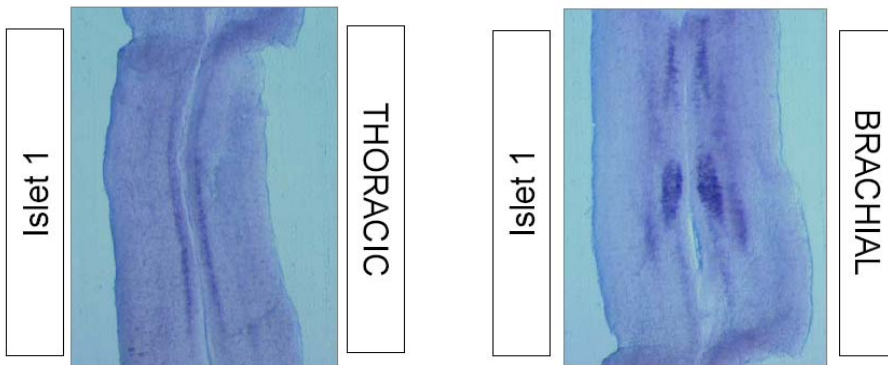


Figure A2: Expression of Islet 1 in thoracic and brachial part of spinal cord in E14 knock out LIFR β mouse. *In situ hybridation on E14 dissected spinal cord flat mounted in an open book configuration.*

Expression of Hox transcription factors members.

Members of Hox-c homeodomain protein cluster are expressed by post mitotic motoneurons generated at distinct rostrocaudal positions, and profiles of Hox-c protein expression characteristic of brachial, thoracic and lumbar motoneurons can be induced in vitro by early exposure of neural cells to increasing levels of fibroblast growth factors (FGF) signalling. Moreover, the pattern of Hox-c protein expression changes along with columnar identity after early transposition of brachial and thoracic neural tube. Hox protein influence motoneurons diversification in the hindbrain, and thus, a role for Hox protein in the assignment of spinal motoneurons columnar identity is plausible. There are some Hox family members, Hoxc5, Hoxc6, Hoxc8 and Hoxc9. Hoxc6 expression by motoneurons was confined to brachial levels, whereas Hoxc9 expression by motoneurons was restricted to thoracic levels. Hoxc6 and Hoxc9 positive motoneurons were interspersed at the border of the brachial and thoracic spinal cord, but few neurons expressed both proteins. Thus, caudal brachial LMC neurons co-express Hoxc6 and Hoxc8. At rostral thoracic levels, many motoneurons initially co-expressed Hoxc8 and Hoxc9.

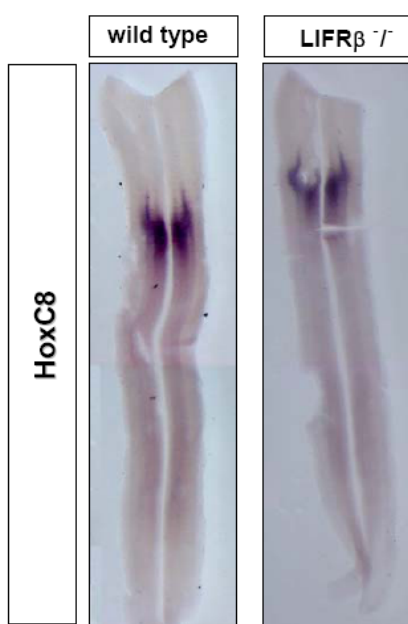


Figure A3: Hoxc8 expression in whole-mount spinal cord. In situ hybridization using Hoxc8 probe. In both cases Hoxc8 were expressed in the brachial part of spinal cord. The expression of Hoxc8 were examined in E13 mouse.

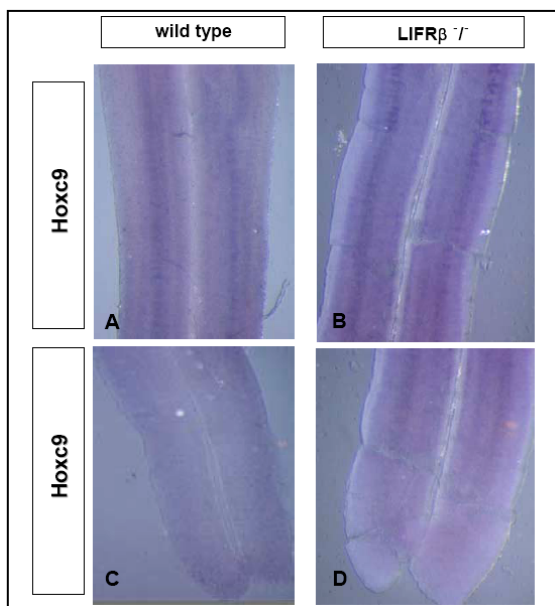


Figure A4: *Hoxc9* expression in whole-mount spinal cord. A and B. *In situ* hybridization at thoracic level. We were used a *Hoxc9* probe in spinal cord of E13 mouse. **C and D.** Expression of *Hoxc9* in sacral part of spinal cord.

Expression of *plexinA4*

Plexins are large transmembrane proteins that are receptors for semaphorins, either alone or in a complex with neuropilin-1 or 2. Nine different mouse plexins have been found: Plexin-A1-4, -B1-3, -C1 and -D1. In the development of nervous system, axons navigate along particular paths toward their final targets after interacting with various cues that are provided by intermediate targets. In the last decade, the identification and characterization of molecules that regulate the directional growth of axons has progressed extensively. Several molecules that can attract or repel axons and their neuronal receptors have been identified.

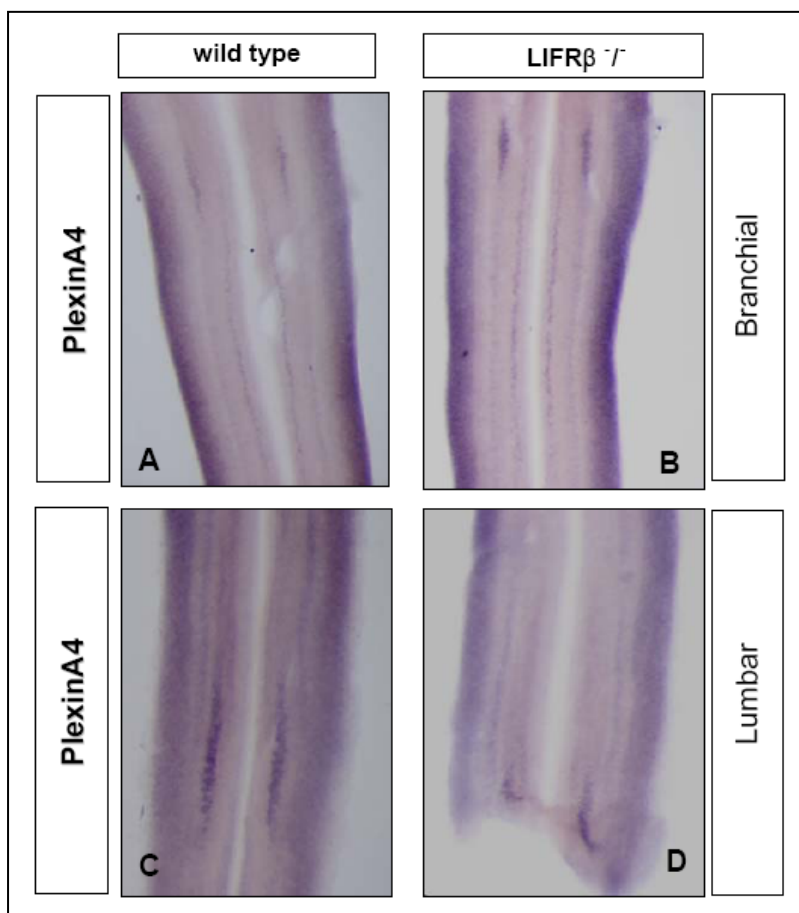


Figure A5: **PlexinA4 expression in whole-mount spinal cord.** We were used a PlexinA4 probe in spinal cord of E13 mouse. A and B correspond to brachial part of spinal cord. C and D correspond to lumbar part.

BIBLIOGRAFÍA

10. BIBLIOGRAFÍA

A

1. Abe, K y Hayashi, T (1997). "Expression of the glial cell line-derived neurotrophic factor gene in rat brain after transient MCA occlusion." **Brain Res** 776(1-2): 230-4.
2. Adler, R ; Landa, KB ; Manthorpe, M y Varon, S (1979). "Cholinergic neurotrophic factors: intraocular distribution of trophic activity for ciliary neurons." **Science** 204(4400): 1434-6.
3. Airaksinen, MS y Saarma, M (2002). "The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value." **Nat Rev Neurosci** 3(5): 383-94.
4. Airaksinen, MS ; Titievsky, A y Saarma, M (1999). "GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant?" **Mol Cell Neurosci** 13(5): 313-25.
5. Alessi, DR ; Andjelkovic, M ; Caudwell, B ; Cron, P ; Morrice, N ; Cohen, P y Hemmings, BA (1996a). "Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1." **Embo J** 15(23): 6541-51.
6. Alessi, DR ; Caudwell, FB ; Andjelkovic, M ; Hemmings, BA y Cohen, P (1996b). "Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase." **FEBS Lett** 399(3): 333-8.
7. Alessi, DR y Cohen, P (1998). "Mechanism of activation and function of protein kinase B." **Curr Opin Genet Dev** 8(1): 55-62.
8. Alessi, DR ; Deak, M ; Casamayor, A ; Caudwell, FB ; Morrice, N ; Norman, DG ; Gaffney, P ; Reese, CB ; MacDougall, CN ; Harbison, D ; Ashworth, A y Bownes, M (1997a). "3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the Drosophila DSTPK61 kinase." **Curr Biol** 7(10): 776-89.
9. Alessi, DR ; James, SR ; Downes, CP ; Holmes, AB ; Gaffney, PR ; Reese, CB y Cohen, P (1997b). "Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha." **Curr Biol** 7(4): 261-9.
10. Anders, J ; Kjar, S y Ibanez, CF (2001). "Molecular modeling of the extracellular domain of the RET receptor tyrosine kinase reveals multiple cadherin-like domains and a calcium-binding site." **J Biol Chem** 276(38): 35808-17.
11. Anderson, KA y Kane, CD (1998). "Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV and calcium signaling." **Biomaterials** 11(4): 331-43.
12. Andjelkovic, M ; Alessi, DR ; Meier, R ; Fernandez, A ; Lamb, NJ ; Frech, M ; Cron, P ; Cohen, P ; Lucocq, JM y Hemmings, BA (1997). "Role of translocation in the activation and function of protein kinase B." **J Biol Chem** 272(50): 31515-24.
13. Arakawa, Y ; Sendtner, M y Thoenen, H (1990). "Survival effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on chick embryonic motoneurons in culture: comparison with other neurotrophic factors and cytokines." **J Neurosci** 10(11): 3507-15.
14. Arenas, E ; Trupp, M ; Akerud, P y Ibanez, CF (1995). "GDNF prevents degeneration and promotes the phenotype of brain noradrenergic neurons in vivo." **Neuron** 15(6): 1465-73.
15. Avantaggiato, V ; Dathan, NA ; Grieco, M ; Fabien, N ; Lazzaro, D ; Fusco, A ; Simeone, A y Santoro, M (1994). "Developmental expression of the RET protooncogene." **Cell Growth Differ** 5(3): 305-11.

B

16. Bae, JS ; Jang, MK ; Hong, S ; An, WG ; Choi, YH ; Kim, HD y Cheong, J (2003). "Phosphorylation of NF-kappa B by calmodulin-dependent kinase IV activates anti-apoptotic gene expression." **Biochem Biophys Res Commun** 305(4): 1094-8.
17. Baker, SJ y Reddy, EP (1998). "Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily." **Oncogene** 17(25): 3261-70.
18. Baldwin, AN ; Bitler, CM ; Welcher, AA y Shooter, EM (1992). "Studies on the structure and binding properties of the cysteine-rich domain of rat low affinity nerve growth factor receptor (p75NGFR)." **J Biol Chem** 267(12): 8352-9.
19. Baloh, RH ; Enomoto, H ; Johnson, EM, Jr. y Milbrandt, J (2000). "The GDNF family ligands and receptors - implications for neural development." **Curr Opin Neurobiol** 10(1): 103-10.
20. Baloh, RH ; Gorodinsky, A ; Golden, JP ; Tansey, MG ; Keck, CL ; Popescu, NC ; Johnson, EM, Jr. y Milbrandt, J (1998a). "GFRalpha3 is an orphan member of the GDNF/neurturin/persephin receptor family." **Proc Natl Acad Sci U S A** 95(10): 5801-6.
21. Baloh, RH ; Tansey, MG ; Lampe, PA ; Fahrner, TJ ; Enomoto, H ; Simburger, KS ; Leitner, ML ; Araki, T ; Johnson, EM, Jr. y Milbrandt, J (1998b). "Artemin, a novel member of the GDNF ligand family, supports peripheral and central neurons and signals through the GFRalpha3-RET receptor complex." **Neuron** 21(6): 1291-302.
22. Barbacid, M (1995). "Neurotrophic factors and their receptors." **Curr Opin Cell Biol** 7(2): 148-55.
23. Barbeito, LH ; Pehar, M ; Cassina, P ; Vargas, MR ; Peluffo, H ; Viera, L ; Estevez, AG y Beckman, JS (2004). "A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis." **Brain Res Brain Res Rev** 47(1-3): 263-74.
24. Barbin, G ; Manthorpe, M y Varon, S (1984). "Purification of the chick eye ciliary neuronotrophic factor." **J Neurochem** 43(5): 1468-78.
25. Barde, YA (1989). "Trophic factors and neuronal survival." **Neuron** 2(6): 1525-34.
26. Barde, YA (1990). "The nerve growth factor family." **Prog Growth Factor Res** 2(4): 237-48.
27. Barker, PA (1998). "p75NTR: A study in contrasts." **Cell Death Differ** 5(5): 346-56.
28. Barker, PA y Shooter, EM (1994). "Disruption of NGF binding to the low affinity neurotrophin receptor p75LNTR reduces NGF binding to TrkA on PC12 cells." **Neuron** 13(1): 203-15.
29. Basu, T ; Warne, PH y Downward, J (1994). "Role of Shc in the activation of Ras in response to epidermal growth factor and nerve growth factor." **Oncogene** 9(12): 3483-91.
30. Bayascas, JR y Alessi, DR (2005). "Regulation of Akt/PKB Ser473 phosphorylation." **Mol Cell** 18(2): 143-5.
31. Beck, KD ; Valverde, J ; Alexi, T ; Poulsen, K ; Moffat, B ; Vandlen, RA ; Rosenthal, A y Hefti, F (1995). "Mesencephalic dopaminergic neurons protected by GDNF from axotomy-induced degeneration in the adult brain." **Nature** 373(6512): 339-41.
32. Becker, E ; Soler, RM ; Yuste, VJ ; Gine, E ; Sanz-Rodriguez, C ; Egea, J ; Martin-Zanca, D y Comella, JX (1998). "Development of survival responsiveness to brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin 3 and neurotrophin 4/5, but not to nerve growth factor, in cultured motoneurons from chick embryo spinal cord." **J Neurosci** 18(19): 7903-11.
33. Bekoff, A (1976). "Ontogeny of leg motor output in the chick embryo: a neural analysis." **Brain Res** 106(2): 271-91.

34. Bellacosa, A ; Chan, TO ; Ahmed, NN ; Datta, K ; Malstrom, S ; Stokoe, D ; McCormick, F ; Feng, J y Tschlis, P (1998). "Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain." **Oncogene** 17(3): 313-25.
35. Bendotti, C y Carri, MT (2004). "Lessons from models of SOD1-linked familial ALS." **Trends Mol Med** 10(8): 393-400.
36. Berninger, B ; Garcia, DE ; Inagaki, N ; Hahnel, C y Lindholm, D (1993). "BDNF and NT-3 induce intracellular Ca²⁺ elevation in hippocampal neurones." **Neuroreport** 4(12): 1303-6.
37. Berridge, MJ (1993). "Inositol trisphosphate and calcium signalling." **Nature** 361(6410): 315-25.
38. Besset, V ; Scott, RP y Ibanez, CF (2000). "Signaling complexes and protein-protein interactions involved in the activation of the Ras and phosphatidylinositol 3-kinase pathways by the c-Ret receptor tyrosine kinase." **J Biol Chem** 275(50): 39159-66.
39. Bhardwaj, A y Aggarwal, BB (2003). "Receptor-mediated choreography of life and death." **J Clin Immunol** 23(5): 317-32.
40. Blotner, D ; Bruggemann, W y Unsicker, K (1989). "Ciliary neurotrophic factor supports target-deprived preganglionic sympathetic spinal cord neurons." **Neurosci Lett** 105(3): 316-20.
41. Boatright, KM ; Renatus, M ; Scott, FL ; Sperandio, S ; Shin, H ; Pedersen, IM ; Ricci, JE ; Edris, WA ; Sutherlin, DP ; Green, DR y Salvesen, GS (2003). "A unified model for apical caspase activation." **Mol Cell** 11(2): 529-41.
42. Bonde, C ; Kristensen, BW ; Blaabjerg, M ; Johansen, TE ; Zimmer, J y Meyer, M (2000). "GDNF and neublastin protect against NMDA-induced excitotoxicity in hippocampal slice cultures." **Neuroreport** 11(18): 4069-73.
43. Bootman, MD ; Berridge, MJ y Lipp, P (1997). "Cooking with calcium: the recipes for composing global signals from elementary events." **Cell** 91(3): 367-73.
44. Borasio, GD ; Markus, A ; Wittinghofer, A ; Barde, YA y Heumann, R (1993). "Involvement of ras p21 in neurotrophin-induced response of sensory, but not sympathetic neurons." **J Cell Biol** 121(3): 665-72.
45. Borodinsky, LN ; Coso, OA y Fiszman, ML (2002). "Contribution of Ca²⁺ calmodulin-dependent protein kinase II and mitogen-activated protein kinase kinase to neural activity-induced neurite outgrowth and survival of cerebellar granule cells." **J Neurochem** 80(6): 1062-70.
46. Borrello, MG ; Mercalli, E ; Perego, C ; Degl'Innocenti, D ; Ghizzoni, S ; Arighi, E ; Eroini, B ; Rizzetti, MG y Pierotti, MA (2002). "Differential interaction of Enigma protein with the two RET isoforms." **Biochem Biophys Res Commun** 296(3): 515-22.
47. Bothwell, M (1995). "Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors." **Annu Rev Neurosci** 18: 223-53.
48. Braun, AP y Schulman, H (1995). "The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function." **Annu Rev Physiol** 57: 417-45.
49. Brostrom, CO ; Huang, YC ; Breckenridge, BM y Wolff, DJ (1975). "Identification of a calcium-binding protein as a calcium-dependent regulator of brain adenylate cyclase." **Proc Natl Acad Sci U S A** 72(1): 64-8.
50. Bruijn, LI ; Miller, TM y Cleveland, DW (2004). "Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS." **Annu Rev Neurosci** 27: 723-49.
51. Brunet, A ; Bonni, A ; Zigmond, MJ ; Lin, MZ ; Juo, P ; Hu, LS ; Anderson, MJ ; Arden, KC ; Blenis, J y Greenberg, ME (1999). "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor." **Cell** 96(6): 857-68.

52. Burek, MJ y Oppenheim, RW (1996). "Programmed cell death in the developing nervous system." **Brain Pathol** 6(4): 427-46.
53. Burgering, BM y Coffey, PJ (1995). "Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction." **Nature** 376(6541): 599-602.
- C**
54. Cardone, MH ; Roy, N ; Stennicke, HR ; Salvesen, GS ; Franke, TF ; Stanbridge, E ; Frisch, S y Reed, JC (1998). "Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation." **Science** 282(5392): 1318-21.
55. Carter, MT ; Yome, JL ; Marcil, MN ; Martin, CA ; Vanhorne, JB y Mulligan, LM (2001). "Conservation of RET proto-oncogene splicing variants and implications for RET isoform function." **Cytogenet Cell Genet** 95(3-4): 169-76.
56. Casey, PJ (1995). "Protein lipidation in cell signaling." **Science** 268(5208): 221-5.
57. Cayuso, J y Marti, E (2005). "Morphogens in motion: growth control of the neural tube." **J Neurobiol** 64(4): 376-87.
58. Cohen, GB ; Ren, R y Baltimore, D (1995). "Modular binding domains in signal transduction proteins." **Cell** 80(2): 237-48.
59. Collins, F y Lile, JD (1989). "The role of dihydropyridine-sensitive voltage-gated calcium channels in potassium-mediated neuronal survival." **Brain Res** 502(1): 99-108.
60. Comella, JX ; Sanz-Rodriguez, C ; Aldea, M y Esquerda, JE (1994). "Skeletal muscle-derived trophic factors prevent motoneurons from entering an active cell death program in vitro." **J Neurosci** 14(5 Pt 1): 2674-86.
61. Comi, GP ; Bordoni, A ; Salani, S ; Franceschina, L ; Sciacco, M ; Prella, A ; Fortunato, F ; Zeviani, M ; Napoli, L ; Bresolin, N ; Moggio, M ; Ausenda, CD ; Taanman, JW y Scarlato, G (1998). "Cytochrome c oxidase subunit I microdeletion in a patient with motor neuron disease." **Ann Neurol** 43(1): 110-6.
62. Corcoran, EE ; Joseph, JD ; MacDonald, JA ; Kane, CD ; Haystead, TA y Means, AR (2003). "Proteomic analysis of calcium/calmodulin-dependent protein kinase I and IV in vitro substrates reveals distinct catalytic preferences." **J Biol Chem** 278(12): 10516-22.
63. Cordon-Cardo, C ; Tapley, P ; Jing, SQ ; Nanduri, V ; O'Rourke, E ; Lamballe, F ; Kovary, K ; Klein, R ; Jones, KR ; Reichardt, LF y et al. (1991). "The trk tyrosine protein kinase mediates the mitogenic properties of nerve growth factor and neurotrophin-3." **Cell** 66(1): 173-83.
64. Culpier, M ; Anders, J y Ibanez, CF (2002). "Coordinated activation of autophosphorylation sites in the RET receptor tyrosine kinase: importance of tyrosine 1062 for GDNF mediated neuronal differentiation and survival." **J Biol Chem** 277(3): 1991-9.
65. Cowan, WM ; Fawcett, JW ; O'Leary, DD y Stanfield, BB (1984). "Regressive events in neurogenesis." **Science** 225(4668): 1258-65.
66. Crews, CM ; Alessandrini, A y Erikson, RL (1992). "Erks: their fifteen minutes has arrived." **Cell Growth Differ** 3(2): 135-42.
67. Crivici, A y Ikura, M (1995). "Molecular and structural basis of target recognition by calmodulin." **Annu Rev Biophys Biomol Struct** 24: 85-116.
68. Cross, DA ; Alessi, DR ; Cohen, P ; Andjelkovich, M y Hemmings, BA (1995). "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B." **Nature** 378(6559): 785-9.
69. Crowder, RJ y Freeman, RS (1998). "Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt protein kinase are necessary and sufficient for the survival of nerve growth factor-dependent sympathetic neurons." **J Neurosci** 18(8): 2933-43.

70. Cryns, V y Yuan, J (1998). "Proteases to die for." **Genes Dev** 12(11): 1551-70.
71. Chao, MV (2003). "Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways." **Nat Rev Neurosci** 4(4): 299-309.
72. Chao, MV y Bothwell, M (2002). "Neurotrophins: to cleave or not to cleave." **Neuron** 33(1): 9-12.
73. Chao, MV ; Bothwell, MA ; Ross, AH ; Koprowski, H ; Lanahan, AA ; Buck, CR y Sehgal, A (1986). "Gene transfer and molecular cloning of the human NGF receptor." **Science** 232(4749): 518-21.
74. Chao, MV y Hempstead, BL (1995). "p75 and Trk: a two-receptor system." **Trends Neurosci** 18(7): 321-6.
75. Cheney, RE y Mooseker, MS (1992). "Unconventional myosins." **Curr Opin Cell Biol** 4(1): 27-35.
76. Cheung, WY ; Bradham, LS ; Lynch, TJ ; Lin, YM y Tallant, EA (1975). "Protein activator of cyclic 3':5'-nucleotide phosphodiesterase of bovine or rat brain also activates its adenylate cyclase." **Biochem Biophys Res Commun** 66(3): 1055-62.
77. Choi, C y Benveniste, EN (2004). "Fas ligand/Fas system in the brain: regulator of immune and apoptotic responses." **Brain Res Brain Res Rev** 44(1): 65-81.
78. Chow, FA ; Anderson, KA ; Noeldner, PK y Means, AR (2005). "The autonomous activity of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV is required for its role in transcription." **J Biol Chem** 280(21): 20530-8.
79. Chu-Wang, IW y Oppenheim, RW (1978). "Cell death of motoneurons in the chick embryo spinal cord. I. A light and electron microscopic study of naturally occurring and induced cell loss during development." **J Comp Neurol** 177(1): 33-57.
80. Chung, J ; Uchida, E ; Grammer, TC y Blenis, J (1997). "STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation." **Mol Cell Biol** 17(11): 6508-16.
-
- ## D
-
81. Danial, NN y Korsmeyer, SJ (2004). "Cell death: critical control points." **Cell** 116(2): 205-19.
82. Davies, AM (1998). "Neuronal survival: early dependence on Schwann cells." **Curr Biol** 8(1): R15-8.
83. Davis, RJ (1994). "MAPKs: new JNK expands the group." **Trends Biochem Sci** 19(11): 470-3.
84. De Bernardi, MA ; Rabins, SJ ; Colangelo, AM ; Brooker, G y Mocchetti, I (1996). "TrkA mediates the nerve growth factor-induced intracellular calcium accumulation." **J Biol Chem** 271(11): 6092-8.
85. Degl'Innocenti, D ; Arighi, E ; Popsueva, A ; Sangregorio, R ; Alberti, L ; Rizzetti, MG ; Ferrario, C ; Sariola, H ; Pierotti, MA y Borrello, MG (2004). "Differential requirement of Tyr1062 multidocking site by RET isoforms to promote neural cell scattering and epithelial cell branching." **Oncogene** 23(44): 7297-309.
86. Dhanasekaran, N y Prasad, MV (1998). "G protein subunits and cell proliferation." **Biol Signals Recept** 7(2): 109-17.
87. Dohrmann, U ; Edgar, D ; Sendtner, M y Thoenen, H (1986). "Muscle-derived factors that support survival and promote fiber outgrowth from embryonic chick spinal motor neurons in culture." **Dev Biol** 118(1): 209-21.
88. Dolcet, X ; Egea, J ; Soler, RM ; Martin-Zanca, D y Comella, JX (1999). "Activation of phosphatidylinositol 3-kinase, but not extracellular-regulated kinases, is necessary to mediate brain-derived neurotrophic factor-

induced motoneuron survival." **J Neurochem** 73(2): 521-31.

89. Dolcet, X ; Soler, RM ; Gould, TW ; Egea, J ; Oppenheim, RW y Comella, JX (2001). "Cytokines promote motoneuron survival through the Janus kinase-dependent activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway." **Mol Cell Neurosci** 18(6): 619-31.

90. Downward, J (1998). "Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt." **Curr Opin Cell Biol** 10(2): 262-7.

91. Downward, J ; Graves, JD ; Warne, PH ; Rayter, S y Cantrell, DA (1990). "Stimulation of p21ras upon T-cell activation." **Nature** 346(6286): 719-23.

92. Draetta, G y Klee, CB (1988). "Purification of calmodulin-stimulated phosphodiesterase by affinity chromatography on calmodulin fragment 1-77 linked to sepharose." **Methods Enzymol** 159: 573-81.

93. Dudek, H ; Datta, SR ; Franke, TF ; Birnbaum, MJ ; Yao, R ; Cooper, GM ; Segal, RA ; Kaplan, DR y Greenberg, ME (1997). "Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt." **Science** 275(5300): 661-5.

E

94. Ebens, A ; Brose, K ; Leonardo, ED ; Hanson, MG, Jr. ; Bladt, F ; Birchmeier, C ; Barres, BA y Tessier-Lavigne, M (1996). "Hepatocyte growth factor/scatter factor is an axonal chemoattractant and a neurotrophic factor for spinal motor neurons." **Neuron** 17(6): 1157-72.

95. Edwards, SN y Tolkovsky, AM (1994). "Characterization of apoptosis in cultured rat sympathetic neurons after nerve growth factor withdrawal." **J Cell Biol** 124(4): 537-46.

96. Egea, J ; Espinet, C ; Soler, RM ; Dolcet, X ; Yuste, VJ ; Encinas, M ; Iglesias, M ; Rocamora, N y Comella, JX (2001). "Neuronal survival induced by neurotrophins

requires calmodulin." **J Cell Biol** 154(3): 585-97.

97. Egea, J ; Espinet, C ; Soler, RM ; Peiro, S ; Rocamora, N y Comella, JX (2000). "Nerve growth factor activation of the extracellular signal-regulated kinase pathway is modulated by Ca(2+) and calmodulin." **Mol Cell Biol** 20(6): 1931-46.

98. Eigenbrot, C y Gerber, N (1997). "X-ray structure of glial cell-derived neurotrophic factor at 1.9 Å resolution and implications for receptor binding." **Nat Struct Biol** 4(6): 435-8.

99. Elson, GC ; Lelievre, E ; Guillet, C ; Chevalier, S ; Plun-Favreau, H ; Froger, J ; Suard, I ; de Coignac, AB ; Delneste, Y ; Bonnefoy, JY ; Gauchat, JF y Gascan, H (2000). "CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex." **Nat Neurosci** 3(9): 867-72.

100. Endo, TA ; Masuhara, M ; Yokouchi, M ; Suzuki, R ; Sakamoto, H ; Mitsui, K ; Matsumoto, A ; Tanimura, S ; Ohtsubo, M ; Misawa, H ; Miyazaki, T ; Leonor, N ; Taniguchi, T ; Fujita, T ; Kanakura, Y ; Komiya, S y Yoshimura, A (1997). "A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases." **Nature** 387(6636): 921-4.

101. Eng, C ; Mulligan, LM ; Healey, CS ; Houghton, C ; Frilling, A ; Raue, F ; Thomas, GA y Ponder, BA (1996). "Heterogeneous mutation of the RET proto-oncogene in subpopulations of medullary thyroid carcinoma." **Cancer Res** 56(9): 2167-70.

102. Enslen, H ; Tokumitsu, H ; Stork, PJ ; Davis, RJ y Soderling, TR (1996). "Regulation of mitogen-activated protein kinases by a calcium/calmodulin-dependent protein kinase cascade." **Proc Natl Acad Sci U S A** 93(20): 10803-8.

103. Ernfors, P ; Lee, KF y Jaenisch, R (1994). "Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits." **Nature** 368(6467): 147-50.

104. Ernsberger, U ; Sendtner, M y Rohrer, H (1989). "Proliferation and differentiation of embryonic chick sympathetic neurons: effects of ciliary neurotrophic factor." **Neuron** 2(3): 1275-84.

F

105. Farinas, I ; Wilkinson, GA ; Backus, C ; Reichardt, LF y Patapoutian, A (1998). "Characterization of neurotrophin and Trk receptor functions in developing sensory ganglia: direct NT-3 activation of TrkB neurons in vivo." **Neuron** 21(2): 325-34.

106. Finkbeiner, S y Greenberg, ME (1996). "Ca(2+)-dependent routes to Ras: mechanisms for neuronal survival, differentiation, and plasticity?" **Neuron** 16(2): 233-6.

107. Fischer, R ; Julsgart, J y Berchtold, MW (1998). "High affinity calmodulin target sequence in the signalling molecule PI 3-kinase." **FEBS Lett** 425(1): 175-7.

108. Franklin, JL y Johnson, EM, Jr. (1992). "Suppression of programmed neuronal death by sustained elevation of cytoplasmic calcium." **Trends Neurosci** 15(12): 501-8.

109. Franklin, JL ; Sanz-Rodriguez, C ; Juhasz, A ; Deckwerth, TL y Johnson, EM, Jr. (1995). "Chronic depolarization prevents programmed death of sympathetic neurons in vitro but does not support growth: requirement for Ca2+ influx but not Trk activation." **J Neurosci** 15(1 Pt 2): 643-64.

110. Friedman, B ; Kleinfeld, D ; Ip, NY ; Verge, VM ; Moulton, R ; Boland, P ; Zlotchenko, E ; Lindsay, RM y Liu, L (1995). "BDNF and NT-4/5 exert neurotrophic influences on injured adult spinal motor neurons." **J Neurosci** 15(2): 1044-56.

111. Fujisawa, H (2001). "Regulation of the activities of multifunctional Ca2+/calmodulin-dependent protein kinases." **J Biochem (Tokyo)** 129(2): 193-9.

G

112. Gallo, V ; Kingsbury, A ; Balazs, R y Jorgensen, OS (1987). "The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture." **J Neurosci** 7(7): 2203-13.

113. Gao, T ; Furnari, F y Newton, AC (2005). "PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth." **Mol Cell** 18(1): 13-24.

114. Garnier, J ; Gibrat, JF y Robson, B (1996). "GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence." **Methods Enzymol** 266: 540-53.

115. Giordano, V ; De Falco, G ; Chiari, R ; Quinto, I ; Pelicci, PG ; Bartholomew, L ; Delmastro, P ; Gadina, M y Scala, G (1997). "Shc mediates IL-6 signaling by interacting with gp130 and Jak2 kinase." **J Immunol** 158(9): 4097-103.

116. Gorin, PD y Johnson, EM (1979). "Experimental autoimmune model of nerve growth factor deprivation: effects on developing peripheral sympathetic and sensory neurons." **Proc Natl Acad Sci U S A** 76(10): 5382-6.

117. Gotz, R ; Koster, R ; Winkler, C ; Raulf, F ; Lottspeich, F ; Scharl, M y Thoenen, H (1994). "Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family." **Nature** 372(6503): 266-9.

118. Greenberg, DA ; Carpenter, CL y Messing, RO (1987). "Interaction of calmodulin inhibitors and protein kinase C inhibitors with voltage-dependent calcium channels." **Brain Res** 404(1-2): 401-4.

119. Griffith, LC y Schulman, H (1988). "The multifunctional Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase mediates Ca2+-dependent phosphorylation of tyrosine hydroxylase." **J Biol Chem** 263(19): 9542-9.

120. Grob, PM ; Ross, AH ; Koprowski, H y Bothwell, M (1985). "Characterization of the

human melanoma nerve growth factor receptor." **J Biol Chem** 260(13): 8044-9.

121. Grondin, R y Gash, DM (1998). "Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF): a drug candidate for the treatment of Parkinson's disease." **J Neurol** 245(11 Suppl 3): P35-42.

H

122. Hallberg, B ; Ashcroft, M ; Loeb, DM ; Kaplan, DR y Downward, J (1998). "Nerve growth factor induced stimulation of Ras requires Trk interaction with Shc but does not involve phosphoinositide 3-OH kinase." **Oncogene** 17(6): 691-7.

123. Hamburger, V (1980). "Trophic interactions in neurogenesis: a personal historical account." **Annu Rev Neurosci** 3: 269-78.

124. Hansen, MR ; Bok, J ; Devaiah, AK ; Zha, XM y Green, SH (2003). "Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases II and IV both promote survival but differ in their effects on axon growth in spiral ganglion neurons." **J Neurosci Res** 72(2): 169-84.

125. Hara, K ; Maruki, Y ; Long, X ; Yoshino, K ; Oshiro, N ; Hidayat, S ; Tokunaga, C ; Avruch, J y Yonezawa, K (2002). "Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action." **Cell** 110(2): 177-89.

126. Hayashi, H ; Ichihara, M ; Iwashita, T ; Murakami, H ; Shimono, Y ; Kawai, K ; Kurokawa, K ; Murakumo, Y ; Imai, T ; Funahashi, H ; Nakao, A y Takahashi, M (2000). "Characterization of intracellular signals via tyrosine 1062 in RET activated by glial cell line-derived neurotrophic factor." **Oncogene** 19(39): 4469-75.

127. He, XL y Garcia, KC (2004). "Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75." **Science** 304(5672): 870-5.

128. Heinrich, PC ; Behrmann, I ; Muller-Newen, G ; Schaper, F y Graeve, L (1998). "Interleukin-6-type cytokine signalling

through the gp130/Jak/STAT pathway." **Biochem J** 334 (Pt 2): 297-314.

129. Henderson, CE ; Camu, W ; Mettling, C ; Gouin, A ; Poulsen, K ; Karihaloo, M ; Rullamas, J ; Evans, T ; McMahon, SB ; Armanini, MP y et al. (1993). "Neurotrophins promote motor neuron survival and are present in embryonic limb bud." **Nature** 363(6426): 266-70.

130. Henderson, CE ; Phillips, HS ; Pollock, RA ; Davies, AM ; Lemeulle, C ; Armanini, M ; Simmons, L ; Moffet, B ; Vandlen, RA ; Simpson, LC y et al. (1994). "GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle." **Science** 266(5187): 1062-4.

131. Hendry, L y John, S (2004). "Regulation of STAT signalling by proteolytic processing." **Eur J Biochem** 271(23-24): 4613-20.

132. Hengartner, MO ; Ellis, RE y Horvitz, HR (1992). "Caenorhabditis elegans gene ced-9 protects cells from programmed cell death." **Nature** 356(6369): 494-9.

133. Hidaka, H ; Sasaki, Y ; Tanaka, T ; Endo, T ; Ohno, S ; Fujii, Y y Nagata, T (1981). "N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide, a calmodulin antagonist, inhibits cell proliferation." **Proc Natl Acad Sci U S A** 78(7): 4354-7.

134. Hidaka, H y Tanaka, T (1983). "Naphthalenesulfonamides as calmodulin antagonists." **Methods Enzymol** 102: 185-94.

135. Hirata, M y Hall, BK (2000). "Temporospatial patterns of apoptosis in chick embryos during the morphogenetic period of development." **Int J Dev Biol** 44(7): 757-68.

136. Ho, N ; Liauw, JA ; Blaeser, F ; Wei, F ; Hanissian, S ; Muglia, LM ; Wozniak, DF ; Nardi, A ; Arvin, KL ; Holtzman, DM ; Linden, DJ ; Zhuo, M ; Muglia, LJ y Chatila, TA (2000). "Impaired synaptic plasticity and cAMP response element-binding protein activation in Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase type IV/Gr-deficient mice." **J Neurosci** 20(17): 6459-72.

137. Hoeflich, KP y Ikura, M (2002). "Calmodulin in action: diversity in target recognition and activation mechanisms." **Cell** 108(6): 739-42.
138. Holgado-Madruga, M ; Emlet, DR ; Moscatello, DK ; Godwin, AK y Wong, AJ (1996). "A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signalling." **Nature** 379(6565): 560-4.
139. Holgado-Madruga, M ; Moscatello, DK ; Emlet, DR ; Dieterich, R y Wong, AJ (1997). "Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor." **Proc Natl Acad Sci U S A** 94(23): 12419-24.
140. Holtmann, B ; Wiese, S ; Samsam, M ; Grohmann, K ; Pennica, D ; Martini, R y Sendtner, M (2005). "Triple knock-out of CNTF, LIF, and CT-1 defines cooperative and distinct roles of these neurotrophic factors for motoneuron maintenance and function." **J Neurosci** 25(7): 1778-87.
141. Hollyday, M y Hamburger, V (1977). "An autoradiographic study of the formation of the lateral motor column in the chick embryo." **Brain Res** 132(2): 197-208.
142. Hook, SS y Means, AR (2001). "Ca(2+)/CaM-dependent kinases: from activation to function." **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 41: 471-505.
143. Hu, P ; Margolis, B ; Skolnik, EY ; Lammers, R ; Ullrich, A y Schlessinger, J (1992). "Interaction of phosphatidylinositol 3-kinase-associated p85 with epidermal growth factor and platelet-derived growth factor receptors." **Mol Cell Biol** 12(3): 981-90.
144. Huang, EJ y Reichardt, LF (2001). "Neurotrophins: roles in neuronal development and function." **Annu Rev Neurosci** 24: 677-736.
145. Hudmon, A y Schulman, H (2002a). "Neuronal CA2+/calmodulin-dependent protein kinase II: the role of structure and autoregulation in cellular function." **Annu Rev Biochem** 71: 473-510.
146. Hudmon, A y Schulman, H (2002b). "Structure-function of the multifunctional Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II." **Biochem J** 364(Pt 3): 593-611.
147. Hughes, RA ; Sendtner, M y Thoenen, H (1993). "Members of several gene families influence survival of rat motoneurons in vitro and in vivo." **J Neurosci Res** 36(6): 663-71.
-
148. Ibanez, CF (1998). "Emerging themes in structural biology of neurotrophic factors." **Trends Neurosci** 21(10): 438-44.
149. Ikeda, I ; Ishizaka, Y ; Tahira, T ; Suzuki, T ; Onda, M ; Sugimura, T y Nagao, M (1990). "Specific expression of the ret proto-oncogene in human neuroblastoma cell lines." **Oncogene** 5(9): 1291-6.
150. Ikeda, T ; Xia, XY ; Xia, YX ; Ikenoue, T ; Han, B y Choi, BH (2000). "Glial cell line-derived neurotrophic factor protects against ischemia/hypoxia-induced brain injury in neonatal rat." **Acta Neuropathol (Berl)** 100(2): 161-7.
151. Inglese, J ; Koch, WJ ; Touhara, K y Lefkowitz, RJ (1995). "G beta gamma interactions with PH domains and Ras-MAPK signaling pathways." **Trends Biochem Sci** 20(4): 151-6.
152. Ip, NY y Yancopoulos, GD (1994). "Neurotrophic factors and their receptors." **Ann Neurol** 35 Suppl: S13-6.
153. Ip, YT y Davis, RJ (1998). "Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development." **Curr Opin Cell Biol** 10(2): 205-19.
154. Ishida, A ; Shigeri, Y ; Taniguchi, T y Kameshita, I (2003). "Protein phosphatases that regulate multifunctional Ca2+/calmodulin-dependent protein kinases: from biochemistry to pharmacology." **Pharmacol Ther** 100(3): 291-305.

155. Ishizaka, Y ; Itoh, F ; Tahira, T ; Ikeda, I ; Sugimura, T ; Tucker, J ; Fertitta, A ; Carrano, AV y Nagao, M (1989). "Human ret proto-oncogene mapped to chromosome 10q11.2." **Oncogene** 4(12): 1519-21.

156. Iwamoto, T ; Taniguchi, M ; Asai, N ; Ohkusu, K ; Nakashima, I y Takahashi, M (1993). "cDNA cloning of mouse ret proto-oncogene and its sequence similarity to the cadherin superfamily." **Oncogene** 8(4): 1087-91.

J

157. Jacobson, MD ; Weil, M y Raff, MC (1997). "Programmed cell death in animal development." **Cell** 88(3): 347-54.

158. Jaiswal, RK ; Moodie, SA ; Wolfman, A y Landreth, GE (1994). "The mitogen-activated protein kinase cascade is activated by B-Raf in response to nerve growth factor through interaction with p21ras." **Mol Cell Biol** 14(10): 6944-53.

159. Jessell, TM (2000). "Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes." **Nat Rev Genet** 1(1): 20-9.

160. Jijiwa, M ; Fukuda, T ; Kawai, K ; Nakamura, A ; Kurokawa, K ; Murakumo, Y ; Ichihara, M y Takahashi, M (2004). "A targeting mutation of tyrosine 1062 in Ret causes a marked decrease of enteric neurons and renal hypoplasia." **Mol Cell Biol** 24(18): 8026-36.

161. Jing, S ; Tapley, P y Barbacid, M (1992). "Nerve growth factor mediates signal transduction through trk homodimer receptors." **Neuron** 9(6): 1067-79.

162. Jing, S ; Wen, D ; Yu, Y ; Holst, PL ; Luo, Y ; Fang, M ; Tamir, R ; Antonio, L ; Hu, Z ; Cupples, R ; Louis, JC ; Hu, S ; Altrock, BW y Fox, GM (1996). "GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF." **Cell** 85(7): 1113-24.

163. Johnson, D ; Lanahan, A ; Buck, CR ; Sehgal, A ; Morgan, C ; Mercer, E ; Bothwell, M y Chao, M (1986). "Expression and structure of the human NGF receptor." **Cell** 47(4): 545-54.

164. Johnson, EM, Jr. (1978). "Destruction of the sympathetic nervous system in neonatal rats and hamsters by vinblastine: prevention by concomitant administration of nerve growth factor." **Brain Res** 141(1): 105-18.

165. Johnson, EM, Jr. ; Gorin, PD ; Brandeis, LD y Pearson, J (1980). "Dorsal root ganglion neurons are destroyed by exposure in utero to maternal antibody to nerve growth factor." **Science** 210(4472): 916-8.

166. Johnson, K ; Liu, L ; Majdzadeh, N ; Chavez, C ; Chin, PC ; Morrison, B ; Wang, L ; Park, J ; Chugh, P ; Chen, HM y D'Mello, SR (2005). "Inhibition of neuronal apoptosis by the cyclin-dependent kinase inhibitor GW8510: identification of 3' substituted indolones as a scaffold for the development of neuroprotective drugs." **J Neurochem** 93(3): 538-48.

167. Joza, N ; Kroemer, G y Penninger, JM (2002). "Genetic analysis of the mammalian cell death machinery." **Trends Genet** 18(3): 142-9.

K

168. Kakiuchi, S y Yamazaki, R (1970). "Calcium dependent phosphodiesterase activity and its activating factor (PAF) from brain studies on cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase (3)." **Biochem Biophys Res Commun** 41(5): 1104-10.

169. Kang, H ; Sun, LD ; Atkins, CM ; Soderling, TR ; Wilson, MA y Tonegawa, S (2001). "An important role of neural activity-dependent CaMKIV signaling in the consolidation of long-term memory." **Cell** 106(6): 771-83.

170. Kao, JP ; Harootunian, AT y Tsien, RY (1989). "Photochemically generated cytosolic calcium pulses and their detection by fluo-3." **J Biol Chem** 264(14): 8179-84.

171. Kaplan, DR y Miller, FD (2000). "Neurotrophin signal transduction in the nervous system." **Curr Opin Neurobiol** 10(3): 381-91.
172. Kasahara, J ; Fukunaga, K y Miyamoto, E (1999). "Differential effects of a calcineurin inhibitor on glutamate-induced phosphorylation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases in cultured rat hippocampal neurons." **J Biol Chem** 274(13): 9061-7.
173. Katz, ME y McCormick, F (1997). "Signal transduction from multiple Ras effectors." **Curr Opin Genet Dev** 7(1): 75-9.
174. Kauffmann-Zeh, A ; Rodriguez-Viciana, P ; Ulrich, E ; Gilbert, C ; Coffey, P ; Downward, J y Evan, G (1997). "Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB." **Nature** 385(6616): 544-8.
175. Kazlauskas, A y Cooper, JA (1990). "Phosphorylation of the PDGF receptor beta subunit creates a tight binding site for phosphatidylinositol 3 kinase." **Embo J** 9(10): 3279-86.
176. Kennedy, MB y Greengard, P (1981). "Two calcium/calmodulin-dependent protein kinases, which are highly concentrated in brain, phosphorylate protein I at distinct sites." **Proc Natl Acad Sci U S A** 78(2): 1293-7.
177. Kerr, JF ; Wyllie, AH y Currie, AR (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." **Br J Cancer** 26(4): 239-57.
178. Kilic, U ; Kilic, E ; Dietz, GP y Bahr, M (2003). "Intravenous TAT-GDNF is protective after focal cerebral ischemia in mice." **Stroke** 34(5): 1304-10.
179. Kim, DH ; Sarbassov, DD ; Ali, SM ; King, JE ; Latek, RR ; Erdjument-Bromage, H ; Tempst, P y Sabatini, DM (2002). "mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery." **Cell** 110(2): 163-75.
180. Klein, R ; Conway, D ; Parada, LF y Barbacid, M (1990). "The trkB tyrosine protein kinase gene codes for a second neurogenic receptor that lacks the catalytic kinase domain." **Cell** 61(4): 647-56.
181. Klein, R ; Nanduri, V ; Jing, SA ; Lamballe, F ; Tapley, P ; Bryant, S ; Cordon-Cardo, C ; Jones, KR ; Reichardt, LF y Barbacid, M (1991). "The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3." **Cell** 66(2): 395-403.
182. Klein, R ; Silos-Santiago, I ; Smeyne, RJ ; Lira, SA ; Brambilla, R ; Bryant, S ; Zhang, L ; Snider, WD y Barbacid, M (1994). "Disruption of the neurotrophin-3 receptor gene trkC eliminates Ia muscle afferents and results in abnormal movements." **Nature** 368(6468): 249-51.
183. Klesse, LJ y Parada, LF (1998). "p21 ras and phosphatidylinositol-3 kinase are required for survival of wild-type and NF1 mutant sensory neurons." **J Neurosci** 18(24): 10420-8.
184. Kotzbauer, PT ; Lampe, PA ; Heuckeroth, RO ; Golden, JP ; Creedon, DJ ; Johnson, EM, Jr. y Milbrandt, J (1996). "Neurturin, a relative of glial-cell-line-derived neurotrophic factor." **Nature** 384(6608): 467-70.
185. Kovac, AD ; Grammig, J ; Mahlo, J ; Steiner, B ; Roth, K ; Nitsch, R y Bechmann, I (2002). "Comparison of neuronal density and subfield sizes in the hippocampus of CD95L-deficient (gld), CD95-deficient (lpr) and nondeficient mice." **Eur J Neurosci** 16(1): 159-63.
186. Kubota, H ; Avarbock, MR y Brinster, RL (2004). "Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells." **Proc Natl Acad Sci U S A** 101(47): 16489-94.
187. Kumar, CC (1998). "Signaling by integrin receptors." **Oncogene** 17(11 Reviews): 1365-73.

L

188. LaFerla, FM (2002). "Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease." **Nat Rev Neurosci** 3(11): 862-72.
189. Laing, NG (1982). "Timing of motoneuron death in the brachial and lumbar regions of the chick embryo." **Brain Res** 281(2): 181-6.
190. Lance-Jones, C (1982). "Motoneuron cell death in the developing lumbar spinal cord of the mouse." **Brain Res** 256(4): 473-9.
191. Landmesser, L y Morris, DG (1975). "The development of functional innervation in the hind limb of the chick embryo." **J Physiol** 249(2): 301-26.
192. Lavrik, I ; Golks, A y Krammer, PH (2005). "Death receptor signaling." **J Cell Sci** 118(Pt 2): 265-7.
193. Lee, R ; Kermani, P ; Teng, KK y Hempstead, BL (2001). "Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins." **Science** 294(5548): 1945-8.
194. Lemmon, MA y Ferguson, KM (2000). "Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains." **Biochem J** 350 Pt 1: 1-18.
195. Lessmann, V ; Gottmann, K y Malcangio, M (2003). "Neurotrophin secretion: current facts and future prospects." **Prog Neurobiol** 69(5): 341-74.
196. Leung, DW ; Parent, AS ; Cachianes, G ; Esch, F ; Coulombe, JN ; Nikolics, K ; Eckenstein, FP y Nishi, R (1992). "Cloning, expression during development, and evidence for release of a trophic factor for ciliary ganglion neurons." **Neuron** 8(6): 1045-53.
197. Levi-Montalcini, R (1987). "The nerve growth factor 35 years later." **Science** 237(4819): 1154-62.
198. Levi-Montalcini, R ; Skaper, SD ; Dal Toso, R ; Petrelli, L y Leon, A (1996). "Nerve growth factor: from neurotrophin to neurokine." **Trends Neurosci** 19(11): 514-20.
199. Lewin, GR y Barde, YA (1996). "Physiology of the neurotrophins." **Annu Rev Neurosci** 19: 289-317.
200. Li, MO ; Sarkisian, MR ; Mehal, WZ ; Rakic, P y Flavell, RA (2003). "Phosphatidylserine receptor is required for clearance of apoptotic cells." **Science** 302(5650): 1560-3.
201. Lin, LF ; Doherty, DH ; Lile, JD ; Bektesh, S y Collins, F (1993). "GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons." **Science** 260(5111): 1130-2.
202. Lin, LF ; Mismer, D ; Lile, JD ; Armes, LG ; Butler, ET, 3rd ; Vannice, JL y Collins, F (1989). "Purification, cloning, and expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF)." **Science** 246(4933): 1023-5.
203. Lindvall, O ; Ernfors, P ; Bengzon, J ; Kokaia, Z ; Smith, ML ; Siesjö, BK y Persson, H (1992). "Differential regulation of mRNAs for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin 3 in the adult rat brain following cerebral ischemia and hypoglycemic coma." **Proc Natl Acad Sci U S A** 89(2): 648-52.
204. Liu, L y D'Mello, SR (2006). "Phosphorylation of I κ B β is necessary for neuronal survival." **J Biol Chem** 281(3): 1506-15.
205. Liu, R ; Cai, J ; Hu, X ; Tan, M ; Qi, Y ; German, M ; Rubenstein, J ; Sander, M y Qiu, M (2003). "Region-specific and stage-dependent regulation of Olig gene expression and oligodendrogenesis by Nkx6.1 homeodomain transcription factor." **Development** 130(25): 6221-31.
206. Liu, YC y Storm, DR (1990). "Regulation of free calmodulin levels by neuromodulin: neuron growth and regeneration." **Trends Pharmacol Sci** 11(3): 107-11.

207. Los, M ; Burek, CJ ; Stroh, C ; Benedyk, K ; Hug, H y Mackiewicz, A (2003). "Anticancer drugs of tomorrow: apoptotic pathways as targets for drug design." **Drug Discov Today** 8(2): 67-77.

M

208. Manalan, AS y Klee, CB (1984). "Calmodulin." **Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res** 18: 227-78.

209. Manfredi, G y Xu, Z (2005). "Mitochondrial dysfunction and its role in motor neuron degeneration in ALS." **Mitochondrion** 5(2): 77-87.

210. Manie, S ; Santoro, M ; Fusco, A y Billaud, M (2001). "The RET receptor: function in development and dysfunction in congenital malformation." **Trends Genet** 17(10): 580-9.

211. Marshall, CJ (1994). "MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase." **Curr Opin Genet Dev** 4(1): 82-9.

212. Marshall, CJ (1995). "Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation." **Cell** 80(2): 179-85.

213. Marte, BM ; Rodriguez-Viciana, P ; Wennstrom, S ; Warne, PH y Downward, J (1997). "R-Ras can activate the phosphoinositide 3-kinase but not the MAP kinase arm of the Ras effector pathways." **Curr Biol** 7(1): 63-70.

214. Martin-Zanca, D ; Hughes, SH y Barbacid, M (1986). "A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences." **Nature** 319(6056): 743-8.

215. Martin-Zanca, D ; Oskam, R ; Mitra, G ; Copeland, T y Barbacid, M (1989). "Molecular and biochemical characterization of the human trk proto-oncogene." **Mol Cell Biol** 9(1): 24-33.

216. Martinou, JC ; Martinou, I y Kato, AC (1992). "Cholinergic differentiation factor (CDF/LIF) promotes survival of isolated rat embryonic motoneurons in vitro." **Neuron** 8(4): 737-44.

217. Matsushita, M y Nairn, AC (1999). "Inhibition of the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I cascade by cAMP-dependent protein kinase." **J Biol Chem** 274(15): 10086-93.

218. Matynia, A ; Kushner, SA y Silva, AJ (2002). "Genetic approaches to molecular and cellular cognition: a focus on LTP and learning and memory." **Annu Rev Genet** 36: 687-720.

219. Maxwell, GD ; Reid, K ; Elefanty, A ; Bartlett, PF y Murphy, M (1996). "Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes the development of adrenergic neurons in mouse neural crest cultures." **Proc Natl Acad Sci U S A** 93(23): 13274-9.

220. Mazzoni, IE ; Said, FA ; Aloyz, R ; Miller, FD y Kaplan, D (1999). "Ras regulates sympathetic neuron survival by suppressing the p53-mediated cell death pathway." **J Neurosci** 19(22): 9716-27.

221. McCarty, JH y Feinstein, SC (1998). "Activation loop tyrosines contribute varying roles to TrkB autophosphorylation and signal transduction." **Oncogene** 16(13): 1691-700.

222. McCormick, F (1994). "Activators and effectors of ras p21 proteins." **Curr Opin Genet Dev** 4(1): 71-6.

223. Means, AR (2000). "Regulatory cascades involving calmodulin-dependent protein kinases." **Mol Endocrinol** 14(1): 4-13.

224. Meier, P ; Finch, A y Evan, G (2000). "Apoptosis in development." **Nature** 407(6805): 796-801.

225. Melander Gradin, H ; Marklund, U ; Larsson, N ; Chatila, TA y Gullberg, M (1997). "Regulation of microtubule dynamics by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase IV/Gr-

dependent phosphorylation of oncoprotein 18." **Mol Cell Biol** 17(6): 3459-67.

226. Middlemas, DS ; Meisenhelder, J y Hunter, T (1994). "Identification of TrkB autophosphorylation sites and evidence that phospholipase C-gamma 1 is a substrate of the TrkB receptor." **J Biol Chem** 269(7): 5458-66.

227. Milbrandt, J ; de Sauvage, FJ ; Fahrner, TJ ; Baloh, RH ; Leitner, ML ; Tansey, MG ; Lampe, PA ; Heuckeroth, RO ; Kotzbauer, PT ; Simburger, KS ; Golden, JP ; Davies, JA ; Vejsada, R ; Kato, AC ; Hynes, M ; Sherman, D ; Nishimura, M ; Wang, LC ; Vandlen, R ; Moffat, B ; Klein, RD ; Poulsen, K ; Gray, C ; Garcés, A ; Johnson, EM, Jr. y et al. (1998). "Persephin, a novel neurotrophic factor related to GDNF and neurturin." **Neuron** 20(2): 245-53.

228. Millward, TA ; Zolnierowicz, S y Hemmings, BA (1999). "Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A." **Trends Biochem Sci** 24(5): 186-91.

229. Misra, RP ; Bonni, A ; Miranti, CK ; Rivera, VM ; Sheng, M y Greenberg, ME (1994). "L-type voltage-sensitive calcium channel activation stimulates gene expression by a serum response factor-dependent pathway." **J Biol Chem** 269(41): 25483-93.

230. Miyano, O ; Kameshita, I y Fujisawa, H (1992). "Purification and characterization of a brain-specific multifunctional calmodulin-dependent protein kinase from rat cerebellum." **J Biol Chem** 267(2): 1198-203.

231. Mowla, SJ ; Pareek, S ; Farhadi, HF ; Petrecca, K ; Fawcett, JP ; Seidah, NG ; Morris, SJ ; Sossin, WS y Murphy, RA (1999). "Differential sorting of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons." **J Neurosci** 19(6): 2069-80.

232. Myers, SM y Mulligan, LM (2004). "The RET receptor is linked to stress response pathways." **Cancer Res** 64(13): 4453-63.

N

233. Nagata, S (1997). "Apoptosis by death factor." **Cell** 88(3): 355-65.

234. Nairn, AC y Picciotto, MR (1994). "Calcium/calmodulin-dependent protein kinases." **Semin Cancer Biol** 5(4): 295-303.

235. Naito, Y ; Watanabe, Y ; Yokokura, H ; Sugita, R ; Nishio, M y Hidaka, H (1997). "Isoform-specific activation and structural diversity of calmodulin kinase I." **J Biol Chem** 272(51): 32704-8.

236. Nakashima, K y Taga, T (1998). "gp130 and the IL-6 family of cytokines: signaling mechanisms and thrombopoietic activities." **Semin Hematol** 35(3): 210-21.

237. Nakashima, T y Hamashima, Y (1979). "Loss of secretory activity in the glands of nasal polyps." **Ann Otol Rhinol Laryngol** 88(2 Pt 1): 210-6.

238. Neff, NT ; Prevette, D ; Houenou, LJ ; Lewis, ME ; Glicksman, MA ; Yin, QW y Oppenheim, RW (1993). "Insulin-like growth factors: putative muscle-derived trophic agents that promote motoneuron survival." **J Neurobiol** 24(12): 1578-88.

239. Nicole, O ; Ali, C ; Docagne, F ; Plawinski, L ; MacKenzie, ET ; Vivien, D y Buisson, A (2001). "Neuroprotection mediated by glial cell line-derived neurotrophic factor: involvement of a reduction of NMDA-induced calcium influx by the mitogen-activated protein kinase pathway." **J Neurosci** 21(9): 3024-33.

240. Nicholson, SE ; Willson, TA ; Farley, A ; Starr, R ; Zhang, JG ; Baca, M ; Alexander, WS ; Metcalf, D ; Hilton, DJ y Nicola, NA (1999). "Mutational analyses of the SOCS proteins suggest a dual domain requirement but distinct mechanisms for inhibition of LIF and IL-6 signal transduction." **Embo J** 18(2): 375-85.

241. Nilsson, AS ; Fainzilber, M ; Falck, P y Ibanez, CF (1998). "Neurotrophin-7: a novel

member of the neurotrophin family from the zebrafish." **FEBS Lett** 424(3): 285-90.

242. Nishida, E y Gotoh, Y (1993). "The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways." **Trends Biochem Sci** 18(4): 128-31.

243. Nobes, CD y Tolkovsky, AM (1995). "Neutralizing anti-p21ras Fabs suppress rat sympathetic neuron survival induced by NGF, LIF, CNTF and cAMP." **Eur J Neurosci** 7(2): 344-50.

244. Nozaki, C ; Asai, N ; Murakami, H ; Iwashita, T ; Iwata, Y ; Horibe, K ; Klein, RD ; Rosenthal, A y Takahashi, M (1998). "Calcium-dependent Ret activation by GDNF and neurturin." **Oncogene** 16(3): 293-9.

245. Nykjaer, A ; Willnow, TE y Petersen, CM (2005). "p75NTR--live or let die." **Curr Opin Neurobiol** 15(1): 49-57.

O

246. Obermeier, A ; Bradshaw, RA ; Seedorf, K ; Choidas, A ; Schlessinger, J y Ullrich, A (1994). "Neuronal differentiation signals are controlled by nerve growth factor receptor/Trk binding sites for SHC and PLC gamma." **Embo J** 13(7): 1585-90.

247. Obermeier, A ; Lammers, R ; Wiesmuller, KH ; Jung, G ; Schlessinger, J y Ullrich, A (1993). "Identification of Trk binding sites for SHC and phosphatidylinositol 3'-kinase and formation of a multimeric signaling complex." **J Biol Chem** 268(31): 22963-6.

248. Olson, L (1997). "The coming of age of the GDNF family and its receptors: gene delivery in a rat Parkinson model may have clinical implications." **Trends Neurosci** 20(7): 277-9.

249. Oppenheim, RW (1989). "The neurotrophic theory and naturally occurring motoneuron death." **Trends Neurosci** 12(7): 252-5.

250. Oppenheim, RW (1991). "Cell death during development of the nervous system." **Annu Rev Neurosci** 14: 453-501.

251. Oppenheim, RW ; Houenou, L ; Pincon-Raymond, M ; Powell, JA ; Rieger, F y Standish, LJ (1986). "The development of motoneurons in the embryonic spinal cord of the mouse mutant, muscular dysgenesis (mdg/mdg): survival, morphology, and biochemical differentiation." **Dev Biol** 114(2): 426-36.

252. Oppenheim, RW ; Maderdrut, JL y Wells, DJ (1982). "Reduction of naturally-occurring cell death in the thoraco-lumbar preganglionic cell column of the chick embryo by nerve growth factor and hemicholinium-3." **Brain Res** 255(1): 134-9.

253. Oppenheim, RW ; Prevette, D ; Yin, QW ; Collins, F y MacDonald, J (1991). "Control of embryonic motoneuron survival in vivo by ciliary neurotrophic factor." **Science** 251(5001): 1616-8.

254. Otsu, M ; Hiles, I ; Gout, I ; Fry, MJ ; Ruiz-Larrea, F ; Panayotou, G ; Thompson, A ; Dhand, R ; Hsuan, J ; Totty, N y et al. (1991). "Characterization of two 85 kd proteins that associate with receptor tyrosine kinases, middle-T/pp60c-src complexes, and PI3-kinase." **Cell** 65(1): 91-104.

P

255. Pachnis, V ; Mankoo, B y Costantini, F (1993). "Expression of the c-ret proto-oncogene during mouse embryogenesis." **Development** 119(4): 1005-17.

256. Pandiella-Alonso, A ; Malgaroli, A ; Vicentini, LM y Meldolesi, J (1986). "Early rise of cytosolic Ca²⁺ induced by NGF in PC12 and chromaffin cells." **FEBS Lett** 208(1): 48-51.

257. Paratcha, G ; Ledda, F y Ibanez, CF (2003). "The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands." **Cell** 113(7): 867-79.

258. Park, IK y Soderling, TR (1995). "Activation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (CaM-kinase) IV by CaM-kinase kinase in Jurkat T lymphocytes." **J Biol Chem** 270(51): 30464-9.
259. Pasini, B ; Ceccherini, I y Romeo, G (1996). "RET mutations in human disease." **Trends Genet** 12(4): 138-44.
260. Passier, R ; Zeng, H ; Frey, N ; Naya, FJ ; Nicol, RL ; McKinsey, TA ; Overbeek, P ; Richardson, JA ; Grant, SR y Olson, EN (2000). "CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo." **J Clin Invest** 105(10): 1395-406.
261. Pennica, D ; Shaw, KJ ; Swanson, TA ; Moore, MW ; Shelton, DL ; Zioncheck, KA ; Rosenthal, A ; Taga, T ; Paoni, NF y Wood, WI (1995). "Cardiotrophin-1. Biological activities and binding to the leukemia inhibitory factor receptor/gp130 signaling complex." **J Biol Chem** 270(18): 10915-22.
262. Perez, P ; Coll, PM ; Hempstead, BL ; Martin-Zanca, D y Chao, MV (1995). "NGF binding to the trk tyrosine kinase receptor requires the extracellular immunoglobulin-like domains." **Mol Cell Neurosci** 6(2): 97-105.
263. Picciotto, MR ; Czernik, AJ y Nairn, AC (1993). "Calcium/calmodulin-dependent protein kinase I. cDNA cloning and identification of autophosphorylation site." **J Biol Chem** 268(35): 26512-21.
264. Picciotto, MR ; Nastiuk, KL y Nairn, AC (1996). "Structure, regulation, and function of calcium/calmodulin-dependent protein kinase I." **Adv Pharmacol** 36: 251-75.
265. Ponder, BA (1999). "The phenotypes associated with ret mutations in the multiple endocrine neoplasia type 2 syndrome." **Cancer Res** 59(7 Suppl): 1736s-1741s; discussion 1742s.
266. Popsueva, A ; Poteryaev, D ; Arighi, E ; Meng, X ; Angers-Loustau, A ; Kaplan, D ; Saarma, M y Sariola, H (2003). "GDNF promotes tubulogenesis of GFRalpha1-expressing MDCK cells by Src-mediated phosphorylation of Met receptor tyrosine kinase." **J Cell Biol** 161(1): 119-29.
267. Poteryaev, D ; Titievsky, A ; Sun, YF ; Thomas-Crusells, J ; Lindahl, M ; Billaud, M ; Arumae, U y Saarma, M (1999). "GDNF triggers a novel ret-independent Src kinase family-coupled signaling via a GPI-linked GDNF receptor alpha1." **FEBS Lett** 463(1-2): 63-6.
268. Price, NE y Mumby, MC (1999). "Brain protein serine/threonine phosphatases." **Curr Opin Neurobiol** 9(3): 336-42.
269. Purves, D ; Snider, WD y Voyvodic, JT (1988). "Trophic regulation of nerve cell morphology and innervation in the autonomic nervous system." **Nature** 336(6195): 123-8.
-
- ## R
-
270. Rao, MS ; Tyrrell, S ; Landis, SC y Patterson, PH (1992). "Effects of ciliary neurotrophic factor (CNTF) and depolarization on neuropeptide expression in cultured sympathetic neurons." **Dev Biol** 150(2): 281-93.
271. Rao, MV y Nixon, RA (2003). "Defective neurofilament transport in mouse models of amyotrophic lateral sclerosis: a review." **Neurochem Res** 28(7): 1041-7.
272. Rao, SD y Weiss, JH (2004). "Excitotoxic and oxidative cross-talk between motor neurons and glia in ALS pathogenesis." **Trends Neurosci** 27(1): 17-23.
273. Raoul, C ; Barthelemy, C ; Couzinet, A ; Hancock, D ; Pettmann, B y Hueber, AO (2005). "Expression of a dominant negative form of Daxx in vivo rescues motoneurons from Fas (CD95)-induced cell death." **J Neurobiol** 62(2): 178-88.
274. Raoul, C ; Henderson, CE y Pettmann, B (1999). "Programmed cell death of embryonic motoneurons triggered through the Fas death receptor." **J Cell Biol** 147(5): 1049-62.

275. Rasmussen, CD y Means, AR (1989). "Calmodulin is required for cell-cycle progression during G1 and mitosis." **Embo J** 8(1): 73-82.
276. Ribar, TJ ; Rodriguiz, RM ; Khiroug, L ; Wetsel, WC ; Augustine, GJ y Means, AR (2000). "Cerebellar defects in Ca²⁺/calmodulin kinase IV-deficient mice." **J Neurosci** 20(22): RC107.
277. Riethmacher, D ; Sonnenberg-Riethmacher, E ; Brinkmann, V ; Yamaai, T ; Lewin, GR y Birchmeier, C (1997). "Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor." **Nature** 389(6652): 725-30.
278. Ringstedt, T ; Ibanez, CF y Nosrat, CA (1999). "Role of brain-derived neurotrophic factor in target invasion in the gustatory system." **J Neurosci** 19(9): 3507-18.
279. Robertson, J ; Kriz, J ; Nguyen, MD y Julien, JP (2002). "Pathways to motor neuron degeneration in transgenic mouse models." **Biochimie** 84(11): 1151-60.
280. Rodriguez-Tebar, A ; Dechant, G y Barde, YA (1990). "Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor." **Neuron** 4(4): 487-92.
281. Rodriguez-Viciana, P ; Warne, PH ; Dhand, R ; Vanhaesebroeck, B ; Gout, I ; Fry, MJ ; Waterfield, MD y Downward, J (1994). "Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras." **Nature** 370(6490): 527-32.
282. Rordorf-Nikolic, T ; Van Horn, DJ ; Chen, D ; White, MF y Backer, JM (1995). "Regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase by tyrosyl phosphoproteins. Full activation requires occupancy of both SH2 domains in the 85-kDa regulatory subunit." **J Biol Chem** 270(8): 3662-6.
283. Roux, PP y Barker, PA (2002). "Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor." **Prog Neurobiol** 67(3): 203-33.
284. Rozakis-Adcock, M ; Fernley, R ; Wade, J ; Pawson, T y Bowtell, D (1993). "The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1." **Nature** 363(6424): 83-5.
285. Rozakis-Adcock, M ; McGlade, J ; Mbamalu, G ; Pelicci, G ; Daly, R ; Li, W ; Batzer, A ; Thomas, S ; Brugge, J ; Pelicci, PG y et al. (1992). "Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases." **Nature** 360(6405): 689-92.

S

286. Saadat, S ; Sendtner, M y Rohrer, H (1989). "Ciliary neurotrophic factor induces cholinergic differentiation of rat sympathetic neurons in culture." **J Cell Biol** 108(5): 1807-16.
287. Saarma, M (2000). "GDNF - a stranger in the TGF-beta superfamily?" **Eur J Biochem** 267(24): 6968-71.
288. Saarma, M (2001). "GDNF recruits the signaling crew into lipid rafts." **Trends Neurosci** 24(8): 427-9.
289. Sakagami, H y Kondo, H (1993). "Cloning and sequencing of a gene encoding the beta polypeptide of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV and its expression confined to the mature cerebellar granule cells." **Brain Res Mol Brain Res** 19(3): 215-8.
290. Salvesen, GS y Abrams, JM (2004). "Caspase activation - stepping on the gas or releasing the brakes? Lessons from humans and flies." **Oncogene** 23(16): 2774-84.
291. Santella, L y Carafoli, E (1997). "Calcium signaling in the cell nucleus." **Faseb J** 11(13): 1091-109.
292. Santoro, M ; Rosati, R ; Grieco, M ; Berlingieri, MT ; D'Amato, GL ; de Franciscis, V y Fusco, A (1990). "The ret proto-oncogene is consistently expressed in human pheochromocytomas and thyroid

- medullary carcinomas." **Oncogene** 5(10): 1595-8.
293. Sarbassov, DD ; Guertin, DA ; Ali, SM y Sabatini, DM (2005). "Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex." **Science** 307(5712): 1098-101.
294. Sariola, H y Saarma, M (2003). "Novel functions and signalling pathways for GDNF." **J Cell Sci** 116(Pt 19): 3855-62.
295. Schedl, A y Hastie, ND (2000). "Cross-talk in kidney development." **Curr Opin Genet Dev** 10(5): 543-9.
296. Schinder, AF y Poo, M (2000). "The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity." **Trends Neurosci** 23(12): 639-45.
297. Schmitt, JM ; Wayman, GA ; Nozaki, N y Soderling, TR (2004). "Calcium activation of ERK mediated by calmodulin kinase I." **J Biol Chem** 279(23): 24064-72.
298. Schor, NF (2005). "The p75 neurotrophin receptor in human development and disease." **Prog Neurobiol** 77(3): 201-14.
299. Schuetz, G ; Rosario, M ; Grimm, J ; Boeckers, TM ; Gundelfinger, ED y Birchmeier, W (2004). "The neuronal scaffold protein Shank3 mediates signaling and biological function of the receptor tyrosine kinase Ret in epithelial cells." **J Cell Biol** 167(5): 945-52.
300. Schuringa, JJ ; Wojtachnio, K ; Hagens, W ; Vellenga, E ; Buys, CH ; Hofstra, R y Kruijer, W (2001). "MEN2A-RET-induced cellular transformation by activation of STAT3." **Oncogene** 20(38): 5350-8.
301. See, V ; Boutillier, AL ; Bito, H y Loeffler, JP (2001). "Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV (CaMKIV) inhibits apoptosis induced by potassium deprivation in cerebellar granule neurons." **Faseb J** 15(1): 134-144.
302. Segal, RA y Greenberg, ME (1996). "Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors." **Annu Rev Neurosci** 19: 463-89.
303. Sendtner, M (1998). "Neurotrophic factors: effects in modulating properties of the neuromuscular endplate." **Cytokine Growth Factor Rev** 9(1): 1-7.
304. Sendtner, M ; Kreutzberg, GW y Thoenen, H (1990). "Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy." **Nature** 345(6274): 440-1.
305. Sendtner, M ; Pei, G ; Beck, M ; Schweizer, U y Wiese, S (2000). "Developmental motoneuron cell death and neurotrophic factors." **Cell Tissue Res** 301(1): 71-84.
306. Shepherd, PR ; Withers, DJ y Siddle, K (1998). "Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling." **Biochem J** 333 (Pt 3): 471-90.
307. Shi, Y (2002). "Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis." **Mol Cell** 9(3): 459-70.
308. Shi, Y ; Wang, W ; Yourey, PA ; Gohari, S ; Zukauskas, D ; Zhang, J ; Ruben, S y Alderson, RF (1999). "Computational EST database analysis identifies a novel member of the neuropoietic cytokine family." **Biochem Biophys Res Commun** 262(1): 132-8.
309. Simons, K y Ikonen, E (1997). "Functional rafts in cell membranes." **Nature** 387(6633): 569-72.
310. Simpson, L y Parsons, R (2001). "PTEN: life as a tumor suppressor." **Exp Cell Res** 264(1): 29-41.
311. Smith, CA ; Farrah, T y Goodwin, RG (1994). "The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death." **Cell** 76(6): 959-62.
312. Sobue, K ; Ichida, S ; Yoshida, H ; Yamazaki, R y Kakiuchi, S (1979).

- "Occurrence of a Ca²⁺- and modulator protein-activatable ATPase in the synaptic plasma membranes of brain." **FEBS Lett** 99(1): 199-202.
313. Soderling, TR (1999). "The Ca-calmodulin-dependent protein kinase cascade." **Trends Biochem Sci** 24(6): 232-6.
314. Soderling, TR ; Chang, B y Brickey, D (2001). "Cellular signaling through multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II." **J Biol Chem** 276(6): 3719-22.
315. Soler, RM ; Dolcet, X ; Encinas, M ; Egea, J ; Bayascas, JR y Comella, JX (1999). "Receptors of the glial cell line-derived neurotrophic factor family of neurotrophic factors signal cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in spinal cord motoneurons." **J Neurosci** 19(21): 9160-9.
316. Soler, RM ; Egea, J ; Mintenig, GM ; Sanz-Rodriguez, C ; Iglesias, M y Comella, JX (1998). "Calmodulin is involved in membrane depolarization-mediated survival of motoneurons by phosphatidylinositol-3 kinase- and MAPK-independent pathways." **J Neurosci** 18(4): 1230-9.
317. Spiegel, R ; Hagmann, A ; Boltshauser, E y Moser, H (1996). "[Molecular genetic diagnosis and deletion analysis in Type I-III spinal muscular atrophy]." **Schweiz Med Wochenschr** 126(21): 907-14.
318. Squinto, SP ; Stitt, TN ; Aldrich, TH ; Davis, S ; Bianco, SM ; Radziejewski, C ; Glass, DJ ; Masiakowski, P ; Furth, ME ; Valenzuela, DM y et al. (1991). "trkB encodes a functional receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 but not nerve growth factor." **Cell** 65(5): 885-93.
319. Stahl, N y Yancopoulos, GD (1994). "The tripartite CNTF receptor complex: activation and signaling involves components shared with other cytokines." **J Neurobiol** 25(11): 1454-66.
320. Starr, R ; Willson, TA ; Viney, EM ; Murray, LJ ; Rayner, JR ; Jenkins, BJ ; Gonda, TJ ; Alexander, WS ; Metcalf, D ; Nicola, NA y Hilton, DJ (1997). "A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling." **Nature** 387(6636): 917-21.
321. Stephens, L ; Smrcka, A ; Cooke, FT ; Jackson, TR ; Sternweis, PC y Hawkins, PT (1994). "A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G protein beta gamma subunits." **Cell** 77(1): 83-93.
322. Stockli, KA ; Lottspeich, F ; Sendtner, M ; Masiakowski, P ; Carroll, P ; Gotz, R ; Lindholm, D y Thoenen, H (1989). "Molecular cloning, expression and regional distribution of rat ciliary neurotrophic factor." **Nature** 342(6252): 920-3.
323. Stokoe, D ; Stephens, LR ; Copeland, T ; Gaffney, PR ; Reese, CB ; Painter, GF ; Holmes, AB ; McCormick, F y Hawkins, PT (1997). "Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B." **Science** 277(5325): 567-70.
324. Strynadka, NC y James, MN (1989). "Crystal structures of the helix-loop-helix calcium-binding proteins." **Annu Rev Biochem** 58: 951-98.
325. Sulston, JE ; Schierenberg, E ; White, JG y Thomson, JN (1983). "The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*." **Dev Biol** 100(1): 64-119.
326. Sun, P ; Enslin, H ; Myung, PS y Maurer, RA (1994). "Differential activation of CREB by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity." **Genes Dev** 8(21): 2527-39.
327. Sun, W ; Gould, TW ; Newbern, J ; Milligan, C ; Choi, SY ; Kim, H y Oppenheim, RW (2005). "Phosphorylation of c-Jun in avian and mammalian motoneurons in vivo during programmed cell death: an early reversible event in the apoptotic cascade." **J Neurosci** 25(23): 5595-603.

328. Symes, AJ ; Rao, MS ; Lewis, SE ; Landis, SC ; Hyman, SE y Fink, JS (1993). "Ciliary neurotrophic factor coordinately activates transcription of neuropeptide genes in a neuroblastoma cell line." **Proc Natl Acad Sci U S A** 90(2): 572-6.

T

329. Tahira, T ; Ishizaka, Y ; Itoh, F ; Sugimura, T y Nagao, M (1990). "Characterization of ret proto-oncogene mRNAs encoding two isoforms of the protein product in a human neuroblastoma cell line." **Oncogene** 5(1): 97-102.

330. Takahashi, M ; Asai, N ; Iwashita, T ; Isomura, T ; Miyazaki, K y Matsuyama, M (1993). "Characterization of the ret proto-oncogene products expressed in mouse L cells." **Oncogene** 8(11): 2925-9.

331. Takahashi, M ; Buma, Y y Taniguchi, M (1991). "Identification of the ret proto-oncogene products in neuroblastoma and leukemia cells." **Oncogene** 6(2): 297-301.

332. Takahashi, M ; Inaguma, Y ; Hiai, H y Hirose, F (1988). "Developmentally regulated expression of a human "finger"-containing gene encoded by the 5' half of the ret transforming gene." **Mol Cell Biol** 8(4): 1853-6.

333. Taniuchi, M ; Johnson, EM, Jr. ; Roach, PJ y Lawrence, JC, Jr. (1986). "Phosphorylation of nerve growth factor receptor proteins in sympathetic neurons and PC12 cells. In vitro phosphorylation by the cAMP-independent protein kinase FA/GSK-3." **J Biol Chem** 261(28): 13342-9.

334. Thaler, CD ; Suhr, L ; Ip, N y Katz, DM (1994). "Leukemia inhibitory factor and neurotrophins support overlapping populations of rat nodose sensory neurons in culture." **Dev Biol** 161(2): 338-44.

335. Thastrup, O ; Cullen, PJ ; Drobak, BK ; Hanley, MR y Dawson, AP (1990). "Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-

ATPase." **Proc Natl Acad Sci U S A** 87(7): 2466-70.

336. Thomas, SM ; DeMarco, M ; D'Arcangelo, G ; Halegoua, S y Brugge, JS (1992). "Ras is essential for nerve growth factor- and phorbol ester-induced tyrosine phosphorylation of MAP kinases." **Cell** 68(6): 1031-40.

337. Tokumitsu, H ; Brickey, DA ; Glod, J ; Hidaka, H ; Sikela, J y Soderling, TR (1994). "Activation mechanisms for Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV. Identification of a brain CaM-kinase IV kinase." **J Biol Chem** 269(46): 28640-7.

338. Tokumitsu, H y Soderling, TR (1996). "Requirements for calcium and calmodulin in the calmodulin kinase activation cascade." **J Biol Chem** 271(10): 5617-22.

339. Tokumitsu, H ; Wayman, GA ; Muramatsu, M y Soderling, TR (1997). "Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase: identification of regulatory domains." **Biochemistry** 36(42): 12823-7.

340. Tolkovsky, AM ; Walker, AE ; Murrell, RD y Suidan, HS (1990). "Ca²⁺ transients are not required as signals for long-term neurite outgrowth from cultured sympathetic neurons." **J Cell Biol** 110(4): 1295-306.

341. Toutenhoofd, SL y Strehler, EE (2000). "The calmodulin multigene family as a unique case of genetic redundancy: multiple levels of regulation to provide spatial and temporal control of calmodulin pools?" **Cell Calcium** 28(2): 83-96.

342. Treanor, JJ ; Goodman, L ; de Sauvage, F ; Stone, DM ; Poulsen, KT ; Beck, CD ; Gray, C ; Armanini, MP ; Pollock, RA ; Hefti, F ; Phillips, HS ; Goddard, A ; Moore, MW ; Buj-Bello, A ; Davies, AM ; Asai, N ; Takahashi, M ; Vandlen, R ; Henderson, CE y Rosenthal, A (1996). "Characterization of a multicomponent receptor for GDNF." **Nature** 382(6586): 80-3.

343. Trupp, M ; Arenas, E ; Fainzilber, M ; Nilsson, AS ; Sieber, BA ; Grigoriou, M ; Kilkenny, C ; Salazar-Gruesso, E ; Pachnis, V y Arumae, U (1996). "Functional receptor for

GDNF encoded by the c-ret proto-oncogene." **Nature** 381(6585): 785-9.

344. Trupp, M ; Belluardo, N ; Funakoshi, H y Ibanez, CF (1997). "Complementary and overlapping expression of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), c-ret proto-oncogene, and GDNF receptor-alpha indicates multiple mechanisms of trophic actions in the adult rat CNS." **J Neurosci** 17(10): 3554-67.

345. Tsuchida, T ; Ensini, M ; Morton, SB ; Baldassare, M ; Edlund, T ; Jessell, TM y Pfaff, SL (1994). "Topographic organization of embryonic motor neurons defined by expression of LIM homeobox genes." **Cell** 79(6): 957-70.

346. Tsui-Pierchala, BA ; Milbrandt, J y Johnson, EM, Jr. (2002). "NGF utilizes c-Ret via a novel GFL-independent, inter-RTK signaling mechanism to maintain the trophic status of mature sympathetic neurons." **Neuron** 33(2): 261-73.

347. Tsuzuki, T ; Takahashi, M ; Asai, N ; Iwashita, T ; Matsuyama, M y Asai, J (1995). "Spatial and temporal expression of the ret proto-oncogene product in embryonic, infant and adult rat tissues." **Oncogene** 10(1): 191-8.

U

348. Ultsch, MH ; Wiesmann, C ; Simmons, LC ; Henrich, J ; Yang, M ; Reilly, D ; Bass, SH y de Vos, AM (1999). "Crystal structures of the neurotrophin-binding domain of TrkA, TrkB and TrkC." **J Mol Biol** 290(1): 149-59.

349. Urfer, R ; Tsoulfas, P ; O'Connell, L ; Hongo, JA ; Zhao, W y Presta, LG (1998). "High resolution mapping of the binding site of TrkA for nerve growth factor and TrkC for neurotrophin-3 on the second immunoglobulin-like domain of the Trk receptors." **J Biol Chem** 273(10): 5829-40.

350. Urfer, R ; Tsoulfas, P ; O'Connell, L ; Shelton, DL ; Parada, LF y Presta, LG (1995). "An immunoglobulin-like domain determines the specificity of neurotrophin receptors." **Embo J** 14(12): 2795-805.

351. Uzunov, P y Weiss, B (1972). "Psychopharmacological agents and the cyclic AMP system of rat brain." **Adv Cyclic Nucleotide Res** 1: 435-53.

V

352. Vaillant, AR ; Mazzone, I ; Tudan, C ; Boudreau, M ; Kaplan, DR y Miller, FD (1999). "Depolarization and neurotrophins converge on the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway to synergistically regulate neuronal survival." **J Cell Biol** 146(5): 955-66.

353. Vallano, ML y Beaman-Hall, CM (1989). "Differentiation increases type II calmodulin-dependent protein kinase in the neuroblastoma/glioma cell line 108CC15 (NG108-15)." **J Neurosci** 9(2): 539-47.

354. Van Den Bosch, L ; Storkebaum, E ; Vlemminckx, V ; Moons, L ; Vanopdenbosch, L ; Scheveneels, W ; Carmeliet, P y Robberecht, W (2004). "Effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) on motor neuron degeneration." **Neurobiol Dis** 17(1): 21-8.

355. Vaux, DL y Korsmeyer, SJ (1999). "Cell death in development." **Cell** 96(2): 245-54.

356. Vejsada, R ; Sagot, Y y Kato, AC (1995). "Quantitative comparison of the transient rescue effects of neurotrophic factors on axotomized motoneurons in vivo." **Eur J Neurosci** 7(1): 108-15.

357. Vetter, ML ; Martin-Zanca, D ; Parada, LF ; Bishop, JM y Kaplan, DR (1991). "Nerve growth factor rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 by a kinase activity associated with the product of the trk protooncogene." **Proc Natl Acad Sci U S A** 88(13): 5650-4.

358. Viglietto, G ; Dolci, S ; Bruni, P ; Baldassarre, G ; Chiariotti, L ; Melillo, RM ; Salvatore, G ; Chiappetta, G ; Sferratore, F ; Fusco, A y Santoro, M (2000). "Glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin can act as paracrine growth factors stimulating DNA synthesis of Ret-expressing spermatogonia." **Int J Oncol** 16(4): 689-94.

359. von Bartheld, CS ; Williams, R ; Lefcort, F ; Clary, DO ; Reichardt, LF y Bothwell, M (1996). "Retrograde transport of neurotrophins from the eye to the brain in chick embryos: roles of the p75NTR and trkB receptors." **J Neurosci** 16(9): 2995-3008.

W

360. Walker, NP ; Talanian, RV ; Brady, KD ; Dang, LC ; Bump, NJ ; Ferenz, CR ; Franklin, S ; Ghayur, T ; Hackett, MC ; Hammill, LD y et al. (1994). "Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer." **Cell** 78(2): 343-52.

361. Wang, JH ; Pallen, CJ ; Sharma, RK ; Adachi, AM y Adachi, K (1985). "The calmodulin regulatory system." **Curr Top Cell Regul** 27: 419-36.

362. Wang, Y ; Chiang, YH ; Su, TP ; Hayashi, T ; Morales, M ; Hoffer, BJ y Lin, SZ (2000). "Vitamin D(3) attenuates cortical infarction induced by middle cerebral arterial ligation in rats." **Neuropharmacology** 39(5): 873-80.

363. Way, JC y Chalfie, M (1988). "mec-3, a homeobox-containing gene that specifies differentiation of the touch receptor neurons in *C. elegans*." **Cell** 54(1): 5-16.

364. Wayman, GA ; Tokumitsu, H y Soderling, TR (1997). "Inhibitory cross-talk by cAMP kinase on the calmodulin-dependent protein kinase cascade." **J Biol Chem** 272(26): 16073-6.

365. Weiss, A y Schlessinger, J (1998). "Switching signals on or off by receptor dimerization." **Cell** 94(3): 277-80.

366. Westphal, RS ; Anderson, KA ; Means, AR y Wadzinski, BE (1998). "A signaling complex of Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase IV and protein phosphatase 2A." **Science** 280(5367): 1258-61.

367. White, RR ; Kwon, YG ; Taing, M ; Lawrence, DS y Edelman, AM (1998). "Definition of optimal substrate recognition

motifs of Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinases IV and II reveals shared and distinctive features." **J Biol Chem** 273(6): 3166-72.

368. Widenfalk, J ; Nosrat, C ; Tomac, A ; Westphal, H ; Hoffer, B y Olson, L (1997). "Neurturin and glial cell line-derived neurotrophic factor receptor-beta (GDNFR-beta), novel proteins related to GDNF and GDNFR-alpha with specific cellular patterns of expression suggesting roles in the developing and adult nervous system and in peripheral organs." **J Neurosci** 17(21): 8506-19.

369. Wiesmann, C ; Ultsch, MH ; Bass, SH y de Vos, AM (1999). "Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the TrkA receptor." **Nature** 401(6749): 184-8.

370. Williams, NG ; Roberts, TM y Li, P (1992). "Both p21ras and pp60v-src are required, but neither alone is sufficient, to activate the Raf-1 kinase." **Proc Natl Acad Sci U S A** 89(7): 2922-6.

371. Williamson, DL ; Kubica, N ; Kimball, SR y Jefferson, LS (2006). "Exercise-induced alterations in ERK1/2 and mTOR signaling to regulatory mechanisms of mRNA translation in mouse muscle." **J Physiol**.

372. Windisch, JM ; Marksteiner, R ; Lang, ME ; Auer, B y Schneider, R (1995). "Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4 bind to a single leucine-rich motif of TrkB." **Biochemistry** 34(35): 11256-63.

373. Wong, V ; Glass, DJ ; Arriaga, R ; Yancopoulos, GD ; Lindsay, RM y Conn, G (1997). "Hepatocyte growth factor promotes motor neuron survival and synergizes with ciliary neurotrophic factor." **J Biol Chem** 272(8): 5187-91.

374. Wood, KW ; Sarnecki, C ; Roberts, TM y Blenis, J (1992). "ras mediates nerve growth factor receptor modulation of three signal-transducing protein kinases: MAP kinase, Raf-1, and RSK." **Cell** 68(6): 1041-50.

375. Wu, H ; Kanatous, SB ; Thurmond, FA ; Gallardo, T ; Isotani, E ; Bassel-Duby, R y Williams, RS (2002). "Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by CaMK." **Science** 296(5566): 349-52.

376. Wu, JY ; Ribar, TJ ; Cummings, DE ; Burton, KA ; McKnight, GS y Means, AR (2000). "Spermiogenesis and exchange of basic nuclear proteins are impaired in male germ cells lacking Camk4." **Nat Genet** 25(4): 448-52.

X

377. Xu, Z ; Jung, C ; Higgins, C ; Levine, J y Kong, J (2004). "Mitochondrial degeneration in amyotrophic lateral sclerosis." **J Bioenerg Biomembr** 36(4): 395-9.

Y

378. Yaginuma, H ; Tomita, M ; Takashita, N ; McKay, SE ; Cardwell, C ; Yin, QW y Oppenheim, RW (1996). "A novel type of programmed neuronal death in the cervical spinal cord of the chick embryo." **J Neurosci** 16(11): 3685-703.

379. Yamamoto, Y y Henderson, CE (1999). "Patterns of programmed cell death in populations of developing spinal motoneurons in chicken, mouse, and rat." **Dev Biol** 214(1): 60-71.

380. Yamauchi, T (2005). "Neuronal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II—discovery, progress in a quarter of a century, and perspective: implication for learning and memory." **Biol Pharm Bull** 28(8): 1342-54.

381. Yan, H y Chao, MV (1991). "Disruption of cysteine-rich repeats of the p75 nerve growth factor receptor leads to loss of ligand binding." **J Biol Chem** 266(18): 12099-104.

382. Yang, C ; Jas, GS y Kuczera, K (2004). "Structure, dynamics and interaction with kinase targets: computer simulations of calmodulin." **Biochim Biophys Acta** 1697(1-2): 289-300.

383. Yao, R y Cooper, GM (1995). "Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor." **Science** 267(5206): 2003-6.

384. Ye, X ; Mehlen, P ; Rabizadeh, S ; VanArsdale, T ; Zhang, H ; Shin, H ; Wang, JJ ; Leo, E ; Zapata, J ; Hauser, CA ; Reed, JC y Bredesen, DE (1999). "TRAF family proteins interact with the common neurotrophin receptor and modulate apoptosis induction." **J Biol Chem** 274(42): 30202-8.

385. Yeo, W y Gautier, J (2004). "Early neural cell death: dying to become neurons." **Dev Biol** 274(2): 233-44.

386. Yin, C ; Knudson, CM ; Korsmeyer, SJ y Van Dyke, T (1997). "Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo." **Nature** 385(6617): 637-40.

387. York, RD ; Yao, H ; Dillon, T ; Ellig, CL ; Eckert, SP ; McCleskey, EW y Stork, PJ (1998). "Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor." **Nature** 392(6676): 622-6.

388. Yu, T ; Scully, S ; Yu, Y ; Fox, GM ; Jing, S y Zhou, R (1998). "Expression of GDNF family receptor components during development: implications in the mechanisms of interaction." **J Neurosci** 18(12): 4684-96.

389. Yuan, J y Horvitz, HR (1992). "The *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-4* encodes a novel protein and is expressed during the period of extensive programmed cell death." **Development** 116(2): 309-20.

390. Yuan, J ; Shaham, S ; Ledoux, S ; Ellis, HM y Horvitz, HR (1993). "The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme." **Cell** 75(4): 641-52.

Z

391. Zafra, F ; Hengerer, B ; Leibrock, J ; Thoenen, H y Lindholm, D (1990). "Activity

dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors." **Embo J** 9(11): 3545-50.

392. Zhang, L ; Schmidt, RE ; Yan, Q y Snider, WD (1994). "NGF and NT-3 have differing effects on the growth of dorsal root axons in developing mammalian spinal cord." **J Neurosci** 14(9): 5187-201.

393. Zhang, T ; Johnson, EN ; Gu, Y ; Morissette, MR ; Sah, VP ; Gigena, MS ; Belke, DD ; Dillmann, WH ; Rogers, TB ; Schulman, H ; Ross, J, Jr. y Brown, JH (2002). "The cardiac-specific nuclear delta(B) isoform of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II induces hypertrophy and dilated cardiomyopathy associated with

increased protein phosphatase 2A activity." **J Biol Chem** 277(2): 1261-7.

394. Zhao, Z ; Alam, S ; Oppenheim, RW ; Prevette, DM ; Evenson, A y Parsadanian, A (2004). "Overexpression of glial cell line-derived neurotrophic factor in the CNS rescues motoneurons from programmed cell death and promotes their long-term survival following axotomy." **Exp Neurol** 190(2): 356-72.

395. Zhou, LW ; Moyer, JA ; Muth, EA ; Clark, B ; Palkovits, M y Weiss, B (1985). "Regional distribution of calmodulin activity in rat brain." **J Neurochem** 44(5): 1657-62.