



Universitat
Autònoma
de Barcelona

MODULACIÓN DE LA TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL ASOCIADA A RECEPTORES TIROSINA QUINASA POR EL FRAGMENTO C-TERMINAL DE LA TOXINA TETÁNICA EN TEJIDO NERVIOSO

Memoria presentada por
Imane Chaib Oukadour
para optar al grado de
Doctora en Bioquímica

Dr. José Aguilera Avila
Facultat de Medicina
Departament de
Bioquímica i de Biologia
Molecular

Edifici M
08193 Cerdanyola del Vallés
Campus UAB
Phone: (34) (93) 581 41 16
Fax: (34) (93) 581 15 73

José Aguilera Avila

Profesor titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Barcelona

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral "**MODULACIÓN DE LA TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL ASOCIADA A RECEPTORES TIROSINA QUINASA POR EL FRAGMENTO C-TERMINAL DE LA TOXINA TETÁNICA EN TEJIDO NERVIOSO**" que ha dirigido y de la que es autora IMANE CHAIB OUKADOUR está en condiciones de ser presentada y defendida ante el Tribunal correspondiente. Lo que hace constar a los efectos oportunos a 7 de Octubre de 2004

Dr. José Aguilera Avila

Dr. José Aguilera Avila
Facultat de Medicina
Departament de
Bioquímica i de Biologia
Molecular

Edifici M
08193 Cerdanyola del Vallés
Campus UAB
Phone: (34) (93) 581 41 16
Fax: (34) (93) 581 15 73

Esta tesis ha sido realizada bajo la dirección del Dr. José Aguilera Avila en la Unidad de Bioquímica del departamento de Bioquímica y de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Barcelona

Barcelona, Octubre del 2004

*La ciencia es orgullosa por lo mucho que ha aprendido; la sabiduría es humilde porque no sabe más. **Cowper, William***

*Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa. **Gandhi, Mahatma***

*A nadie le faltan fuerzas; lo que a muchísimos les falta es voluntad. **Hugo, Victor***

Para mi tía (Emma)
Para mi primo (Omar)
Y Para mis padres, que siempre los llevo conmigo

ÍNDICE

| | Pág. |
|---|------------|
| Abreviaturas..... | i. |
| I. Introducción..... | 1. |
| 1. Las neurotoxinas clostridiales..... | 3. |
| 2. La toxina tetánica, síntesis y estructura..... | 7. |
| 2.1.El fragmento Hc de la TeTx (Hc-TeTx)..... | 9. |
| 2.2.Unión al tejido nervioso..... | 10. |
| 2.3.Internalización por endocitosis..... | 13. |
| 2.4.Translocación..... | 14. |
| 2.5.Transporte retroaxonal..... | 15. |
| 3. las neurotrofinas y sus receptores..... | 17. |
| 3.1.Las neurotrofinas..... | 18. |
| 3.1.1. Estructura molecular..... | 21. |
| 3.1.2. Transporte retrógrado..... | 22. |
| 3.1.3. Funciones fisiológicas..... | 23. |
| 3.2.Receptores de baja afinidad..... | 25. |
| 3.3.Receptores de alta afinidad..... | 29. |
| 3.3.1. Estructura molecular..... | 33. |
| 3.3.2. Funciones biológicas..... | 35. |
| 3.4.Vías de transducción mediadas por los receptores Trk..... | 36. |
| 3.4.1. Fosforilación de los receptores Trk..... | 36. |
| 3.4.2. La vía p21Ras/MAPK..... | 39. |

| | |
|---|------------|
| 3.4.3. La vía PI-3K/Akt..... | 48. |
| 3.4.4. La vía fosfolipasa C- γ /PKC..... | 51. |
| 4. El equilibrio entre la vida y la muerte..... | 57. |
| 5. La muerte celular..... | 58. |
| 5.1.La necrosis..... | 58. |
| 5.2.La apoptosis..... | 59. |
| 5.2.1. Características de la apoptosis..... | 60. |
| 5.2.2. Vías de señalización implicadas en la apoptosis..... | 62. |
| 5.2.2.1. Vía extrínseca..... | 62. |
| 5.2.2.2. Vía intrínseca..... | 65. |
| 5.2.3. Moduladores del proceso apoptótico..... | 67. |
| 5.2.4. La apoptosis en neuronas granulares de cerebelo..... | 73. |
| 5.2.5. La apoptosis y el MPP ⁺ | 75. |
| 6. Participación de las vías de transducción en la supervivencia..... | 78. |
| 6.1.Participación de la vía PI-3K/Akt | 78. |
| 6.2.Participación de la vía p21Ras/MAPK..... | 81. |
| 6.3.Participación de la vía PLC- γ /PKC..... | 84. |
| 6.4.Participación de otras vías..... | 85. |
| II. Objetivos..... | 87. |
| III. Resultados..... | 93. |
| 1. HC fragment (C-terminal portion of the heavy chain) of tetanus toxin activates protein kinase C isoforms and phosphoproteins involved in signal transduction..... | 95. |

| | |
|---|------|
| 2. C-terminal fragment of tetanus toxin heavy chain activates Akt and MEK/ERK signalling pathways in a Trk receptor-dependent manner in cultured cortical neurons..... | 105. |
| 3. The C-terminal domain of the heavy chain of tetanus toxin rescues cerebellar granule neurons from apoptotic death: involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways..... | 115. |
| 4. Resultados anexos..... | 127. |
| 5. C-Terminal Domain of the Heavy Chain of Tetanus Toxin Attenuate 1-Methyl-4-Phenylpyridinium Toxicity in Cerebellar Granule Neurons..... | 133. |
| IV. Discusión general..... | 159. |
| V. Conclusiones generales..... | 173. |
| VI. Bibliografía..... | 179. |

ABREVIATURAS

Abreviaturas

| | |
|---|--|
| 5-HT | 5-hidroxitriptamina, serotonina |
| Apaf-1 | <i>Apoptosis protease-activating factor-1</i> |
| ATP | Adenosina 5'-trifosfato |
| Bad | <i>Bcl-X_L/Bcl-2-associated death promoter homologue</i> |
| Bak | <i>Bcl-2 homologous antagonist killer</i> |
| Bax: | <i>Bcl-2-associated X protein</i> |
| Bcl-2 | <i>B cell leukemia/lymphoma-2</i> |
| Bcl-X _S y Bcl-X _L | <i>Bcl-2 homologue splice variants derived from the same gene</i> |
| BDNF | <i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i> |
| BH | Dominios Bcl-2 de homología |
| BME | <i>Basal medium Eagle</i> |
| BoNT | Neurotoxina botulínica |
| BSA | Albúmina sérica bovina |
| CaM | Calmodulina |
| CARD | <i>Caspase recruitment domain</i> |
| Caspasa | <i>Cysteine-aspartate-protease</i> |
| cit C | Citocromo C |
| CNC | <i>Cortical neuron culture</i> |
| CGN | <i>Cerebellar granule neurons</i> |
| CNTs | Neurotoxinas clostridiales |
| cPKC | PKC convencional o clásica |
| CREB | <i>cAMP response element-binding protein</i> |
| DAG | Diacilglicerol |
| DD | Dominio de muerte |
| DED | Dominio efector de muerte |

| | |
|--------------------|---|
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA: | Ácido desoxiribonucleico |
| DRM | <i>Detergent resistant membrane</i> |
| EDTA | Ácido etilenediaminotetracético |
| eIF2B | Eukaryotic initiation factor 2B |
| EGF | <i>Epidermic Growth Factor</i> |
| ER- α | Receptor de estrógenos- α |
| ERK (p42/p44 MAPK) | <i>Extracellular-signal-regulated kinase</i> |
| Fas-L | Ligando de Fas |
| FCS | Suero de ternero fetal |
| FHS | Suero de caballo fetal |
| FLIPs | <i>FLICE-like inhibitory proteins</i> |
| GAP | <i>GTPase-activating protein</i> |
| GRF | <i>Guanine nucleotide exchange factor</i> |
| GSK-3 | <i>Glycogen synthase kinase-3</i> |
| H | Cadena pesada de la toxina tetánica (o de CNT) |
| Hc | Dominio C-terminal de la cadena pesada (H) |
| HEPES | <i>N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-thanesulfonic acid]</i> |
| IAP | <i>Inhibitor apoptotic protein</i> |
| IGF-1 | <i>Insulin like Growth Factor-1</i> |
| IL-1 | Interleucina-1b |
| IMS | <i>Mitochondrial intermembrane space</i> |
| Ins 1,4,5P3 | Inositol 1,4,5-trifosfato |
| Ins | Inositol |
| IP's | Inositoles fosfatos |
| I κ B | <i>Inhibitor of κB</i> |
| JNK | <i>c-Jun N-terminal kinase</i> |
| L | Cadena ligera de la toxina tetánica (o de CNT) |

| | |
|--------------------|---|
| L-H _N | Cadena ligera unida al extremo N-terminal de H |
| MADD | <i>Mitogen-activated kinase activating death domain protein</i> |
| MAPK | <i>Mitogen-activated protein kinase</i> |
| MAPKAP-K1 (Rsk) | <i>MAPK-activated protein kinase-1</i> |
| MEK | <i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i> |
| mSOS | <i>Son of sevenless</i> |
| MSK | <i>Mitogen- and stress-activated protein kinase</i> |
| mTOR | <i>Mammalian target of rapamycin</i> |
| MTT | metil-tiazol-tetrazolio |
| N-CAM | <i>Neural cell adhesion molecule</i> |
| NFκB | <i>Nuclear factor-κB</i> |
| NGF | <i>Nerve Growth Factor</i> |
| p75 ^{NTR} | <i>p75 neurotrophin receptor</i> |
| PACAP | <i>Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide</i> |
| PARP | Poli (ADP-ribosil) polimerasa |
| PBS | Tampón fosfato salino |
| PD | PD98059 |
| PI-3K | <i>Phosphatidylinositol 3-Kinase</i> |
| PIGS | <i>Protein inducible-genes</i> |
| PIPES | <i>Piperazine-N-N'-bis[2-ethanesulfonic acid]</i> |
| PKB (Akt) | Proteína quinasa B |
| PKC | Proteína quinasa C |
| PLC | Fosfolipasa C |
| PMSF | <i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i> |
| PS | Fosfatidilserina |
| PtdIns4,5P2 | Fosfatidilinositol 4,5-difosfato |
| PtdSer | Fosfatidilserina |
| RE | Retículo endoplasmático |

| | |
|----------------|---|
| RIP | <i>Receptor-interacting protein</i> |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| S6K1 | <i>P70 ribosomal S6 kinase-1</i> |
| Sc-TeTx | <i>Single chain tetanus toxin</i> |
| SDS | Dodecil sulfato sódico |
| SDS-PAGE | Sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis |
| SERT | Transportador de serotonina |
| SNARE | <i>Soluble NSF-attachment protein receptor</i> |
| SNC | Sistema nervioso central |
| SSRI | Inhibidor selectivo del transporte de serotonina |
| TeTx | Toxina tetánica (<i>tetanus toxin</i>) |
| TNF | <i>Tumor necrosis factor</i> |
| TNFR | <i>TNF receptor</i> |
| TPA | 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato |
| TRADD | <i>TNF-receptor associated death domain</i> |
| TRAF | <i>TNF-receptor-associated factor</i> |
| Trk | <i>High-affinity tyrosine kinase receptor for neurotrophins</i> |
| UV | Ultravioleta |
| VAMP | <i>Vesicle-associated membrane protein</i> |
| Z-VAD.fmk | benciloxycarbonil-valina-alanina-aspartato-fluorometilcetona |
| $\Delta\Psi_m$ | potencial de membrana mitocondrial |

INTRODUCCIÓN

I. Introducción

1. Las neurotoxinas clostridiales

Las neurotoxinas clostridiales (CNTs) son holoproteínas sintetizadas por diferentes especies de bacterias del género *Clostridium*. El género *Clostridium* lo conforman bacilos *Gram*-positivos, anaerobios estrictos y formadores de esporas, ampliamente distribuidos en la naturaleza. La toxina tetánica (TeTx) es sintetizada por algunas cepas de *Cl. tetani*, y algunas cepas de *Cl. botulinum* producen las diferentes neurotoxinas botulínicas (BoNTs) serológicamente distintas denominadas de la A a la G. Otras especies tales como *Cl. butyricum* y *Cl. baratii* también participan en la síntesis de BoNT/E, y *Cl. argentinense* en la síntesis de BoNT/F (McCroskey et al., 1986, 1991). Todas las CNTs comparten el mismo origen, estructuras moleculares similares y mecanismos de acción a nivel molecular semejantes.

A pesar de las coincidencias de estructura y secuencia, las enfermedades producidas por estas neurotoxinas, presentan diferencias importantes. El tétanos es una enfermedad caracterizada por contractura muscular y espasmos recurrentes (produciéndose la muerte en un elevado porcentaje de los casos). Mientras que, el botulismo se manifiesta mediante una parálisis flácida generalizada. En ambas patologías la muerte se produce en un porcentaje elevado y generalmente por colapso respiratorio y asfixia.

La estructura tridimensional, común en las CNTs, muestra tres dominios funcionales de aproximadamente 50 kDa cada uno: los dominios de unión, de translocación, y de catálisis (Fig. 1) (Montecucco y Schiavo, 1995). Estos dominios participan en el proceso de toxicidad a tres niveles (como fue descrito por: Simpson, 1980). En el primer nivel, el dominio de

unión media la interacción entre la neurotoxina y la membrana presináptica del terminal nervioso (Dolly et al., 1984); esta interacción parece tener lugar a través de gangliósidos y de aceptores de características glicoproteicas; después de la unión, las neurotoxinas son internalizadas por endocitosis. El segundo paso está favorecido por la actividad de la bomba de protones ATPasa-tipoV que acidifica los endosomas. El pH ácido del lumen vesicular parece causar un cambio estructural en el dominio de translocación, permitiendo que se forme un poro en la membrana vesicular. Este poro permite la translocación del dominio catalítico a través de la membrana, accediendo la neurotoxina al compartimento citosólico. El tercer paso implica la hidrólisis específica de uno o varios enlaces peptídicos de una o varias proteínas implicadas en la fusión sináptica de la membrana vesicular con la membrana plasmática, impidiendo los procesos de secreción vesicular.

Hasta ahora como acción tóxica más relevante de las CNTs se ha descrito la inhibición de la liberación vesicular en las células nerviosas neuronales debido a la capacidad hidrolítica de las mismas. Las CNTs producen otras acciones a nivel molecular como son el bloqueo de la captación de algunos neurotransmisores o bien de algunos de sus precursores, acción que ha sido poco estudiada y presenta todavía ciertas ambigüedades. Los procesos de captación a nivel de membrana plasmática han sido estudiados principalmente en preparaciones enriquecidas de sinaptosomas y en cultivos primarios de neuronas (Wellhoner, 1982). Inicialmente, estos trabajos no mostraron ninguna alteración en la captación de colina (precursor y producto de la acetilcolina) debida a las CNTs (Wonnacott y Marchbanks, 1976; Collingridge et al., 1980). Sin embargo, otros autores sí encontraron bloqueo del transporte de transmisores producido tanto por la BoNT/A (Gundersen y Howard, 1978) como por la TeTx (Habermann et al., 1981).

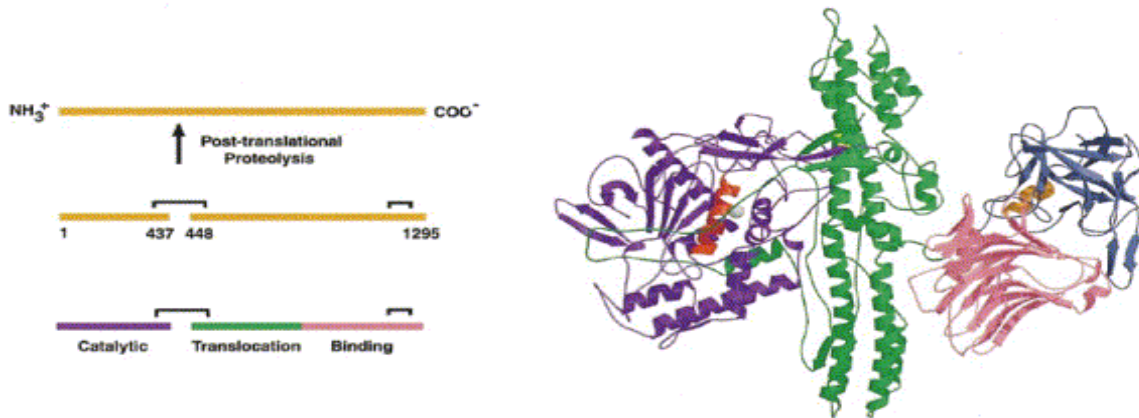


Figura 1. Estructura tridimensional de la BoNT/A (Lacy y Stevens, 1999). El color violeta corresponde al dominio catalítico (*cadena L*), responsable del bloqueo de la exocitosis. El color rosa corresponde al dominio de reconocimiento y unión (*cadena H*). El color verde corresponde al dominio de translocación. La esfera gris corresponde al átomo de zinc, responsable de la

Existen evidencias de que la toxina tetánica actúa de manera especial en el sistema serotoninérgico. Así se ha observado que inyecciones intraventriculares o intraperitoneales de TeTx, en ratas o en ratones, producen una marcada elevación de los niveles de serotonina (5-HT), tanto en cerebro como en médula espinal, no observándose estos cambios significativos en otras aminas biógenas (Aguilera et al., 1987; 1991; Aguilera y González-Sastre, 1988). La causa del aumento de 5-HT parece deberse a un aumento de la actividad enzimática de la triptófano hidroxilasa producida tras la intoxicación tetánica, sin haberse determinado las causas directas de dicha activación (Aguilera et al., 1987, 1991). No se ha observado un efecto directo, a nivel enzimático, de las CNTs sobre la síntesis de neurotransmisores. Por otro lado, la TeTx inhibe selectivamente el transporte (captación) dependiente de sodio de 5-HT (Inserte et al., 1999).

El avance reciente en Biología molecular y el avance específico en el conocimiento de la neurotransmisión permitieron saber que las CNTs actúan como metaloproteasas en el interior de las terminaciones nerviosas. A partir de este hallazgo, en pocos años, se ha producido un enorme

progreso en la identificación y caracterización de las proteínas sobre las cuales actúan las CNTs. Particularmente, el progreso hecho en el conocimiento de la composición proteica de las vesículas sinápticas ha proporcionado una amplia lista de posibles proteínas dianas de las CNTs (revisado por: Südhof y Jahn, 1991). En la actualidad, se conocen proteínas dianas de cada una de las CNTs, siendo todos los sustratos, hasta el momento, proteínas sinápticas, que forman parte del complejo de liberación vesicular.

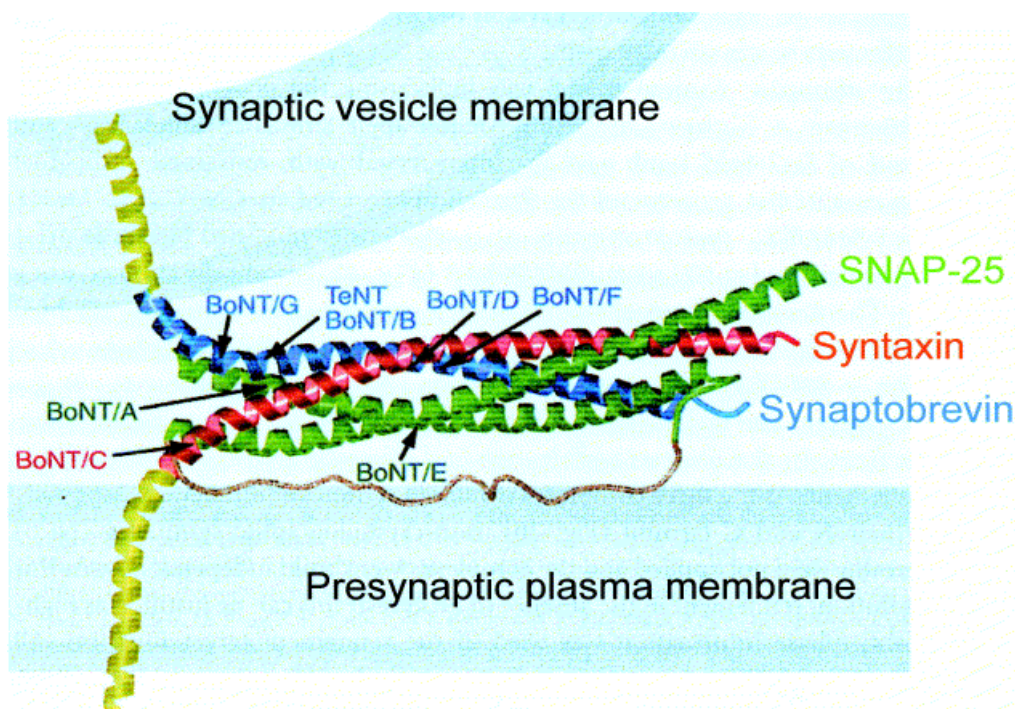


Figura 2. El complejo SNARE, lo conforma tres proteínas sinápticas: sinaptobrevina/VAMP, una proteína de la membrana vesicular, y syntaxina, SNAP-25 proteínas de la membrana plasmática. Las proteínas SNARE son dianas de las CNT que bloquean la liberación del neurotransmisor. La sinaptobrevina es hidrolizada por las neurotoxinas botulínicas: BoNT/B, /D, /G y /F y la TeTx, la

Los sustratos descritos para las CNTs forman parte del núcleo central del complejo SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment protein receptor): La sinaptobrevina (o VAMP, *vesicular associated membrane protein*) diana molecular de las neurotoxinas TeTx,

BoNT/B, /D, /F y /G que se encuentra anclada en las membranas vesiculares de la terminación nerviosa. La SNAP-25 (*synaptosomal associated protein of 25 kDa*) diana de las neurotoxinas BoNT/A, /C1 y /E, y por último, la sintaxina, diana de la BoNT/C1. Estas últimas se encuentran asociadas a la membrana plasmática (Fig. 2). Las tres proteínas sustratos forman el complejo SNARE que con la colaboración con otras proteínas, actuarían en las diferentes etapas previas a la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana plasmática (revisado por: Südhof, 1995).

2. La toxina tetánica, síntesis y estructura molecular

Entre las CNTs fijaremos nuestra atención en la TeTx, estructura serológica única producida por *Cl. tetani*. El polipéptido precursor de la TeTx es una cadena polipeptídica con un peso molecular aproximado de 150 kDa (*single chain*-TeTx, *sc*-TeTx, o endotoxina). La forma activa o exotoxina se produce por la hidrólisis de un enlace peptídico por medio de una endoproteasa clostridial (o bien por una endoproteasa del huésped) de características catalíticas parecidas a la tripsina. Los productos finales de la hidrólisis son dos cadenas polipeptídicas unidas por la existencia de un puente disulfuro intramolecular. La reducción del puente disulfuro da lugar a la cadena ligera L-TeTx (N-terminal) de 50 kDa con actividad toxigénica sobre la neurosecreción, y a la cadena pesada H-TeTx (C-terminal) de 100 kDa con características de unión específica al tejido diana (Craven y Dawson, 1973; Helting y Zwisler, 1977b).

La papaína, produce la ruptura de la cadena H-TeTx entre la Ser⁸⁶⁴ y la Lys⁸⁶⁵ generándose el fragmento L-H_N-TeTx, formado por la cadena ligera unido al resto N-terminal de la cadena pesada, y el fragmento Hc-TeTx, péptido C-terminal de la cadena H-TeTx (Fig. 3).

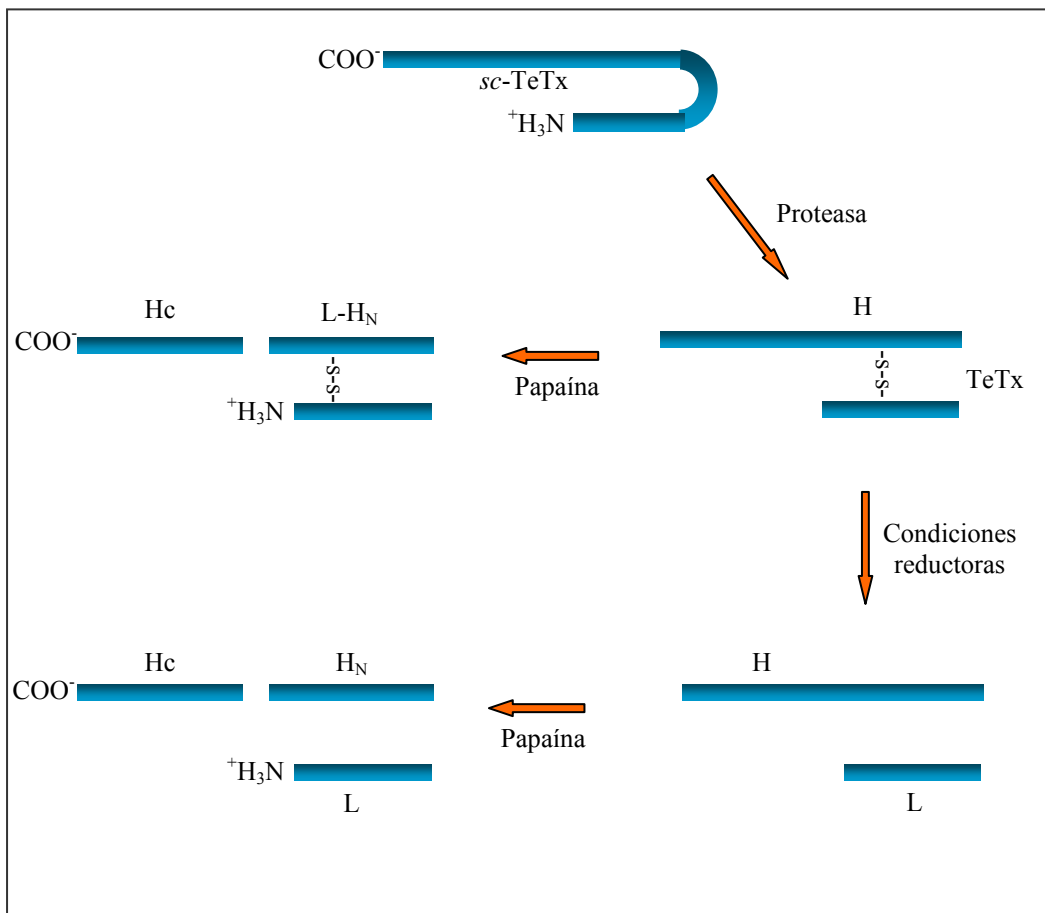


Figura 3. Fragmentación parcial de la TeTx y generación del fragmento Hc-TeTx.

La cadena ligera, L-TeTx, se encuentra unida covalentemente a través de un puente disulfuro a la cadena pesada, H-TeTx. La neurotoxina, de una sola cadena polipeptídica (*sc*: *single chain*), es tal y como es sintetizada por la bacteria. Los fragmentos producidos experimentalmente por proteólisis de la cadena H-TeTx por la endopeptidasa papaína, reciben el nombre H_N-TeTx (fragmento N-terminal) y Hc-TeTx (fragmento C-terminal).

Estos fragmentos son de gran utilidad experimental ya que en su estructura conservan la capacidad de producir la inhibición de la secreción vesicular mediante su actividad metaloproteásica (Mochida et al., 1995), y la capacidad de unión a la membrana plasmática, respectivamente (Meckler et al., 1990).

2.1 El fragmento Carboxi-terminal de la cadena H de la toxina tetánica

Es el fragmento Carboxi-terminal de la cadena H de la TeTx (fragmento comprendido entre los residuos 865 y 1315), es el dominio que se une de manera altamente específica a las zonas no mielinizadas de las membranas plasmáticas neuronales de los sistemas nerviosos central y periférico (Yavin et al., 1981; Montecucco, 1986). La implicación de este dominio en la unión de la TeTx al tejido nervioso ha sido demostrada por la capacidad de unión de dicho dominio a las membranas cerebrales de rata (Goldberg et al., 1981), a los cultivos primarios de neuronas (Halpern et al., 1990; Lalli et al., 1999), a las líneas celulares de neuroblastoma (Staub et al., 1986), etc.



Figura 4. Estructura tridimensional del frag. Hc-TeTx

La estructura tridimensional del fragmento Hc-TeTx pone de manifiesto la existencia de dos subdominios: N-terminal *lectin-like* (H_{CN} -TeTx, residuos 865-1110) y el dominio C-terminal *β -trefoil* (H_{CC} -TeTx, residuos 1110-1315), (Umland et al., 1997;

Emsley et al., 2000) unidos por una sola cadena hélice α (Fig. 4). Estudios de mutagénesis dirigida realizados tanto con la neurotoxina entera como con los fragmentos nativos y recombinantes del fragmento Hc-TeTx revelaron que el dominio *β -trefoil* del fragmento Hc-TeTx se une a los polisialogangliósidos y a las células neuronales de manera más eficaz que el fragmento Hc-TeTx entero (Halpern y Loftus, 1993). Mientras que, en

estudios paralelos llevados a cabo por Figueiredo y col. (1995) no se detectó afinidad del dominio H_{CN}-TeTx sobre dichos lípidos complejos.

Estudios más específicos de foto-afinidad han definido un área próxima al residuo *His*¹²⁹³ como sitio de unión a los gangliósidos (Shapiro et al., 1997). Estos resultados fueron posteriormente apoyados por otros grupos, entre ellos los estudios basados en la estructura cristalina del complejo Hc-TeTx/lactosa [*Gal*(β1-4)*Glc*] (Fotinou et al., 2001).

2.2 Unión específica del fragmento Hc-TeTx al tejido nervioso

La estructura cristalina del complejo formado por el fragmento Hc-TeTx y un análogo sintético del gangliósido GT1b proporciona la primera evidencia estructural directa de la interacción de la TeTx con gangliósidos. Posteriormente, esta afinidad fue demostrada para las demás neurotoxinas clostridiales, estudiándose asimismo el grado de afinidad para cada gangliósido, encontrándose alta afinidad entre algunas neurotoxinas y gangliósidos específicos.

Numerosos trabajos han intentado caracterizar la unión de la TeTx, y del resto de las CNTs, con los gangliósidos, utilizando análisis tanto *in vivo* como *in vitro* (ver: Halpern y Neale, 1995). Estos trabajos documentan que la TeTx y el fragmento aislado Hc-TeTx muestran tendencia a unirse a gangliósidos con dos o más restos de ácido siálico unidos a un resto de galactosa, por ejemplo los gangliósidos GD1b, GT1b y GQ1b (van Heyningen, 1963; Lalli et al., 1999) mostrando poca afinidad por el gangliósido monosiálico GM1, demostrando así el requisito de la presencia de dos o más ácidos siálicos para la unión de *alta afinidad*. También se demostró mediante estudios muy recientes de *binding* y por ensayos de toxicidad, que la unión del fragmento Hc-TeTx tanto a lactosa como a

ácido siálico, son vitales para la toxicidad de la TeTx (Rummel et al., 2003).

También se ha establecido que la toxina tetánica interacciona, a través de su fragmento Hc-TeTx, con la membrana neuronal en microdominios específicos que se conocen por membranas resistentes a detergentes (DRM) o *lipid rafts* (Herreros et al., 2001). Estos dominios DRM están altamente enriquecidos en gangliosidos (Revisado por: Pike, 2003).

El hecho de que la presencia de los gangliósidos sea requerida en la superficie de la célula, para que la unión membrana/CNT sea eficaz, fue demostrado por el aumento de sensibilidad a la TeTx y a las BoNTs de las células cromafinas incubadas con GD1b y GT1b (Marxen et al., 1989). Por otra parte, experimentos recientes han demostrado que las neuronas primarias de médula espinal llegaron a ser insensibles a la TeTx después de ser tratadas con fumonisina, inhibidor de la síntesis de gangliósidos, y que tras la adición de gangliósidos exógenos recuperaron la sensibilidad a dicha neurotoxina (Williamson et al., 1999).

Sin embargo, algunas evidencias experimentales, sobre si los gangliósidos son los receptores exclusivos de las neurotoxinas, son contradictorias (Critchley et al., 1986; Habermann y Albus, 1986; Wadsworth et al., 1990).

Para conciliar la necesidad de un receptor de *alta afinidad* lipídico con un receptor de *muy alta afinidad* proteico, se ha propuesto un modelo de receptor doble para la TeTx (Montecucco, 1986). En este modelo el fragmento Hc-TeTx, se uniría inicialmente a gangliósidos. Estos actuarían como primer aceptor, sensible a sialidasas, que acumularía la TeTx en la superficie de la membrana plasmática. El complejo formado, por movimiento lateral aprovechando la fluidez de las membranas, alcanzaría

el receptor específico, sensible a proteasas, de naturaleza proteica y que estaría implicado en la internalización de la toxina (Fig. 5).

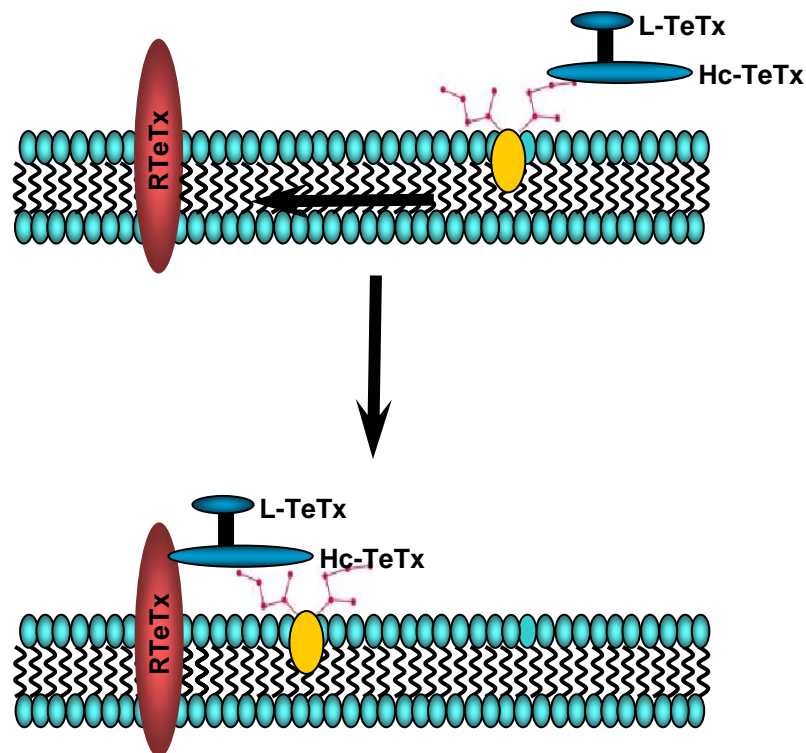


Figura 5. Mecanismo propuesto para la interacción de la toxina tetánica con la membrana presináptica. Etapa 1) Fijación del fragmento Hc-TeTx a polisialopangliósidos (G). Etapa 2) fijación al receptor proteico (RTeTx) después del desplazamiento lateral del complejo gangliósido-toxina en la membrana.

Se ha encontrado que el dominio Hc de la TeTx interacciona con una proteína de 20 kDa que se encuentra presente en la superficie de células PC12 (*Pheochromacytoma*) diferenciadas con NGF (*nerve growth factor*) (Schiavo et al., 1991). Sin embargo, los resultados no han sido concluyentes, y su implicación en la fijación de la toxina no ha sido aclarada. También, experimentos de “*cross-linking*” usando motoneuronas primarias de médula espinal y células PC12 NGF-diferenciadas han identificado una glicoproteína de 15 kDa como posible receptor neuronal de la TeTx (Herreros et al., 2000a). Este hipotético receptor se une solamente a la mitad del dominio C-terminal del fragmento Hc-TeTx (Herreros et al., 2000b).

2.3. Internalización TeTx por endocitosis

Después de la unión a la terminación nerviosa, un proceso que es independiente de la temperatura, la TeTx, o el fragmento Hc-TeTx, son internalizados en vesículas mediante endocitosis, proceso dependiente de la temperatura y favorecido por la actividad eléctrica de las neuronas (Montesano et al., 1982; Black y Dolly, 1986b; Parton et al., 1987).

La endocitosis de las CNTs puede tener lugar por invaginación de membranas cubiertas o no cubiertas de clatrina (Kalz y Welhöner, 1990), siendo un proceso endocítico mediado por receptor. Por ejemplo, se ha descrito que la TeTx se internaliza en membranas no cubiertas de clatrina (Montesano et al., 1982; Parton et al., 1987; Black y Dolly, 1986a, b) y que la neurotoxina BoNT/A se internaliza en membranas cubiertas de clatrina (Black y Dolly, 1986a, b).

Una vez atrapada la neurotoxina por las vesículas endocíticas, se ha observado que la proteína queda inaccesible a cualquier ataque por proteasas o por anticuerpos específicos. Tanto la TeTx como las BoNTs son captadas por las uniones neuromusculares u otras terminaciones periféricas, pero la internalización no es sinónimo de entrada directa al citosol, donde se encuentran los sustratos específicos de las neurotoxinas clostridiales. Asimismo para cambiar de compartimento, las CNTs necesitan translocarse a través de las membranas vesiculares.

Las BoNTs conservan poca capacidad de transportarse retroaxonalmente por lo que producen su acción neurotóxica principal en las terminaciones neuromusculares, a diferencia de la TeTx que es mayoritariamente transportada retroaxonalmente hasta las neuronas intercalares inhibitorias de la médula espinal (Schwab et al., 1979). A este nivel de relevo neuronal, la TeTx no necesita receptores de “*muy alta*” afinidad, como demuestra el hecho que la TeTx, así como el fragmento L-H_N-TeTx, producen bloqueo de la liberación de neurotransmisores

cuando se inyecta dentro de la médula espinal, mientras que no se produce cuando el fragmento L-H_N-TeTx es inyectado intramuscularmente de forma directa.

2.4. Translocación al citosol de la TeTx

Como se ha mencionado en el apartado anterior, las neurotoxinas internalizadas han de acceder al citosol, proceso específico que parece consistir en la inyección a través de la membrana de la subunidad catalítica o cadena L-CNT. Esta etapa es la menos comprendida, sin embargo podemos encontrar muchos trabajos que han ayudado a elaborar una hipótesis razonable (Boquet y Duflot, 1982; Hoch et al., 1985; Donovan y Middlebrook, 1986; Blaustein et al., 1987; Shone et al., 1987; Menestrina et al., 1989; Schiavo et al. 1991b). En este punto se ha de remarcar que la mayoría de las toxinas o proteínas captadas por estas vesículas son degradadas o recirculadas tras un proceso previo de acidificación del lumen vesicular sin que se observe su translocación o paso directo al citosol (Sandvig et al., 1992; Papini et al., 1993).

El lumen vesicular es acidificado mediante la bomba de protones ATPasa del tipo V lo que facilitaría la translocación de la cadena L-CNT (Boquet y Duflot, 1982). Algunas evidencias han sido recogidas al respecto que apoyan esta hipótesis, estas son: La intoxicación tetánica es prevenida en neuronas espinales mediante el inhibidor específico de la bomba protónica, la bafilomicina A1 (Williamson y Neale, 1994); la cloroquina y la nigerina (sustancias quelantes del gradiente protónico) inhiben la acción de la BoNT en la unión neuromuscular (Simpson, 1983). Este modelo tiene como antecedente el mecanismo de translocación utilizado por la toxina diftérica, que entra en la célula vía el compartimento ácido (revisado por: Montecucco et al., 1992). No queda claro, sin embargo, si la translocación se produce por formación de poros en la membrana o bien es una translocación en la cual la

cadena H-CNT y el puente disulfuro jugarían un papel de facilitadores de la penetración (Schiavo et al., 1990; de Paiva et al., 1993a).

2.5 Transporte retroaxonal de la TeTx y del fragmento Hc-TeTx

Después de la fijación e internalización por las terminaciones nerviosas periféricas, motoras o vegetativas, la TeTx o su fragmento Hc-TeTx pueden alcanzar niveles diferentes del SNC por transporte axonal retrógrado (Fig. 6), hecho conocido desde antiguo y demostrado por inyección intramuscular de la TeTx y del fragmento Hc-TeTx marcados radioactivamente, observándose el transporte en médula espinal, tal y como ha sido demostrado por autoradiografía (Stöckel et al., 1975; Meckler et al., 1990).

Se ha demostrado que el fragmento Hc-TeTx puede ser transportado por las neuronas de una manera similar que la toxina nativa sin causar los síntomas clínicos (Bizzini et al., 1977; Manning et al., 1990). El hecho de que un fragmento atóxico de la toxina tetánica pudiera ser transportado retroaxonalmente y acumulado en el SNC condujo a la especulación de que tal fragmento se podría utilizar como un portador neurotrófico (Bizzini et al., 1980). Estudios más recientes, *in vivo*, revelaron que la proteína híbrida producida por la fusión del producto del gen *lacZ* y el fragmento Hc-TeTx se puede transportar retroaxonalmente y producir saltos trans-sinápticos, demostrando así que el fragmento Hc-TeTx se puede utilizar como vehículo eficiente para transportar productos exógenos con actividades biológicas alienas, como en este caso la actividad β -galactosidasa, desde la periferia a neuronas de niveles superiores del SNC (Coen et al., 1997).

Numerosos ejemplos de recombinación del fragmento Hc-TeTx con proteínas carentes de capacidad de acceder al sistema nervioso han sido publicados, por ejemplo la recombinación de la superóxido dismutasa, de interés en la enfermedad de Parkinson, con el fragmento Hc-TeTx. Este

producto recombinante fue tan eficaz transportándose retroaxonalmente y produciendo saltos trans-sinápticos como lo es la toxina integra, tal como se demostró por microscopía óptica, inmunohistoquímica y por ELISA, tras su aplicación intramuscular (Figueiredo et al., 1997).

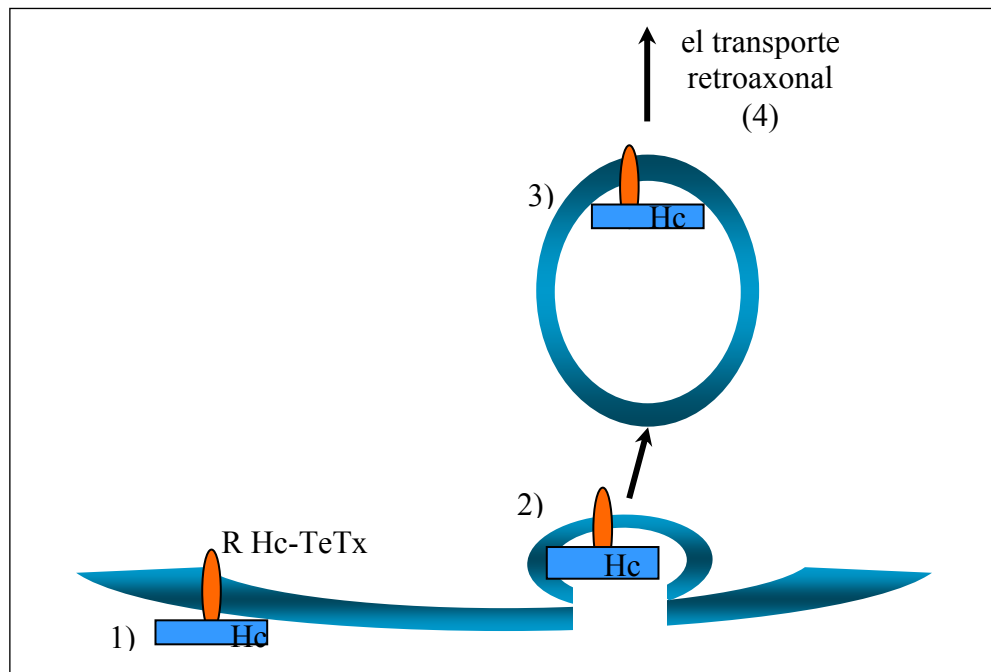


Figura 6. Vía de entrada del fragmento Hc-TeTx, al interior de la terminación nerviosa. El fragmento Hc-TeTx se une al receptor hipotetizado en la membrana presináptica (1), y es internalizado mediante vesículas endocíticas (2 y 3), proceso favorecido por la actividad eléctrica de la neurona. Después de la unión y de la internalización, el fragmento Hc-TeTx es transportado retroaxonalmente (4).

Habermann (1977) estimó la velocidad del transporte retroaxonal del fragmento Hc-TeTx en 7,5 mm/h, velocidad que corresponde a un transporte axonal rápido. Este transporte puede intensificarse por estimulación neuromuscular, o bien bloquearse por compuestos como la colchicina o vblastina, inhibidores de la polimerización de los microtúbulos. Se considera que la reabsorción es un mecanismo específico, mientras que el transporte retrógrado sería un mecanismo inespecífico.

Se ha observado que algunas neurotrofinas como el factor de crecimiento nervioso (NGF) y algunos receptores de membrana con

actividad tirosina quinasa (como el propio receptor del NGF el TrkA) también son transportados de manera análoga al fragmento Hc-TeTx.

3. Las neurotrofinas y sus receptores de membrana celular

Las neurotrofinas fueron primeramente localizadas en el sistema nervioso participando en la regulación de la supervivencia de las neuronas y en la inducción del crecimiento de fibras neurales. Actualmente, estudios recientes han establecido nuevas funciones de las neurotrofinas en el desarrollo y en la plasticidad sináptica, particularmente en el sistema nervioso central (Huang and Reichardt, 2001; Lu, 2003). Dentro de la familia de neurotrofinas podemos destacar al factor de crecimiento nervioso (*Nerve growth factor*, NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (*Brain derived nerve factor*, BDNF), la neurotrofina 3 (también conocida como *Hipocampus-derived neurotrophic factor*, HDNF) y las neurotrofinas 4/5. Estos factores tróficos son polipéptidos que presentan, entre ellos, una elevada homología en su secuencia (Ibáñez et al., 1991).

En la señalización debido a neurotrofinas están implicados dos tipos de receptores. Un primer tipo de receptor glicoproteico de baja afinidad, denominado **p75^{NTR}** (*neurotrophin receptor of 75 kDa*), que reconoce con moderada afinidad a las distintas neurotrofinas descritas, y que no posee actividad enzimática intrínseca reconocida. Y la otra clase de receptores la conforman también glicoproteínas codificados por los genes *trk*. Estas estructuras de naturaleza glicoproteica son específicas para cada una de las neurotrofinas, caracterizándose hasta la actualidad tres especies con las siguientes afinidades preferentes: el TrkA, receptor de NGF, el TrkB, receptor de BDNF y el TrkC receptor de las neurotrofinas 3/4.

3.1 Las neurotrofinas

Para que una molécula sea considerada una neurotrofina, debe reunir una serie de criterios, por ejemplo estar disponible en cantidades subsaturantes o limitantes, actuar sobre neuronas a nivel presináptico mediante su interacción con receptores, y ser fijadas a nivel de los terminales nerviosos. Las neurotrofinas, además de producir una acción inmediata de activación de la fosforilación en tirosinas, inducen el transporte retroaxonal de vesículas endocíticas transportándose con ellas la propia neurotrofina con su receptor hasta el soma celular, donde alteran la expresión genética promoviendo la supervivencia y la diferenciación neuronal (Oppenheim, 1989).

La síntesis y la liberación de las neurotrofinas a nivel de los tejidos diana son aparentemente constitutivas (Barth et al., 1984), y no parecen depender, ni de la llegada de los axones neuronales al tejido diana de inervación, ni del número en que lo hacen (Shelton y Reichardt, 1986b; Rohrer et al., 1988a). Este hecho podría indicar que las neurotrofinas no están directamente implicadas en el crecimiento inicial y la posterior guía de los axones hacia sus dianas de inervación (Coughlin y Collins, 1985).

El NGF fue la primera molécula neurotrófica caracterizada, la más estudiada y por tanto la mejor conocida. Esta neurotrofina fue descubierta a partir de tejidos transplantados que la sintetizaban y liberaban. El NGF es sintetizado originalmente en forma de pre-proNGF, molécula que experimenta sucesivos cortes hidrolíticos hasta dar lugar a la forma madura. El NGF aislado a partir de las glándulas salivales del ratón macho es un complejo con un coeficiente de sedimentación de 7S formado por tres subunidades (α , β y γ) y con un peso molecular aproximado de 140 kDa (Smith et al., 1969). La subunidad β es un dímero no covalente muy estable, las cadenas polipeptídicas poseen cada una de ellas 118

aminoácidos y un peso molecular de 13,3 kDa (revisado por: Harper y Thoenen, 1980) con elevado grado de conservación a nivel de secuencia entre diferentes especies. De las tres subunidades que constituyen el complejo 7S, sólo la subunidad β tiene actividad promotora del crecimiento neuronal, correspondiéndose con la forma 2,5S. Esta forma 2,5S, difiere ligeramente de la subunidad β por la ausencia de nueve aminoácidos en una de las dos cadenas polipeptídicas.

La subunidad α , con un peso molecular de 26 kDa, presenta un alto grado de homología con la familia de la kaliceína (Isackson et al., 1987), por lo que se le ha atribuido una función protectora contra supuestos ataques enzimáticos dirigidos a la subunidad β (Greene et al., 1969). Por último la subunidad γ , con un peso molecular similar al de la subunidad α , es una esteropeptidasa arginina-específica que cataliza el paso de la molécula precursora conocida como pro- β al monómero de la subunidad β (Greene y Shooter, 1980).

El BDNF fue descubierto accidentalmente a partir de un medio de cultivo condicionado por una línea de células gliales (Barde et al., 1978, 1980). Posteriormente, tras comprobarse su presencia en extractos de cerebro de cerdo, fue aislado, siendo necesario un factor de purificación superior a 1:1.000.000 (Barde et al., 1982). Pocos años después fue posible elucidar su estructura primaria (Leibrock et al., 1989), y conseguir su clonación (Leibrock et al., 1989; Hofer et al., 1990). Se trata de una proteína básica de 119 aminoácidos y 12,3 kDa de peso molecular, con un precursor de 252 aminoácidos y un grado de homología con el NGF respecto a su composición en aminoácidos próximo al 55 % (Leibrock et al., 1989).

Poco después de conocerse la secuencia genómica del BDNF, un tercer miembro de la familia de las neurotrofinas, La neurotrofina 3

(**NT-3**), fue identificada por diferentes laboratorios simultáneamente (Ernfors et al., 1990b; Hohn et al., 1990). La NT-3 fue la primera neurotrofina identificada mediante técnicas de Biología Molecular, sin necesidad de purificar previamente la proteína nativa. La NT-3 presenta mucha analogía estructural con NGF y BDNF (Thoenen, 1991). Se trata de un polipéptido cuya forma madura consta de 119 aminoácidos y se genera a partir de un precursor con péptido señal de 258 aminoácidos (Maisonpierre et al., 1990a). La NT-3 madura tiene una identidad en su secuencia de aminoácidos del 57 % y 58 % con el NGF y el BDNF, respectivamente, lo que supone una homología del 48% entre las tres moléculas. No obstante, la NT-3 difiere del NGF y del BDNF en su patrón de expresión regional (Ernfors et al., 1990b; Hallböök et al., 1993).

Recientemente, mediante una estrategia de búsquedas de PCR utilizando las regiones conservadas de las neurotrofinas NGF, BDNF y NT-3, se aisló en el genoma de *Xenopus* un nuevo miembro de la familia de las neurotrofinas denominado neurotrofina 4 (**NT-4**) (Hallböök et al., 1991). La forma madura de esta neurotrofina es un polipéptido de 123 aminoácidos, generado a partir de un precursor de 236 aminoácidos, con un 51-60 % de identidad con las otras neurotrofinas. Posteriormente, Ip y colaboradores (1992a), de nuevo mediante una estrategia de PCR, identificaron en el genoma de mamíferos una secuencia homóloga a la de la NT-4 de *Xenopus*, que denominaron NT-4 de mamífero. Curiosamente, a pesar de que la NT-4 de mamífero está más relacionada con la NT-4 de *Xenopus* que con cualquier otra neurotrofina, el grado de identidad interespecífica es sólo del 65 %, mucho menor que la homología habitual que se encuentran entre distintas especies para las otras neurotrofinas, en torno al 99 %.

Poco tiempo después de aislarse la NT-4 de *Xenopus*, se aisló en el genoma de mamíferos la secuencia génica de una nueva neurotrofina, que denominaron neurotrofina 5 (Berkemeier et al., 1991) que presenta homología, a nivel de secuencia genómica con el NGF, el BDNF y la NT-3, del 50 % al 60 % (Berkemeier et al., 1991).

3.1.1 Estructura molecular de las neurotrofinas

Las neurotrofinas, a concentraciones fisiológicas, forman dímeros no covalentes entre sí (McDonald et al., 1991) según se ha comprobado a partir de estudios de cristalización (McDonald et al., 1991). Estas uniones se establecen a través de la interacción entre numerosos núcleos hidrofóbicos presentes en cada uno de los monómeros. El núcleo hidrofóbico formado está condicionado por la existencia de una serie de aminoácidos, entre los que se incluyen seis residuos de cisteína que forman a su vez tres puentes disulfuro intracatenarios, indispensables para la estabilidad de la estructura tridimensional de la neurotrofina, (McDonald et al., 1991) así como para su actividad biológica (Thoenen y Barde, 1980).

Los seis residuos de cisteína están altamente conservados entre las distintas neurotrofinas (Berkemeier et al., 1991), lo que sugiere que las diferentes neurotrofinas probablemente comparten una estructura tridimensional similar (McDonald et al., 1991). Por otra parte, mediante experimentos de mutagénesis dirigida y el diseño de neurotrofinas quiméricas recombinantes, ha sido posible localizar las regiones del NGF (Ibáñez et al., 1991, 1992, 1993; McDonald et al., 1991), del BDNF (Rosenfeld et al., 1993), de la NT-3 (Urfer et al., 1994) y de la NT-4/5 (Treanor et al., 1995) implicadas en la interacción con sus respectivos receptores de alta y baja afinidad.

3.1.2 Transporte retrógrado, elemento clave en la acción de las neurotrofinas

El mecanismo de transferencia de información desde el tejido diana de inervación a los somas neuronales, constituye un caso especial de transducción de señal, ya que la activación de los receptores se sitúa a una larga distancia del núcleo de la neurona. En general, dicha distancia se corresponde con el axón y, en ocasiones, puede ser superior a un metro. Tras producirse la interacción entre una neurotrofina y su respectivo receptor a nivel de los terminales nerviosos (Schwab et al., 1982), el complejo ligando-receptor es internalizado en un proceso que reúne las características de endocitosis mediada por un receptor de alta afinidad (Thoenen y Barde, 1980; Yan et al., 1993) y que se corresponde con la interacción de una de las neurotrofinas con su receptor específico de alta afinidad tipo Trk (tirosina quinasa), y no con su receptor inespecífico de baja afinidad el p75^{NTR} (Kahle et al., 1994).

A continuación, las neurotrofinas son transportadas retrógradamente a lo largo de los microtúbulos axonales hasta el soma de las neuronas (DiStefano et al., 1992). El transporte retrógrado de las neurotrofinas precisa la unión de alta afinidad (von Bartheld et al., 1996) así como la participación de p75^{NTR} (Yan et al., 1993; Curtis et al., 1995; von Bartheld et al., 1996). Las neurotrofinas llegan intactas al soma neuronal (Johnson et al., 1978), donde se acumulan en el interior de compartimentos membranosos (Levi et al., 1980) para ser degradadas seguidamente en estructuras lisosomales (Thoenen y Barde, 1980).

Se desconoce hasta qué punto el transporte retrógrado de las neurotrofinas es importante para su mecanismo de acción, aunque sí parece evidente que la interferencia con este transporte comporta la abolición de las acciones estimuladas por las neurotrofinas (DiStefano et al., 1992).

Inicialmente se sugirió la posibilidad de que las moléculas neurotróficas fuesen transportadas retrógradamente hasta el soma neuronal, donde ejercerían sus efectos biológicos. Sin embargo, parece improbable que las propias neurotrofinas actúen como mensajeros neurotróficos a nivel del soma neuronal dado que la inyección intracelular de las neurotrofinas no mimetiza sus efectos neurotróficos, ni los anticuerpos anti-neurotrofinas bloquean los efectos producidos. En este punto, se ha de dejar bien claro que es el receptor neurotrófico el que una vez activado por las neurotrofinas es el verdadero efector, tanto en la terminación nerviosa como a nivel del soma celular una vez transportado retroaxonálmente.

3.1.3 Funciones fisiológicas de las neurotrofinas

Múltiples funciones han sido asignadas a estas moléculas neurotróficas, entre las que podemos incluir la estimulación de la división celular en neuroblastos (DiCicco et al., 1993) y la de precursores de células gliales (Barres et al., 1994); o la modulación de la expresión de péptidos (Lindsay et al., 1994); así como efectos sobre las células implicadas en la respuesta inmune (Ehrhard et al., 1993). También han sido identificadas como agentes oncogénicos y como supresores de tumores, como se ha observado en diversos tumores humanos (Nakagawara et al., 1993).

Inicialmente, se ha demostrado que las células no neuronales presentes a lo largo de las vías de proyecciones neuronales sintetizaban NGF, así como también en sus puntos de destinación. También se ha hecho evidente, que las neuronas pueden ser una fuente de estas moléculas. Así se ha descubierto, mediante hibridación *in situ*, la presencia de mRNAs de BDNF y de NGF en neuronas corticales y en neuronas del hipocampo (Kokaia et al., 1993).

Los efectos producidos por el NGF han sido estudiados intensamente en células PC12. Estas son células neoplásicas proliferativas derivadas de

células cromafines adrenales provenientes de la cresta neural inmadura. La exposición de estas células al NGF interrumpe su división y activa la expresión fenotípica de muchas de las propiedades de las neuronas simpáticas maduras (Levi y Alemá, 1991). Aunque no se ha definido la función de las neurotrofinas expresadas por las células nerviosas, la coexpresión de estos factores y de sus receptores en dichas células sugiere una función autocrina o paracrina.

La actividad de las neuronas es un factor que podría influir en la expresión de las neurotrofinas, como sugiere el hecho que neuronas corticales mantenidas viables con BDNF secretan BDNF en respuesta a la activación de un canal de calcio sensibles a voltaje (Ghosh et al., 1994). Diversos estudios en ratones *knockout* transgénicos han confirmado la estricta dependencia del NGF de las neuronas simpáticas en desarrollo y han indicado que la NT-3 también tiene una función en este sistema. *Knockouts* de los genes *trkA* o de NGF presentaban una reducción masiva en el número de neuronas de los ganglios superiores cervicales (Smeyne et al., 1994). Esta reducción no era tan espectacular cuando los genes afectados eran *trkC* o el gen que da lugar a NT-3 (Farinas et al., 1994). Estudios en cultivos de células han demostrado que la variación en la dependencia de las neurotrofinas varía con el desarrollo. Células embrionarias de los ganglios simpáticos correspondientes al día 14,5 de gestación son mantenidas por la presencia de NT-3, pero no por la de NGF. Esta dependencia se revierte al momento del nacimiento (Birren y Anderson, 1993). Por otra parte, las neurotrofinas BDNF, NT-3 y NT-4 tienen efectos sobre la supervivencia, como se ha demostrado tanto en neuronas motoras (Yan et al., 1993) como en neuronas granulares (Kubo et al., 1995).

3.2 Receptores de baja afinidad: p75^{NTR}

Hasta hace poco tiempo en la literatura científica sólo se contemplaba el receptor de baja afinidad para el NGF (Johnson et al., 1986a). Un hecho constatado desde hace muchos años, del cual no se tenía una explicación clara, es que este receptor está presente en todas las neuronas, las que responden a NGF (Patil et al., 1990) y en las no sensibles a este agente neurotrófico. Posteriormente se comprobó que el receptor de baja afinidad para el NGF se une con la misma afinidad ($K_d \sim 10^{-9}$ M) al BDNF, a la NT-3 y a las NT4/5 (Hallböök et al., 1991), por lo que nos podemos referir a él como un único receptor de baja afinidad de las neurotrofinas.

El receptor de baja afinidad de las neurotrofinas fue el primer receptor neurotrófico caracterizado a nivel molecular. La identificación de la secuencia de aminoácidos y su clonación (Johnson et al., 1986a), permitieron saber que se trata de una proteína de 427 aminoácidos que contiene un péptido señal de 28 aminoácidos, un dominio extracelular con cuatro repeticiones de 40 aminoácidos con seis residuos de cisteína en las posiciones conservadas más por una región rica en serina/treonina, un sólo dominio transmembrana, y un dominio citoplásmico de 155 aminoácidos (Johnson et al., 1986a). El receptor se glicosila en su dominio extracelular hasta convertirse en una proteína de 75 kDa *in vitro* (p75^{NTR}).

El receptor p75^{NTR} pertenece a una familia de proteínas de superficie celular formada, entre otros, por los dos receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR-1 y TNFR-2), el antígeno Fas (CD95), los antígenos linfocitarios TOX40 y mu4-1BB, y los antígenos linfocitarios B (CD30 y CD40) (Dürkop et al., 1992). Esta familia de moléculas presenta un grado importante de homología en el patrón de repeticiones ricas en cisteínas a nivel del extremo N-terminal de su dominio extracelular que, en el caso de p75^{NTR}, determinan los diferentes sitios de unión de las neurotrofinas. A

nivel del dominio intracelular de p75^{NTR}, no se ha observado la presencia de ningún dominio del tipo serina/treonina quinasa o tirosina quinasa (Johnson et al., 1986a), aunque en la región C-terminal de p75^{NTR} se ha identificado un dominio que se corresponde con una secuencia aminoacídica, consenso para la unión a proteínas G así como otro dominio denominado "de muerte" (Chapman, 1995), homólogo al que está presente en la porción citoplasmática del receptor del factor TNF α (Chapman, 1995).

A pesar de que en un principio se desconocían respuestas biológicas mediadas únicamente por el receptor de baja afinidad (Loeb y Greene, 1993), en los últimos años han aparecido una serie de estudios que indican que p75^{NTR} es importante para la función neurotrófica, delineando funciones específicas para dicho receptor en la señalización neurotrófica (Dostaler et al., 1996).

La demostración más contundente de la relevancia de p75^{NTR} para la señalización neurotrófica la constituye el análisis de animales mutantes homocigotos para p75^{NTR} (Lee et al., 1992a). Dichos animales presentan deficiencias pronunciadas a nivel de la sensibilidad térmica debida a una pérdida de neuronas y fibras sensoriales periféricas implicadas en la nocicepción y la termocepción (Lee et al., 1992a). Asimismo, en estos animales la inervación de algunas dianas simpáticas parece depender de p75^{NTR} (Lee et al., 1994a). Por otra parte, en etapas precoces del desarrollo embrionario durante la fase de independencia neurotrófica, p75^{NTR} puede translucir señales en relación con la maduración neuronal a través de mecanismos autocrinos y/o paracrinos.

Una de las funciones más novedosas sugeridas para p75^{NTR} es su participación en la discriminación entre diferentes factores neurotróficos, contribuyendo así a modular la respuesta celular a las diversas neurotrofinas. En concreto, p75^{NTR} parece ser especialmente relevante para

la señalización inducida por la NT-4/5 (Rydén et al., 1995). Aunque se ha demostrado que $p75^{\text{NTR}}$ es capaz de unirse a las distintas neurotrofinas con baja afinidad, las tasas de asociación/disociación varían considerablemente, teniendo el NGF las tasas más rápidas y el BDNF las más lentas (Rodríguez-Tébar et al., 1990, 1992). Estas diferencias probablemente guardan relación con los distintos cambios conformacionales que experimenta $p75^{\text{NTR}}$ al interactuar con cada una de las neurotrofinas (Timm et al., 1994).

El receptor $p75^{\text{NTR}}$ aumenta aparentemente la sensibilidad de los receptores Trk a las neurotrofinas (Lee et al., 1994b). De nuevo, parecen existir diferencias en la acción moduladora de $p75^{\text{NTR}}$ sobre la función de los distintos receptores Trk (Hantzopoulos et al., 1994), presumiblemente a través de la interacción física entre los diferentes receptores y la afectación directa de la función de los receptores Trk, o a través de la actuación sobre las vías de señalización activadas por dicho receptor. Otra posibilidad es que los receptores $p75^{\text{NTR}}$ actúen como presentadores de las neurotrofinas para los receptores Trk (Jing et al., 1992; Ibáñez et al., 1993), consiguiendo así un incremento de la concentración local de las neurotrofinas alrededor de los receptores Trk. En cualquier caso, parece claro que la acción discriminadora de $p75^{\text{NTR}}$ podría depender de su capacidad de interactuar físicamente de forma diferenciada con los diversos receptores Trk y/o factores neurotróficos.

La función moduladora y discriminadora de la acción de las neurotrofinas atribuida al receptor $p75^{\text{NTR}}$ tiene traducción a nivel fisiológico; el $p75^{\text{NTR}}$ incrementa la capacidad de respuesta de las neuronas a las neurotrofinas en estadios específicos de la maduración neuronal e influye sobre la cinética de la maduración neuronal y el crecimiento neurítico (Dostaler et al., 1996). Incluso se ha sugerido que $p75^{\text{NTR}}$ podría ser relevante en mecanismos autocrinos (Hantzopoulos et al., 1994).

Asimismo, el receptor $p75^{\text{NTR}}$, como mediador del transporte retrógrado de las neurotrofinas (Yan et al., 1993; von Bartheld et al., 1996) también actúa de forma diferente según la neurotrofina (Curtis et al., 1995).

Para sorpresa de muchos investigadores, se ha comprobado en los últimos años que el receptor $p75^{\text{NTR}}$ puede mediar la muerte apoptótica de células neuronales (Frade et al., 1996; Bunone et al., 1997) y células gliales (Bonnefil et al., 1996). Sin embargo, la capacidad del $p75^{\text{NTR}}$ para inducir la muerte neuronal no debe resultarnos tan sorprendente si recordamos que el $p75^{\text{NTR}}$ pertenece a una superfamilia de receptores con capacidad de señalar la muerte celular (Dürkop et al., 1992).

En ausencia del NGF, el $p75^{\text{NTR}}$ induce la muerte de células neuronales sensibles a dicha neurotrofina, mientras que en su presencia el $p75^{\text{NTR}}$ pierde sus propiedades letales (Bunone et al., 1997). No obstante, en presencia de un receptor Trk, el receptor $p75^{\text{NTR}}$ pierde su capacidad para mediar tanto la muerte neuronal apoptótica por privación neurotrófica (Barrett y Bartlett, 1994) como la supervivencia neuronal en presencia de la neurotrofina correspondiente (Tagliatela et al., 1996). Por el contrario, es el receptor Trk el que media la acción inhibitoria de la muerte neuronal de las neurotrofinas (Tagliatela et al., 1996).

Independientemente de esta circunstancia, se ha propuesto que el $p75^{\text{NTR}}$ puede favorecer la muerte o la supervivencia de las células neuronales dependiendo del estado del desarrollo embrionario (Barrett y Bartlett, 1994; Frade et al., 1996). En el caso de las neuronas sensoriales, durante el período de inervación el $p75^{\text{NTR}}$ es aparentemente necesario para la supervivencia estimulada por el NGF, mientras que en etapas más tardías del desarrollo embrionario el receptor $p75^{\text{NTR}}$ probablemente media una señal apoptótica (Barrett y Bartlett, 1994). En la edad postnatal, el bloqueo de la expresión del $p75^{\text{NTR}}$ permite evitar la muerte apoptótica de neuronas sensoriales inducida por axotomía (Cheema et al., 1996).

El receptor p75^{NTR} también participa en el proceso de regeneración nerviosa. Tras producirse la lesión de un nervio periférico en la edad adulta, se origina un incremento muy importante de la expresión de p75^{NTR} en el segmento distal del nervio lesionado que se localiza a nivel de las células de Schwann (Taniuchi et al., 1988).

3.3 Receptores de alta afinidad: Trk

Los receptores Trk son considerados como una subfamilia integrada en la gran familia de receptores con actividad tirosina quinasa. En esta familia, se incluyen más de 30 receptores como los receptores de la insulina, el EGF, el PDGF, los FGF's, etc. Todos ellos comparten una serie de características a nivel estructural y de las vías de señalización que emplean. Este hecho ha facilitado enormemente el estudio de los mecanismos de transducción de señal utilizados por los receptores Trk. Es necesario reseñar que la gran mayoría de datos de que disponemos han sido obtenidos a partir del estudio del receptor TrkA. No obstante, existen evidencias de que los diferentes receptores Trk interaccionan de una forma similar con componentes de señalización a nivel intracelular.

El primero de la familia de receptores Trk en ser conocido fue el TrkA, inicialmente identificado como una proteína oncogénica fusionada con la tropomiosina no muscular en un carcinoma de colon humano (Martín-Zanca et al., 1986). El aislamiento y la caracterización molecular de este oncogén quimérico permitió la posterior identificación del alelo normal, el protooncogén *trkA* (Martín-Zanca et al., 1989). Este protooncogén codifica una proteína transmembrana de 790 aminoácidos, con un péptido señal de 32 aminoácidos, un dominio de unión al ligando rico en sitios de N-glicosilación, un dominio transmembrana único, una

región catalítica con dominio tirosina quinasa y una cola corta C-terminal de 15 aminoácidos (Martín-Zanca et al., 1989).

El análisis bioquímico de células NIH-3T3 que expresan el protooncogén *trkA* indica que el principal producto traduccional de este gen es una glicoproteína de 110 kDa con un esqueleto polipeptídico de 80 kDa. La glicoproteína de 110 kDa se glicosila durante su transporte a la membrana plasmática, dando lugar a la forma madura de 140 kDa (Martín-Zanca et al., 1989). Si bien tanto gp110^{*trkA*} como gp140^{*trkA*} presentan actividad tirosina quinasa, sólo la forma de 140 kDa está presente en la superficie celular (Martín-Zanca et al., 1989).

La comprobación posterior de que la expresión del gen *trkA* se localiza en estructuras anatómicas del SN y en neuronas con capacidad de responder al NGF (Martín-Zanca et al., 1990; Kaplan et al., 1991b), propició que se hipotetizara la implicación del protooncogén *trkA* en la mediación de los efectos biológicos del NGF. Esta hipótesis se confirmó al comprobarse que el NGF provoca la fosforilación a nivel de residuos de tirosina y estimula la actividad tirosina quinasa del receptor TrkA, siendo así identificado como un receptor para el NGF (Kaplan et al., 1991a, 1991b; Klein et al., 1991a).

Recientemente se han identificado las regiones extracelular de TrkA implicadas en la interacción con el NGF (Pérez et al., 1995; Macdonald y Meakin, 1996). El receptor TrkA también es capaz de interactuar con la NT-3 y las NT-4/5 (Kaplan et al., 1991a, 1991b; Klein et al., 1991a, 1991b), aunque estudios de afinidad sugieren que TrkA utiliza diferentes sitios de unión para unirse al NGF y a la NT-3 (Cordon-Cardo et al., 1991).

Trabajos más recientes han permitido establecer que el protooncogén *trkA* codifica una segunda isoforma de 796 aminoácidos con actividad tirosina quinasa, que difiere de la primera por la presencia de 6 residuos aminoacídicos adicionales en el dominio extracelular (Barker et al., 1993).

Aunque no se han realizado estudios comparativos entre las dos isoformas, aparentemente tienen propiedades biológicas similares (Klein et al., 1991a).

El segundo receptor de la familia Trk en ser identificado fue TrkB. Como TrkA, es una molécula de 145 kDa de peso molecular y 821 aminoácidos, altamente glicosilada y con todas las características propias de los receptores de superficie con actividad tirosina quinasa (Klein et al., 1990a, b). La comparación de las secuencias de aminoácidos de TrkA y TrkB indica un elevado grado de homología, tanto en el dominio extracelular (57% homología, 38% identidad) como en la región catalítica tirosina quinasa (88% homología, 73% identidad). Además, ambas moléculas exhiben una cola C-terminal de 15 aminoácidos (Klein et al., 1990a, b).

TrkB constituye el receptor funcional para el BDNF y las NT-4/5, a pesar de que también es capaz de interactuar con la NT-3 (Berkemeier et al., 1991; Klein et al., 1991b; Dechant et al., 1993b). Las tres neurotrofinas provocan la fosforilación de trkB a nivel de los residuos de tirosina presentes en su dominio intracitoplasmático y, secundariamente, inducen su actividad tirosina quinasa intrínseca (Berkemeier et al., 1991; Klein et al., 1991b). Estudios de mutagénesis dirigida parecen indicar que el receptor TrkB cuenta con al menos dos sitios de unión diferentes en su dominio extracelular (Pérez et al., 1995).

El locus del protooncogén *trkB* es grande y complejo con un complicado patrón transcripcional, habiéndose identificado un gran número de transcritos de diferentes tamaños (Dechant et al., 1993b; Strohmaier et al., 1996). Codifica al menos tres isoformas no catalíticas (Dechant et al., 1993b; Shelton et al., 1995), aunque hasta el momento sólo se ha documentado la expresión de la proteína gp95^{trkB} (Klein et al., 1990b). Se trata de una glicoproteína idéntica a gp145^{trkB} en los 465 primeros aminoácidos de la secuencia primaria, que comprende: el péptido señal, el

dominio extracelular y la región transmembrana. Sin embargo, gp95^{trkB} tiene un dominio citoplasmático muy corto de 23 aminoácidos, de los cuales los últimos 11 no son homólogos a ninguna de las secuencias presentes en gp145^{trkB} (Klein et al., 1990b). Se ha predicho la existencia de una segunda isoforma no catalítica con una secuencia casi idéntica a la de gp95^{trkB} (Middlemas et al., 1991).

El protooncogén *trkC* es el tercer miembro de la familia génica de receptores Trk. El *locus trkC* codifica dos formas de receptores: Las isoformas catalíticas y las isoformas truncadas. Hasta la fecha se han descrito varias isoformas catalíticas de TrkC (Shelton et al., 1995). La isoforma catalítica prototípica es un receptor tirosina quinasa de 825 aminoácidos y un peso molecular de 145 kDa con todos los rasgos característicos de la familia de receptores Trk. El dominio extracelular de TrkC presenta con TrkA y TrkB una homología del 54% y 52% y una identidad del 35% y 39%, respectivamente. Los grados de homología son mucho mayores cuando se comparan los dominios catalíticos (86% y 90% de homología con TrkA y TrkB, respectivamente). TrkC también presenta un extremo corto C-terminal de 15 aminoácidos, como los otros miembros de la familia Trk. Las otras isoformas catalíticas de TrkC incorporan un número adicional y variable de residuos aminoacídicos a nivel del dominio intracitoplasmático (Shelton et al., 1995).

Por otra parte, las isoformas no catalíticas o truncadas de TrkC tienen una estructura similar a la de los receptores TrkB truncados, de forma que carecen del dominio tirosina quinasa. Hasta la fecha se han descrito cuatro formas truncadas diferentes de TrkC, difiriendo en el número de residuos aminoacídicos citoplasmáticos (Shelton et al., 1995). TrkC parece ser el receptor preferido de la NT-3, no siendo capaz de unirse ni al BDNF ni al NGF (Lamballe et al., 1991). Aunque las respuestas biológicas a la NT-3

están mediadas por TrkC (Lamballe et al., 1991), datos obtenidos *in vitro* sugieren que las diferentes isoformas catalíticas de TrkC difieren en su capacidad para mediar la actividad de la NT-3 (Lamballe et al., 1993).

3.3.1 Estructura molecular de los receptores de alta afinidad

La estructura molecular del receptor de *baja afinidad* de las neurotrofinas ha sido resuelta con elevada precisión. Sin embargo, existen discrepancias sobre la estructura de sus receptores de *alta afinidad*. La solución a dicha controversia se ha articulado bajo dos modelos hipotéticos.

El primer modelo ha sido denominado heterodímero $p75^{NTR}/Trk$ (Hempstead et al., 1991), y en el se establece que los sitios de unión de alta afinidad para las diferentes neurotrofinas se crean por la asociación de $p75^{NTR}$ y un receptor Trk específico para una neurotrofina determinada. Tanto los receptores Trk como el receptor $p75^{NTR}$, individualmente, tendrían la característica de unión de baja afinidad (Kaplan et al., 1991a), siendo la coexpresión la que propiciaría la generación de sitios de alta afinidad (Hempstead et al., 1991; Huber y Chao, 1995).

El modelo heterodímero ha sido reiteradamente cuestionado al ser difícil de demostrar la asociación entre los dos tipos de receptores, Trk y $p75^{NTR}$ (Meakin y Shooter, 1992; Jing et al., 1992). Recientemente, se ha podido observar la capacidad de TrkA para inmovilizar $p75^{NTR}$ en la membrana celular, formando así complejos de alta afinidad (Huber y Chao, 1995). En los últimos años se han publicado una serie de trabajos que han reimpulsado el modelo heterodímero Trk/ $p75^{NTR}$. Entre las aportaciones al respecto encontramos que para que se generen complejos de alta afinidad a NGF, se precisa la presencia de al menos diez veces más moléculas $p75^{NTR}$ que de TrkA (Mahadeo et al., 1994). Aparentemente la coexpresión de $p75^{NTR}$ y un receptor Trk da lugar a un incremento de sensibilidad a la neurotrofina correspondiente (Lee et al., 1994b) y una mayor

discriminación de las neurotrofinas (Benedetti et al., 1993). Se ha hipotetizado que el dominio citoplasmático de p75^{NTR} podría interactuar con los receptores Trk, puesto que la unión de alta afinidad de las neurotrofinas parece requerir este dominio para la señalización transmembrana (Hempstead et al., 1991). Cuando se introducen mutaciones en el dominio citoplasmático de p75^{NTR}, el receptor es incapaz de generar sitios de alta afinidad (Hempstead et al., 1990).

El segundo modelo ha sido denominado homodímero Trk, en el que se establece que sitios de alta afinidad están constituidos exclusivamente por receptores Trk (Klein et al., 1991a; Ibáñez et al., 1992; Meakin et al., 1992). De acuerdo con este modelo, los dímeros Trk por sí solos serían capaces de interactuar con las neurotrofinas con alta afinidad desencadenando las respuestas biológicas. Este modelo está avalado por las observaciones Klein y colaboradores (1991a) en las que se describe que el NGF es capaz de unirse con alta afinidad a TrkA en ausencia de p75^{NTR} y es capaz de inducir la proliferación celular, la supervivencia y/o la diferenciación de células no neuronales.

Este último modelo presupone que p75^{NTR} no participa en las uniones de alta afinidad para las neurotrofinas. De hecho, anticuerpos policlonales dirigidos contra p75^{NTR} no reconocen las uniones de alta afinidad en células PC12, ni en cultivos primarios de ganglios espinales (Meakin y Shooter, 1991a). Por otra parte, moléculas de NGF modificadas, incapaces de interactuar con p75^{NTR}, sí pueden mediar la supervivencia celular y el crecimiento neurítico en cultivos neuronales (Ibáñez et al., 1992).

En cualquier caso, resulta evidente que se debe ser muy precavido a la hora de interpretar gran parte de los experimentos que respaldan ambos modelos, dado que un determinado receptor puede comportarse de formas diversas en función del tipo celular en el que se exprese.

3.3.2 Funciones biológicas de los receptores Trk

Los receptores de alta afinidad son los responsables de la mediación de la mayoría de efectos biológicos inducidos por las neurotrofinas, incluidas las respuestas de diferenciación y supervivencia neuronal. Sin embargo, la misma controversia que existe sobre la naturaleza molecular de los receptores de alta afinidad se ha trasladado a la participación de los diferentes receptores conocidos, p75^{NTR} y la familia Trk, en la mediación de los efectos biológicos. Resulta obvio que, independientemente de la función de p75^{NTR}, la activación de los receptores Trk de las neurotrofinas es crucial y necesaria para el desencadenamiento de la mayoría de las respuestas celulares de las neurotrofinas (Klein et al., 1991b; Loeb et al., 1991; Ibáñez et al., 1992; von Bartheld et al., 1996), incluida la internalización y el transporte retrógrado de las neurotrofinas (Loeb y Greene, 1993; von Bartheld et al., 1996).

La identificación de diferentes isoformas catalíticas y no catalíticas de los receptores Trk generadas a través de mecanismos de *splicing* alternativo (Shelton et al., 1995) ha planteado la existencia de nuevos procesos de regulación de las respuestas celulares a las neurotrofinas mediadas por los receptores Trk. Aunque todavía se desconocen en gran medida las funciones de las diferentes isoformas, éstas difieren en su capacidad para señalizar y/o interactuar con sus ligandos endógenos. Por ejemplo, se ha comprobado cómo las isoformas catalíticas de TrkC con una inserción a nivel de su dominio tirosina quinasa intracitoplasmático son capaces de mediar respuestas de diferenciación y transformación, aunque no de supervivencia (Garner y Large, 1994). En cambio, en los mamíferos se han identificado isoformas catalíticas incapaces de estimular la neuritogénesis (Lamballe et al., 1993).

Por consiguiente, es concebible que distintas isoformas de receptores Trk sean responsables de la mediación de un subgrupo de respuestas, y que

la activación de múltiples receptores Trk diferentes sea precisa para obtener toda la gama de efectos biológicos de las neurotrofinas. También se ha demostrado cómo, además de la función de señalización intracelular, los receptores TrkB y TrkC también podrían funcionar como moléculas de adhesión neuronal, ya que presentan en sus dominios extracelulares motivos homólogos con repeticiones presentes en moléculas de adhesión celular tipo N-CAM (*neural cell adhesion molecules*) (Schneider y Schweiger, 1991).

Aún no se dispone de suficiente información sobre la funcionalidad de las isoformas truncadas de los receptores Trk. Las formas truncadas no catalíticas podrían competir con las formas catalíticas por el ligando endógeno o incluso podrían actuar formando barreras contra la difusión de las neurotrofinas. Es posible que interaccionen con otras subunidades ancladas en la membrana celular con capacidad de señalización intracelular. Se ha sugerido en base al patrón de expresión de las isoformas truncadas de TrkB (a nivel del revestimiento ependimario y los plexos coroideos), su implicación en la eliminación o en el transporte de BDNF a través de la barrera hematoencefálica, para a continuación poder actuar en el hipocampo (Barbacid et al., 1991). Otra posible función es que los receptores truncados actúen como inhibidores de sus isoformas catalíticas en aquellas células en las que se coexpresen. Tras interaccionar con su correspondiente ligando, las formas truncadas podrían formar heterodímeros inactivos con las formas catalíticas de los receptores Trk.

3.4 Vías de transducción de señales asociadas a los receptores Trk

3.4.1 Fosforilación/autofosforilación de los receptores Trk

La fosforilación a nivel de residuos de tirosina de los receptores Trk es el primer paso en la activación de sus dominios tirosina quinasa y el

inicio de la transmisión de señal a nivel intracelular (revisado por: Kalpan y Stephens, 1994). La autofosforilación en tirosinas es un fenómeno generalizado en relación con la activación de los receptores por sus correspondientes ligandos. Los receptores, mediante la interacción con las neurotrofinas, se dimerizan o se oligomerizan, propiciando así la transfosforilación intermolecular (revisado por: Ullrich y Schlessinger, 1990). Con la fosforilación los receptores experimentan cambios conformacionales en sus dominios citoplasmáticos, cambios necesarios tanto para la activación catalítica como para facilitar su interacción con factores citoplasmáticos señalizadores (Kaplan y Stephens, 1994).

En el caso del TrkA, la activación catalítica se produce de forma inmediata tras la interacción con su ligando endógeno principal, el NGF (Kaplan et al., 1991a; Klein et al., 1991a). Este mecanismo de activación pasa por la formación previa de homodímeros, y probablemente también oligómeros de TrkA, a través de la interacción con NGF (Clary et al., 1994), así como por la autofosforilación del receptor TrkA a nivel de residuos de tirosina. Coherentemente con este modelo, diferentes inhibidores de quinasas, como la metil-5'-tioadenosina (MTA), el K252-a, el K252-b, la estaurosporina o algunas trifostinas, neutralizan las acciones biológicas de las neurotrofinas a través de la inhibición de la autofosforilación de los receptores Trk (Ohmichi et al., 1992a, 1993a).

La internalización de las neurotrofinas parece depender de su interacción con el correspondiente receptor Trk, aunque no de la autofosforilación de este último. Asimismo, se cree que la posterior reducción de la actividad catalítica de TrkA es debida a la desfosforilación y a la internalización de los receptores TrkA.

La fosforilación en tirosina de los Trk tiene dos funciones básicas. En primer lugar, se ha demostrado mediante experimentos de mutagénesis dirigida la existencia de tres residuos de fosfotirosina necesarios para la

transfosforilación eficaz y eficiente de otros residuos de tirosina, a su vez esenciales para la propagación de la señal neurotrófica (Kaplan y Stephens, 1994). En segundo lugar, la fosforilación de los receptores Trk proporciona lugares de anclaje para proteínas dianas específicas (Kaplan y Stephens, 1994). Estos lugares de autofosforilación representan estructuras de reconocimiento para proteínas con dominios de homología Src Tipo 2 (SH2). Los dominios SH2 son secuencias conservadas de aproximadamente 1000 aminoácidos que se encuentran en varias moléculas de señalización y proteínas oncogénicas (revisado por Cohen et al., 1995). Los dominios SH2 a menudo se acompañan de otras secuencias conservadas de aproximadamente 50 aminoácidos, denominadas dominios de homología Src Tipo 3 (SH3), que probablemente interaccionan de forma cooperativa con dominios SH2, regulando así las interacciones entre proteínas durante la transducción de señal (revisado por: Schlessinger y Ullrich, 1992; Cohen et al., 1995).

La interacción de los dominios SH2 con fosfotirosinas específicas presentes en los receptores TrkA permite la interacción específica con diversas proteínas reguladoras y proteínas enzimáticas, iniciándose así múltiples vías de señalización intracelulares. La especificidad de los dominios SH2 es elevada no sólo por su afinidad a fosfotirosinas en dominios específicos sino también porque poseen afinidad por los dominios cercanos carboxi-terminales a las fosfotirosinas (Piccione et al., 1993). Igualmente, la especificidad de los dominios SH3 parece estar determinada por aminoácidos que rodean los residuos invariables (Erpel et al., 1995).

Las proteínas con dominios SH2 que interaccionan con los dominios citoplasmáticos fosforilados de los receptores Trk pueden dividirse en dos grupos. El primer grupo incluye proteínas con actividad enzimática que se activan al interaccionar con el receptor, ya sea por modulación no covalente o por fosforilación. En este grupo se encuentran proteínas como

la PLC- γ (Stephens et al., 1994), la subunidad p85 de la PI-3K (Obermeier et al., 1993b), la isoforma ERK1 (Loeb et al., 1992) y la proteína GAP, entre otras (Obermeier et al., 1993b). El segundo grupo lo integran proteínas adaptadoras (proteínas que permiten la aproximación del receptor a determinados sustratos o a componentes reguladores de subunidades catalíticas). Entre éstas destacan la Grb2 (Rozakis-Adcock et al., 1992) y la Shc (Obermeier et al., 1993b; Stephenes et al., 1994) (Fig. 7).

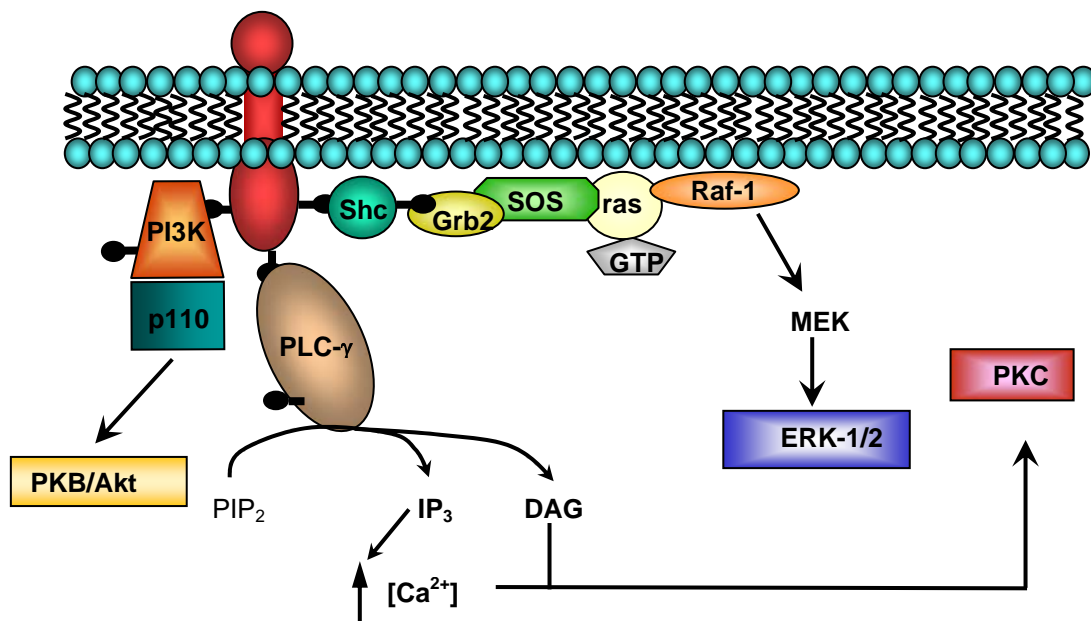


Figura 7. Vías de transducción de señales activadas por los receptores Trk

3.4.2 La vía de transducción p21Ras/MAPK

Las proteínas adaptadoras Shc, Grb2/Sem-5 y mSOS

Las proteínas Shc son sustratos importantes de la actividad de fosforilación inducida por NGF en las células neuronales (Rozakis-Adcock et al., 1992). El gen *Shc* codifica diferentes isoformas de pesos moleculares de 46, 52 y 66 kDa (Pelicci et al., 1992). La interacción entre el dominio SH2 de estas proteínas adaptadoras (Pelicci et al., 1992) y la correspondiente fosfotirosina a nivel de receptor Trk (el residuo P-Tyr⁴⁹⁰ en

el caso de TrkA) (Obermeier et al., 1993b), inicia una vía de señalización que conocemos como la vía p21Ras/MAPK, que aparentemente es crítica para las respuestas de diferenciación neuronal en relación con la estimulación neurotrófica (revisado por: Segal y Greenberg, 1996).

La proteína Shc fosforilada se asocia a través de su fosfotirosina con otra proteína conocida, la Grb2 (Rozakis-Adcock et al., 1992), homóloga a la proteína Sem-5 de *Caenorhabditis elegans*. Grb2 está integrada por un dominio SH2 flanqueado por dos dominios SH3 (SH3-SH2-SH3). Los dominios SH3 de Grb2 median su asociación con una tercera proteína, mSOS (*son of sevenless*), que se ha identificado en mamíferos como proteína homóloga de una proteína implicada en la regulación del desarrollo ocular de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. Previamente a esta interacción, el receptor Trk fosforila la proteína mSOS inicialmente anclada en la membrana. No obstante, se desconoce hasta qué punto dicha fosforilación es relevante para la función de mSOS. La proteína mSOS actúa junto con otros factores intercambiadores como una proteína liberadora del nucleótido difosfatado de guanina, facilitando la sustitución de los nucleótidos GDP por GTP en p21Ras (revisado por: McCormick, 1994).

La proteína G monomérica p21Ras

p21Ras es la denominación genérica de una familia de proteínas G monoméricas de ~21 kDa de peso molecular con capacidad de unirse e hidrolizar moléculas de GTP durante el curso de su activación (revisado por: Wiesmüller y Wittinghofer, 1994). p21Ras en condiciones normales se asocian con la superficie citoplasmática de la membrana celular a través de una cola lipídica (Casey, 1995). La activación de las proteínas p21Ras constituye un acontecimiento crítico en la diferenciación y supervivencia

neuronal inducida por las neurotrofinas. Tanto el NGF como el BDNF incrementan los niveles de p21Ras activado en células neuronales, aunque aparentemente de forma diferente (Carter et al., 1995; Zirrgiebel y Lindholm, 1996).

La introducción de formas activas de p21Ras en células neuronales, ya sea mediante microinyección intracitoplasmática, microtrituration (Borasio et al., 1996; Weng et al., 1996), infección viral (Simpson et al., 1991) o transfección génica (Rukenstein et al., 1991), estimula el efecto promotor de las neurotrofinas de diferenciación y de supervivencia neuronal. Por otra parte, la expresión de un mutante inhibitorio de p21Ras (Szeberenyi et al., 1992) así como la inyección intracitoplasmática de anticuerpos anti-p21Ras (Nobes y Tolkovsky, 1995) en células neuronales interfieren con las respuestas biológicas a las neurotrofinas. De hecho, en las células neuronales el NGF activa p21Ras a través del receptor TrkA, produciendo un marcado aumento de la forma p21Ras-GTP (Ng y Shooter, 1993). El análisis cinético demuestra que la activación de p21Ras estimulada por las neurotrofinas es mantenida, a diferencia de lo que ocurre con otros factores no neurotróficos que tan sólo producen una activación transitoria de p21Ras (Ng y Shooter, 1993).

La actividad biológica de p21Ras está aparentemente controlada por dos familias de proteínas: los factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GRF's; *guanine nucleotide exchange factors*) y las proteínas activadoras de la actividad guanosina trifosfatasa (GAP; *GTPase-activating protein*). Mientras que la actividad GRF estimula el paso de p21Ras-GDP a p21Ras-GTP (Wolfman y Macara, 1990), la actividad GAP encarnada en una familia de proteínas con un peso molecular aproximado de 120 kDa favorece la actividad GTPasa de p21Ras y por tanto la aparición de las formas p21Ras-GDP (Revisado por: McCormick, 1994). De esta forma, la

activación de p21Ras está sometida a un estricto control gracias al equilibrio existente entre estas dos actividades reguladoras.

En las células neuronales, las neurotrofinas estimulan un incremento tanto de la actividad GRF como de la actividad GAP, aparentemente a través de la activación de los receptores Trk. Recientemente se han obtenido evidencias indirectas *in vivo* de la implicación de GAP en el control estricto de la actividad p21Ras, a su vez necesaria para la supervivencia neuronal y un adecuado desarrollo del sistema nervioso (Henkemeyer et al., 1995). No obstante, no resulta del todo evidente que GAP participe en la activación inducida por las neurotrofinas en las células neuronales (Muroya et al., 1992).

En las células neuronales expuestas a las neurotrofinas, la forma activa de p21Ras interacciona con la *Ser/Thr* quinasa Raf, fosforilándola y activándola (Fabian et al., 1994; Leever et al., 1994). De hecho, se ha demostrado la implicación de Raf en la mediación de la señal neurotrófica (Traverse y Cohen, 1994).

Activación de la quinasa Raf-1

Raf-1 es una *Ser/Thr*-quinasa de 70-75 kDa que contiene el dominio catalítico en el extremo C-terminal, siendo el resto ocupado por un dominio regulador. La interacción del dominio regulador con la forma p21Ras-GTP conduce a la translocación de Raf a la membrana plasmática, donde se activa por un mecanismo desconocido (Stokoe, 1994). La activación de Raf-1 va acompañada de una hiperfosforilación del enzima, que parece afectar a centros del dominio regulador que son diferentes de los centros de fosforilación. Una quinasa candidata a ser la responsable de esta hiperfosforilación es la PKC aunque existe controversia en este punto (Morrison et al., 1993). Algunas *Tyr*-quinasas también podrían actuar como

activadoras de Raf-1, ya que esta presenta fosforilación en una tirosina esencial para su actividad (Fabian et al., 1993), y que la *Tyr*-quinasa p56^{lck} puede fosforilar y activar Raf-1. Por otra parte, el hecho que Raf-1 contenga un dominio parecido a los “dedos de zinc” y al dominio de unión de la PKC a los lípidos (Force et al., 1994) hace que sea posible que Raf-1 este activada por un mecanismo que implica un segundo mensajero y que sea parecido al mecanismo de activación de la PKC. No se ha podido detectar p21Ras en las preparaciones de Raf-1 activa, demostrando así que una vez se activa Raf-1 no requiere p21Ras-GTP para mantener esta activación (Leevers et al., 1994).

Una vez activada Raf, fosforila y estimula la actividad de la proteína MEK (Alessi et al., 1994; Jaiswal et al., 1994; Lange-Carter y Johnson, 1994; Peraldi et al., 1995).

Modulación de la actividad *Ser/Thr*-quinasas de MEK

Los enzimas MEK constituyen una familia evolutivamente conservada de *Ser/Thr*-quinasas que, hasta hoy en día en mamíferos han sido descritas tres isoformas con elevada homología (85%): MEK-1a (44 kDa), MEK-1b (41 kDa) y MEK-2 (45 kDa). El mecanismo de activación de MEK-1 implica fosforilación en serinas (*Ser*²¹⁸ y *Ser*²²²) (Ahn et al., 1993; Alessi et al., 1994), activación debida a Raf-1 o a su autofosforilación (Gardner et al., 1994). Las mutaciones de estos residuos de serina han demostrado ser importantes para la actividad. Residuos de serina, treonina y tirosina que se encuentran en la entrada del centro activo han de estar fosforilados para mantener el centro de fijación abierto para permitir la unión de los sustratos. Aparentemente, la activación de MEK es necesaria y suficiente para ciertos aspectos de la diferenciación de las células neuronales. Los únicos sustratos conocidos de MEK son los

enzimas MAPK –también llamados ERK. En células neuronales estimuladas con neurotrofinas, es posible comprobar cómo MEK cataliza la fosforilación de las MAPK a nivel de residuos de treonina y tirosina (Payne et al., 1991), necesaria para su activación (Kosako et al., 1992) y posterior translocación al núcleo celular. En buena lógica, las neurotrofinas estimulan la fosforilación a nivel de tirosinas, activación y translocación nuclear de las MAPK (Gotoh et al., 1990). Asimismo, se ha demostrado *in vivo* la capacidad de las neuronas periféricas para transportar retrógradamente Raf, MEK y MAPK (Johanson et al., 1995).

Quinasas activadas por mitógenos: MAPK/ERK

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK, o bien un subgrupo de ellas las ERK, *extracellular regulated kinases*) son una familia de *Ser/Thr*-quinasas ampliamente conservadas, que son activadas en la respuesta celular frente a una gran variedad de estímulos extracelulares (revisado por: Su y Karin, 1996; Garrington y Johnson, 1999) (Fig. 8).

Las ERK se activan por doble fosforilación en residuos de treonina y tirosina. Esta fosforilación está catalizada por las MEK (las MAPK quinasa, MAPKK,) que, a su vez, es fosforilada y activada por la *Ser/Thr*-quinasa Raf (la MAPKK quinasa, MAPKKK) (Nishida y Gotoh, 1993; Davis, 1994; Cobb y Goldsmith, 1995; Kiyakis y Avruch, 1996). Raf se activa frente a la interacción con GTPasas monoméricas de bajo peso molecular y/o con otras proteínas quinasas.

Si describimos brevemente esta vía de transducción, las ERK se activan por diversos factores de crecimiento, interviniendo en la progresión del ciclo celular, en el crecimiento celular y en una gran variedad de paradigmas celulares (Nishida y Gotoh, 1993; Davis, 1994; Cobb y Goldsmith, 1995; Kiyakis y Avruch, 1996). Las ERK se activan mediante

una cascada de transducción conocida en la cual participan Shc, Grb2, Ras, Raf y MEK (Vojtek y Der, 1998; Garrington y Johnson, 1999).

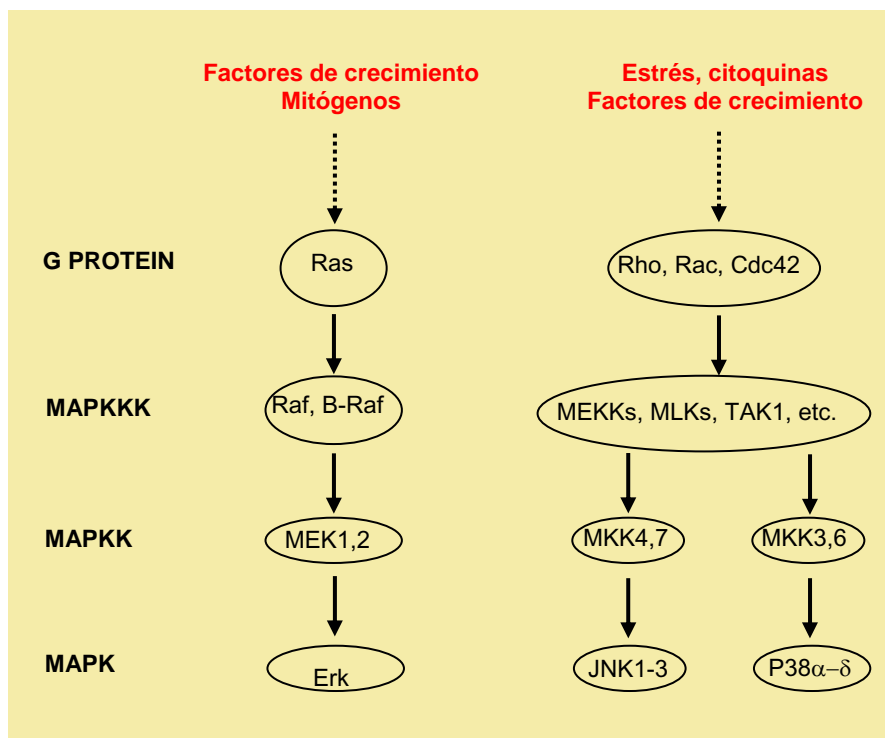


Figura 8. Vías de transducción de señal de la familia de las MAP quinasas. Las MAPK se agrupan en tres grandes grupos: ERK, JNK y p38 MAPK y se activan por fosforilación. Los estímulos externos activan a las MAPKKK las cuales, a su vez, fosforilan las MAPKK que activarán a las MAPK.

Esta cascada de transducción se inicia generalmente por la interacción de un factor trófico con su correspondiente receptor con actividad *Tyr*-quinasa, produciéndose la autofosforilación del receptor. La fosforilación de los receptores activa p21Ras que fosforila Raf. La fosforilación de Raf 1 activa las ERK1/2 a través de la activación de las MEK1/2. Esto lleva a la posterior translocación de las ERK al núcleo. Allí van a fosforilar a una serie de factores de transcripción, entre los que se encuentran CREB, SRF, TCF, Elk-1, c-myc, c-jun, c-fos, etc. Así como otras familias de quinasas, las quinasas S6 ribosomales de 90 kDa (p90Rsk) y la MAPKAP quinasa 2 (Zhao et al., 1995; Segal y Greenberg, 1996).

Actividad RSK y fosforilación de CREB

Las RSK (p90Rsk) son *Ser/Thr*-quinasas de 90 kDa. Las RSK son las únicas entre las quinasas *Ser/Thr* que contienen dos dominios funcionales: un dominio N-terminal que fosforila los sustratos de RSK y un dominio C-terminal implicado en el mecanismo de activación de las RSK. Las isoformas de RSK son activadas virtualmente por todas las moléculas de señalización extracelulares que estimulan la vía de p21Ras/MAPK, tales como los factores de crecimiento y las citoquinas así como muchas hormonas y neurotransmisores. Los sustratos de RSK incluyen factores de transcripción como CREB (*cAMP response element-binding protein*), el receptor- α de estrógenos (ER α), I κ B α /NF κ B y c-Fos (Xing et al., 1996; Ghoda et al., 1997; Schouten et al., 1997; Joel et al., 1998). Además, RSK se une a los poliribosomas y fosforila varias proteínas en el complejo ribosomal (Angenstein et al., 1998). Finalmente, se ha visto que RSK fosforila también GSK-3 y la L1 CAM (neural cell adhesión molecule) (Sutherland et al., 1993b; Wong et al., 1996). La diversidad de estos sustratos sugiere que RSK está implicada en la regulación de una amplia gama de funciones celulares.

La familia de RSK incluye tres isoformas: RSK1, RSK2 y RSK3 que son codificadas por genes distintos y presentan un grado de homología entre 75 % y 80 % (Zhao et al., 1995). Los tres cDNAs dan lugar a isoformas de 70 kDa. Su peso molecular más elevado es debido a una hiperfosforilación después de ser activada. Aunque ampliamente distribuidos, los tres miembros de la familia de RSK, muestran una expresión variable en el tejido, sugiriendo que pueden estar implicados en diversas funciones en el organismo.

Recientemente, se ha descubierto una nueva familia de RSK que incluye MSK (*mitogen- and stress-activated protein kinase*) y RSK-B

(New et al., 1999). Estas quinasas (MSK) contienen dos dominios proteína quinasa en un sólo polipéptido típico de la familia de RSK y comparten una identidad de la secuencia aminoacídica del 90 %. MSK son sustratos de ERK, pero son también fosforiladas por p38 MAPK.

Los miembros de la familia de RSK están presentes en el citoplasma así como en el núcleo, según se ha demostrado por las técnicas de inmunocitoquímica y de fraccionamiento de cultivos de células HELA (Chen et al., 1992). La adición de factores de crecimiento, da lugar a la activación de RSK citosólica y RSK nuclear. Además, después de esta activación parte de la RSK citosólica también se transloca al núcleo. Estos experimentos fueron realizados sin referencia a las isoformas individuales de RSK. La activación y la translocación nuclear de RSK están relacionadas directamente con la expresión génica, lo que indica que RSK puede fosforilar y activar factores de transcripción (Chen et al., 1992, 1993). De hecho, un grupo de factores de transcripción se han identificado como sustratos de RSK entre ellos destaca CREB, un regulador importante de la transcripción que se le ha implicado en la proliferación del timocito y en la apoptosis (Barton et al., 1996). Las señales extracelulares que activan CREB inducen su fosforilación en Ser^{133} , lo que conduce al reclutamiento de los coactivadores transcripcionales CBP o p300 y a la inducción de los genes que contienen CRE (*cAMP response element*) en el promotor. Varias quinasas fosforilan CREB en Ser^{133} , incluyendo PKA, CaMK y PKB (Du y Montminy, 1998). Se ha aclarado un mecanismo de señalización mediante el cual los factores de crecimiento activan CREB a través la vía p21Ras/ERK (Ginty et al., 1994; Xing et al., 1996). ERK activa una quinasa que a su vez activa y fosforila a CREB. La purificación y la secuenciación de la quinasa que activa CREB, a través de las cascadas de transducción iniciadas por factores de crecimiento, indicaron que era idéntica a la RSK2. ERK fosforila también un complejo de factores de

transcripción compuesto por Elk1 y el factor suero-respuesta que une el elemento Suero-respuesta (SRE) en el promotor de *c-fos* (Marais et al., 1993).

3.4.3 La vía de transducción PI-3K/PKB

La activación de los receptores Trk por sus respectivos ligandos induce la asociación y activación de la PI-3K (Carter y Downes, 1992; Ohmichi et al., 1992b). Existe una cierta controversia sobre la capacidad de la PI-3K para interaccionar directa o indirectamente con los receptores Trk (Wang et al., 1995a), aunque sí parece claro que las neurotrofinas inducen la actividad de este enzima mediante su fosforilación en tirosinas (Ohmichi et al., 1992b; Soltoff et al., 1992) y su posterior translocación al compartimento nuclear por el NGF en células PC12 (Neri et al., 1994).

La PI-3K es un heterodímero compuesto de una subunidad reguladora de 85 kDa con dominios SH2 en su estructura, y de una subunidad catalítica de 110 kDa (Skolnik et al., 1991). La fosforilación activadora de la PI-3K se produce a nivel de p85 (Solttoff et al., 1992), aunque existen algunos datos que sugieren que p110 también podría ser fosforilada (Ohmichi et al., 1992b). La PI-3K activada puede fosforilar en la posición 3' el fosfatidilinositol (IP), el fosfatidilinositol 4-fosfato (IP₄P) y el IP_{4,5}P (revisado por: Carpenter y Cantley, 1990), así como residuos de serina en sustratos proteicos (Auger et al., 1989). Los sustratos proteicos de la PI-3K mejor caracterizados son su propia subunidad reguladora p85 y el sustrato 1 del receptor de la insulina (IRS-1) (Carpenter et al., 1990).

El siguiente elemento participante en la vía de la PI-3K es la quinasa dependiente de fosfatidilinositol (PDK1). Esta quinasa posee un dominio PH que es el causante de que se encuentre en la membrana plasmática unida al fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃) generado por la actividad de la PI-3K. La PDK1 se localiza en la membrana junto a la PKB que la

fosforila en el residuo de *Thr*³⁰⁸ induciendo así su activación. La activación de PKB produce la translocación a la membrana a la que se une por su dominio PH al igual que lo hace la PDK1. (Alessi, 2001). El enzima responsable de la fosforilación de PKB en el residuo de *Ser*⁴⁷³, se ha denominado PDK2, pero no ha sido todavía identificado ni clonado.

Akt (PKB) sustrato de PI-3K

Los fosfoinosítidos fosforilados en posición 3' por la PI-3K estimulan la quinasa Akt (también denominada proteína quinasa B, PKB) (Klippel et al., 1996, 1997). A su vez la activación de Akt comporta la estimulación de la quinasa ribosomal S6 de 90 kDa (p90Rsk) denominada también RSK (Burgering y Coffey, 1995). De hecho se han correlacionado las activaciones de PI-3K y p90Rsk (Klippel et al., 1996). Asimismo, fosfoinosítidos fosforilados por PI-3K activan algunas isoformas de PKC (Toker et al., 1994).

En los últimos años se ha relacionado la PI-3K con la vía de señalización p21Ras/MAPK (Rodríguez-Viciana et al., 1994; Hu et al., 1995). En su forma activa, p21Ras puede interaccionar y asociarse directamente con la PI-3K, estimulando la producción de lípidos 3'-fosforilados (Rodríguez-Viciana et al., 1994). A su vez, la PI-3K es capaz de inducir acumulación de la forma activa de p21Ras (Hu et al., 1995). El ácido fosfatídico, el ácido araquidónico, el IP, el IP4P y el IP4,5P son capaces de inhibir la actividad de GAP (Bollag y McCormick, 1991), favoreciendo indirectamente un incremento de la actividad de p21Ras. Otro punto de conexión entre la PI-3K y la vía p21Ras/MAPK parece situarse a nivel de la quinasa JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*), cuya activación comporta un incremento de la expresión de *c-Jun* y *c-fos* (Gille et al., 1995a). La PI-3K activada estimula la quinasa JNK, aparentemente a través

de p21Ras (Klipell et al., 1996). Por último, se ha descrito otra conexión entre la PI-3K y la activación de las MAPK a través de quinasas de identidad aún desconocida. Sin embargo, en general se desconoce en qué medida estos mecanismos contribuyen a la señalización a través de la PI-3K de la respuesta de supervivencia neuronal.

GSK-3, sustrato relevante de Akt

Un sustrato relevante de Akt es la GSK-3 (glucógeno sintasa quinasa 3). Identificada originalmente como regulador del metabolismo del glucógeno (Welsh et al., 1996), GSK-3 es ahora un componente establecido de la vía de señalización de Wnt. GSK-3 también puede desempeñar papeles importantes en la síntesis de proteínas, en la proliferación y diferenciación celular, en las dinámicas de los microtúbulos y en la motilidad celular; fosforilando factores de iniciación, componentes del ciclo celular, factores de transcripción, proteínas implicadas en la función de los microtúbulos y en la adherencia celular. La generación de ratones *knockout* de GSK-3 β y su estudio en neuronas sugirió también un papel importante en apoptosis (Revisado por: Frame y Cohen, 2001).

Se han identificado dos isoformas glucógeno sintasa quinasa 3, GSK-3 α y GSK-3 β , que comparten una homología del 97 %. El tratamiento con insulina inhibe GSK-3 al ser fosforilada en N-terminal (*Ser*²¹ en GSK-3 α y *Ser*⁹ en GSK-3 β) por PKB. La insulina, inhibiendo GSK-3, también estimula la defosforilación y la activación del factor eucariótico de la iniciación de la síntesis proteica (eIF2B) contribuyendo a un índice creciente de la síntesis de proteínas (Welsh y Proud, 1993). RSK proporciona también una vía de inhibición de GSK-3 por factores de crecimiento y otras señales que activan la vía MAPK (Sutherland y Cohen, 1994). Otras quinasas que contribuyen a la fosforilación de GSK-3 en

*Ser*²¹/*Ser*⁹ *in vitro* son p70 S6 ribosomal kinase-1(S6K1). S6K1 es regulada por la diana de rapamicina de mamíferos (mTOR), una proteína que detecta la presencia de aminoácidos en el medio. Por lo tanto, la fosforilación de GSK-3 por S6K1 puede ser la base de la inhibición observada de GSK-3 inducida por los aminoácidos.

3.4.4 La vía de transducción PLC- γ /PKC

Activación de la fosfolipasa C de fosfoinosítidos (PLC γ)

La PLC γ es otro de los enzimas cuya actividad catalítica es inducida por las neurotrofinas (Widmer et al., 1993). Se han descrito dos subtipos de PLC γ , PLC γ -1 y PLC γ -2 (Lee y Rhee, 1995). En la secuencia aminoacídica de PLC γ se distinguen dos regiones, el dominio X (de unos 170 aminoácidos) y el dominio Y (de unos 260 aminoácidos). En ellos seguramente reside la actividad catalítica. Entre los dominios X e Y, se encuentran dos módulos estructurales pequeños de tipo SH2 y SH3, homólogos a los de la familia de tirosina quinasas Src. Ambos facilitan el reconocimiento y la interacción con determinadas proteínas: el primero con proteínas con tirosinas fosforiladas, como los receptores con actividad tirosina quinasa, y el segundo con proteínas enriquecidas con prolina, como algunas proteínas del citoesqueleto. En el extremo N-terminal de la PLC γ de unos 300 residuos, se encuentra el dominio PH (homólogo a la plectrina), presente también entre X e Y. Entre el dominio PH y el dominio X hay cuatro motivos “*EF-hand*”, requeridos en la actividad catalítica. El extremo C-terminal es de 400 aminoácidos aproximadamente en la PLC β y prácticamente inexistente en la PLC δ . Cerca del extremo C-terminal, en los tres tipos de PLC, hay un dominio C2, presente también en muchas isoenzimas de la PKC y responsable de la unión de fosfolípidos de manera

dependiente de calcio. Se cree que puede participar en la unión a la membrana (Exton, 1997).

La PLC γ interacciona con el receptor TrkA activado a nivel del residuo Tyr⁷⁸⁵ (Obermeier et al., 1993a; Stephens et al., 1994). Dicha interacción da lugar a fosforilación a nivel de residuos de Tyr y Ser de la PLC γ y a su activación (Obermeier et al., 1993a; Widmer et al., 1993). El enzima activo hidroliza fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (IP4,5P), generando dos moléculas con capacidad de señalización: el diacilglicerol (DAG) y el inositol 1,4,5-trifosfato (IP1,4,5P) (revisado por: Rhee y Choi, 1992). De hecho, en células sensibles al NGF la exposición a dicha neurotrofina produce una rápida elevación de los niveles intracelulares de IP1,4,5P y DAG (Altín y Bradshaw, 1990). El IP1,4,5P interacciona con su receptor a nivel de retículo endoplasmático y desencadena la liberación en el citoplasma del Ca²⁺ acumulado en depósitos intracelulares (Berninger et al., 1993).

La proteína quinasa dependiente de Ca²⁺ y fosfolípidos (PKC)

La proteína quinasa C (PKC) fue inicialmente descrita como una Ser/Thr quinasa de cerebelo bovino activada por proteólisis (Takai et al., 1977; Inoue et al., 1977). Posteriormente se descubrió que podía activarse sin necesidad de proteólisis, por Ca²⁺, fosfolípidos y por un factor asociado a la membrana, que se identificó más tarde como el diacilglicerol (Takai et al., 1979). Como se mencionó anteriormente el DAG se forma transitoriamente por la hidrólisis de fosfoglicéridos, como consecuencia de la activación de receptores de membrana que desencadenan la activación dependiente de agonistas de ciertas fosfolipasas. Posteriormente, Castagna y colaboradores (1982) descubrieron que los ésteres de forbol, sustancias o

compuestos análogos al DAG y potentes promotores de tumores, causan una activación prolongada de la PKC.

Se ha demostrado que la PKC se encuentra implicada en múltiples procesos celulares, muchos de ellos no relacionados con la carcinogénesis. De hecho, esta diversidad de actuación se encuentra relacionada con el hecho que la PKC presenta una gran variedad de isoformas.

El DAG, de naturaleza lipídica, no difunde dentro del citoplasma, sino que permanece en la membrana donde realiza su función, de activación de la PKC, responsable de fosforilar residuos de *Ser* y *Thr* de numerosas moléculas citosólicas como la MAPK, la MARKS, la miogenina, la lamina B o la glicoproteína P (Nishizuka, 1995). Este proceso de activación de la PKC implica en primer lugar, una translocación de la quinasa a la membrana plasmática, proceso favorecido por el incremento de calcio intracelular y en segundo lugar, una interacción con el DAG mediada posiblemente por la unión de la PKC a la membrana a través de otras moléculas de naturaleza lipídica como las fosfatidilserinas (PtdSer). Bajo la denominación general PKC encontramos una familia de proteínas estrechamente relacionadas que se clasifican en base a determinadas similitudes estructurales y bioquímicas. Se conocen once isoformas de PKC divididas en tres familias, que tienen en común el requerimiento de fosfolípidos para su activación.

La primera familia esta formada por las isoformas *clásicas* (cPKC): α , β I, β II, y γ . Esta familia se caracteriza desde el punto de vista enzimático por su dependencia de calcio, fosfolípidos y DAG, existiendo diferencias entre las diferentes isoformas (Nishizuka, 1988). Las isoformas β I y β II presentan una mayor sensibilidad al DAG que las isoformas α y γ . Las isoformas α y β se encuentran ampliamente distribuidas en todo el organismo, mientras que la isoforma γ es exclusiva del cerebro.

La segunda familia, las isoformas *nuevas*, (*nPKC*). δ , ν , ϵ , τ y υ , son isoenzimas estructuralmente similares a la familia *clásica*, excepto a lo que respecta al dominio C2, ya que no presentan los residuos funcionales que actúan en la unión de Ca^{2+} .

La tercera familia está formada por las isoformas *atípicas*, (*aPKC*): ζ y λ ; estas difieren significativamente en estructura de las otras dos clases. El dominio C1 contiene, tan solo, una única región rica en cisteínas. Se ha descrito que estas enzimas no responden a los ésteres de forbol, ni *in vivo* ni *in vitro*. Esta ausencia de respuesta es probablemente debida a su única región rica en cisteínas, que a diferencia de las *cPKC* y *nPKC*, poseen dos regiones ricas en cisteínas, posiblemente responsables de la unión del DAG y de los ésteres de forbol.

Los miembros de la familia de PKC son proteínas monoméricas de 68-84 kDa con dos dominios, uno catalítico, situado en el extremo C-terminal, y el otro regulador, en el extremo N-terminal. Analizando la secuencia de los subtipos clásicos se han encontrado cuatro regiones conservadas (C1-C4) y cinco variables (V1-V5) (Fig. 9).

De las primeras familias C1 y C2 están situadas en el dominio regulador, y C3 y C4 en el catalítico. Estos últimos dominios están presentes en todas las familias de PKC, mientras que la región C1 está presente sólo en las *cPKC* y *nPKC*, la región C2 es exclusiva de las *cPKC*. La región C1 es rica en Cys y tiene lugares de unión al DAG y a los ésteres de forbol. La resolución de la estructura del cristal del dominio C1 de la PKC γ unido a un éster de forbol ha revelado que este sitio de unión está formado por láminas plegadas β de esta región. La inserción del éster de forbol dentro de este lugar de unión resulta en una superficie hidrofóbica que podría facilitar la asociación de la PKC a la membrana.

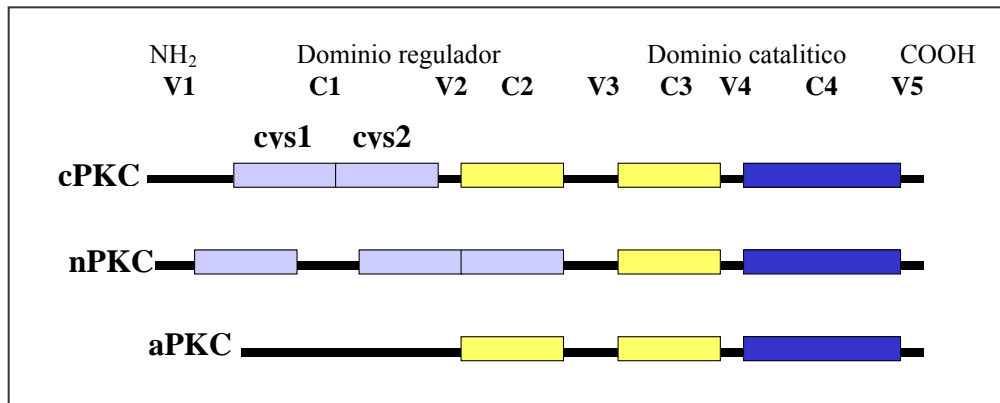


Figura 9. Representación esquemática de la estructura de los miembros de la familia de la PKC (cPKC, clásicas; nPKC, nuevas; aPKC, atípicas). Se indica el extremo N-terminal, el dominio C1 que presenta una o dos regiones ricas en cisteínas, ya que es el dominio donde se unen los ésteres de forbol, el DAG y el Zn²⁺, el dominio C2 de unión a fosfatidilserina y calcio, el dominio C3 donde se une el ATP y el dominio C4 de unión del sustrato. Los dominios variables se encuentran entre cada dominio constante, estando el V1 en el extremo N-terminal y el dominio V5 en el extremo C-terminal. El dominio C2 de las nPKC presenta determinados aminoácidos implicados en la unión de calcio, pero conservan residuos implicados en el mantenimiento del plegamiento (dominio *C2-like*). La región variable V5 cubre el lugar de variación de "splice" entre las isoformas βI y βII.

El dominio C1 coordina dos átomos de zinc. Muy cerca del extremo N-terminal de la región C1, también hay una secuencia pseudosustrato, que bloquea el centro activo de la activación de la PKC. Por otro lado, la región C2 es un sándwich β que permite la interacción con los fosfolípidos de manera dependiente de Ca²⁺. Se ha propuesto que cuando C2 une el calcio quedan expuestas tres *Lys* que podrían formar el lugar de unión a PtdSer. Este dominio se encuentra ausente en las isoformas *nuevas* y *atípicas*. La región C3 es el dominio de unión del ATP, y C4 contiene el centro de unión del sustrato y de catálisis. Las dos mitades de la enzima están separadas por una región fronteriza que es susceptible de hidrólisis cuando la enzima se encuentra unida a la membrana. La región V3 de la familia aPKC contiene un potencial sitio de unión al calcio. En esta misma región se encuentran los lugares susceptibles al ataque de la calpaína y de la

tripsina. El ataque proteolítico de la enzima da lugar al dominio catalítico libre de cualquier necesidad de activación (PKM).

Se han propuesto diferentes factores que pueden modular la actividad de los diferentes isoenzimas de la PKC, hecho que da gran variabilidad en el proceso de activación de la PKC y su regulación. Así, el DAG y sus análogos, los ésteres de forbol, pueden activar las PKCs y muchos subtipos de las *n*PKC pero no las *a*PKC. La activación de la *s*PKCc por DAG puede ser aumentada por fosfolípidos y ácidos grasos libres, inactivos por ellos solos. Los ácidos grasos también pueden activar las *n*PKC y *a*PKC (Spiegel et al., 1996). Por otra parte, el Ca^{2+} actúa como cofactor totalmente necesario para las isoformas *c*PKC aumentando su afinidad por los fosfolípidos ácidos.

Con todas estas características, se deduce que los diferentes miembros de la familia de las PKC responden de forma diferente a diversas combinaciones de lípidos variando de esta manera los patrones de activación de las diferentes isoformas de PKC en intensidad, duración y localización subcelular.

La regulación de la PKC puede realizarse mediante degradación (*down-regulation*). Los ésteres de forbol, como el 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) o como el forbol-12,13-dibutirato (PDBu), son potentes promotores de tumores. El TPA presenta una estructura muy similar al DAG y es capaz de sustituirlo a concentraciones muy bajas. De igual manera que el DAG, actúa aumentando espectacularmente la afinidad de la PKC por calcio dentro del rango de 10^{-7} M, dando lugar a su activación completa sin movilización intracelular detectable de calcio. La utilización de ésteres de forbol en varios contextos ha proporcionado evidencias de la capacidad de las isoformas de la PKC para regular los diferentes procesos celulares. La capacidad de los ésteres de forbol de inducir activación sostenida o asociación a la membrana de

diferentes isoformas de la PKC, tiene consecuencias más allá de las que se dan como consecuencia del DAG. Una de ellas es la degradación de las isoenzimas que responden a ésteres de forbol, un fenómeno conocido con el nombre de *down-regulation*.

4. El equilibrio entre la vida y la muerte

La vida y la muerte son partes esenciales del ciclo natural de los seres vivos. En los organismos pluricelulares, las células se reproducen normalmente siguiendo el proceso de división celular conocido como mitosis; durante el crecimiento se produce un incremento en el número de células, al tiempo que en el desarrollo o en la morfogénesis de los tejidos determinadas células son eliminadas a través de un proceso de muerte celular programada conocida como apoptosis. Así, en un hombre adulto se forman cerca de cien mil células nuevas cada segundo, mientras un número similar desaparece por apoptosis (revisado por: Vaux y Korsmeyer, 1999). A este equilibrio dinámico entre proliferación y muerte celular se le conoce como homeostasis y si se rompe se pueden producir distintos procesos patológicos, entre ellos la formación de tumores.

Resulta paradójico que la muerte celular programada sea un fenómeno necesario para el desarrollo y la vida normal de los organismos. Hay tejidos que se renuevan constantemente a partir de las células madre (médula ósea, tejido epitelial, gónadas, etc.), otros siguen un proceso menos dinámico pero cuando es necesario entran rápidamente en proliferación (p.e.: piel, hígado) y también los hay formados por células que una vez diferenciadas nunca volverán a dividirse (p.e.: las células nerviosas). La apoptosis es un proceso que tiene lugar sobre todo en los tejidos que son mitóticamente activos. A lo largo de nuestra vida, alrededor del 99.9 % de nuestras células seguirán esta misma suerte.

5. La muerte celular

Los dos tipos de muerte celular reconocidos son la *necrosis* y la *apoptosis*. La primera tiene un carácter patológico, que se produce tras un daño celular extremo. Por el contrario, la apoptosis es un proceso fisiológico que ocurre de forma habitual en los organismos eucariotas pluricelulares, tanto en el desarrollo embrionario como en la etapa adulta.

5.1 La necrosis

La necrosis es un proceso de muerte celular que se produce ante un daño grave en la célula. El término necrosis deriva del griego *nekrosis*, muerte, y para algunos autores describe los cambios secundarios que se derivan de la muerte celular y no al proceso en sí, al que ellos llaman *oncosis* (revisado por: Majno y Joris, 1995); dado que los estímulos que la originan son del tipo hipoxia, isquemia, infecciones virales o bacterianas y la exposición a determinados agentes corrosivos, otros especialistas prefieren llamarla muerte celular accidental.

La necrosis es un proceso pasivo, que no requiere la participación activa de la célula y puede afectar a una zona más o menos amplia de tejido; se caracteriza principalmente por la ruptura osmótica de la célula debida a la alteración de la permeabilidad de la membrana plasmática, que permite la entrada masiva de Ca^{2+} y consecuentemente la entrada pasiva de agua, acompañada de un flujo anormal de iones. También se distingue por la respuesta inflamatoria que se desencadena a consecuencia de esta citolisis.

En respuesta a determinados estímulos se producen una serie de cambios morfológicos característicos de la necrosis: a) la dilatación de la célula y la hinchazón de las mitocondrias, seguidos de, b) la vacuolización y dilatación del retículo endoplasmático (RE), el aumento de la

permeabilidad y la condensación del núcleo (picnosis), c) coagulación y cariólisis; y finalmente, d) la liberación del contenido celular activa una respuesta inflamatoria que induce un fenómeno necrótico en las células vecinas.

5.2 La apoptosis

El término apoptosis, ha sido utilizado con frecuencia como sinónimo de muerte celular programada (PCD, *programed cell death*), entendiéndose que la célula tiene la capacidad en cualquier momento de poner en marcha un programa “suicida” en respuesta a determinados estímulos. Esta definición tiene un carácter funcional e implica que la muerte se produce por activación regulada de un programa preexistente codificado en el genoma. Durante el desarrollo, la muerte celular ayuda a la formación de distintas partes del cuerpo, como por ejemplo las cavidades. También elimina estructuras vestigiales que tuvieron función durante la embriogénesis. En los animales maduros, la apoptosis se halla en equilibrio con la división celular, manteniendo constante la masa tisular. La remoción de células dañadas por defectos genéticos, envejecimiento o enfermedad también se produce por apoptosis. El exceso o la deficiencia de apoptosis contribuyen a la patogénesis de muchas enfermedades relacionadas con isquemia, neurodegeneración, autoinmunidad e infecciones virales.

En la apoptosis, el daño a nivel de membrana ocurre en etapas tardías y las células muertas son fagocitadas por células vecinas o fagocitos, produciendo una inflamación escasa o nula. Sin embargo, aclaran, la descripción clásica de apoptosis no se aplica necesariamente a todas las situaciones en que predomina este mecanismo de muerte celular. En circunstancias que involucran estrés celular por toxinas, agentes físicos o isquemia, las células pueden morir por apoptosis o por necrosis. Pueden observarse, entonces, células con morfología mixta apoptótica y necrótica.

El modo de muerte celular (apoptótica, necrótica o indeterminada) depende de la intensidad y duración del estímulo dañino y del grado de compromiso del suministro de energía. La superposición de fenómenos bioquímicos entre la apoptosis y la necrosis ha dado lugar a interpretaciones incorrectas de los mecanismos de muerte celular en tejidos enfermos, particularmente en los afectados por isquemia. Por ejemplo, el clivaje de ADN internucleosomal detectado por electroforesis no permite distinguir la apoptosis de la necrosis.

Algunos de los procesos fisiológicos en los que la muerte celular es un acontecimiento normal son la involución del tejido mamario después del destete, el desprendimiento del endometrio en la menstruación, la muerte de neutrófilos durante las respuestas inflamatorias y la deleción de células T autorreactivas en el timo en desarrollo. Además, la apoptosis neuronal desempeña un papel central en la patología de enfermedades degenerativas del SNC, como en la enfermedad de Alzheimer y en la enfermedad de Parkinson.

5.2.1 Características de la apoptosis

Las células que mueren presentan una serie de cambios morfológicos, por los que en algunos casos, es posible su identificación (Kerr et al., 1972). Estos cambios incluyen contracción celular, condensación nuclear, formación de vesículas en la membrana, formación de cuerpos apoptóticos ligados a membranas y cambios en la superficie que eventualmente llevan a la fagocitosis de la célula apoptótica.

Las células apoptóticas presentan una condensación debida a una disminución del volumen celular con pérdida de agua y electrólitos. Este hecho permite su aislamiento a través de gradientes de sedimentación. También es frecuente encontrar alteraciones en la estructura de la membrana debido a la expresión o desaparición de receptores, variaciones

en la composición de los lípidos de la bicapa, como el desplazamiento del fosfolípido fosfatidilserina (PS), de la cara interna a la cara externa de la membrana celular, a través de un mecanismo enzimático dependiente de ATP. Es también frecuente observar burbujeo o blebbing de la membrana celular, dado que después de un estímulo apoptótico se desencadenan procesos que conducen a la depolimerización de los filamentos de actina. Ya que el objetivo del proceso apoptótico consiste en la rápida eliminación de células potencialmente nocivas, uno de los principales mecanismos será la rápida destrucción del genoma impidiendo así que aquellas lleguen a dividirse.

La fragmentación nuclear ocurre a través de la activación de diferentes endonucleasas dependientes de Mg^{2+} y reguladas por Ca^{2+} . Inicialmente estas endonucleasas con la colaboración de diferentes proteasas, rompen el DNA en fragmentos de alto peso molecular de aproximadamente 700 Kb los cuales progresivamente forman fragmentos menores de 300 y 50 Kb. En algunos sistemas celulares el DNA es finalmente degradado en pequeños fragmentos de 200 pares de bases, correspondientes a las unidades de nucleosomas o múltiples de estas estructuras básicas las cuales pueden caracterizarse por métodos electroforéticos en gel de agarosa. El *laddering* o fragmentación del DNA nuclear así obtenido es uno de los marcadores más conocidos del proceso apoptótico (Vaux et al., 1994). El proceso de desintegración de la cromatina presenta similitudes con el proceso de mitosis durante la división celular, en el cual también hay una pérdida de la estructura nuclear normal pero, a diferencia del proceso apoptótico, la membrana nuclear desaparece. Finalmente el contenido celular se empaqueta en pequeñas porciones formando los llamados cuerpos apoptóticos.

5.2.2 Vías de señalización implicadas en la apoptosis

Mucho antes de que aparezcan los cambios morfológicos que caracterizan el proceso apoptótico, diversas reacciones moleculares, inician vías de señalización como respuesta a estímulos proapoptóticos específicos (Sachs et al., 1993; Kroemer et al., 1995). Estas vías involucran:

- a) La unión de ligandos (moléculas específicas que se unen a un determinado receptor)
- b) La activación de cascadas de fosforilación y defosforilación, mediadas por diferentes familias de proteínas quinasas.
- c) Cambios en el potencial de oxido-reducción (Bustamante et al., 1997).
- d) Alteraciones en el metabolismo energético (Bustamante et al., 2000).
- e) Reorganización de la estructura de canales iónicos en las distintas membranas, induciendo alteraciones en la homeostasis del calcio y otros iones en las distintas organelas.
- f) Cambios en el pH intracelular.
- g) Disfunción mitocondrial.
- h) Activación de diferentes factores de transcripción.
- i) Expresión de programas genéticos.
- j) Finalmente, la activación de endonucleasas y proteasas que llevan a cabo la organizada desintegración, de gran parte de la estructura celular, típica de este proceso.

5.2.2.1 Vía extrínseca de la apoptosis

Bajo condiciones fisiológicas los llamados receptores de muerte celular son activados por ligandos específicos. Algunos receptores de muerte celular forman parte de la superfamilia del TNF-R (*tumor necrosis factor-receptor*), cuyos miembros participan en procesos como la proliferación, la diferenciación, la regulación de la respuesta inmunológica,

la expresión de genes y también en la supervivencia y en la muerte celular; de hecho, algunos de ellos como el TNFR-1 y Fas (CD95/APO-1) están directamente relacionados con la inducción de la apoptosis a través de unas vías de señal muy similares (Chinnaiyan et al., 1996).

Los receptores de muerte celular tienen en común un lugar de unión al ligando en la cara externa de la membrana celular y un dominio de muerte o DD (*death domain*) en la cara citoplasmática. El ligando endógeno es una proteína transmembrana que también existe en forma soluble; está formado por tres subunidades idénticas que al unirse al receptor induce su oligomerización y unión a nivel citoplasmático a una proteína adaptadora que a su vez se unirá y activará a una proteasa (pro-caspasa), maquinaria efectora de la apoptosis. Sin embargo, no siempre es necesaria la unión del ligando para que se produzca la oligomerización del receptor y una respuesta apoptótica, tal es el caso de las radiaciones UV (Carswell et al., 1975).

Uno de los receptores mejor caracterizados es el CD95 también llamado Fas o APO-1 (Kroemer et al., 1995), que desempeña un papel importante en la regulación de la respuesta inmunitaria; se caracteriza por tener tres dominios extracelulares ricos en cisteína, una región transmembrana y el dominio citoplasmático DD. La unión del ligando de Fas (Fas-L) al receptor provoca su asociación con la proteína adaptadora FADD (MORT-1) que a su vez se asocia por su dominio efector de muerte, ED, con la pro-caspasa 8 activándola (Chinnaiyan *et al.*, 1996). Otra ruta de inducción de la apoptosis común a Fas y TNF-R1 es a través de la molécula adaptadora RAIDD, que posee un dominio de reclutamiento de caspasas CARD por el que se une y activa a la pro-caspasa 2 (Duan y Dixit, 1997; Ahmad et al., 1997).

Los receptores de muerte también participan en vías independientes a la ruta de las caspasas. Así pues, TNF-R1 puede intervenir en la activación

de ERK2 a través de MADD (*mitogen-activated kinase activating death domain protein*) (Schievella et al., 1997) y Fas se puede unir a Daxx e inducir la activación de las quinasas JNK, activando o reforzando las señales de apoptosis (Yang et al., 1997).

TRADD (*TNF-receptor associated death domain*) y RIP (*receptor-interacting protein*) son otros adaptadores con DD capaces además de activar a NF- κ B (Hsu et al., 1995; Stanger et al., 1995; Ting et al., 1996). TRADD se une a TNF-R1, a FADD y a RIP, mientras que RIP necesita ser reclutada por otra proteína adaptadora, como TRAF2 (*TNF-receptor-associated factor*), porque no puede unirse directamente a TNF-R1 (Hsu et al., 1996). La activación de los receptores de muerte puede ser una diana en la terapia anticancerosa; de hecho se ha visto que algunas drogas utilizadas en el tratamiento del cáncer inducen la síntesis del ligando Fas-L (Friesen et al., 1996; Muller et al., 1997; Fulda et al., 1997).

Tabla 1. Receptores de muerte y sus respectivos ligandos

| Receptores | Ligandos |
|-----------------|-------------------------|
| CD95 | CD95L |
| TRAIL-R1-4, OPG | TRAIL (APO-2L) |
| OPG | TANCE(RANKL/OPGL) |
| TNF-RI, TNF-RII | TNF-alfa, lymphotoxin a |
| LTb-R | Lymphotoxin beta |
| CD40 | CD40L (TRAP/gp39) |
| CD30 | CD30L |
| CD27 | CD27L(CD70) |
| 4-IBB | 4-IBBL |
| OX-40 | OX-40L (gp34) |

5.2.2.2 Vía intrínseca de la apoptosis

La apoptosis inducida por señales intrínsecas o apoptosis inducida por estrés, se inicia en la mitocondria con la salida del citocromo *c*.

El citocromo *c*

La mitocondria está formada por una doble membrana que limita la matriz y el espacio intermembranoso, siendo en la membrana interna donde está localizada la cadena respiratoria. La transferencia de electrones se produce a lo largo de la cadena respiratoria y está asociada con el bombeo de protones de la matriz al espacio intermembranoso, de forma que se crea un potencial de membrana mitocondrial ($A\psi_m$) a través de la membrana interna que es necesario para la síntesis de ATP. La cadena respiratoria contiene numerosos transportadores de electrones entre los que se encuentran los citocromos, proteínas transportadoras de electrones que contienen un grupo hemo.

La liberación de citocromo *c* mitocondrial está relacionada con la activación de la apoptosis ya que una vez en el citosol se puede asociar a Apaf-1 (factor activador de proteasas) y de esta forma unirse y activar a la pro-caspasa 9 a través de sus dominios CARD con la consecuente activación de la cascada de caspasas. Existe una segunda región en Apaf-1 que permite la asociación de varias moléculas Apaf-1, provocando indirectamente la agregación y activación de la pro-caspasa 9 (Srinivasula et al., 1998). La salida de la mitocondria del citocromo *c* puede producirse como consecuencia de ciertos estímulos apoptóticos que provocarán el colapso de la membrana interna mitocondrial y/o a una caída del potencial de membrana debido a la apertura transitoria de poros permeables en la membrana mitocondrial (Green y Reed, 1998). Bcl-2, Bcl-X_L y Bax comparten la capacidad de formar canales a través de las membranas

intracelulares, de esta forma controlan la permeabilidad de estas membranas y en el caso de la mitocondria la salida del citocromo *c*; mientras que Bcl-2 y Bcl-X_L inhiben la formación de dichos canales, la unión de Bax a la mitocondria puede tener el efecto opuesto.

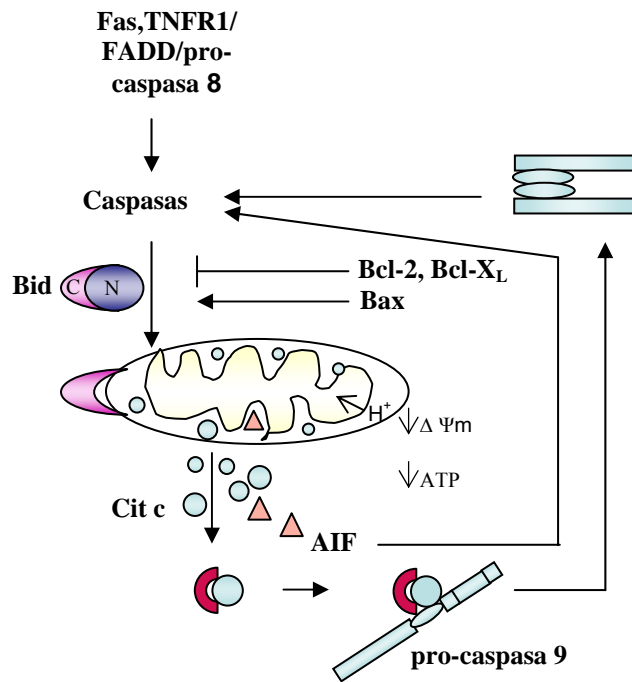


Figura 10. Mediación de la salida del citocromo *c* (cit *c*) de la mitocondria por los receptores de muerte y por la familia de Bcl-2. la caspasa 8 fragmenta a Bid lo que permite que su fragmento C-terminal se transloca a la membrana mitocondrial y la permeabilize. Bax tiene un efecto similar a Bid mientras que Bcl-2 y Bcl-X_L protegen la integridad mitocondrial. La ruptura de la membrana mitocondrial externa permite la liberación de AIF, de los activadores y del cit *c*, produciéndose un bucle de amplificación mitocondrial. La apertura de poros en la membrana interna también contribuye a la destabilización al permitir la entrada de H⁺ en la matriz mitocondrial y provocando de esta forma la caída del $\Delta\Psi_m$ y de la síntesis de ATP.

Los receptores de muerte también pueden inducir indirectamente la liberación de citocromo *c* a través de la activación de la pro-caspasa-8 y de la fragmentación de Bid, amplificándose así la señal apoptótica (Gross et al., 1999) (Fig. 10).

El mantenimiento de la integridad mitocondrial es indispensable para el buen funcionamiento de la célula. Así pues, mientras que la inhibición de las caspasas protege totalmente de la apoptosis inducida por la vía de los receptores de muerte no ocurre lo mismo con la señal que va a través de la vía mitocondrial, ya que la célula morirá igualmente *a posteriori* debido a

la disfunción mitocondrial y de la cadena respiratoria (Cecconi et al., 1998).

5.2.3. Moduladores del proceso apoptótico

El proceso de apoptosis se encuentra rigurosamente controlado por diversos tipos de mecanismos. La identificación y caracterización de las diversas moléculas involucradas en este proceso ha permitido un avance importante. Evidencias genéticas encontradas en la larva de *Caenorhabditis elegans*, mostraron que existen reguladores positivos y negativos de dicho proceso, los genes *ced-9*, *ced-3* y *ced-4* capaces de controlar la muerte vía apoptosis en este nemátodo, poseen sus homólogos en células de mamíferos.

La familia de Bcl-2

El proto-oncogén de Bcl-2 (*B-cell leukemia/lymphoma-2*) denominado así por su relación con el linfoma de células B y la leucemia linfoblástica aguda, fue inicialmente descubierto en linfomas foliculares de células B humanos, viéndose que en un 85 % de los casos estaba sobreexpresado como consecuencia de una translocación entre los cromosomas 14 y 18 (Tsujimoto et al., 1984, 1985); desde entonces se ha estudiado su relación con el cáncer.

Bcl-2 da el nombre a toda una familia de proteínas homólogas que están repartidas en dos grupos, el de los miembros antiapoptóticos o factores de supervivencia que inhiben la muerte celular por apoptosis (Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Al, etc), y el formado por miembros proapoptóticos o promotores de la apoptosis (Bax, Bcl-X_s, Bad, Bak, Bid, etc), siendo Bax el miembro mejor estudiado.

Todas estas proteínas poseen entre uno y cuatro dominios hélices α BH conservados (dominios Bcl-2 de homología) llamados BH4,

BH3, BH1 y BH2, según el orden en el que aparecen desde el extremo N-terminal y también poseen en la mayoría de los casos una región de transmembrana (TM) en el extremo C-terminal (Fig. 11) que les permite emplazarse en las membranas del retículo endoplasmático (RE), núcleo, y en la membrana mitocondrial externa.

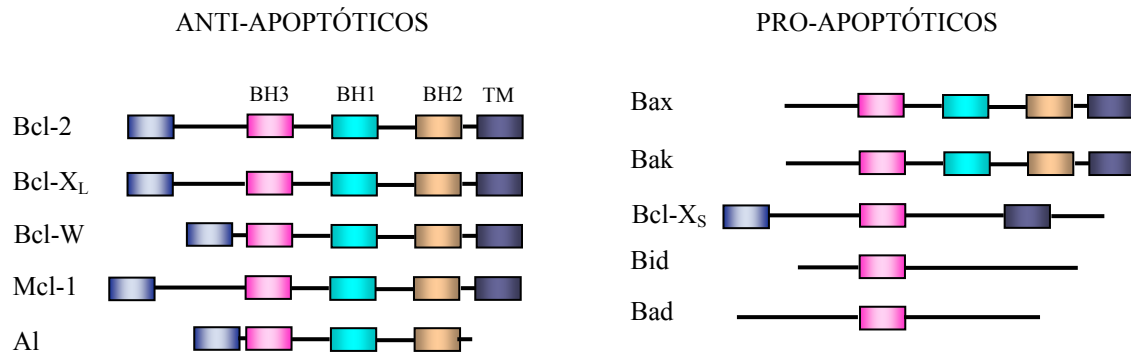


Figura 11. Dominios BH de algunos miembros de la familia de Bcl-2

La localización subcelular de los dos grupos es diferente en ausencia de señales de muerte; los miembros anti-apoptóticos son integrales de membrana (membrana nuclear, mitocondrial y del RE), mientras que la mayoría de los miembros pro-apoptóticos se localizan en el citosol o en el citoesqueleto. La llegada de la señal de muerte provoca cambios conformacionales en los miembros pro-apoptóticos que permiten su integración en las membranas, especialmente la membrana mitocondrial externa y su homodimerización (revisado por: Gross et al., 1999).

Estudios *in vitro* han demostrado que el mecanismo por el que Bcl-2 regula la apoptosis es por su capacidad de formar canales a través de las membranas intracelulares, mecanismo que comparte con Bcl-X_L y con Bax. A nivel mitocondrial, Bcl-2 controlaría la permeabilidad de la membrana evitando la abertura de canales que permitiesen la formación de radicales libres y la salida al citosol, entre otros componentes, del Ca²⁺ y del

citocromo *c* (revisado por: Antonson y Martinou, 2000; Vander Heiden y Thompson, 1999).

Como hemos mencionado anteriormente, la inducción de la apoptosis a través de los receptores de muerte también puede seguir una ruta que implique a los miembros de la familia de Bcl-2, a través de Bid, un sustrato de la caspasa 8 (Gross et al., 1999) (Fig. 10).

Bcl-2 está ampliamente expresada durante el desarrollo embrionario. Se sabe que favorece la supervivencia de la célula frente a determinados estímulos apoptóticos como tratamientos con UV, radiaciones- γ , *shock* térmico, la ausencia de factores de crecimiento (TGF- β y TNF- α), citoquinas, algunas interleuquinas, infecciones virales, agentes promotores de la formación de radicales libres, etc. (Reed, 1994; Bowen et al., 1998).

Las caspasas

Las caspasas (*cysteine-aspartate-proteases*) son proteasas que juegan un papel clave en el proceso de apoptosis (revisado por: Thornberry, 1998). La familia de las caspasas está constituida por más de doce proteasas caracterizadas por la presencia de residuos de cisteína en su sitio activo. Estas proteínas están ampliamente conservadas en el proceso evolutivo y comparten secuencias estructurales comunes (Wolf et al., 1999). Las caspasas se sintetizan como precursores inactivos que se convierten en la forma activa por rotura proteolítica (Fig. 12). Una vez activas, las caspasas producen la hidrólisis a partir de residuos de ácido aspártico en la proteína sustrato. Así, la activación inicial de una caspasa provoca una reacción en cadena que conduce a la activación de otras caspasas y a la muerte de la célula. Por lo tanto, la regulación de la activación de las caspasas es fundamental para determinar la supervivencia celular (revisado por: Thornberry, 1998).

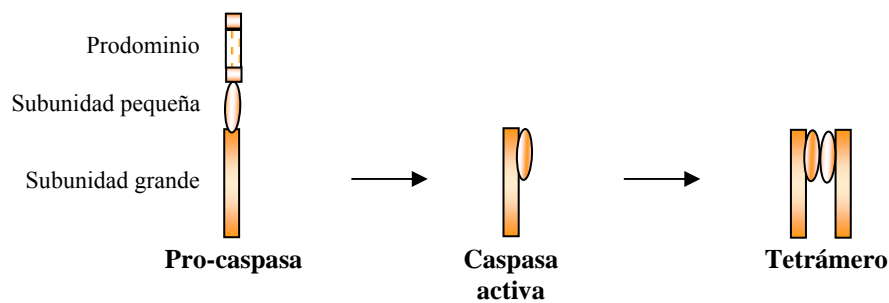


Figura 12. Activación de las caspasas. Pro-caspasa contiene tres dominios: un predominio, una subunidad grande y otra pequeña. La pro-caspasa es inactiva y una vez que sufre dos roturas proteolíticas se separan las tres subunidades. La subunidad grande y la pequeña forman un heterodímero por unión de sus sitios activos. La unión de dos heterodímeros se verifica en dirección opuesta con dos subunidades pequeñas adyacentes rodeadas por las subunidades grandes.

Aunque la familia de las caspasas comparte una estructura común, los análisis filogenéticos han demostrado la existencia de subfamilias que presentan diferentes características y que por lo tanto pueden tener distinto papel en el proceso de apoptosis (Lincz, 1998; Wolf et al., 1999).

Así, las *caspasas iniciadoras* (caspasas -2, -8, -9, -10) presentan predominios funcionales que permiten la asociación de estas moléculas con complejos de señalización; las *caspasas ejecutoras* (caspasas -3, -6, -7) son activadas por las caspasas iniciadoras y son las responsables de la interacción con otras moléculas que desencadenan la apoptosis. La tercera subfamilia de caspasas es la de las *caspasas procesadoras de citoquinas* (caspasas-1, -4, -5, -12, -13, -14) (Fig. 13).

Se ha descrito que la caspasa-1 se activa por la ausencia de factores de crecimiento (Jung et al, 1996), que hidroliza a la caspasa-3 *in vitro* y que promueve el procesamiento y activación de la interleucina-1b (IL-1b), sustancia implicada en la muerte neuronal (Troy et al., 1996). En cuanto a la caspasa-2, se sabe que se activa tras su unión a una molécula adaptadora que a su vez se une a una parte del complejo de señalización del receptor de

factor de necrosis tumoral (TNF). La caspasa-2 activa puede procesar su propio precursor (Ahmad et al., 1997).

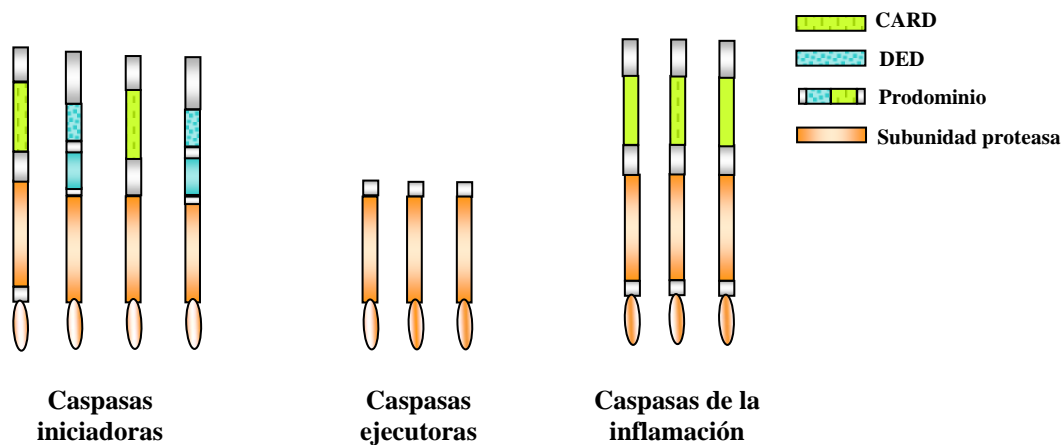


Figura 13. Homología y función de las caspasas

La caspasa-9, que en situación fisiológica se encuentra en su forma inactiva en el citosol, se activa tras la salida de citocromo *c* desde la mitocondria. Ante un determinado daño se produce una alteración en la membrana mitocondrial que desencadena la salida de citocromo *c* al citosol. El citocromo *c* forma entonces un complejo con el factor activador de proteasa (Apaf-1), dATP y procaspasa-9, lo que conduce a la activación de la caspasa. Una vez activa, la caspasa-9 puede activar otras caspasas (Kroemer et al., 1998) (Fig. 10).

Las caspasas-3, -6 y -7 son las principales responsables de los cambios morfológicos y bioquímicos que ocurren en las células apoptóticas. Entre sus sustratos se encuentran un factor responsable de la fragmentación del ADN (Hacker, 2000). Además, las caspasas eliminan la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) (Kaufmann et al., 1993), molécula implicada en la maquinaria celular que repara el daño en el ADN. Por otro lado, activan la vía que conduce a la condensación de la cromatina (Hacker, 2000) y participan en la destrucción de la lámina nuclear (Duband-Goulet et al., 1998) y de las proteínas del citoesqueleto (Thornberry et al., 1998).

Otros reguladores del proceso apoptótico

Otras moléculas reguladoras del proceso apoptótico son las IAP (*inhibitor apoptotic protein*), las FLIPs (*FLICE-like inhibitory proteins*). Estas moléculas interactúan en diversas vías de señalización del proceso de apoptosis. Las FLIPs son proteínas que actúan durante la fase temprana de inducción, interfiriendo en la formación del DISC, mientras que, los miembros de la familia Bcl-2 actúan aparentemente después de una señalización mitocondrial.

Otra molécula importante en la modulación del proceso apoptótico es el factor de transcripción p53. Esta molécula tiene la capacidad para inducir apoptosis en diferentes sistemas biológicos, después de diversos estímulos asociados con daño en el DNA o ausencia de IL-3. Es importante anotar que una gran mayoría de tumores presenta mutaciones en esta proteína. Los mecanismos moleculares involucrados, inducen no solamente el cese del ciclo celular sino la expresión de diversas proteínas como Bax, DR5 (un receptor de membrana celular asociado con la activación de caspasas) y otras proteínas llamadas PIGS (*p53 inducible-genes*), que podrían estar involucradas con la producción intracelular de especies reactivas del oxígeno (radicales libres) y del nitrógeno. La *Tabla 2* incorpora una lista de los genes moduladores y su localización.

Tabla 2. Genes moduladores del proceso apoptótico

| Gene | Localización | Efecto |
|--------------|--|----------|
| bcl-2/bcl-xl | membrana mitocondrial membrana nuclear retículo endoplásmico | bloquea |
| bax/bak/bad | membrana mitocondrial membrana nuclear | estimula |

| | | |
|-----------|-----------------------|---|
| | retículo endoplásmico | |
| myc | núcleo | estimula (también estimula la prolif. celular |
| p53 | núcleo | estimula mutante, bloquea |
| APO-1/Fas | membrana celular | estimula |
| ALT/VIT E | citosol | estimula |
| CPP32 | citosol | estimula |

5.3 La apoptosis en neuronas granulares de cerebelo

Las neuronas granulares de cerebelo (CGN) son la población más abundante de neuronas del cerebro de mamíferos y suponen un sistema muy útil para estudiar los mecanismos de la muerte celular programada en el SNC (Ito, 1984a). Cuando se obtienen a partir de ratas de 7 u 8 días de vida, las CGN se diferencian *in vitro* y adquieren las características morfológicas, bioquímicas y electrofisiológicas de las neuronas maduras (Levi et al., 1984; Hockberger et al., 1987; Cull-Candy et al., 1988). En los cultivos primarios de estas células, la supervivencia de las neuronas maduras, aunque no para las inmaduras, depende de la presencia en el medio extracelular de elevadas concentraciones de KCl (K^+ 25 mM) (Lasher y Zaigon, 1972; Gallo et al., 1987). Además se ha observado, que si un cultivo mantenido en un medio con 25 mM de KCl se cambia a un medio de concentraciones más fisiológicas de este catión (5 mM) inducimos la muerte del mismo por apoptosis (D'Mello et al., 1993).

En cultivos de neuronas granulares, la apoptosis inducida por bajada de la concentración de K^+ (cambio a un medio 5 mM KCl) produce, por este orden: síntesis de ARNm y proteínas, activación de las caspasas y generación de especies reactivas de oxígeno (Schulz et al., 1996). Además, se produce la síntesis y posterior fosforilación de *c-Jun* (Watson y cols., 1998) y una inactivación de la PI-3K y, por tanto, de la proteína quinasa B (PKB) (D'Mello et al., 1997; Dudek et al., 1997; Miller et al., 1997; Shimoke et al., 1997; Skaper et al., 1998). De ahí que sea lógico suponer que la fosforilación y activación de la vía de la PI-3K/PKB inhibiera este tipo de apoptosis (Datta et al., 1997; Dudek et al., 1997).

Respecto a las especies reactivas de oxígeno, trabajos recientes en otros modelos celulares (Herrera et al., 2001) están mostrando que su generación parece ser previa al daño mitocondrial y por tanto a la activación de las caspasas efectoras. Sin embargo, este aspecto no ha sido aún demostrado en cultivos de CGN.

En las neuronas granulares de ratón. La activación de las caspasas comienzan a las 4 h del cambio al medio con baja concentración de potasio (-KCl) alcanzando los niveles máximos de actividad a las 6 h (Armstrong et al., 1997), tiempo en el que se puede detectar ya el citocromo *c* en el citosol (Gleichmann et al., 2000). En estas primeras 4 h, tanto los inhibidores de la síntesis de proteínas y de ARN, como el potasio usado a concentraciones despolarizantes, previenen la muerte del cultivo así como la fragmentación internucleosomal de ADN (D'Mello et al., 1993; Galli et al., 1995; Nardi et al., 1997; Watson et al., 1998). Sin embargo, la apoptosis es ya irreversible en un 50 % de las células del cultivo tras 6 h de exposición al medio con baja concentración de potasio (KCl 5 mM) (Nardi et al., 1997).

Se ha visto que en CGN de ratón el factor de transcripción E2F-1, el cual juega un papel fundamental en la transición de ciclo G1/S (Nevins,

1992; Wu et al., 1996), modula la apoptosis inducida por la bajada en la concentración de KCl (O'Hare et al., 2000). La participación de diversas cascadas de transducción de señal, diferentes a las relacionadas con el ciclo celular, está bien establecida para este paradigma apoptótico. Por ejemplo, se ha descrito la activación de la JNK (Waston et al., 1998) y del ligando de Fas (Le-Niculescu et al., 1999) en CGN sometidas al cambio de medio con concentraciones bajas de KCl.

5.4. La apoptosis y el MPP⁺

Varios estudios sugieren que el MPP⁺ es capaz de inducir la apoptosis *in vitro* en varios tipos celulares como las neuronas granulares de cerebelo (Leist et al., 1998), la línea celular PC12 (Shimoke y Kudo, 2001), SH-SY5Y (Itano y Nomura, 1995; Fall y Bennett, 1998; Gomez et al., 2001) o SN4741 (Chun et al., 2001). También se han detectado núcleos apoptóticos *in vivo* después de la adición del MPP⁺ o el MPTP (Tatton y Kish, 1997).

EL MPP⁺ (N-metil-4-fenilpiridinium) es el metabolito activo de la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP), derivado meperidínico con capacidad de inducir un síndrome parkinsoniano asociado a una degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNc. El MPTP es una molécula hidrofóbica que atraviesa fácilmente la barrera hemato-encefálica, transformándose en su amina cuaternaria, el MPP⁺, por acción del enzima monoamino oxidasa-B (MAO-B) que se encuentra en concentraciones altas en los astrositos y otros tipos gliales.

El MPP⁺ se acumula después en el sistema dopaminérgico nigroestriado debido a una recaptación selectiva por el transportador de la dopamina (DA) (Chiba et al., 1985; González-Polo et al., 2001). Ahí, el MPP⁺ libre, entra en la mitocondria mediante un mecanismo dependiente de energía (Ramsay et al., 1986), e inhibe la cadena de transporte

electrónico a nivel de NADH deshidrogenasa (complejo I) a la ubiquinona. El MPP⁺ bloquea el transporte electrónico uniéndose cerca o en el mismo sitio que dos otros inhibidores de la respiración mitocondrial: la rotenona y la piericidina A (Krueger et al., 1993). Así, la inhibición mitocondrial lleva a una disminución en los niveles de ATP (Di Monte et al., 1986), pérdida del potencial de membrana mitocondrial (Gómez et al., 2001), alteraciones en la homeóstasis de calcio, formación de radicales libres (Adams et al., 2001), y la liberación del citocromo *c* desde el espacio intermembrana al citoplasma de la célula. Una vez en el citoplasma, el citocromo *c* activa unas proteasas específicas, las caspasas, que participan en la destrucción sistemática de varios componentes intracelulares. Todos estos procesos constituyen los primeros pasos de la cascada de reacciones que culminan en la apoptosis.

Trabajos recientes están mostrando las vías proapoptóticas que se activan por el MPP⁺. Se ha descrito que CEP-1347/KT-7515, inhibidor de la activación de JNK (*c-jun N-terminal kinase*), reduce el efecto neurotóxico del MPTP administrado *in vivo* (Saporito et al., 2000). En estudios posteriores del mismo grupo (Saporito et al., 2000) la implicación de JNK ha sido confirmada, en los cuales se ha demostrado claramente que el tratamiento con MPTP induce un aumento rápido en los niveles de fosforilación de JNK y de JNK quinasa en el sistema nigroestriado.

Algunas evidencias muestran también la implicación de las proteínas de la familia Bcl-2 en la apoptosis inducida por el MPP⁺ ya que se ha descrito un incremento de los niveles de RNAm de la proteína Bax en la SN de ratones tratados con MPTP, mientras que los animales *knockout* que carecen de este gen proapoptótico son considerablemente resistentes a dicha neurotoxina, lo que demuestra que Bax desempeña un papel crítico en el proceso neurotóxico de MPTP (Vila et al., 2001). También se ha descrito que la sobreexpresión de Bcl-2 protege las células

catecolaminérgicas de la toxicidad inducida por el MPTP/MPP⁺ tanto *in vitro* como *in vivo*, mientras que la disminución de los niveles de Bcl-2 y Bcl-X_L por tratamiento farmacológico o bien por modificaciones genéticas, aumenta la muerte inducida por MPP⁺ (Hochman et al., 1998; Kitamura et al., 1998).

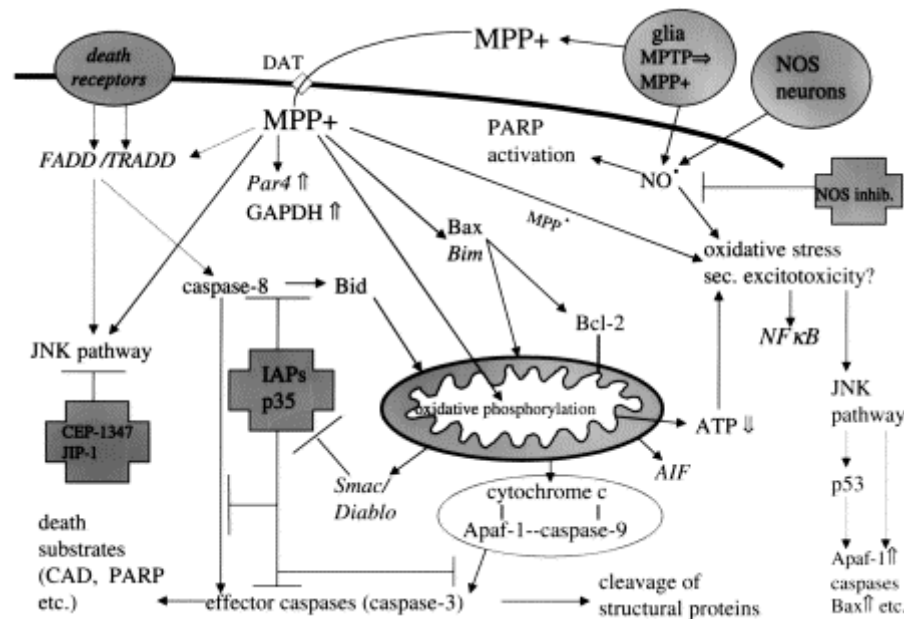


Figura 14. Vías de señalización implicadas en el mecanismo de toxicidad inducido por MPTP.

Por otra parte, se ha demostrado una actividad de caspasa-3 *in vitro* después del tratamiento con 60 μM de MPP⁺ en CGN (Du et al., 1997). También, se ha visto que la apoptosis inducida por MPP⁺ fue prevenida totalmente por el amplio inhibidor zVAD.fmk de la actividad caspasa pero no por el inhibidor IETD.fmk de la caspasa-8. En otros experimentos, se probó si los inhibidores Ac-YVAD-CHO (inhibidor de la caspasa-1) y Ac-DEVD-CHO (inhibidor de la caspasa-3) eran capaces de atenuar los efectos neurotóxicos del MPP⁺ en CGN (Du et al., 1997). Fue comprobado así que solamente Ac-DEVD-CHO es capaz de reducir los efectos de la neurotoxina según lo determinado por el análisis de DNA y la tinción de los núcleos con Hoechst.

6. Participación de las vías de transducción de la supervivencia

Algunas vías de señalización promueven la supervivencia celular mediante la inhibición de la apoptosis. Estas vías de señalización controlan el destino de una gran variedad de células cuya supervivencia depende de factores de crecimiento extracelulares o de interacciones célula-célula. Entre los primeros, figuran las neurotrofinas y en particular el factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF).

Una de las principales vías de señalización intracelular que promueve la supervivencia de la célula comienza en la enzima fosfoinositido-3 quinasa (PI-3K), que es activada bien por la proteína tirosina quinasa o bien por receptores asociados a proteínas G.

6.1 Participación de la vía PI3K/PKB

Tanto en neuronas como en otros tipos celulares, se ha comprobado la gran relevancia de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI-3K) en la regulación de la supervivencia inducida por esos factores de crecimiento. La PI-3K parece ser una de las enzimas claves a la hora de la regulación de diversos procesos celulares, entre ellos la supervivencia y la proliferación de multitud de sistemas celulares. De hecho, los inhibidores de la PI-3K bloquean la supervivencia inducida por el IGF-1 (D'Mello et al., 1997; Dudek et al., 1997; Miller et al., 1997) y por el BDNF (Yamagishi et al., 2003) en neuronas granulares de cerebelo.

La vía de señalización de la PI-3K media gran cantidad de respuestas celulares tras su activación por factores de crecimiento peptídicos o por hormonas. La desregulación de esta vía está relacionada con enfermedades como el cáncer o la diabetes en humanos, y su importancia en la biología de la célula se pone de manifiesto por el hecho de intervenir en la muerte y en la supervivencia celular, así como en otras funciones celulares

fundamentales como son: el crecimiento, la motilidad, la diferenciación o las acciones de la insulina (revisado por: Marte y Downward, 1997). Su amplio abanico de acciones se debe a que activa múltiples vías de transducción secundarias. Uno de los grupos de enzimas que parecen más importantes es la superfamilia AGC de *Ser/Thr*-quinasas (llamadas así al incluir a las proteínas quinasas A, G y C), conocidas desde hace tiempo por formar parte importante de la maquinaria celular de transducción de señal (Alessi, 2001). Las quinasas de esta superfamilia poseen alrededor de un 40 % de homología en su dominio catalítico. Para ser activadas necesitan fosforilarse en un residuo altamente conservado en todas ellas que se sitúa en el extremo carboxilo en una región que se ha denominado lazo T (*T-loop*) (Vanhaesebroeck y Alessi, 2000).

Una de las enzimas activadas por la producción de PIP_3 por parte de la PI-3K, es la **PKB**, la cual es la intermediaria en las señales de supervivencia inducidas por la PI-3K (revisado por: Marte y Downward, 1997). La activación de la PKB por la PI-3K y la subsiguiente inducción de la degradación por fosforilación de la proteína proapoptótica Bad es el mecanismo propuesto para la acción antiapoptótica de la vía PI-3K/PKB (Datta et al., 1997; del Peso et al., 1997). Bad es uno de los miembros de la familia de Bcl-2 que, como Bid, induce la muerte celular estimulando la liberación de citocromo *c* desde la mitocondria. La fosforilación de Bad por PKB genera un sitio de unión para las proteínas que secuestran a Bad en el citosol, impidiendo de esta manera la translocación de Bad a la membrana mitocondrial (Datta et al., 1997). Bad actúa a nivel de la mitocondria inhibiendo la proteína antiapoptótica Bcl- X_L (Zha et al., 1996). La acción de la PKB sobre la Bad es a través de la fosforilación de *Ser*¹³⁶ (Gleichmann et al., 2000). La fosforilación de esta serina provoca la dimerización de la Bad con la proteína 14-3-3 impidiendo de esta manera que Bad promueva su acción proapoptótica. La proteína 14-3-3 secuestra

Bad y se ha sugerido que actuaría como un cofactor que regularía la fosforilación secuencial de diferentes serinas de Bad inhibiendo así la función proapoptótica de Bad (Zha et al., 1996; Datta et al., 2000).

Sin embargo, también se ha visto (Scheid and Duronio, 1998) que la señal de supervivencia de la PI-3K puede ser independiente de la fosforilación de Bad, de ahí que se sugiera que la PI-3K pueda actuar sobre diversos componentes de la cascada apoptótica. De hecho, además de Bad, la PKB fosforila e inactiva a diversos componentes celulares que estarían implicados en la apoptosis: los factores de transcripción Forkhead (FKHR) (Brunet et al., 1999), la GSK-3 (Cross et al., 1995) y la caspasa 9 (Rommel et al., 1999).

La GSK-3, es un elemento fundamental de la vía de la supervivencia PI-3K/PKB, es inhibida por la PKB, la cual la fosforila en la *Ser*²¹ en la GSK-3 α y en la *Ser*⁹ en la GSK-3 β , siendo estas fosforilaciones de estos residuos el principal sitio de regulación por inhibición de esta proteína (Cross et al., 1995). La GSK-3 se encuentra implicada tanto en la regulación del ciclo celular de *Dictyostelium*, como en el desarrollo de *Drosophila* y *Xenopus*. Además, regula la proteólisis y la localización subcelular de la ciclina D1 (Diehl et al., 1998).

Respecto a su papel en la apoptosis, se ha descrito que la sobreexpresión de formas constitutivamente activas de la GSK-3 β facilitan el proceso apoptótico en distintos sistemas neuronales (Bijur et al., 2000). De su importancia en la apoptosis neuronal también da cuenta el hecho de que la empresa farmacéutica Glaxo-SmithKlein ha desarrollado inhibidores selectivos de la GSK-3, SB-216763 y SB-415286, que protegen frente a la apoptosis inducida por el cambio a medio con bajas concentraciones de potasio en CGN (Cross et al., 2001).

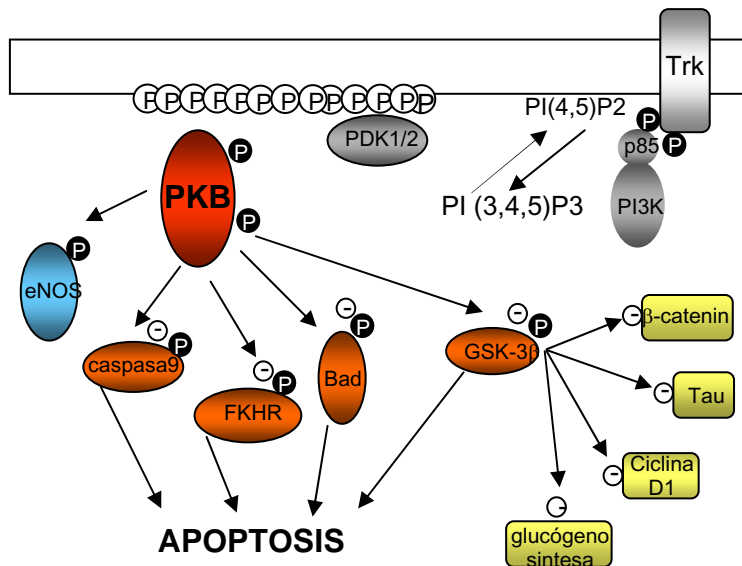


Figura 15. Esquema de la vía de señalización de PI3K/PKB. Tras la estimulación de un receptor tirosina quinasa la estimulación de la PI3K induce la translocación de la PKB a la membrana y su posterior activación por fosforilación.

La inhibición de la muerte neuronal mediada por estos compuestos implica la inhibición de la actividad GSK-3 y la modulación de sus sustratos Tau y β-catenina. Así, además de los papeles previamente asignados a GSK-3, estos datos proporcionan evidencia farmacológica y bioquímica clara que la inhibición selectiva de la actividad endógena de GSK-3 en neuronas primarias es suficiente para prevenir la muerte. Dichos inhibidores también protegen las neuronas granulares de cerebelo de rata y las neuronas del hipocampo frente a la toxicidad inducida por los agonistas del receptor de NMDA y del non-NMDA (Facci e al., 2003).

6.2. Participación de la vía p21Ras/MAPK

En muchas neuronas, p21Ras promueve la supervivencia neuronal mediante la activación de PI-3K y la MAPK. Los datos de muchos grupos indican que p21Ras es el principal mediador de la supervivencia celular inducida por los factores de crecimiento (Borasio et al., 1989; Nobes y Tolkovsky, 1995; revisado por: Downward, 1998).

p21Ras activa muchas vías a la vez. Como anteriormente hemos mencionado, una de estas vías es la vía de las proteínas Raf, MEK, y MAPK. Se ha visto en muchos trabajos que esta vía de señalización

promueve la supervivencia celular e inhibe la apoptosis (Xia et al., 1995; Revisado por: Meier y Evan, 1998; Meyer-Franke et al., 1998).

El mecanismo mediante el cual esta vía inhibe la apoptosis implica la fosforilación y activación por la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) de una proteína quinasa denominada quinasa ribosómica S6 90 kDa (RSK). Un sustrato relevante de la RSK es Bad. Al igual que PKB/Akt, RSK fosforila a Bad (Bonni et al., 1999), de tal manera que Bad es un punto de convergencia de las vías de la PI-3K/Akt y de las MAPK en la señalización de la supervivencia celular. RSK fosforila Bad en la *Ser*¹¹² (Lizcano et al., 2000), inhibiendo así su interacción con Bcl-2/Bcl-X_L, mediando de tal modo una señal de supervivencia.

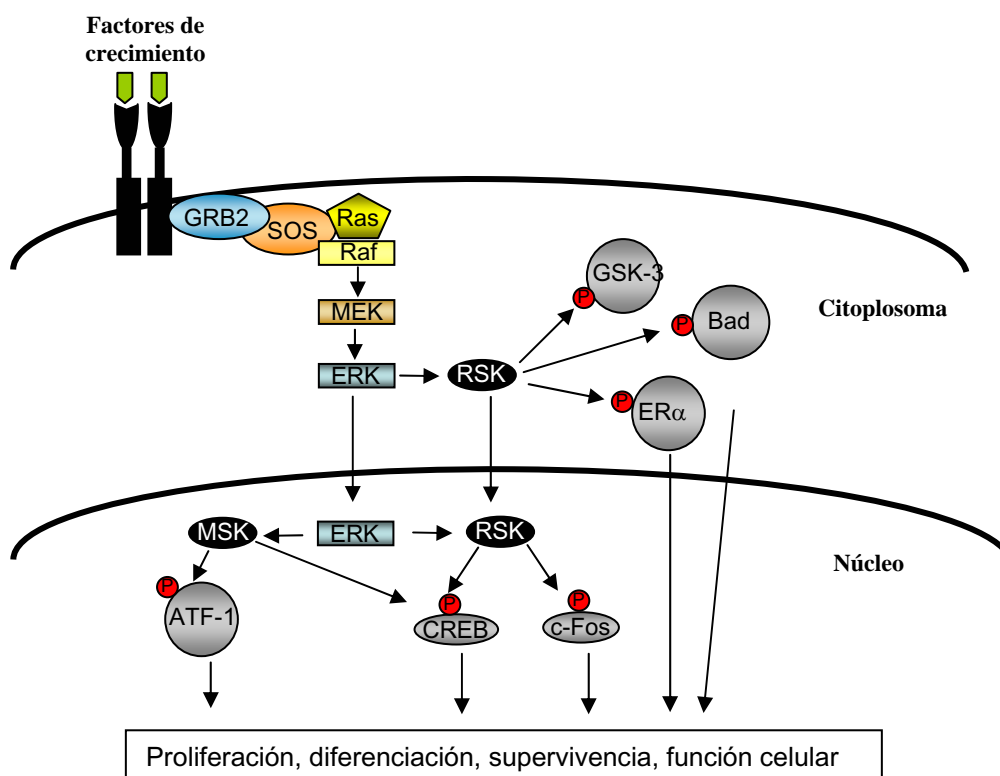


Figura 16. Mecanismos de supervivencia regulados a través de la vía

Además ERK y RSK pueden fosforilar factores de transcripción que afectan a la expresión de genes que regulan la apoptosis (Fig. 16). Uno de estos factores es CREB (revisado en párrafos anteriores). Trabajos *in vitro*

en neuronas granulares de cerebelo de rata y en neuronas simpáticas han demostrado que CREB regula genes esenciales para la supervivencia (Bonni et al., 1999; Riccio et al., 1999).

CREB es activado por los estímulos, tales como la actividad sináptica y las neurotrofinas (Ginty et al., 1994; Moore et al., 1996; Finkbeiner et al., 1997), que induce su fosforilación en el residuo *Ser*¹³³ (González y Montminy, 1989). CREB es fosforilado por varias quinasas: la proteína quinasa A (PKA), quinasa de Ca^{2+} -calmodulina-dependiente (CaMK), la proteína quinasa B (Akt/PKB) y la MAPK (González et al., 1989; Dash et al., 1991; Moore et al., 1996; Xing et al., 1996; Finkbeiner et al., 1997; Deisseroth et al., 1998; Du y Montminy, 1998) y su actividad está implicada en varias funciones del cerebro, tales como plasticidad sináptica, aprendizaje y memoria (Dash et al., 1990; Tully, 1997; Shieh y Ghosh, 1999; Taubenfeld et al., 1999). Recientemente, se ha propuesto que CREB también está implicado en la supervivencia neuronal y el desarrollo cerebral (Riccio et al., 1999; Sala et al., 2000; revisado por: Walton y Dragunow, 2000).

La relación entre la fosforilación de CREB y la supervivencia se ha demostrado en isquemia focal (Tanaka et al., 1999) y en la degeneración de las células PC12 (Beitner-Johnson and Millhorn, 1998; Walton et al., 1999). También se ha demostrado recientemente que los ratones que carecen de la función de CREB experimentan la neurodegeneración tanto en el sistema nervioso periférico (Lonze et al., 2002) como en el sistema nervioso central (Mantamadiotis et al., 2002).

Varios factores que promueven la supervivencia y/o la diferenciación neuronales pueden activar CREB: entre ellos están los estrógenos (Goodman et al., 1996; Green et al., 1997), el PACAP (*Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide*) (Villalba et al., 1997), el IGF-1 (*Insulin like*

Growth Factor-1) (Kulik et al., 1997) y las neurotrofinas (Walton et al., 1999).

Resultados de Bonni y colaboradores (1999) sugieren un mecanismo doble mediante el cual esta vía inhibe la apoptosis. Este mecanismo implica, por una parte, la fosforilación y inhibición de la proteína proapoptótica Bad, y por otra parte, la inducción de expresión de genes de supervivencia por CREB.

También se ha visto que la despolarización de membrana en cultivos de granulares de cerebelo inducida por potasio promueve la supervivencia neuronal a través de la vía MAPK, posiblemente aumentando la activación de proteínas específicas de la supervivencia dependiente del factor de transcripción CREB (Zhong et al., 2004), ya que los inhibidores de esta vía, PD98059 y UO126, bloquean tanto el efecto neuroprotector de la despolarización de membrana como el aumento de fosforilación de CREB y la síntesis proteica inducidos por altas concentraciones de potasio.

6.3 Participación de la vía PLC γ /PKC

Las PKCs desempeñan distintos papeles en los balances proliferación/apoptosis/ supervivencia. Se ha asociado una baja actividad de la PKC con la apoptosis (Sánchez et al., 1992) y también a la PKC ι con la resistencia a muchos agentes apoptóticos (Murray y Fields, 1997). Hay sustancias inductoras de la apoptosis que lo que hacen es inhibir la PKC; otras sustancias lo que hacen es activar a la PKC, promoviendo así la supervivencia celular (McCubrey et al., 2000; Lavin et al., 1996)

La vía PKC también regula parcialmente el proceso de la fosforilación/ defosforilación de Bcl-2 y de esta forma, a través de la fosforilación de Bcl-2 previene la apoptosis (Murata et al., 1997).

Los ésteres de forbol (promotores tumorales análogos al DAG) activan las isoformas de PKCs sensibles y esto conduce a su agotamiento o

disminución porque al activarse, se pone en marcha el proceso de degradación de las PKCs vía ubiquitina (Lu et al., 1998). Resultados de Bertolotto y colaboradores (2000) han demostrado que el 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) previene la apoptosis en linfocitos T inducida por Fas mediante la PKC, puesto que dicho efecto fue suprimido específicamente por el inhibidor GF109203X de PKC y por dominantes negativos de PKCtheta, PKCepsilon, y PKCalpha. Por otra parte, el TPA estimula la fosforilación de Bad en la *Ser*¹¹², un efecto bloqueado por GF109203X pero no por el inhibidor PD98059.

6.4 Participación de otras vías

El factor de transcripción NFκβ

Un número de estudios recientes han proporcionado evidencia que NFκβ, un factor de la transcripción implicado en procesos dispares tales como inflamación, crecimiento y desarrollo, también desempeña un papel importante en la regulación de la apoptosis en las neuronas y las células no-neuronales (revisado por: Ghosh et al., 1998; Karin y Ben-Neriah 2000; Mattson et al., 2000). Aunque algunos estudios realizados en sistemas neuronales han encontrado que el NFκβ está asociado a la apoptosis, muchos otros han demostrado que NFκβ protege las neuronas contra una variedad de estímulos que inducen la muerte (Lin et el al., 1998; Maggirwar et al., 1998; Cheema et al. 1999; Daily et al., 2001).

NFκβ es un factor de transcripción que forma parte de una vía de transducción de señal dependiente de PKC. Se sabe que puede actuar como inhibidor de la apoptosis, siendo capaz de bloquear la activación de la caspasa 8 a través de la regulación de ciertos genes que codifican para IAPs (factores inhibidores de la apoptosis) y para TRAF1/2; también se ha visto que inhibe la liberación del citocromo *c* mitocondrial induciendo la

expresión de miembros antiapoptóticos de la familia de Bcl-2 (Park y Levitt, 1993; Wang et al., 1999).

También puede inducir la transcripción de genes de respuesta inflamatoria como citoquinas y receptores de citoquinas (Philpott et al., 2000) y más recientemente se ha descrito una actividad pro-apoptótica a través de genes inductores de la apoptosis (Lin et al., 1999; Sohur et al., 2000; Israel, 2000).

NF κ B está presente en el citosol en estado inactivo, formando parte de un complejo con el inhibidor I κ B; su activación se produce cuando I κ B es fosforilado en respuesta a diferentes estímulos y entonces tiene lugar la separación del complejo y la eliminación de I κ B vía ubiquitina. La forma NF κ B libre es entonces translocada al núcleo donde activará la transcripción de diferentes genes diana, entre ellos algunos implicados en la respuesta inmune.

OBJETIVOS

II. Objetivos

Descubrimientos recientes de nuestro Grupo (Gil et al., 2000) indican que los aceptores glicoproteicos implicados en los mecanismos de acción de la TeTx son miembros de la familia de receptores con actividad tirosina quinasa (por ejemplo los Trks), encontrándose paralelismo entre la acción de la TeTx y algunos factores de crecimiento, como el factor de crecimiento nervioso (NGF). La interacción de los factores neurotróficos (neurotrofinas) con sus aceptores desencadena la activación de tres importantes vías de señalización intracelulares iniciadas tras la activación de los Trks: las vías p21Ras/MAPK, PI-3K/Akt y PLC γ /PKC. La TeTx, en sinaptosomas de encéfalo y en cultivos primarios corticales de rata, mimetiza en algunos aspectos la acción de los factores neurotróficos, por ejemplo la del NGF (Gil et al., 1998, 2000; Pelliccioni et al., 2001).

El **Objetivo Inicial** de la presente Tesis ha sido describir con detalle la respuesta de cada uno de los elementos de las cascadas de transducción a la aplicación de TeTx o de su fragmento atóxico Hc-TeTx. En primer lugar utilizando un sistema simple, preparaciones enriquecidas en sinaptosomas, puesto que la TeTx se une con alta afinidad a través de su dominio C-terminal a la membrana presináptica, y en segundo lugar utilizando cultivos primarios de células corticales de cerebro de rata, ya que este sistema es más cercano a los sistemas *in vivo* que son las dianas naturales de las CNTs, es un sistema biológico homogéneo, y está libre de acciones indirectas que pudieran enmascarar el efecto a considerar.

Con el propósito de desarrollar esta parte del trabajo, el objetivo inicial antes mencionado fue dividido en dos más concretos:

- Descripción de la activación, autofosforilación y fosforilación de los receptores Trk. Concretamente estudiaremos los receptores TrkA y TrkB.
- Descripción de la activación, fosforilación, translocación, etc. de algunos elementos claves en las vías de señalización como consecuencia de la activación previa de los receptores anteriormente mencionados: las vías p21Ras/MAPK, PI-3K/Akt y PLC γ /PKC.

Para darle un valor añadido a nuestro objetivo inicial proponemos como **Objetivo Final** estudiar la probable implicación de las vías de transducción, a través de la TeTx y del fragmento Hc-TeTx, en la neuroprotección. Para conseguirlo estudiaremos la supervivencia celular debida a la TeTx, pero con más interés, debida al fragmento recombinante atóxico Hc-TeTx. Los trabajos que se llevaran a cabo son:

➤ En los cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo producir la muerte celular por deprivación de potasio y estudiar en presencia o no de los factores propuestos (BDNF, TeTx y Hc-TeTx):

La viabilidad neuronal por determinación de MTT.

La viabilidad neuronal por condensación nuclear.

La alteración de algunos elementos de las vías de transducción indicadas.

La situación de factores de transcripción implicados en neuroprotección.

➤ En los cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo producir la muerte celular por aplicación de MPP⁺ y estudiar en presencia o no de factores propuestos (TeTx, Hc-TeTx):

La viabilidad neuronal por determinación de MTT.

La viabilidad neuronal por condensación nuclear.

La translocación de citocromo c/Bax

La activación de pro-caspasa-3

Los cambios de afinidad de Bad frente a los factores 14-3-3 y Bcl

Queremos finalmente llegar a demostrar, o al menos afianzar la hipótesis, que el fragmento Hc-TeTx puede ser un poderoso fármaco para la prevención de enfermedades neurodegenerativas.

RESULTADOS

Trabajo I:

HC fragment (C-terminal portion of the heavy chain) of tetanus toxin activates protein kinase C isoforms and phosphoproteins involved in signal transduction.

H_C fragment (C-terminal portion of the heavy chain) of tetanus toxin activates protein kinase C isoforms and phosphoproteins involved in signal transduction

Carles GIL*, Imane CHAIB-OUKADOUR*, Juan BLASI† and José AGUILERA*¹

*Departament de Bioquímica i de Biologia Molecular, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Barcelona, Spain, and †Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica, Universitat de Barcelona, L'Hospitalet de Llobregat, Catalunya, Spain

A recent report [Gil, Chaib-Oukadour, Pelliccioni and Aguilera (2000) FEBS Lett. **481**, 177–182] describes activation of signal transduction pathways by tetanus toxin (TeTx), a Zn²⁺-dependent endopeptidase synthesized by the *Clostridium tetani* bacillus, which is responsible for tetanus disease. In the present work, specific activation of protein kinase C (PKC) isoforms and of intracellular signal-transduction pathways, which include nerve-growth-factor (NGF) receptor trkA, phospholipase C(PLC)γ-1 and extracellular regulated kinases (ERKs) 1 and 2, by the recombinant C-terminal portion of the TeTx heavy chain (H_C-TeTx) is reported. The activation of PKC isoforms was assessed through their translocation from the soluble (cytosolic) compartment to the membranous compartment, showing that clear translocation of PKC-α, -β, -γ and -δ isoforms exists, whereas PKC-ε showed a slight decrease in its soluble fraction immunoreactivity. The PKC-ζ isoform showed no consistent response. Using immunoprecipitation assays against phospho-

tyrosine residues, time- and dose-dependent increases in tyrosine phosphorylation were observed in the trkA receptor, PLCγ-1 and ERK-1/2. The effects shown by the H_C-TeTx fragment on tyrosine phosphorylation were compared with the effects produced by NGF. The trkA and ERK-1/2 activation were corroborated using phospho-specific antibodies against trkA phosphorylated on Tyr⁴⁹⁰, and antibodies against Thr/Tyr phosphorylated ERK-1/2. Moreover, PLCγ-1 phosphorylation was supported by its H_C-TeTx-induced translocation to the membranous compartment, an event related to PLCγ-1 activation. Since H_C-TeTx is the domain responsible for membrane binding and lacks catalytic activity, the activations described here must be exclusively triggered by the interaction of TeTx with a membrane component.

Key words: clostridial neurotoxins, rat brain, signal transduction, synaptosomes.

INTRODUCTION

Tetanus toxin (TeTx), one of the most lethal toxins known, is a protein with Zn²⁺-dependent proteolytic activity and is produced by the bacilli *Clostridium tetani* under strictly anaerobic conditions [1]. TeTx is synthesized as a single polypeptide chain of 150 kDa and is subsequently activated by a bacterial endopeptidase to generate a dipeptide toxin. The toxigenic light chain (50 kDa) remains linked by a disulphide bridge to the binding domain of the targeting heavy chain (100 kDa). The heavy chain can be disrupted into two fragments by the protease papain, which correspond to its C-terminal part (H_C fragment, residues 864–1315 of TeTx; 50 kDa) and to its N-terminal part (50 kDa). The H_C domain is responsible for TeTx binding to the cell membrane [2]. Although the N-terminal of the H_C-TeTx is similar in structure to many lectins, deletion mutagenesis studies suggest that the C-terminus is essential for cell- and ganglioside-binding activity [3]. The main targets of TeTx are both the central and peripheral nervous systems (for a review see [4]), where inhibition of neurotransmitter release occurs through the selective cleavage of synaptobrevin II, a protein involved in synaptic vesicle docking and neurotransmitter release [5]. Other molecular mechanisms underlying TeTx toxicity have been proposed recently. TeTx can activate a Ca²⁺-dependent, GTP-

modulated transglutaminase [6], thus acting synergistically on neurotransmitter blocking. It has been demonstrated that TeTx can partially block neurotransmitter release by stimulating a transglutaminase activity, even when Zn²⁺-dependent metalloprotease activity is abolished [7]. The first implication of TeTx in signal transduction pathways arose when TeTx-treated macrophages and spinal cord cells of mice manifesting generalized tetanus intoxication showed a diminution in protein kinase C (PKC) activity [8]. Later, our group described activation and subsequent down-regulation of PKC after intracerebral injection of TeTx into adult and neonatal rat brain [9]. PKC translocation appeared before the classic symptoms of tetanus neurotoxicity in the perinatal rat [10]. The increase in polyphosphoinositide hydrolysis in rat cerebral cortex preparations treated with TeTx indicates activation of phospholipases, an effect directly related to PKC activation [11]. This PKC activation is paralleled by an increase in 5-hydroxytryptamine levels [12], an effect which has recently been related to inhibition of the 5-hydroxytryptamine re-uptake produced by TeTx and by its H_C fragment [13]. These data indicate that TeTx is a powerful toxin that acts by different mechanisms which induce changes in relevant processes in the central nervous system.

The neurotrophin family comprises nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor and neurotrophins 3

Abbreviations used: TeTx, tetanus toxin; H_C-TeTx, C-terminal half of the TeTx heavy chain; ERK, extracellular regulated kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; NGF, nerve growth factor; PKC, protein kinase C; PLC, phospholipase C.

¹ To whom correspondence should be addressed (e-mail jose.aguilera@uab.es).

and 4/5 [14], which exert their effects through the interaction with membrane receptors, so-called trk receptors. NGF binds specifically to the trkA receptor, whereas brain-derived neurotrophic factor and neurotrophins 4/5 bind to trkB and neurotrophin 3 to trkC (for a review see [15]). In addition, neurotrophins can bind non-specifically to a 75 kDa membrane receptor (p75^{NTR}), but NGF seems to be uniquely able to activate it [16]. Binding of neurotrophin to its trk receptor activates the protein kinase intrinsic to the receptor, leading to autophosphorylation of tyrosine residues of the receptor, which allows recognition of the receptor by several intracellular signalling proteins that contain Src homology domains, such as phospholipase C (PLC) γ -1, Shc proteins and the p85 PtdIns(1,4,5)P₃ kinase subunit (for a review see [17]). Such interactions lead, by means of a kinase cascade, to the activation of the extracellular regulated kinases (ERKs), a family of protein serine/threonine kinases of which the best characterized members are ERK-1 (p44) and ERK-2 (p42), on threonine and tyrosine residues [18]. Once activated, ERK phosphorylates and activates other protein kinases, in addition to a set of effector proteins, which includes cytoskeletal proteins and transcription factors [19]. ERK activity can also be enhanced by direct action of PKC on Raf kinase [20]. PKC is an extended family of protein Ser/Thr kinases, especially abundant in the nervous system, and is composed of homologous isoforms which can be divided into three subfamilies, depending on their activation requirement. (1) Classical PKCs (α , β I, β II and γ isoforms); (2) novel PKCs (δ , ϵ , θ , and η isoforms) and (3) atypical PKCs (ζ and ι isoforms) [21]. Some physiological activators can cause the translocation of PKC activity from the cytosolic fraction to the membrane [22], initially resulting in activation followed by down-regulation, by means of a not yet well-known proteolytic pathway [23]. One relevant feature of trk receptors is the ability to communicate their signal in a retrograde manner from distal axons to neuron cell bodies. This communication is exerted through the endocytosis of activated receptors and formation of signalling endosomes [24]. Since both TeTx and its H_c fragment are internalized through an endocytic mechanism and are subsequently retroaxonally transported, the possibility of an interaction between the TeTx and trk receptors arises. This mechanism could be used by *Clostridium* in order to transport the TeTx to the central nervous system.

In a recent publication, the activation of several enzymes involved in signal transduction by the whole TeTx protein (trkA, PKC isoforms, ERK-1/2 and PLC γ -1) is described [25]. In the present study, the existence of a differential activation of PKC isoenzymes by the H_c fragment of TeTx, which has been described as being responsible for toxin binding to cellular membrane, is addressed. The analysis of several tyrosine-phosphorylated proteins reveals the stimulation of PLC γ -1 tyrosine-phosphorylation and translocation to the membrane, as well as trkA activation. The parallel activation of ERK-1/2 is a further observation that indicates the triggering of signal-transduction pathways by TeTx by means of its H_c fragment.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Polyclonal antibodies against PKC isoforms α , γ and ζ and Protein A-agarose beads were purchased from Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Germany). A specific antibody against phosphotyrosine (Clone PY20) was obtained from Zymed Laboratories Inc. (San Francisco, CA, U.S.A.). Monoclonal antibodies against PLC γ -1 and polyclonal anti-trkA were from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, U.S.A.). Phospho-

p44/42 mitogen-activated protein kinase (MAPK) (ERK-1/2) E10 monoclonal antibody and phospho-specific trkA (Tyr⁴⁹⁰) antibody were from New England BioLabs (Beverly, MA, U.S.A.). Monoclonal antibody against ERK-1 and anti-mouse and anti-rabbit secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase and monoclonal antibodies against PKC isoforms β , δ and ϵ were from Transduction Laboratories (Lexington, KY, U.S.A.). Despite anti-ERK-1 antibody being described as specific for this kinase, it also detected ERK-2, although with less potency. NGF 2.5S was supplied by Alomone Labs (Jerusalem, Israel). All electrophoresis reagents were of analytical grade and were from Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden).

Expression and purification of H_c-TeTx

Escherichia coli M15 cells were induced to express a pQE3 (Qiagen, Chatsworth, CA, U.S.A.)-derived expression vector containing the cDNA for a H_c-TeTx-His₆ fusion protein by addition of 0.4 mM isopropyl β -D-thiogalactoside. Cells were pelleted, after 4 h, by centrifugation at 6000 g for 10 min, resuspended in 50 mM NaH₂PO₄/300 mM NaCl (pH 8), and sonicated with a probe sonicator, on ice, for two 60 s periods. The suspension was centrifuged at 15000 g for 20 min, and the clear supernatant was applied to a Ni-NTA-agarose precast column (Qiagen). Protein purification was carried out according to the manufacturer's instructions. Briefly, after a washing step with 50 mM NaH₂PO₄/300 mM CaCl₂/10% (v/v) glycerol (pH 6), the attached protein was eluted with a 50–300 mM imidazole gradient. Fractions (1 ml) were collected, separated by SDS/PAGE and the gels were stained with Coomassie Blue. Those fractions containing purified H_c-TeTx were concentrated by centrifugation using ultrafree-MC filtration tubes with a molecular mass cut-off of 10000 (Millipore, Bedford, MA, U.S.A.), and stored in aliquots at -80°C .

Preparation of synaptosomes from rat brain

All experiments were performed with a crude synaptosomal fraction (P₂) prepared from Sprague-Dawley, 4-to-6-week-old rat brains, as described previously [26] with slight modifications. The whole brain was homogenized in 40 vol. (wt/vol.) of phosphate buffer (pH 7.4) supplemented with 0.32 M sucrose. Homogenization was performed with 12 strokes (900 rev./min) of a Potter homogenizer with a Teflon pestle (0.1–0.15 mm clearance). The homogenate was centrifuged at 1000 g for 5 min at 4 $^{\circ}\text{C}$. The resultant supernatant was centrifuged at 12000 g for 20 min. The crude synaptosomal pellet obtained from one brain was gently resuspended in 7 ml of Krebs-Ringer bicarbonate buffer containing 125 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM CaCl₂, 22 mM NaHCO₃, 1 mM NaH₂PO₄ and 10 mM glucose, gassed before use with a mixture of O₂/CO₂ (19:1) for 20 min, and the pH was adjusted to 7.4.

Subcellular fractionation

Where subcellular fractionation was required, after each treatment the synaptosomes were collected by centrifugation and resuspended in 0.5 ml of homogenization buffer [20 mM Tris/HCl (pH 7.5), 2 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 2 mM dithiothreitol, 1 mM Na₃VO₄, 50 mM NaF and 2 mM PMSF containing 10 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin and 25 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin] and disrupted by sonication in a sonic dismembrator (Dyna-tech). The homogenate was centrifuged at 100000 g for 1 h to separate the soluble fraction (cytosolic compartment) from the particulate fraction (membranous compartment). The precipitated fraction

(pellet) was resuspended to the original volume in homogenization buffer supplemented with Triton X-100 (0.3% final concentration), and subsequently sonicated and kept for 1 h at 4 °C. The extract was centrifuged for 1 h at 100000 *g* and the resulting supernatant was considered the particulate fraction (membranous compartment).

Immunoprecipitation and immunoblotting analysis

The synaptosome suspension was diluted to a final protein concentration of 1 mg/ml, and divided into the necessary aliquots. After treatment, synaptosomes were collected by centrifugation and the reaction medium was removed. Next, 1 ml of homogenization buffer supplemented with 0.3% Triton X-100 was added and synaptosomes were disrupted by sonication (three times for 10 s each). For immunoprecipitation, 1 mg of total protein was incubated in the presence of 4 µg of antibody overnight at 4 °C, with gently rocking. The immunocomplex was then recovered by adding 50 µl of washed Protein A-agarose bead slurry (25 µl of packed beads) with gentle rocking for 2 h at room temperature. The agarose beads were collected by centrifugation in a microcentrifuge and the supernatant was removed. The beads were washed three times with ice-cold PBS and resuspended in 100 µl of 2 × reducing sample buffer [62 mM Tris/HCl, 0.1 M sucrose, 2% (v/w) SDS, 2 mM EDTA, 50 mM dithiothreitol, 0.02% Bromophenol Blue] and boiled for 2 min. The agarose beads recovered by centrifugation and 15 µl of each sample were subjected to SDS/PAGE. The separated proteins were transferred on to a PVDF membrane (Millipore) using a Mini TransBlot Cell II (Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.) at 100 V for 1 h. The blotting buffer used contained 48 mM Tris, 39 mM glycine, 1.3 mM SDS and 20% (v/v) methanol (pH 8.3). The membrane filters were blocked for 1 h with PBS supplemented with 0.1% (v/v) Tween 20 and 5% (w/v) defatted powdered milk. The membranes were then incubated overnight with the appropriate antibody diluted in blocking buffer, and then for 1 h with a secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase diluted in blocking buffer. Several washes with PBS/0.1% Tween 20 were performed between each of the steps. The Western blots were developed using SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate from Pierce (Rockford, IL, U.S.A.) and exposed to ECL[®] films (Amersham). Computer-assisted analysis of the bands was performed using a GS700 system (Bio-Rad), and data were processed with a Molecular Analyst image program (Bio-Rad) using a Dell workstation. Repeated scans were taken for correction of film non-linearity.

RESULTS

H_c-TeTx induces differential translocation of PKC isoforms

The classical PKC isoforms (PKC- α , - β and - γ), as well as PKC- δ , were detected in rat brain synaptosomes, and had an apparent molecular mass of 80 kDa, whereas the apparent molecular mass of PKC- ϵ was 110 kDa and of PKC- ζ 68 kDa. The treatment of synaptosomes with 100 nM PMA (results not shown) induced a typical response in PKC isoforms, as described previously [25], proving the reliability of the system. The incubation of synaptosomes with increasing concentrations of H_c-TeTx for 15 min induced changes in the distribution of PKC isoforms (Figure 1). Sustained translocation was observed in PKC- β , - γ and - δ isoforms, without significant loss of total immunoreactivity. The H_c-TeTx fragment induced, at the highest concentration tested (100 nM), a slight translocation of the PKC- α isoform (a 27.6% loss in the soluble fraction and a 21% increase in the particulate fraction). A decrease in PKC- ϵ immuno-

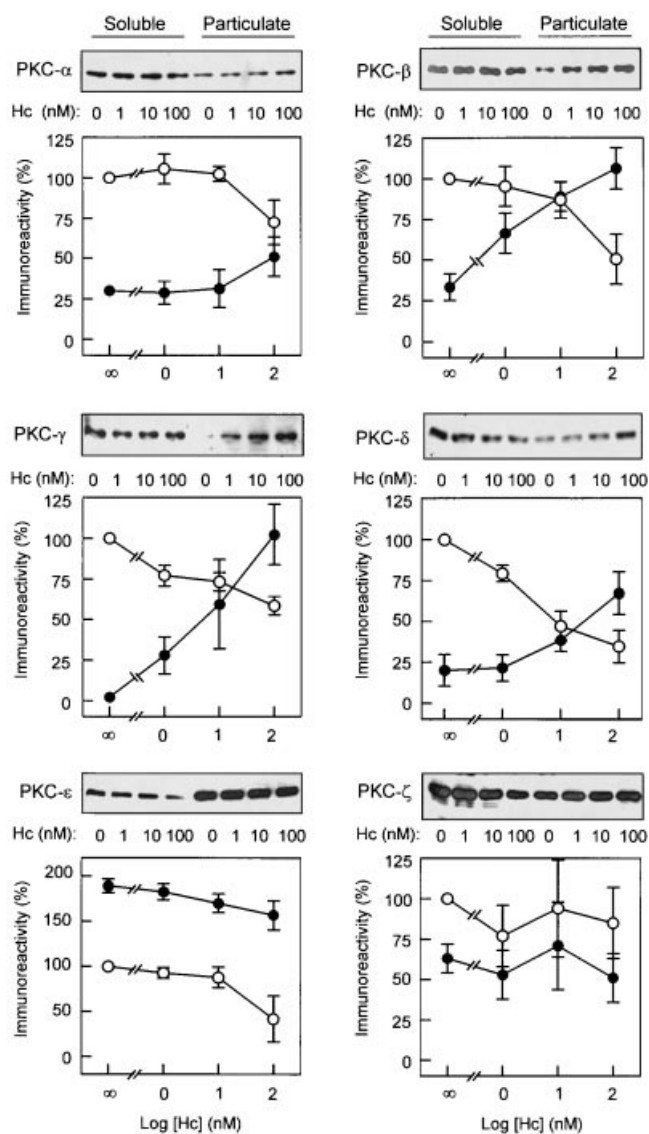


Figure 1 PKC isoform translocation induced by H_c-TeTx

Aliquots of 1 ml from a suspension of synaptosomes (2 mg/ml protein) were exposed to 1, 10 or 100 nM H_c-TeTx (Hc) for 15 min, and soluble and particulate fractions were prepared as described in the Materials and methods section. For SDS/PAGE, protein loading was 20 µg/lane for each fraction. Following SDS/PAGE and transfer of protein on to the PVDF membrane, immunoblotting was carried out and bands were detected by ECL[®]. The upper panels show representative blots obtained with each immunodetected isoform (PKC- α , - β , - γ , - δ , ϵ and - ζ), as is indicated on the left of each blot. The lower panels show quantification, by laser-scanning densitometry, of the concentration dependence of the immunoreactivity of the soluble (○) and particulate (●) fractions. Data were normalized to the soluble control absorbance arbitrary units, taking this value as 100%. The amounts of immunoreactive PKC isoform in the soluble or particulate fraction (expressed as a percentage of the soluble control value) were plotted against log H_c-TeTx concentration. Data from three separate experiments are expressed as means ± S.D.

reactivity in the soluble fraction after treatment with the H_c-TeTx fragment at 100 nM was also observed, whereas no significant effect was seen at any concentration with PKC- ζ . In order to determine whether down-regulation exerted by H_c-TeTx exists, time-course experiments were performed. At a fixed H_c-TeTx concentration of 100 nM, only PKC- β showed clear down-regulation between 10 and 30 min, whereas neither PKC- γ nor

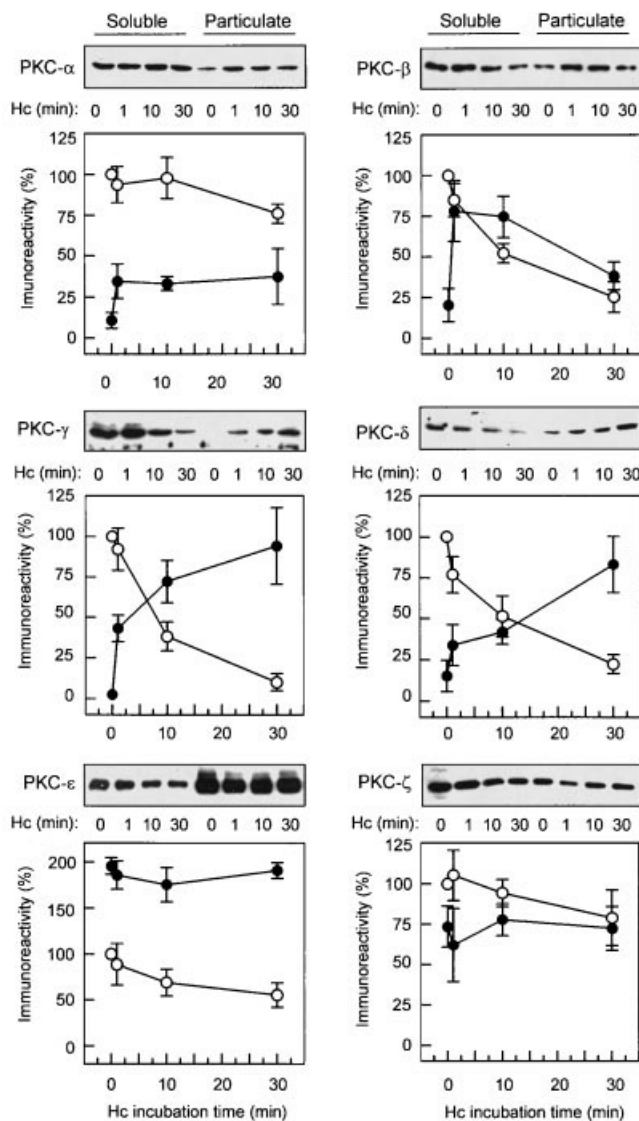


Figure 2 Time course of PKC isoform redistribution by H_c-TeTx

Synaptosomes were treated with vehicle, as a control, for 30 min, or with 100 nM H_c-TeTx (Hc) for 1, 10 or 30 min, at 30 °C. Representative blots of the results obtained for each PKC isoform are included at the top of each panel. Data were normalized, taking the value of the soluble control absorbance arbitrary units as 100%. The amounts of immunoreactive PKC isoform in the soluble (○) or particulate (●) fraction (expressed as a percentage of the soluble control value) were plotted against the incubation time of H_c-TeTx. Data from three separate experiments are expressed as means ± S.D.

PKC- δ showed down-regulation up to 30 min, the longest time tested (Figure 2). The PKC- α kinetics shows a rapid onset, since translocation was detectable at 1 min, followed by a modest down-regulation at 10 min and 30 min. In these experiments a loss of PKC- ϵ from the soluble fraction was also found ($55 \pm 13\%$ with respect to the control). No consistent translocation was observed in the case of PKC- ζ , even after 30 min of incubation.

Tyrosine phosphorylation of trkA, PLC γ -1 and ERK-1/2 is stimulated by H_c-TeTx

Immunoprecipitation experiments using anti-phosphotyrosine antibodies were performed in order to determine the possible

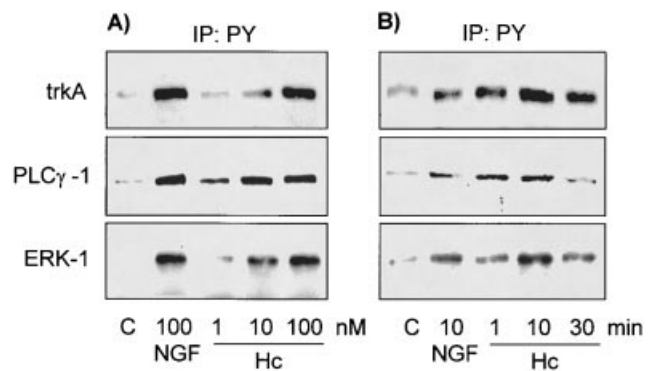


Figure 3 H_c-TeTx-induced tyrosine phosphorylation of trkA, PLC γ -1 and ERK-1

(A) Synaptosomes, in suspension in Krebs–Ringer buffer supplemented with 10 mM glucose, were incubated at 30 °C with NGF (100 nM), as a positive control, for 10 min or with various H_c-TeTx (Hc) concentrations (1, 10 or 100 nM) for 5 min. (B) Synaptosomes were incubated at 30 °C with NGF (100 nM), as a positive control, for 10 min or for various times (1, 10 or 30 min) with 100 nM H_c-TeTx (Hc). Equal amounts of lysate from each time point (1 mg protein/ml), obtained by sonication, were immunoprecipitated (IP), as described in the Material and methods section, with 4 μ g of antibody directed against phosphotyrosine residues (PY). Subsequent blots were probed with anti-trkA, anti-PLC γ -1 or with anti-ERK-1. Each experiment was repeated three times and similar results were obtained.

effect of H_c-TeTx on cellular signal transduction pathways which involve tyrosine phosphorylation. In each experiment, whole synaptosomal homogenates were immunoprecipitated using antibodies from the PY20 clone, and the content of several proteins phosphorylated on tyrosine, i.e. trkA, PLC γ -1 and ERK-1, was determined by Western blotting. NGF, as a typical signal transduction activator, was used as a control. The amount of tyrosine phosphorylation that appeared in trkA, PLC γ -1 and ERK-1 was dependent on the H_c-TeTx fragment concentration, and reached a maximum at 100 nM (Figure 3A). The extent of response achieved with H_c-TeTx as activator of phosphorylation was similar to that of NGF, in the cases where the neurotrophin was used as a positive control. The band corresponding to the trkA receptor appeared at approx. 140 kDa molecular mass, and the band corresponding to PLC γ -1 at approx. 150 kDa. The onset of tyrosine phosphorylation was rapid and detectable within 1 min of incubation with H_c-TeTx (100 nM) in the three phosphoproteins tested (Figure 3B), although the maximum amount of signal was seen at 10 min, and had declined at 30 min. In some experiments, a band corresponding to ERK-2 appeared, indicating that parallel activation of ERK-2 also existed (results not shown). The major detection of ERK-1 in immunoprecipitates was because of the greater specificity of this antibody for ERK-1, as explained in the Materials and methods section. The PLC γ -1 phosphorylation was further supported by our finding that TeTx induced a modest, but significant, increase in polyphosphoinositide hydrolysis in rat brain synaptosomes, which is in agreement with a PLC activity enhancement [27].

Time-course experiments and subsequent analyses with antibodies specific for Thr/Tyr-phosphorylated ERK-1 (p44) and ERK-2 (p42) were performed, and the results are shown in Figure 4(A). In these experiments, the induction of p42 and p44 phosphorylation was evident, and appeared after 10 min of incubation. Equal loading of protein between samples was confirmed by detection with antibody described as specific for ERK-1, independent of phosphorylation state, although the antibody recognized both p44 and p42 when the amount of

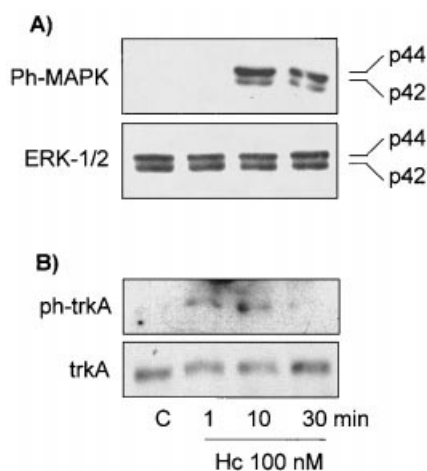


Figure 4 H_c-TeTx increases phosphorylation of ERK-1/2 and of trkA

Synaptosomes were incubated at 30 °C with the H_c-TeTx (Hc) fragment (100 nM) for various times (1, 10 or 30 min), and 20 µg/lane of total synaptosomal lysates were separated by SDS/PAGE. Protein was transferred to a PVDF membrane and immunoblotted as described in the Materials and methods section. Detection was by ECL[®]. **(A)** The upper blot was analysed using an antibody specific for Thr/Tyr phosphorylated ERK-1 (p44) and ERK-2 (p42) (phospho-p44/42 MAPK E10 monoclonal antibody; Ph-MAPK), and the lower blot shows the immunoreactivity obtained for the same samples with antibodies specific for ERK-1 and ERK-2 (ERK-1/2), independent of their phosphorylation state. **(B)** The upper blot was analysed using an antibody specific for phosphorylated trkA in Tyr⁴⁹⁰ (ph-trkA), and the lower blot shows the immunoreactivity obtained for the same samples with antibodies specific for trkA, independent of their phosphorylation state. All blots are representative of three separate experiments.

ERK-2 was great enough. Analysis of time-course experiments with an antibody which recognized the Tyr⁴⁹⁰-phosphorylated trkA receptor indicated that this tyrosine kinase receptor was

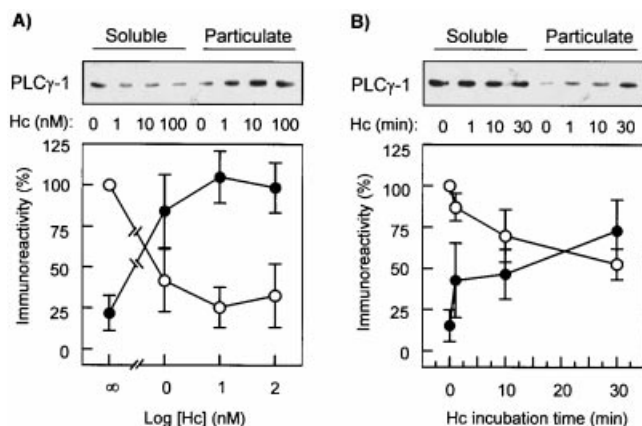


Figure 5 PLC γ -1 translocation induced by H_c-TeTx

(A) Dependence of H_c-TeTx concentration of PLC γ -1 translocation. Aliquots of 1 ml from a suspension of synaptosomes (2 mg protein/ml) were exposed to 1, 10 or 100 nM H_c-TeTx (Hc) for 30 min, and soluble and particulate fractions were prepared as described in the Materials and methods section. **(B)** Time course of PLC γ -1 redistribution. Synaptosomes (2 mg protein/ml) were treated with vehicle, as the control, for 30 min, or with 100 nM H_c-TeTx (Hc) for 1, 10 or 30 min, at 30 °C. For SDS/PAGE, in both cases, protein loading was 20 µg/lane for each fraction. Data were normalized, taking the soluble control arbitrary absorbance unit value as 100%. The amount of immunoreactive bands in the soluble or particulate fraction (expressed as a percentage of the soluble control value) were plotted against log H_c-TeTx concentration and incubation time. Data from three separate experiments were expressed as means \pm S.D.

phosphorylated, at least on Tyr⁴⁹⁰, in response to 100 nM H_c-TeTx (Figure 4B). These analyses confirm the result observed in Figure 3(A), showing that after 10 min of incubation (time of maximal Tyr⁴⁹⁰ phosphorylation) the signal decreased, indicating dephosphorylation of trkA. The results shown in Figure 4 point to a previous trkA activation (signal appeared after 1 min of incubation) with respect to ERK activation (signal appeared after 10 min) in response to the H_c-TeTx fragment. Equal loading of protein between samples was confirmed by detection with anti-trkA, which was independent of phosphorylation state.

H_c-TeTx induces PLC γ -1 translocation to particulate fraction

A similar series of experiments to those described in Figures 1 and 2 were carried out in order to assess the effect of H_c-TeTx on PLC γ -1 translocation. Treatment of synaptosomes with 1, 10 or 100 nM H_c-TeTx for 30 min indicated that translocation of PLC γ -1 from the soluble fraction to the particulate fraction was concentration dependent (Figure 5A). The translocation of PLC γ -1 at a fixed H_c-TeTx concentration of 100 nM was detectable after 1 min of treatment, and increased further after 10 and 30 min of H_c-TeTx treatment (Figure 5B).

DISCUSSION

The first work on the influence of TeTx on members of the signal transduction pathways described a decrease in total PKC activity in TeTx-treated macrophages and in the spinal cord of mice with generalized tetanus [8]. Later, our group described the TeTx-induced activation of PKC in the perinatal rat brain, which paralleled an elevation in 5-hydroxytryptamine levels [12]. The findings that intraventricular administration of TeTx into adult rats induced translocation and down-regulation of PKC [9], and that treatment of primary neuron cultures from fetal rat brain enhanced translocation of PKC activity and increased polyphosphoinositide hydrolysis [11] pointed in the same direction. Since PKC activity is the sum of various molecular PKC entities, a detailed investigation into which PKC isoforms are affected by the H_c-TeTx fragment was performed and is described in the present paper. In previous work by our group, it was determined that the H_c-TeTx fragment inhibits 5-hydroxytryptamine uptake in rat brain synaptosomes, an action similar to that of TeTx in its whole di-chain form, as well as in the single-chain form [27,11]. This inhibition of 5-hydroxytryptamine transport is directly related to the TeTx-induced phosphorylation of serine residues in the 5-hydroxytryptamine transporter by PKC [28]. Thus the H_c-TeTx fragment could exert similar effects on some cellular events as entire TeTx. In addition, we have shown now that H_c-TeTx acts in a similar way to the whole toxin in the activation of intracellular signalling pathways, an effect described recently [25]. The triggering of this effect could be related to the interaction of TeTx through its H_c fragment with a still undefined membrane component.

The PKC translocation observed in this work is directly related to the activation of PLC γ -1, assessed through the increase in its phosphotyrosine content, since the products of phospholipases are activators of PKC activity and translocation. Moreover, this PLC γ -1 phosphorylation is in accord with enhancement of polyphosphoinositide hydrolysis by TeTx observed in primary neuron cultures from fetal rat brain and in slices from adult rat cerebral cortex [11]. The increase in PLC activity, which is modest but significant, is very similar to that exerted by NGF in rat brain synaptosomes [29]. Stimulation of inositol phospholipid hydrolysis in response to TeTx has also been detected in rat brain synaptosomes, and at a similar level to that exerted by NGF [27]. NGF is a signalling molecule, which acts through specific PLC γ

activation by means of its association with *trkA*, auto-phosphorylated on tyrosine residues [30]. Thus the modest increase in polyphosphoinositide hydrolysis in synaptosomes by NGF and TeTx described by our group, when compared with the muscarinic agonist carbachol [11,29], can be related to isoform-specific PLC activation. On the other hand, PLC γ -1 translocation has been described in several studies, and this event has been related to its phosphotyrosine content and to the activation of tyrosine kinase receptors [31]. In addition to the probable role of PLC γ -1 in TeTx-triggered pathways, the H_c-TeTx-induced phosphorylation of *trkA* in Tyr⁴⁹⁰ points to a parallel interaction between Shc proteins and *trkA*, an event described as important in neuronal differentiation, due to tyrosine kinase receptors. Since Shc adaptor proteins are the first link in a pathway that results in ERK-1/2 activation [18], this putative association with *trkA* is additionally supported by the ERK-1/2 phosphorylation observed in the present work. In addition to this, changes in the *c-fos* and *Fos*-like immunoreactivity have been observed in the cortex of rats with TeTx-induced epilepsy [32], and these could be a direct consequence of the activation of the MAPK pathway, since growth-factor-induced *c-fos* expression is activated through transcription factors, such as Elk-1 or SAP-1, which are targets of Ras/MAPK or PKC-mediated phosphorylation [33].

The atoxic H_c fragment of TeTx has the same ability to bind nerve tissue and to be retrogradely transported through synapses and reach the central nervous system as the native whole toxin, but without causing clinical symptoms [34]. On the other hand, studies on dissociated fetal cortical neurons indicate that TeTx is clearly superior to the ganglioside binding H_c-TeTx fragment in its capacity for neuronal binding and internalization [35]. Moreover, the H_c-TeTx fragment also exerts the same effect as the holoprotein in inhibiting 5-hydroxytryptamine uptake in rat brain synaptosomes [27]. This effect is not due to the action on the 5-hydroxytryptamine high-affinity site on the 5-hydroxytryptamine transporter, since binding of [³H]imipramine and 5-[³H]hydroxytryptamine did not change after TeTx treatment [11]. Probably, the inhibition of 5-hydroxytryptamine transport and the activation of transducer enzymes are a consequence of the interaction between TeTx and a membrane component through the H_c-TeTx domain. Although gangliosides containing '1b' structures have been described as high affinity membrane receptors for TeTx [36], a two-receptor model has been postulated, since TeTx binding to cells and neuronal membranes is sensitive to proteases [37]. In this model, the initial toxin binding to gangliosides is followed by lateral movement in the membrane until the toxin reaches the proteic receptor, and is then internalized through a vesicle endocytosis mechanism [38]. The identity of this neurospecific proteic receptor for clostridial neurotoxins is still unknown. Recently, the binding of the H_c fragment from BoNT/A to three proteins of 150, 120 and 75 kDa in rat synaptosomes has been reported [39]. The fact that BoNT/A is the only retroaxonally transported botulinum neurotoxin known is remarkable, although it is transported at a slower rate than TeTx [40]. In the case of TeTx, the C-terminal half of its H_c fragment has been identified as being responsible for neuronal binding and interaction with a putative protein receptor with an apparent molecular mass of 15 kDa [41].

The differential translocation of synaptosomal PKC isoforms in response to TeTx, as well as the induction of phosphorylation of *trkA*, PLC γ -1 and ERK-1/2 and activation of PKC isoforms, has recently been demonstrated by our group [25]. As a consequence of the results presented in the present work, we can attribute this signal activation to the H_c-TeTx fragment. This observation is consistent with the extensive descriptions in the literature of H_c-TeTx being responsible for toxin binding to the

cell membrane, and thus being the trigger of signal transduction pathways by TeTx. The putative interaction between TeTx and *trkA* would explain the finding of the toxin in endocytic vesicles, as well as representing the way by which TeTx is carried from the injury site to its target tissues, i.e. the peripheral and central nervous systems, since the *trk* receptors have been described as retroaxonally transported. On the other hand, the activation of signal transducers could represent a collateral effect as a consequence of the binding of the toxin to the *trkA* receptor. In any case, further studies are required to establish the specific role of *trkA* in TeTx action, membrane binding and mobility, as well as the implications of the activation of signal transduction pathways by the neurotoxin.

This work was supported, in part, by Grant PB97-0169 from the Ministerio de Educación y Cultura, Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica. We thank Dr Salvador Bartolomé from Laboratori d'Anàlisi Bioquímiques for technical assistance in image scanning.

REFERENCES

- 1 Simpson, L. L. (1989) *Botulinum Neurotoxin and Tetanus Toxin*, Academic Press, San Diego
- 2 Goldberg, R. L., Costa, T., Habif, W. H., Kohn, L. D. and Hardegree, M. C. (1981) Characterization of fragment C and tetanus toxin binding to rat brain membranes. *Mol. Pharmacol.* **20**, 565–570
- 3 Halpern, J. L. and Loftus, A. (1993) Characterization of the receptor-binding domain of tetanus toxin. *J. Biol. Chem.* **268**, 11188–11192
- 4 Niemann, H., Blasi, J. and Jahn, R. (1994) Clostridial neurotoxins: new tools for dissecting exocytosis. *Trends Cell Biol.* **4**, 179–185
- 5 Schiavo, G., Benfenati, F., Poulain, B., Rossetto, O., DeLaureto, P. P., DasGupta, B. R. and Montecucco, C. (1992) Tetanus toxin and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature (London)* **359**, 832–835
- 6 Facchiano, F., Valtorta, F., Benfenati, F. and Luini, A. (1993) The transglutaminase hypothesis for the action of tetanus toxin. *Trends Biochem. Sci.* **18**, 327–329
- 7 Ashton, A. C., Li, Y., Doussau, F., Weller, U., Dougan, G., Poulain, B. and Dolly, O. (1995) Tetanus toxin inhibits neuroexocytosis even when its Zn²⁺-dependent protease activity is removed. *J. Biol. Chem.* **270**, 31386–31390
- 8 Ho, J. L. and Klempner, M. S. (1988) Diminished activity of PKC in tetanus toxin-treated macrophages and in the spinal cord of mice manifesting generalized tetanus intoxication. *J. Infect. Dis.* **157**, 925–933
- 9 Aguilera, J. and Yavin, E. (1990) *In vivo* translocation and down-regulation of protein kinase C following intraventricular administration of tetanus toxin. *J. Neurochem.* **54**, 339–342
- 10 Aguilera, J., Padrós-Giralt, C., Habig, W. H. and Yavin, E. (1993) GT1b ganglioside prevents tetanus toxin-induced PKC activation and down-regulation in the neonatal brain *in vivo*. *J. Neurochem.* **60**, 709–713
- 11 Gil, C., Ruiz-Meana, M., Alava, M., Yavin, E. and Aguilera, J. (1998) Tetanus toxin enhances protein kinase C activity translocation and increases polyphosphoinositide hydrolysis in rat cerebral cortex preparations. *J. Neurochem.* **70**, 1636–1643
- 12 Aguilera, J., López, L. A. and Yavin, E. (1990) Tetanus toxin-induced PKC activation and elevated serotonin levels in the perinatal rat brain. *FEBS Lett.* **263**, 61–65
- 13 Najib, A., Pelliccioni, P., Gil, C. and Aguilera, J. (1999) *Clostridium* neurotoxins influence serotonin uptake and release differently in rat brain synaptosomes. *J. Neurochem.* **72**, 1991–1998
- 14 Ibañez, C. F., Ebendal, T. and Persson, H. (1991) Chimeric molecules with multiple neurotrophic activities reveal structural elements determining the specificities of NGF and BDNF. *EMBO J.* **10**, 2105–2110
- 15 Barbacid, M. (1993) NGF: a tale of two receptors. *Oncogene* **8**, 2033–2042
- 16 Dechant, G. and Barde, Y.-A. (1997) Signaling through the neurotrophin receptor p75NTR. *Curr. Opin. Neurobiol.* **7**, 413–418
- 17 Segal, R. A. and Greenberg, M. E. (1996) Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu. Rev. Neurosci.* **19**, 463–489
- 18 Robbins, D. J., Zhen, E., Owaki, H., Vanderbilt, C. A., Ebert, D., Geppert, T. D. and Cobb, M. H. (1993) Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **268**, 5097–5106
- 19 Seger, R. and Krebs, E. G. (1995) The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* **9**, 726–735
- 20 Morrison, D. K., Heidecker, G., Rapp, U. and Copeland, T. D. (1993) Identification of the major phosphorylation sites of the Raf-1 kinase. *J. Biol. Chem.* **268**, 17309–17316

- 21 Nishizuka, Y. (1995) Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* **9**, 484–496
- 22 Kraft, A. S. and Anderson, W. B. (1983) Phorbol esters increase the amount of Ca²⁺, phospholipid-dependent protein kinase associated with plasma membrane. *Nature (London)* **301**, 621–623
- 23 Saïdo, T. C., Sorimachi, H. and Suzuki, K. (1994) Calpain: new perspective in molecular diversity and physiological-pathological involvement. *FASEB J.* **8**, 814–822
- 24 Grimes, M. L., Zhou, J., Beattie, E. C., Yuen, E. C., Hall, D. E., Valletta, J. S., Topp, K. S., LaVail, J. H., Bunnett, N. W. and Mobley, W. C. (1996) Endocytosis of activated TrkA: Evidence that nerve growth factor induces formation of signaling endosomes. *J. Neurosci.* **16**, 7950–7964
- 25 Gil, C., Chaib-Oukadour, I., Pelliccioni, P. and Aguilera, J. (2000) Activation of signal transduction pathways involving trkA, PLC γ -1, PKC isoforms and ERK-1/2 by tetanus toxin. *FEBS Lett.* **481**, 177–182
- 26 Gray, E. G. and Whittaker, U. P. (1962) The isolation of nerve ending from brain: an electron-microscope study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation. *J. Anat.* **96**, 1–36
- 27 Inserte, J., Najib, A., Pelliccioni, P., Gil, C. and Aguilera, J. (1999) Inhibition by tetanus toxin of sodium-dependent, high-affinity [³H]5-hydroxytryptamine uptake in rat synaptosomes. *Biochem. Pharmacol.* **57**, 111–120
- 28 Najib, A., Pelliccioni, P., Gil, C. and Aguilera, J. (2000) Serotonin transporter phosphorylation modulated by tetanus toxin. *FEBS Lett.* **486**, 136–142
- 29 Gil, C., Pelliccioni, P., Itarte, E. and Aguilera, J. (1999) Differential action of nerve growth factor and phorbol ester TPA on rat synaptosomal PKC isoenzymes. *Neurochem. Int.* **35**, 281–291
- 30 Ohmichi, M., Decker, S. J., Pang, L. and Saltiel, A. R. (1991) Nerve growth factor binds to the 140 kd *trk* proto-oncogen product and stimulates its association with the *src* homology domain of phospholipases C γ 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**, 217–223
- 31 Zhang, B.-H. and Farrell, G. C. (1999) Chronic ethanol consumption disrupts complexation between EGF receptor and phospholipase C- γ 1: relevance to impaired hepatocyte proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257**, 89–94
- 32 Liang, F. and Jones, E. G. (1997) Zif268 and Fos-like immunoreactivity in tetanus toxin-induced epilepsy: reciprocal changes in the epileptic focus and the surround. *Brain Res.* **778**, 281–292
- 33 Hill, C. S. and Treisman, R. (1995) Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell* **80**, 199–211
- 34 Manning, K. A., Erichsen, J. T. and Evinger, C. (1990) Retrograde transneuronal transport properties of fragment C of tetanus toxin. *Neuroscience* **34**, 251–263
- 35 Fishman, P. S., Parks, D. A., Patwardhan, A. J. and Matthews, C. C. (1999) Neuronal binding of tetanus toxin compared to its ganglioside binding fragment H_C. *Nat. Toxins* **7**, 151–156
- 36 Rogers, T. B. and Snyder, S. H. (1981) High affinity binding of tetanus toxin to mammalian brain membranes. *J. Biol. Chem.* **256**, 2402–2407
- 37 Yavin, E. and Nathan, A. (1986) Tetanus toxin receptor on nerve cells contains a trypsin-sensitive component. *Eur. J. Biochem.* **105**, 403–407
- 38 Montecucco, C. (1986) How do tetanus and botulinum toxins bind to neuronal membranes? *Trends Biochem. Sci.* **11**, 314–317
- 39 Li, L. and Singh, B. R. (1999) *In vitro* translation of type A *Clostridium botulinum* neurotoxin heavy chain and analysis of its binding to rat synaptosomes. *J. Protein Chem.* **18**, 89–95
- 40 Wellhöner, H. H. (1989) Clostridial toxins and the central nervous system: studies on *in situ* tissues. In *Botulinum Neurotoxin and Tetanus Toxin* (Simpson, L. L., ed.), pp. 231–253, Academic Press, San Diego
- 41 Herreros, J., Lalli, G. and Schiavo, G. (2000) C-terminal half of tetanus toxin fragment C is sufficient for neuronal binding and interaction with a putative protein receptor. *Biochem. J.* **347**, 199–204

Received 23 November 2000/1 February 2001; accepted 23 February 2001

Trabajo II:

**C-terminal fragment of tetanus toxin heavy chain
activates Akt and MEK/ERK signalling pathways in a
Trk receptor-dependent manner in cultured cortical
neurons.**

C-terminal fragment of tetanus toxin heavy chain activates Akt and MEK/ERK signalling pathways in a Trk receptor-dependent manner in cultured cortical neurons

Carles GIL¹, Imane CHAIB-OUKADOUR and José AGUILERA

Departament de Bioquímica i de Biologia Molecular, Facultat de Medicina, Institut de Neurociències, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra (Barcelona), Catalunya, Spain

Previous publications from our group [Gil, Chaib, Pelliccioni and Aguilera (2000) FEBS Lett. **481**, 177–182; Gil, Chaib, Blasi and Aguilera (2001) Biochem. J. **356**, 97–103] have reported the activation, in rat brain synaptosomes, of several phosphoproteins, such as neurotrophin tyrosine kinase (Trk) A receptor, phospholipase C γ -1, protein kinase C (PKC) isoforms and extracellular-signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK-1/2). In the present study, we examined, by means of phospho-specific antibodies, the activation of the signalling cascades involving neurotrophin Trk receptor, Akt kinase and ERK pathway, in cultured cortical neurons from foetal rat brain, by tetanus toxin (TeTx) as well as by the C-terminal part of its heavy chain (H_C-TeTx). TeTx and H_C-TeTx induce fast and transient phosphorylation of Trk receptor at Tyr⁶⁷⁴ and Tyr⁶⁷⁵, but not at Tyr⁴⁹⁰, although the potency of TeTx in this action was higher when compared with H_C-TeTx action. Moreover, H_C-TeTx and TeTx also induced phosphorylation of Akt (at Ser⁴⁷³ and Thr³⁰⁸) and of ERK-1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴), in a time- and concentration-dependent manner. The detection of TeTx- and H_C-TeTx-induced

phosphorylation at Ser⁹ of glycogen synthase kinase 3 β confirms Akt activation. In the extended analysis of the ERK pathway, phosphorylation of the Raf, mitogen-activated protein kinase kinase (MEK)-1/2 and p90Rsk kinases and phosphorylation of the transcription factor cAMP-response-element-binding protein were detected. The use of tyrphostin AG879, an inhibitor of Trk receptors, demonstrates their necessary participation in the H_C-TeTx-induced activation of Akt and ERK pathways, as well as in the phosphorylation of phospholipase C γ -1. Furthermore, both pathways are totally dependent on phosphatidylinositol 3-kinase action, and they are independent of PKC action, as assessed using wortmannin and Ro-31-8220 as inhibitors. The activation of PKC isoforms was determined by their translocation from the cytosolic compartment to the membranous compartment, showing a clear H_C-TeTx-induced translocation of PKC- α and - β , but not of PKC- ϵ .

Key words: Akt, cortical neuron, extracellular-signal-regulated kinase (ERK), neurotrophin, tetanus toxin.

INTRODUCTION

Tetanus toxin (TeTx) is among the most powerful bacterial protein toxins known. TeTx induces spastic paralysis by specifically cleaving vesicle-associated membrane protein (VAMP)/synaptobrevin, a SNARE (soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor) protein and a key component of the neurotransmitter exocytosis machinery. TeTx consists of a light chain (molecular mass 50 kDa) responsible for the cytotoxic activity, and a heavy chain (molecular mass 100 kDa), which can be disrupted into two fragments by the protease papain, corresponding to its C-terminal part (H_C fragment, 50 kDa, residues 864–1315 of TeTx) and its N-terminal part (H_N fragment, 50 kDa). The H_C domain is responsible for TeTx binding to the cell membrane. Once TeTx binds to nerve termini of motor neurons, it is retroaxonally transported to the central nervous system (CNS). On release and recapture by interneurons, it blocks the secretion of inhibitory neurotransmitters (i.e. γ -aminobutyric acid and glycine). The TeTx-blocking activity is due to a Zn²⁺-dependent proteolytic cleavage of VAMP (reviewed in [1]). It is well documented that TeTx binding to neurons requires polysialogangliosides and

involves the C-terminal part of the TeTx heavy chain (H_C-TeTx) [2]. However, the necessity for a protein as a co-receptor for TeTx on neurons is highly suspected [3].

Recently, growing evidence from our group suggests that TeTx can activate, through the H_C fragment, intracellular signalling pathways, involving the Trk receptor, extracellular-signal-regulated kinase (ERK) and protein kinase C (PKC) isoforms [4,5]. The neurotrophin family comprises nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophin-3 and -4/5, which exert their effects through the interaction with membrane receptors, i.e. the Trk receptors. NGF binds specifically to the TrkA receptor, whereas BDNF and neurotrophin-4/5 bind to TrkB and neurotrophin-3 binds to TrkC (reviewed in [6]). In addition, neurotrophins can bind non-specifically to a 75 kDa membrane receptor (p75^{NTR}) [7]. On the other hand, p75^{NTR} is the high-affinity receptor for pro-neurotrophins, which are converted into mature molecules by means of proteolytic cleavage [8]. One relevant feature of Trk receptors is the ability to communicate their signal in a retrograde manner from distal axons to neuron cell bodies. This communication is exerted through the endocytosis of activated receptors and formation of signalling endosomes [9]. Binding

Abbreviations used: BDNF, brain-derived neurotrophic factor; CNC, cortical neuron culture; CNS, central nervous system; CREB, cAMP-response-element-binding protein; DTT, dithiothreitol; E18, embryonic day 18; ERK, extracellular-signal-regulated kinase; GSK3 β , glycogen synthase kinase 3 β ; MAP kinase, mitogen-activated protein kinase; MEK, mitogen-activated protein kinase kinase; NGF, nerve growth factor; PI-3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PKC, protein kinase C; PLC, phospholipase C; TeTx, tetanus toxin; H_C-TeTx, C-terminal part of TeTx heavy chain; Trk, high-affinity tyrosine kinase receptors from neurotrophins; VAMP, vesicle-associated membrane protein.

¹ To whom correspondence should be addressed (e-mail carles.gil@uab.es).

of neurotrophin to its Trk receptor activates the protein kinase intrinsic to the receptor, leading to autophosphorylation at tyrosine residues, which allows recognition of the phosphorylated tyrosine residues of the receptor by several intracellular signalling proteins that contain Src homology 2 domains, such as phospholipase C γ -1 (PLC γ -1), Shc proteins and the p85 phosphatidylinositol 3-kinase (PI-3K) subunit (reviewed in [10]). Such interactions lead to the activation, by means of a kinase cascade, of the Raf/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) kinase (MEK)/ERK pathway. ERK is a family of protein serine/threonine kinases of which the best-characterized members are ERK-1 (p44) and ERK-2 (p42). These become activated after phosphorylation at threonine and tyrosine residues [11]. Once activated, ERK phosphorylates and activates other protein kinases. Among the substrates of ERK is the family of p90 ribosomal S6 kinases (p90Rsk), which is activated by virtually all extracellular signalling molecules that stimulate the ERK pathway. On the other hand, ERK induces phosphorylation of the transcription factor cAMP-response-element-binding protein (CREB), an action mediated by the protein kinases mitogen- and stress-activated kinases 1 and 2 [12]. ERK activity can also be enhanced by the direct action of PKC on Raf kinase [13]. PKC is an extended family of protein serine/threonine kinases, especially abundant in the nervous system, composed of homologous isoforms, which can be divided into three subfamilies depending on their activation requirement: 'classical' PKCs (α , β I, β II and γ isoforms), 'novel' PKCs (δ , ϵ , θ and η isoforms) and 'atypical' PKCs (ζ and ι isoforms) [14]. Some activators can cause the translocation of PKC from the cytosolic fraction to the membrane, an event directly related to their activation [15].

As has been pointed out previously, activation of Trk receptors can also trigger a pathway initiated by PI-3K, which leads to the activation of Akt, a 60 kDa serine/threonine kinase. It is well documented that Akt is a general mediator of survival signals and that Akt is both necessary and sufficient for survival of eukaryotic cells [16]. In the current model for Akt activation, Akt is first recruited from the cytoplasm to cellular membranes by interaction of its pleckstrin homology domain with phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate and phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate, which are lipid products of PI-3K [17]. Akt activity is not stimulated by translocation itself but is dependent on phosphorylation at two residues (Ser⁴⁷³ and Thr³⁰⁸). Thr³⁰⁸ is phosphorylated by the phosphoinositide-dependent kinase 1, which also contains a pleckstrin homology domain [18]. The mechanism of phosphorylation of Ser⁴⁷³ remains elusive; although phosphoinositide-dependent kinase 1 is a possible candidate, the integrin-linked kinase and very recently autophosphorylation have also been implicated [19]. Mutational analysis has shown that although Thr³⁰⁸ is sufficient to activate Akt, both residues are required for maximal activation [20].

In the present study, new actions of TeTx exerted through the interaction of this toxin with the cellular membrane are described. Since both TeTx and its H_C fragment are internalized through an endocytic mechanism and subsequently retroaxonally transported, the possibility of an interaction between TeTx and the Trk receptors arises. This possible mechanism could be used by *Clostridium* to transport the TeTx to the CNS, without excluding possible advantages for the pathogen in affecting host signalling.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Biologically active TeTx was supplied by List Biological Laboratories (Campbell, CA, U.S.A.). Polyclonal anti-TrkB and

anti- α -tubulin antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, U.S.A.). Monoclonal anti-PLC γ -1 was supplied by Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, U.S.A.). A phosphotyrosine-specific antibody (clone PY20) was obtained from Zymed Laboratories (San Francisco, CA, U.S.A.). All of the antibodies raised against phosphorylated residues, i.e. E10 monoclonal antibodies against phospho-p44/42 MAP kinase, polyclonal antibodies against phospho-Akt (Ser⁴⁷³ and Thr³⁰⁸), phospho-glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) (Ser⁹), phospho-C-Raf (Ser²⁵⁹), phospho-MEK-1/2 (Ser²¹⁷/Ser²²¹), phospho-p90Rsk (Ser³⁸⁰), phospho-CREB (Ser¹³³), phospho-specific Trk receptor (Tyr⁴⁹⁰ and Tyr⁶⁷⁴/Tyr⁶⁷⁵) and anti-Akt antibody were obtained from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, U.S.A.). Monoclonal antibody raised against ERK-1 and anti-mouse and anti-rabbit secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase, as well as monoclonal antibodies against PKC isoforms β and ϵ , were from Transduction Laboratories (Lexington, KY, U.S.A.). Polyclonal antibody against PKC isoform α and Protein A-agarose beads were purchased from Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany). Despite the anti-ERK-1 antibody being described as specific for this kinase, it also detected ERK-2, though with less potency. Human recombinant BDNF and wortmannin were supplied by Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.), whereas tyrphostin AG879, PD98059 and Ro-31-8220 were from Calbiochem (Darmstadt, Germany). All other reagents were of the highest grade possible from standard commercial sources.

Primary cortical neuron cultures (CNCs)

Timed-pregnant Sprague-Dawley rats were purchased from the Servei d'estabulari (Cerdanyola, CAT, Spain). After the mother was killed by decapitation under diethyl ether anaesthesia, the fetuses were removed on embryonic day 18 (E18), their brains were removed and placed in ice-cold PBS and the cortices were dissected. Then, single cells were dissociated using a glass pipette and cultured at a density of 1.5×10^6 cells/ml in basal Eagle's medium (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Germany), supplemented with 5% (v/v) heat-inactivated bovine calf serum, 5% (v/v) heat-inactivated foetal horse serum, 0.5% glucose, 2 mM L-glutamine and antibiotics (penicillin and streptomycin). Cultures were maintained at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. After culture for 7 days *in vitro*, on day 7 the medium was changed to basal Eagle's medium, supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated bovine calf serum and cytosine arabinoside (10 μ M) to remove non-neural cells. Only mature cultures (10–12 days *in vitro*) were used for experiments.

Expression and purification of H_C-TeTx

Escherichia coli M15 cells were induced to express a pQE3-derived expression vector (Qiagen, Chatsworth, CA, U.S.A.) containing the cDNA for the H_C-TeTx fragment-His₆ fusion protein by the addition of 0.4 mM isopropyl β -D-thiogalactoside. Cells were pelleted after 4 h, resuspended in 50 mM NaH₂PO₄/300 mM NaCl (pH 8) and sonicated on ice for two 60 s periods with a probe sonicator. The suspension was centrifuged at 15 000 g for 20 min, and the clear supernatant was applied to an Ni²⁺-nitrilotriacetate-agarose pre-cast column (Qiagen). Protein purification was performed by following the manufacturer's instructions. Briefly, after a washing step with 50 mM NaH₂PO₄/300 mM CaCl₂/10% (v/v) glycerol (pH 6), the attached protein was eluted with a 50–300 mM imidazole

gradient. Fractions (1 ml) were collected and analysed by SDS/PAGE followed by staining with Coomassie Blue. Those fractions containing purified H_C-TeTx were concentrated by centrifugation using ultrafree-MC filtration tubes (Millipore; molecular mass cut-off value was 10 kDa) and stored at -80 °C in aliquots.

Subcellular fractionation

In the cases where subcellular fractionation was required, after each treatment, cells were resuspended in 0.3 ml of homogenization buffer containing 20 mM Tris/HCl (pH 7.5), 2 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 2 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM Na₃VO₄, 50 mM NaF, 2 mM PMSF, 10 µg/ml leupeptin and 25 µg/ml aprotinin and disrupted by sonication in a Dynatech Sonic Dismembrator. The homogenate was centrifuged for 1 h at 100 000 *g* to separate the soluble fraction, corresponding to the cytosolic compartment, from the particulate fraction, corresponding to the membranous compartment. The precipitated fraction was further resuspended to the original volume using homogenization buffer, supplemented with Triton X-100 (0.1 % final concentration) and subsequently sonicated and incubated for 1 h at 4 °C. The extract was centrifuged for 1 h at 100 000 *g* and the resulting supernatant was considered as the particulate fraction. A fraction (25 µl) of each sample was analysed by SDS/PAGE.

Western-blot analysis

At the end of the incubation, the medium was removed and cells were rinsed with cold PBS. The cells were lysed by scraping them in ice-cold lysis buffer [62.5 mM Tris (pH 6.8)/2 % SDS/10 % (v/v) glycerol/50 mM DTT/0.1 % Bromophenol Blue], and subjected to SDS/PAGE. The separated proteins were transferred to Protran nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Dassel, Germany), using a Mini TransBlot Cell 3 (Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.) at 100 V for 1 h. The blotting buffer used contained 25 mM Tris, 200 mM glycine and 10 % (v/v) methanol. The membrane filters were blocked for 1 h with Tris-buffered saline, supplemented with 0.1 % Tween 20 and 5 % (w/v) defatted powdered milk. Then the membranes were incubated overnight with the corresponding antibody diluted in blocking buffer. Next, the membrane filters were incubated for 1 h with a secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase diluted in blocking buffer. Several washes with Tris-buffered saline/0.1 % Tween 20 were performed between all of the steps. The Western blots were developed using ECL[®] detection reagents from Amersham Pharmacia Biotech (Little Chalfont, Bucks., U.K.) and exposed to Amersham ECL[®] hyperfilms. The computer-assisted analysis of the bands was performed with Scion Image.

Immunoprecipitation

After treatment, cells were resuspended in 0.5 ml of homogenization buffer containing 20 mM Tris/HCl (pH 7.5), 2 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 2 mM DTT, 1 mM Na₃VO₄, 50 mM NaF, 2 mM PMSF, 10 µg/ml leupeptin and 25 µg/ml aprotinin and disrupted by sonication in a Dynatech Sonic Dismembrator. A fraction (500 µg) of the total protein was incubated by gently rocking at 4 °C overnight in the presence of 4 µg of PY20 antibody. The immunocomplex was then captured by adding

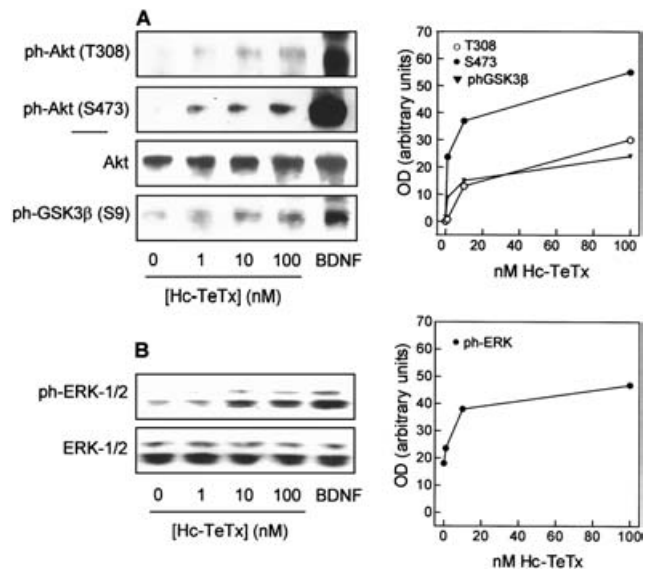


Figure 1 H_C-TeTx fragment induces phosphorylation of ERKs, Akt and GSK3β, an Akt substrate

Primary cortical cultures were treated with increasing concentrations of H_C-TeTx (1, 10 and 100 nM H_C-TeTx) or with 60 ng/ml BDNF as control, for 15 min. Total lysates were separated by SDS/PAGE and subjected to immunoblotting with the indicated antibodies. **(A)** Analysis of Akt activation. The graphs on the right represent the densitometry of the blots shown corresponding to phospho-Akt (ph-Akt) signals (○, phospho-Thr³⁰⁸; ●, phospho-Ser⁴⁷³) and to phospho-GSK3β (ph-GSK3β) (▼). **(B)** Analysis of the phospho-ERK-1/2 (ph-ERK-1/2) signal. The data are representative of two or three independent experiments. OD, absorbance.

50 µl of washed Protein A-agarose bead slurry (25 µl of packed beads) and was gently rocked at room temperature (20 °C) for 2 h. The agarose beads were collected by pulsing in a microcentrifuge and the supernatant was drained off. The beads were washed three times with ice-cold PBS and resuspended in 100 µl of 2× reducing sample buffer and boiled for 2 min. After this, the agarose beads were separated by pulsing, and 25 µl of each sample was analysed by SDS/PAGE and Western blotting.

RESULTS

H_C-TeTx fragment induces Akt and ERK-1/2 phosphorylation in cultured cortical neurons

To characterize further the activation in rat brain synaptosomes of signalling pathways induced by H_C-TeTx, observed in previous reports of our group, we tested the activation of ERK and Akt kinase in cultured cortical neurons from E18 foetal rats. The incubation of cultures with increasing concentrations of H_C-TeTx (0, 1, 10 and 100 nM) for 15 min induces the phosphorylation of Akt at Ser⁴⁷³ and at Thr³⁰⁸, and of ERK-1/2 at Thr²⁰² and at Tyr²⁰⁴, as assessed by Western blotting using phospho-specific antibodies (Figures 1A and 1B). The activation of Akt activity was confirmed by the detection of phosphorylation at Ser⁹ of a well-known Akt substrate, GSK3β. BDNF (60 ng/ml) was used as a classical signalling activator. Equal loading of proteins between samples was confirmed by detection with antibodies against total Akt and against total ERK-1/2. The maximal amount of phosphorylation was reached at 100 nM H_C-TeTx, but without an important difference from the signal which appeared at 10 nM H_C-TeTx, as is shown by densitometric quantification.

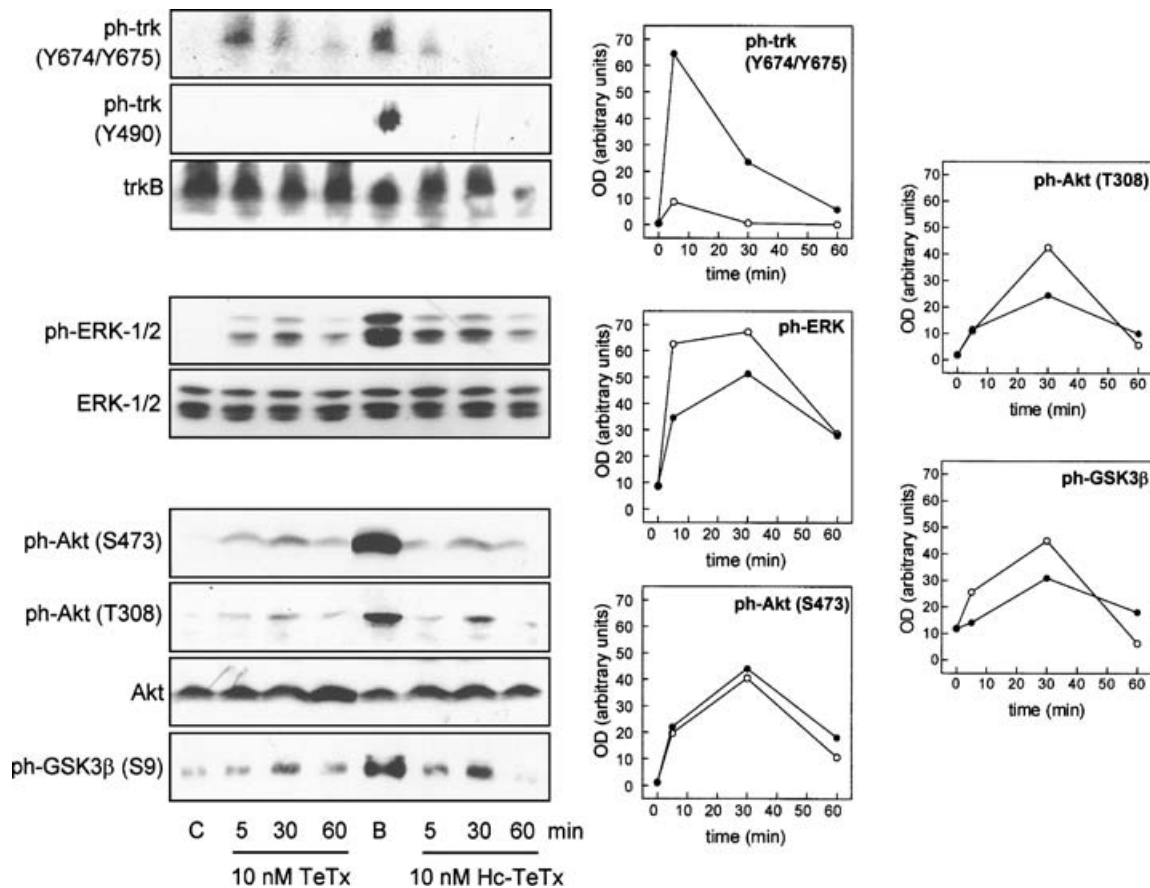


Figure 2 Time course of Trk receptor, ERK and Akt phosphorylation

Primary cortical cultures were treated with 10 nM whole TeTx or with 10 nM H_c-TeTx fragment for 0 (C, control), 5, 30 or 60 min. As positive control, 60 ng/ml BDNF (lanes indicated by 'B') was added for 15 min. Total lysates were separated by SDS/PAGE and subjected to immunoblotting with the indicated antibodies. The graphs represent the densitometry of the blots shown corresponding to the Trk receptor(s) (ph-trk) phosphorylated at Tyr⁶⁷⁴/Tyr⁶⁷⁵ or at Tyr⁴⁹⁰, phospho-ERK-1/2, phospho-Akt and phospho-GSK3β. ●, Phosphorylation due to TeTx; ○, phosphorylation due to the H_c-TeTx fragment. The data are representative of two or three independent experiments. OD, absorbance.

Akt and ERK-1/2 phosphorylation, as well as Trk receptor activation, is caused by whole TeTx

Time-course experiments using Western-blot analysis and phospho-Trk-specific antibodies show that TeTx induces a rapid induction of Trk receptor phosphorylation at Tyr⁶⁷⁴ and Tyr⁶⁷⁵, which lie within the catalytic domain. Phosphorylation at this site reflects Trk kinase activity. This antibody can detect the corresponding residues in TrkA, TrkB and TrkC. When cells are treated with 10 nM TeTx, the maximal signal observed is at 5 min, and the level of signal produced is similar to that produced by 60 ng/ml BDNF. Trk phosphorylation subsequently decreases, still being detectable at the longest time tested (60 min; Figure 2). The same analysis using 10 nM H_c-TeTx as the activator shows a similar pattern, although at a much lesser level, the phospho-Trk signal being detectable only after 5 min of incubation. When the blot is reprobed using specific antibodies for Trk phosphorylated at Tyr⁴⁹⁰, no detectable signal due to either 10 nM TeTx or H_c-TeTx appears, whereas 60 ng/ml BDNF induces a clear Trk phosphorylation at Tyr⁴⁹⁰. Phosphorylation at Tyr⁴⁹⁰ is required for Shc association and activation of the Ras/ERK cascade. This antibody can also detect the corresponding residues in TrkA, TrkB and TrkC.

A time-dependent phosphorylation of ERK-1/2 and of Akt is also observed, using specific antibody against ERK-1 and -2 dually phosphorylated at Thr²⁰² and Tyr²⁰⁴, and antibodies against

Akt phosphorylated at Ser⁴⁷³ or at Thr³⁰⁸. For ERK-1/2, a series of experiments at 5, 30 and 60 min shows a comparable effect of TeTx and of H_c-TeTx (10 nM), both producing the highest signal after 30 min of incubation, with a subsequent decrease. Nevertheless, in no case does a signal due to any toxin form reach the strong phosphorylation exerted by 60 ng/ml BDNF at 15 min. Exactly the same pattern is observed in the analysis of Akt phosphorylation, and the strongest signal is detectable at 30 min of incubation, followed by a subsequent decrease (Figure 2). Phosphorylation state of GSK3β was also detected to confirm Akt activation. GSK3β shows the maximal phosphorylation after 30 min of TeTx or H_c-TeTx incubation, this signal being transient as in the other cases analysed.

Both H_c-TeTx and TeTx enhance phosphorylation of several members of the Raf/MEK/ERK pathway

To expand the knowledge about signalling pathways triggered by TeTx, Western-blot analysis of time-course experiments was performed, using specific antibodies against phosphorylated Raf (Ser²⁵⁹), MEK-1/2 (Ser²¹⁷/Ser²²¹), p90Rsk (Ser³⁸⁰) and CREB (Ser¹³³). In all cases, both TeTx and H_c-TeTx enhanced the phosphorylation of the proteins tested, and with a similar time-dependent pattern. The maximal signal observed in the four cases was at 5 min, which subsequently decreased (Figure 3). Equal

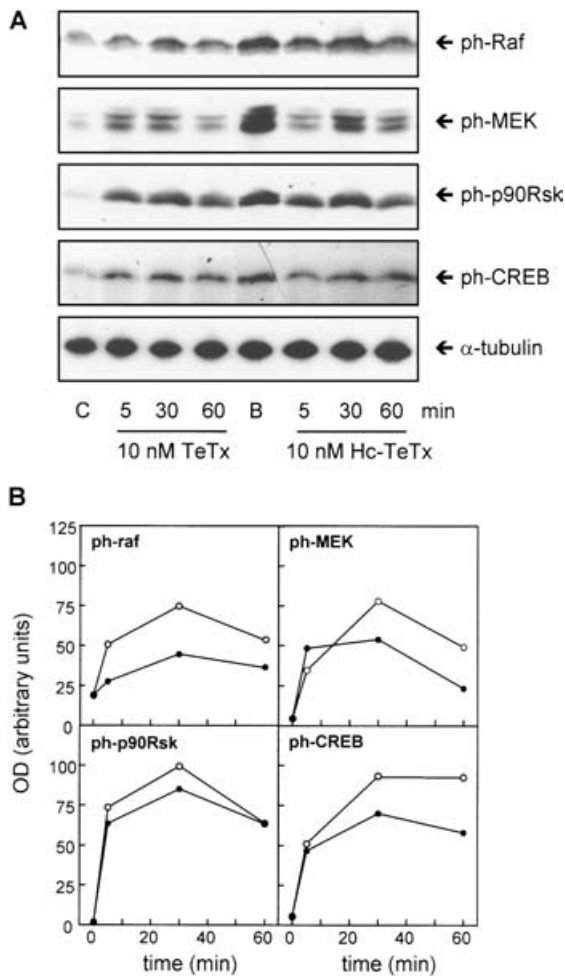


Figure 3 Time course of phosphorylation of several members of the ERK pathway

Primary cortical cultures were treated with 10 nM whole TeTx or with the H_C-TeTx fragment (10 nM) for 0 (C, control), 5, 30 or 60 min. As positive control, 60 ng/ml BDNF (lanes indicated by 'B') was added for 15 min. Total lysates were separated by SDS/PAGE and subjected to immunoblotting with antibodies against phospho-Raf (ph-Raf), phospho-MEK-1/2 (ph-MEK), phospho-p90Rsk (ph-p90Rsk) or phospho-CREB (ph-CREB). An antibody raised against α -tubulin was used as loading control. The graphs represent the densitometry of the blots shown. ●, Phosphorylation due to TeTx; ○, phosphorylation due to the H_C-TeTx fragment. The data are representative of three independent experiments. OD, absorbance.

loading of proteins among samples was confirmed by detection with antibody against α -tubulin. The blot corresponding to phospho-MEK-1/2 showed a doublet, which could correspond to different MEK phosphorylation statuses, since the antibody used reacts with MEK-1/2 dually phosphorylated at Ser²¹⁷ and Ser²²¹, and also with MEK-1/2 singly phosphorylated at Ser²¹⁷, but not with MEK-1/2 singly phosphorylated at Ser²²¹.

H_C-TeTx fragment induces translocation of PKC isoforms to membrane

The activation of PKC isoforms induces their translocation from cytosol to membrane compartments. Therefore the amount of PKC present in membrane is directly correlated to its degree of activation. In experiments aimed at studying the effect of H_C-TeTx on PKC isoforms in cortical neurons, separation of cytosol (soluble fraction) and membrane (particulate fraction) was

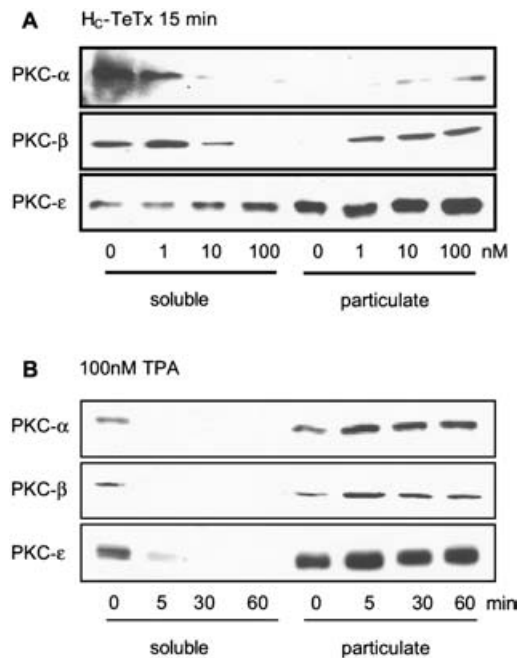


Figure 4 H_C-TeTx-induced translocation of PKC isoforms

Primary cortical cultures were treated with (A) increasing concentrations of H_C-TeTx (1, 10 and 100 nM H_C-TeTx) for 15 min or (B) 100 nM PMA (TPA) for 0, 5, 30 or 60 min. Subsequently, soluble (cytosol) and particulate (membrane) fractions were separated, as indicated in the Materials and methods section. Western-blot analysis was performed using antibodies against PKC isoforms α , β and ϵ .

performed, with subsequent Western-blot analysis against PKC isoforms. This set of experiments shows that incubation of CNC at increasing concentrations (0, 1, 10 and 100 nM) of H_C-TeTx for 15 min induces changes in PKC isoform distribution (Figure 4A). Sustained translocation is observed of the classical isoforms PKC- α and - β , whereas no significant change is observed in the novel isoform PKC- ϵ . A parallel set of time-course experiments, for 0, 5, 30 and 60 min, using 100 nM PMA (a direct and non-physiological activator of diacylglycerol-dependent PKC isoforms) was performed to test the reliability of the system. The translocation was clear for the three isoforms tested (α , β and ϵ), even at only 5 min of PMA incubation (Figure 4B), proving that the compartment fractionation was effective in the system used.

H_C-TeTx fragment-induced activation of Akt and ERK pathways is abolished by tyrphostin AG879 and by wortmannin, but not by Ro-31-8220

The effect of different kinase inhibitors on H_C-TeTx-dependent activation of Akt and ERK pathways was examined. Pretreatment of cells with 10 μ M tyrphostin AG879, an inhibitor of Trk, or with 100 nM wortmannin for 30 min abolished the H_C-TeTx-dependent activation of Akt, MEK-1/2, ERK-1/2 and p90Rsk, as assessed by Western-blot analysis (Figure 5A). This result points to the necessary implication of Trk receptors in H_C-TeTx action on Akt and on ERK-1/2 pathways, and to the necessary implication of the PI-3K/Akt pathway in the subsequent activation of MEK/ERK by H_C-TeTx. On the contrary, H_C-TeTx-dependent activation of Akt, MEK-1/2, ERK-1/2 and p90Rsk was not inhibited after pretreatment of cells with 1 μ M Ro-31-8220 for 30 min. This result indicates that activation of

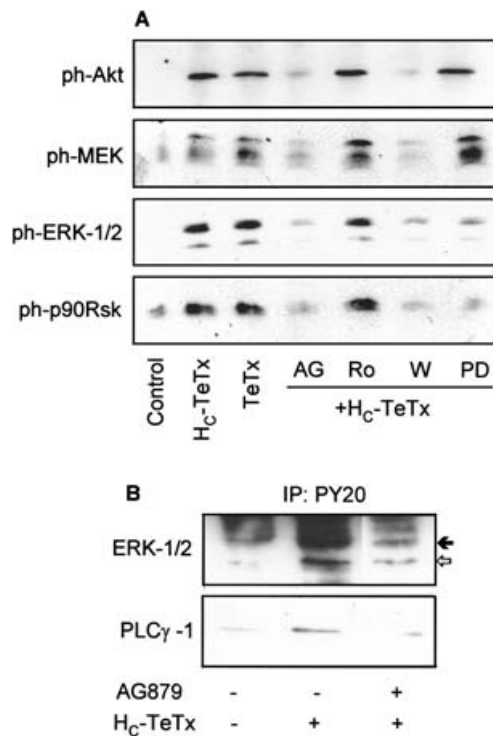


Figure 5 Effect of various kinase inhibitors on induction by the H_c-TeTx fragment of Akt and ERK pathways

(A) Primary cortical cultures were pretreated for 30 min, where indicated, with 10 μ M AG879 (AG), 1 μ M Ro-31-8220 (Ro), 100 nM wortmannin (W) or 50 μ M PD98059 (PD), and then stimulated with 10 nM H_c-TeTx for 30 min. No pretreatment was performed in the controls with 10 nM H_c-TeTx or 10 nM TeTx, both for 30 min. Treatment with vehicle was performed in the control. Total lysates were separated by SDS/PAGE and subjected to immunoblotting with the indicated antibodies. Blots shown are representative of three independent experiments. (B) Cultures were pretreated with or without 10 μ M AG879 for 30 min where indicated, and H_c-TeTx was then added (10 nM for 30 min) where indicated. In the control lane, only vehicle was added. Then immunoprecipitation (IP) was performed as indicated in the Materials and Methods section, using PY20 antibody against phosphotyrosine residues and, subsequently, Western-blot analysis using antibodies against ERK-1/2 and PLC γ -1 was performed. Arrows indicate bands corresponding to ERK-1 (black) or ERK-2 (white). Blots shown are representative of two independent experiments.

PKC is not required for activation of Akt and ERK pathways. Finally, pretreatment of cells with 50 μ M PD98059 for 30 min abolished the H_c-TeTx-dependent activation of ERK-1/2 and of p90Rsk, but not the activation of Akt and MEK-1/2 (Figure 5A). Trk-dependent activation of signalling pathways was confirmed and was further characterized by immunoprecipitation with an anti-phosphotyrosine monoclonal antibody (clone PY20), followed by Western blotting with anti-ERK-1/2 or anti-PLC γ -1. Pretreatment of cells with 10 μ M AG879 for 30 min abolished phosphorylation at tyrosine residues of ERK-1/2 and PLC γ -1 enhanced by 10 nM H_c-TeTx for 30 min (Figure 5B). PLC γ -1 is a PLC isoform, which by binding to tyrosine-phosphorylated membrane receptors, such as Trk receptors, becomes activated and then hydrolyses phospholipids to inositol trisphosphate and diacylglycerol, leading to PKC activation. PLC γ -1 is also tyrosine-phosphorylated by receptors when activated by them. These results reinforce the requirement for Trk receptor activation by H_c-TeTx to induce ERK-1/2 phosphorylation, and show that H_c-TeTx also enhances PLC γ -1 phosphorylation in a Trk-dependent manner. This last result is directly related to the observed activation of PKC isoforms, since PLC products are known to activate PKC.

DISCUSSION

It is shown, in the present study, that incubation of cortical neurons with TeTx can activate two parallel biochemical cascades: a MAP kinase pathway (Raf/MEK/ERK) and an Akt pathway. This effect is dependent on the interaction of TeTx with the cellular membrane and not on the catalytic activity of the toxin, since H_c-TeTx alone can activate the same signals as TeTx. Activation of both the H_c-TeTx-triggered pathways studied is totally dependent on PI-3K. Typically, dual activation of the PI-3K/Akt pathway and the ERK-1/2 cascade in neurons has been shown to occur through the activation of neurotrophin Trk receptors [21]. As was determined in previous reports of our group, both TeTx and H_c-TeTx activate TrkA phosphorylation in rat brain synaptosomes [4,5], showing phosphorylation at Tyr⁴⁹⁰. This result pointed to a role of Shc adaptor proteins in TeTx-induced signalling, since phosphorylated Tyr⁴⁹⁰ is the target for Src-homology-2-domain-containing Shc proteins [11]. In the CNC used in the present study, the TrkA receptor cannot be studied without transfection techniques, since these cells lack TrkA and express only TrkB and TrkC [22]. Therefore TrkB activation was studied, using BDNF as the control of activation and antibodies that recognize all three phosphorylated Trk forms, as indicated by the manufacturer. Surprisingly, we failed to detect phosphorylation of Trk, due to H_c-TeTx or TeTx, at Tyr⁴⁹⁰, indicating that Shc proteins are unlikely to participate in subsequent signalling by TeTx in CNCs. The existence of a phenylarsine oxide-sensitive phosphatase in cortical neurons that rapidly dephosphorylates the tyrosine residue in Shc-binding site of TrkB, i.e. Tyr⁴⁹⁰, has been described previously [23]. Nevertheless, the phosphorylation of Tyr⁴⁹⁰ by BDNF action would be insensitive under the conditions tested to this phosphatase, as shown in Figure 2. A strong BDNF-triggered interaction between Trk and PLC γ -1 has also been described previously [23]. Tyrosine phosphorylation of PLC γ -1 has been suggested to be necessary for its activation in intact cells, but the detailed mechanisms involved are still not clear. However, it appears that binding to the activated receptor is insufficient for PLC γ -1 activation, and that tyrosine phosphorylation is required for PLC γ -1 activation in intact cells [24]. Our findings that H_c-TeTx induces tyrosine phosphorylation of PLC γ -1 in a Trk-dependent manner (Figure 5B) are in agreement with these results and are consistent with the activation by TeTx of polyphosphoinositide hydrolysis described in CNCs by our group [25]. On the other hand, TeTx- and H_c-TeTx-induced phosphorylation of Trk receptor(s) at Tyr⁶⁷⁴ and Tyr⁶⁷⁵ has been observed. These tyrosine residues become autophosphorylated when the agonist binds to the Trk receptor and are required for efficient signal transduction and promotion of biological responses [26]. The extent of phosphorylation induced at Tyr⁶⁷⁴/Tyr⁶⁷⁵ is clearly higher for TeTx when compared with H_c-TeTx, a fact that could be due to the need for some other region for optimum binding to the membrane. In agreement with this, TeTx appears to be clearly superior to H_c-TeTx in the capacity for neuronal binding and internalization, in studies performed in cortical neurons [27]. Nevertheless, the small amount of H_c-TeTx-induced Trk phosphorylation seems to be enough to trigger the signalling described in the present study, and with a similar potency as TeTx. Another intriguing point, in our opinion, is that BDNF, the physiological activator of the TrkB receptor, and TeTx induce Trk phosphorylation at Tyr⁶⁷⁴/Tyr⁶⁷⁵ to a similar extent, but the subsequent activation of ERK and Akt kinase is remarkably higher for BDNF. This result reveals that divergences must exist between BDNF and TeTx downstream signalling, one of them being the action of Shc proteins mentioned above. Recently, it has

been shown that activation of Trk receptor tyrosine kinases can also occur via a G-protein-coupled receptor mechanism, without the involvement of neurotrophins [28]. The possibility of Trk transactivation due to the effect of another membrane receptor in our results is unlikely, since transactivation events typically show a slow time course (2–3 h), whereas TeTx-induced Trk phosphorylation is fast (5 min).

The use of specific inhibitors shows that H_C-TeTx action on Akt, ERK and PLC γ -1 pathways is totally dependent on Trk, since low concentrations of AG879 abolish phosphorylation in all three proteins. The effect of H_C-TeTx on TrkA was described by our group [5], and the results of the present study showing activation of TrkB expand the possibilities of action of this toxin. This action could be direct by means of a ligand–receptor-type interaction, a fact that would have implications in the transport of TeTx from the peripheral nervous system to the CNS, since Trk receptors, together with their ligands, are retroaxonally transported [9]. The coincidence between neurotrophin receptor and TeTx retroaxonal transporters has recently been communicated [29], supporting the role of neurotrophin receptor machinery in the entry of TeTx into the CNS. Another possibility is an indirect interaction with Trk through an adaptor protein or ganglioside. There is a general agreement that TeTx shows the highest affinity for the polysialogangliosides GT1b (a membrane glycosphingolipid containing tri-sialic acid) and GD1b (containing di-sialic acid) [30], and these gangliosides are known to activate Trk receptors and ERK phosphorylation in rat brain slices, although not nearly at as high a level as monosialoganglioside G_{M1} (ganglioside containing mono-sialic acid) [31]. Taking these results together, the possibility of an active ternary complex made up of TeTx, ganglioside and Trk arises.

As can be seen in Figure 5, the use of wortmannin reveals that PI-3K action is necessary for Akt phosphorylation as well as for the activation of the ERK pathway, as demonstrated by the inhibition of MEK, ERK-1/2 and p90Rsk phosphorylation by wortmannin. The dependence of MEK and downstream targets on PI-3K has been described in several works. For example, in PC12 and in dorsal root ganglia cells, PI-3K is required for TrkA internalization and participates in NGF signalling to ERKs via distinct actions on the small G-proteins Ras and Rap1 [32]. On the other hand, PI-3K-dependent activation of ERK by kainate [33] has been demonstrated in striatal neurons. The ERK pathway can also be dependent on the action of some PKC isoforms, this action probably being through a direct interaction between PKC isoforms and Raf [34]. In the CNC used in the present study, PKC can activate the ERK pathway since low concentrations of PMA can transiently activate ERK-1/2 phosphorylation (results not shown). Nevertheless, this does not seem to be the case with the signal activated by TeTx. Although TeTx activates PKC- α and - β isoforms (as their translocation to membrane indicates), they act in an independent manner with respect to the ERK pathway since Ro-31-8220 cannot eliminate phosphorylation of MEK, ERK-1/2 or p90Rsk (Figure 5). Enhancement of the association of PKC activity with cell membrane in CNC due to TeTx has been described by our group [25]. Regarding Raf, this kinase is phosphorylated in the system used in the present study at Ser²⁵⁹ in response to BDNF, TeTx or H_C-TeTx (Figure 3). This is an intriguing result, since Akt [35] and cAMP-dependent kinase [36] have been described as being responsible for phosphorylation at this residue, and causing Raf inhibition, by promoting complex formation with 14-3-3 proteins [37]. However, mutant Raf proteins in which phosphorylatable residues responsible for activation have been changed can still be activated after membrane association, indicating that an additional mechanism(s) of Raf activation exists

[38]. On the other hand, other authors have established that activation of Raf is independent of phosphorylation at Ser²⁵⁹ [39], whereas a Raf-independent activator has been described in PC12 cells [40]. These results point to a possible MEK activation even when Raf is inactivated.

The interference of bacterial proteins in signal transduction pathways of the host is a topic well described in the literature [41]. Pathogens such as *Listeria monocytogenes* [42] or *Bacillus anthracis* [43], among others, use the ERK pathway in their pathological mechanisms. On the other hand, several bacterial pathogens require or purportedly activate PI-3K-mediated signalling pathways to gain entry into non-phagocytic cells. For example, invasin-mediated entry of *Yersinia* into epithelial cells requires PI-3K activity [44] and InIB, a surface protein from *L. monocytogenes*, triggers activation of PI-3K and subsequent bacterial entry [45]. Moreover, type 1 pilus-mediated invasion of bladder epithelial cells by uropathogenic *E. coli* has been shown to require PI-3K activity associated with local cytoskeleton arrangements [46]. The first bacterial protein, and until now the only one, to be identified as an Akt activator was SigD from *Salmonella typhimurium* [47]. SigD, once injected into the host cell, dephosphorylates a variety of soluble inositol polyphosphates as well as inositol phospholipids, an action that could induce a conformational change in recruited Akt, favouring its phosphorylation at Thr³⁰⁸ and Ser⁴⁷³ and leading to full activation. Therefore *Clostridium tetani* could use PI-3K and Akt activation to enhance TeTx endocytosis by host cell, in the same way that PI-3K participates in NGF-induced TrkA endocytosis [32].

In summary, the activation of ERK/Akt pathways and Trk receptors by TeTx opens new possibilities in understanding how *C. tetani* interacts with the plasma membrane, how it uses cellular mechanisms for its own possible benefit and, thus, exerts its high capacity of toxicity. Whether the effects produced by TeTx on transcriptional control have physiological significance in the short or long term remains to be seen.

This work was supported by grant no. SAF2001-2045 from Ministerio de Educación y Cultura, Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica. We acknowledge the gift of *E. coli* strain containing H_C-TeTx recombinant plasmid from Dr J. Blasi (Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica, Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona).

REFERENCES

- Schiavo, G., Matteoli, M. and Montecucco, C. (2000) Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol. Rev.* **80**, 717–766
- Emsley, P., Fotinou, C., Black, I., Fairweather, N. F., Charles, I. G., Watts, C., Hewitt, E. and Isaacs, N. W. (2000) The structures of H_C fragment of tetanus toxin with carbohydrate subunit complexes provide insight into ganglioside binding. *J. Biol. Chem.* **275**, 8889–8894
- Yavin, E. and Nathan, A. (1986) Tetanus toxin receptors on nerve cells contain a trypsin-sensitive component. *Eur. J. Biochem.* **154**, 403–407
- Gil, C., Chaib, I., Pelliccioni, P. and Aguilera, J. (2000) Activation of signal transduction pathways involving TrkA, PLC γ -1, PKC isoforms and ERK-1/2 by tetanus toxin. *FEBS Lett.* **481**, 177–182
- Gil, C., Chaib, I., Blasi, J. and Aguilera, J. (2001) H_C fragment of tetanus toxin activates protein kinase C isoforms and phosphoproteins involved in signal transduction. *Biochem. J.* **356**, 97–103
- Barbacid, M. (1993) NGF: a tale of two receptors. *Oncogene* **8**, 2033–2042
- Dechant, G. and Barde, Y.-A. (1997) Signaling through the neurotrophin receptor p75NTR. *Curr. Opin. Neurobiol.* **7**, 413–418
- Ibáñez, C. F. (2002) Jekyll–Hyde neurotrophins: the story of proNGF. *Trends Neurosci.* **25**, 284–286
- Grimes, M. L., Zhou, J., Beattie, E. C., Yuen, E. C., Hall, D. E., Valletta, J. S., Topp, K. S., LaVail, J. H., Bunnnett, N. W. and Mobley, W. C. (1996) Endocytosis of activated TrkA: evidence that nerve growth factor induces formation of signaling endosomes. *J. Neurosci.* **16**, 7950–7964

- 10 Segal, R. A. and Greenberg, M. E. (1996) Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu. Rev. Neurosci.* **19**, 463–489
- 11 Robbins, D. J., Zhen, E., Owaki, H., Vanderbilt, C. A., Ebert, D., Geppert, T. D. and Cobb, M. H. (1993) Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **268**, 5097–5106
- 12 Wiggan, G. R., Soloaga, A., Foster, J. M., Murray-Tait, V., Cohen, P. and Arthur, J. S. (2002) MSK1 and MSK2 are required for the mitogen- and stress-induced phosphorylation of CREB and ATF1 in fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 2871–2881
- 13 Morrison, D. K., Heidecker, G., Rapp, U. and Copeland, T. D. (1993) Identification of the major phosphorylation sites of the Raf-1 kinase. *J. Biol. Chem.* **268**, 17309–17316
- 14 Nishizuka, Y. (1995) Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* **9**, 484–496
- 15 Kraft, A. S. and Anderson, W. B. (1983) Phorbol esters increase the amount of Ca²⁺, phospholipid-dependent protein kinase associated with plasma membrane. *Nature (London)* **301**, 621–623
- 16 Datta, S. R., Brunet, A. and Greenberg, M. E. (1999) Cellular survival: a play in three Acts. *Genes Dev.* **13**, 2905–2927
- 17 Marte, B. M. and Downward, J. (1997) PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 355–358
- 18 Alessi, D. R., James, S. R., Downes, C. P., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B. and Cohen, P. (1997) Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . *Curr. Biol.* **7**, 261–269
- 19 Toker, A. and Newton, A. C. (2000) Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *J. Biol. Chem.* **275**, 8271–8274
- 20 Kumari, S., Liu, X., Nguyen, T., Zhang, X. and D'Mello, S. R. (2001) Distinct phosphorylation patterns underlie Akt activation by different survival factors in neurons. *Mol. Brain Res.* **96**, 157–162
- 21 Kaplan, D. R. and Miller, F. D. (2000) Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* **10**, 381–391
- 22 Kume, T., Nishikawa, H., Tomioka, H., Katsuki, H., Akaike, A., Kaneko, S., Maeda, T., Kihara, T. and Shimohama, S. (2000) p75-mediated neuroprotection by NGF against glutamate cytotoxicity in cortical cultures. *Brain Res.* **852**, 279–289
- 23 Yamada, M., Numakawa, T., Koshimizu, H., Tanabe, K., Wada, K., Koizumi, S. and Hatanaka, H. (2002) Distinct usages of phospholipase C γ and Shc in intracellular signaling stimulated by neurotrophins. *Brain Res.* **955**, 183–190
- 24 Puceat, M. and Vassort, G. (1996) Purinergic stimulation of rat cardiomyocytes induces tyrosine phosphorylation and membrane association of phospholipase C γ : a major mechanism for InsP₃ generation. *Biochem. J.* **318**, 723–728
- 25 Gil, C., Ruiz-Meana, M., Alava, M., Yavin, E. and Aguilera, J. (1998) Tetanus toxin enhances protein kinase C activity translocation and increases polyphosphoinositide hydrolysis in rat cerebral cortex preparations. *J. Neurochem.* **70**, 1636–1643
- 26 Cunningham, M. E., Stephens, R. M., Kaplan, D. R. and Greene, L. A. (1997) Autophosphorylation of activation loop tyrosines regulates signaling by the TRK nerve growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* **272**, 10957–10967
- 27 Fishman, P. S., Parks, D. A., Patwardhan, A. J. and Matthews, C. C. (1999) Neuronal binding of tetanus toxin compared to its ganglioside binding fragment (H(c)). *Nat. Toxins* **7**, 151–156
- 28 Lee, F. S., Rajagopal, R. and Chao, M. V. (2002) Distinctive features of Trk neurotrophin receptor transactivation by G protein-coupled receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* **13**, 11–17
- 29 Lalli, G. and Schiavo, G. (2002) Analysis of retrograde transport in motor neurons reveals common endocytic carriers for tetanus toxin and neurotrophin receptor p75. *J. Cell Biol.* **156**, 233–239
- 30 Herreros, J., Lalli, G., Montecucco, C. and Schiavo, G. (1999) Pathophysiological properties of clostridial neurotoxins. In *The Comprehensive Source Book of Bacterial Protein Toxin* (Freer, J. H. and Alouf, J. E., eds.), pp. 202–228, Academic Press, London
- 31 Duchemin, A., Ren, Q., Mo, L., Neff, N. H. and Hadjiconstantinou, M. (2002) GM₁ ganglioside induces phosphorylation and activation of Trk and Erk in brain. *J. Neurochem.* **81**, 696–707
- 32 York, R. D., Molliver, D. C., Grewal, S. S., Stenberg, P. E., McCleskey, E. W. and Stork, P. J. S. (2000) Role of phosphoinositide 3-kinase and endocytosis in nerve growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase activation via Ras and Rap-1. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 8069–8083
- 33 Fuller, G., Veitch, K., Ho, L. K., Cruise, L. and Morris, B. J. (2001) Activation of p44/p42 MAP kinase in striatal neurons via kainate receptors and PI3 kinase. *Mol. Brain Res.* **89**, 126–132
- 34 Cheng, J., Wung, B., Chao, Y. and Wang, D. (2001) Sequential activation of protein kinase C (PKC)- α and PKC- ϵ contributes to sustained Raf/ERK1/2 activation in endothelial cells under mechanical strain. *J. Biol. Chem.* **276**, 31368–31375
- 35 Zimmermen, S. and Moelling, K. (1999) Phosphorylation and regulation of Raf by Akt. *Science* **286**, 1741–1744
- 36 Dhillon, A. S., Pollock, C., Steen, H., Shaw, P. E., Mischak, H. and Kolch, W. (2002) Cyclic AMP-dependent kinase regulates Raf-1 kinase mainly by phosphorylation of serine 259. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 3237–3246
- 37 Tzivion, G., Luo, Z. and Avruch, J. (1998) A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity. *Nature (London)* **394**, 88–92
- 38 Marais, R., Light, Y., Paterson, H. F. and Marshall, C. J. (1995) Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. *EMBO J.* **14**, 3136–3145
- 39 Schönwasser, D. C., Marais, R. M., Marshall, C. J. and Parker, P. J. (1998) Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 790–798
- 40 Pang, L., Zheng, C. F., Guan, K. L. and Saltiel, A. R. (1995) Nerve growth factor stimulates a novel protein kinase in PC12 cells that phosphorylates and activates mitogen-activated protein kinase kinase (MEK). *Biochem. J.* **307**, 513–519
- 41 Alouf, J. E. and Freer, J. H. (eds.) (1999) *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, 2nd edn, Academic Press, London
- 42 Tang, P., Sutherland, C. L., Gold, M. L. and Finlay, B. B. (1998) *Listeria monocytogenes* invasion of epithelial cells requires the MEK-1/ERK-2 mitogen-activated protein kinase pathway. *Infect. Immun.* **66**, 1106–1112
- 43 Vitale, G., Pellizzari, R., Recchi, C., Napolitani, G., Mock, M. and Montecucco, C. (1998) Anthrax lethal factor cleaves the N-terminus of MAPKs and induces tyrosine/threonine phosphorylation of MAPKs in cultured macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **248**, 706–711
- 44 Schulte, R., Zumbihl, R., Kampik, D., Fauconnier, A. and Autenrieth, I. B. (1998) Wortmannin blocks *Yersinia* invasin-triggered internalization, but not interleukin-8 production by epithelial cells. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* **187**, 53–60
- 45 Ireton, K., Payrastra, B. and Cossart, P. (1999) The *Listeria monocytogenes* protein InlB is an agonist of mammalian phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.* **274**, 17025–17032
- 46 Martinez, J. J., Mulvey, M. A., Schilling, J. D., Pinkner, J. S. and Hultgren, S. J. (2000) Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *EMBO J.* **19**, 2803–2812
- 47 Steele Mortimer, O., Knodler, L. A., Marcus, S. L., Scheid, M. P., Goh, B., Pfeifer, C. G., Duronio, V. and Finlay, B. B. (2000) Activation of Akt/protein kinase B in epithelial cells by the *Salmonella typhimurium* effector sigD. *J. Biol. Chem.* **275**, 37718–37724

Received 27 February 2003/4 April 2003; accepted 23 April 2003

Published as BJ Immediate Publication 23 April 2003, DOI 10.1042/BJ20030333

Trabajo III:

The C-terminal domain of the heavy chain of tetanus toxin rescues cerebellar granule neurons from apoptotic death: involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways.

The C-terminal domain of the heavy chain of tetanus toxin rescues cerebellar granule neurones from apoptotic death: involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways

Imane Chaïb-Oukadour, Carles Gil and José Aguilera

Departament de Bioquímica i de Biologia Molecular and Institut de Neurociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

Abstract

When cultured cerebellar granule neurones are transferred from a medium containing high extracellular potassium concentration ($[K^+]_e$) (25 mM) to one with lower $[K^+]_e$ (5 mM), caspase-3 activity is induced and cells die apoptotically. In contrast, if cells in non-depolarizing conditions are treated with brain-derived neurotrophic factor (BDNF), caspase-3 activity, chromatin condensation and cell death are markedly diminished. In this study, we show that the C-terminal domain of the tetanus toxin heavy-chain (Hc-TeTx) is able to produce the same neuroprotective effect, as assessed by reduction of tetrazolium salts and by chromatin condensation. Hc-TeTx-conferred neuroprotection appears to depend on phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and mitogen-activated protein kinase, as is demonstrated by the selective inhibitors

Wortmannin and PD98059, respectively. Hc-TeTx also induces phosphorylation of the tyrosine kinase BDNF receptor, activation of p21Ras in its GTP-bound form, and phosphorylation of the cascade including extracellular-signal-regulated kinases-1/2 (ERK-1/2), p90 ribosomal S6 kinase (p90rsk) and CREB (cAMP-response-element-binding protein). On the other hand, activation of the Akt pathway is also detected, as well as inhibition of the active form of caspase-3. These results point to an implication of both PI3K- and ERK-dependent pathways in the promotion of cerebellar granule cell survival by Hc-TeTx.

Keywords: caspases, cerebellar granule neurones, mitogen-activated protein kinase, neuronal apoptosis, phosphatidylinositol 3-kinase, tetanus toxin, tyrosine kinase receptor.

J. Neurochem. (2004) 10.1111/j.1471-4159.2004.02586.x

Tetanus toxin (TeTx), a close analogue of the larger family of botulinum neurotoxins, is a powerful neurotoxin acting on both central and peripheral nervous system by yet not completely understood modes of action (reviewed by Montecucco and Schiavo 1994). The toxin, produced by *Clostridium tetani* as a single polypeptide chain (150 kDa), is cleaved by an endogenous protease to release a 50-kDa amino-terminal L-chain that is responsible for toxicity. The L-chain remains attached to the rest of the polypeptide (the heavy chain or H-chain) by means of a disulphide bond. The H-chain can be cleaved with papain into two non-toxic fragments, consisting of a C-terminal (Hc-TeTx, 50 kDa) and an N-terminal (H_N-TeTx 50 kDa) part. Each fragment is believed to have a distinct function: Hc-TeTx is responsible for binding to cell membrane of sensitive cells, whereas H_N-TeTx promotes the translocation of the L-chain across the vesicular membrane (Halpern and Neale 1995; Lalli *et al.*

Received January 29, 2004; revised manuscript received March 17, 2004; accepted April 19, 2004.

Address correspondence and reprint requests to José Aguilera, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Edifici M, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Barcelona, Spain.

E-mail: jose.aguilera@uab.es

Abbreviations used: Akt/PKB, Akt/protein kinase B; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; CGN, cerebellar granule neurones; CREB, cAMP-response-element-binding protein; DAPI, 4',6-diamino-2-phenylindole; ERK, extracellular signal-regulated kinase; GSK3 β , glycogen synthase kinase 3 β ; GST, glutathione S-transferase; Hc-TeTx, C-terminal domain of the heavy-chain of tetanus toxin; $[K^+]_e$, extracellular potassium concentration; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MAPKK, mitogen-activated protein kinase kinase; MTT, 3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; NGF, nerve growth factor; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PKC, protein kinase C; PLC γ -1, phospholipase C γ -1; p90rsk, p90 ribosomal S6 kinase; RBD, Ras-binding domain of Raf-1; TeTx, tetanus toxin; Trk, high-affinity tyrosine kinase receptor for neurotrophins.

1999). Although the N-terminal of Hc-TeTx is similar in structure to many lectins, deletion mutagenesis studies suggest that the C-terminus is essential for ganglioside-binding activity in the cell (Halpern and Loftus 1993). As a Zn⁺-metalloprotease, TeTx appears to target synaptobrevin II, an essential protein for synaptic vesicles docking and neurotransmitter release (Schiavo *et al.* 1992). This selective proteolysis of synaptic proteins by clostridial neurotoxins accounts for the total block of neurotransmitter release in infected synapses, and appears to be the event responsible for motor symptoms in the tetanus and in the botulism (Pellizzari *et al.* 1999).

In previous reports we demonstrated a rapid translocation of protein kinase C (PKC) followed by down-regulation after intracerebral injection of TeTx (Aguilera and Yavin 1990). This rapid PKC translocation/down-regulation was detected in parallel with phosphatidyl inositol hydrolysis (Pelliccioni *et al.* 2001). Furthering these studies, we documented, in rat-brain synaptosomal preparations, a substantial phosphorylation of the nerve growth factor (NGF) high-affinity receptor (TrkA) and activation of other elements of a kinase cascade, including phospholipase C α -1 (PLC α -1), classical and novel PKCs and extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK-1/2), after short-time application of both TeTx or its Hc-TeTx fragment (Gil *et al.* 2001). On the other hand, a recent report in rat primary cortical cells (Gil *et al.* 2003) shows also the activation of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) high-affinity receptor (TrkB) and of the akt/PKB signalling pathway. Interestingly this report also describes the phosphorylation of the transcription factor CREB (cAMP-response-element-binding protein) in Ser 133 after Hc-TeTx treatment, pointing to a putative enhancing effect on gene expression.

Since activation of Trk receptors, and subsequent activation of ERK and Akt cascades, has been described as responsible for trophic actions, such as enhancement of survival or neuritogenesis, in neuronal cells (Kaplan and Miller 2000), we addressed our efforts to study the hypothetical neurotrophic action of the Hc-TeTx fragment in cultured cerebellar granule neurones (CGN). In the present work we have further explored the involvement of Hc-TeTx on Trk-dependent signalling cascades in low extracellular potassium concentration ($[K^+]_e$) conditions, and a remarkable neuroprotective action of the fragment on the CGN is found. The molecular mechanism for this rescue appears to act via stimulation of signalling pathways typical to neurotrophic factors such as BDNF. Moreover, these studies also can help to better understand still unresolved issues concerning the molecular mechanisms of TeTx action, such as its extreme high potency at nanomolar concentration and its remarkable capacity of undergo retroaxonal transport along neurones (Lalli and Schiavo 2002).

Materials and methods

Materials

Sprague-Dawley (OFA) rats were obtained from the *Servei d'Estabulari* of the Universitat Autònoma de Barcelona (Barcelona, Spain). Culture media, fetal calf serum, culture dishes and penicillin/streptomycin came from Pan Biotechnology GmbH, Fontlab (Barcelona, Spain). 4',6-Diamino-2-phenylindole (DAPI) was from Vector Laboratories Inc. (Burlingame, CA, USA). Protein A-agarose beads were purchased from Boehringer-Mannheim GmbH (Mannheim, Germany). The specific antibody against phosphotyrosine (Clone PY20) was obtained from Zymed Laboratories Inc. (San Francisco, CA, USA). Anti-diphospho(*Thr*²⁰²-*Tyr*²⁰⁴)p44/p42 MAP kinase (ERK-1/2), anti-phospho(*Ser*³⁸⁰)p90 ribosomal S6 kinase (p90rsk), anti-phospho(*Ser*¹³³)CREB, anti-phospho(*Tyr*^{674/675})TrkA, anti-phospho(*Ser*⁹)GSK3 β (glycogen synthase kinase 3 β), anti-phospho(*Ser*⁴⁷³)Akt, anti-ERK1/2, and anti-Akt (PKB) antibodies, as well as a polyclonal antibody against cleaved caspase-3 were from Cell Signalling Technology (Beverly, MA, USA). The rabbit polyclonal antibody against TrkB was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Monoclonal antibody against ERK-1, and anti-mouse and anti-rabbit secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase were from Transduction Laboratories (Lexington, KY, USA). Despite the anti-ERK-1 antibody being described as specific for this kinase, it also detects ERK-2, although with less potency. Monoclonal antibody against β -tubulin was from Sigma. BDNF was supplied by Alomone Laboratories, Ltd. (Jerusalem, Israel). All other chemicals or reagents used were supplied by Sigma-Aldrich Quimica, SA (Madrid, Spain).

Cell cultures

Cerebellar granule neurones (CGN) cultures were prepared as described by Morán and Patel (1989) with slight modifications. Briefly, cell suspension from dissociated 7–8-day-old rat cerebella tissue was plated at a density of 1.3×10^6 cells/cm² in plastic dishes previously coated with poly-L-lysine (5 μ g/mL) or on glass coverslips (25 \times 25 mm). Cells were grown regularly in basal Eagle's medium supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum, 20 mM KCl, 5 mM glucose, 2 mM glutamine, 50 U/mL penicillin and 50 μ g/mL streptomycin at 37°C in a humidified atmosphere consisting of 5% CO₂/95% air. This medium is referred to in the text as K25, since BME initially contains 5 mM KCl. Cytosine arabinofuranoside (10 μ M) was added to the medium 24 h after seeding to reduce the number of non-neuronal cells to approximately 5% of the total. Cells were maintained for 6–8 days *in vitro*. For experiments, CGN were transferred to a serum-free medium without cytosine arabinofuranoside as described in the Results section, with either 5 mM or 25 mM KCl and a number of additives, including recombinant Hc-TeTx (0.1–100 nM), BDNF (25 ng/mL), PD98059 (50 μ M) and/or Wortmannin (100 nM). Recombinant Hc-TeTx fragment was obtained as previously reported (Gil *et al.* 2003).

Immunoprecipitation

After treatment, CGN were rinsed and scraped from the wells with ice-cold phosphate-buffered saline (2.5 mM Na₂HPO₄, 6 mM NaH₂PO₄ and 0.14 mM NaCl, pH 7.4), collected by centrifugation,

and the reaction medium was eliminated. Next, 0.3 mL of homogenization buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 2 mM dithiothreitol, 10 μ g/mL leupeptin, 25 μ g/mL aprotinin, 2 mM phenylmethylsulphonyl fluoride and 1 mM Na_3VO_4) supplemented with 0.3% Triton X-100 was added and the cells were disrupted by sonication. For immunoprecipitation, 1 mg of total protein was incubated by gentle rocking at 4°C overnight in the presence of 4 μ g of antibody. The immunocomplex was then trapped by adding 50 μ L of washed Protein A-agarose bead slurry (25 μ L of packed beads) previously incubated with 3% bovine serum albumin/phosphate-buffered saline to eliminate unspecific binding and gently rocked at 4°C for 3 h. The agarose beads were collected by centrifugation and the supernatant was drained off. The beads were washed three times with ice-cold phosphate-buffered saline, re-suspended in 200 μ L of 2 \times non-reducing Laemmli sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% sodium dodecyl sulfate, 10% glycerol, 50 mM dithiothreitol, 0.01% bromophenol blue) and then boiled for 2 min.

Western blot analysis

Cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline prior to scraping and lysis. In the case of cleaved caspase-3, cell lysates were obtained by adding Chaps Cell Extract Buffer (50 mM Pipes/NaOH pH 6.5, 2 mM EDTA, 0.1% Chaps Cell Extract Buffer, 5 mM dithiothreitol, 20 μ g/mL Leupeptin, 10 μ g/mL aprotinin, and 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride). After a brief centrifugation, the lysate supernatants were used for immunoblotting. An aliquot of the cell lysate was mixed with loading sample buffer and boiled for 5 min. Equal amounts of protein (20–50 μ g) were resolved on sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis. After electrophoresis, the separated proteins were transferred to a nitrocellulose membrane at 75 V for 2 h. The blotting buffer used contained 48 mM Tris, 39 mM glycine and 20% methanol (pH 8.3). The membrane filters were blocked for 2 h with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline (20 mM Tris base, 0.15 mM NaCl pH 7.6), which was supplemented with 0.1% Tween 20, and subsequently incubated overnight with the corresponding antibody diluted to 1 : 1000 in the same blocking buffer. Membrane filters were washed in Tris-buffered saline/Tween 20 (3 \times 15 min) and incubated for 2 h with a secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase diluted to 1 : 5000. This was followed by three washes (15 min/wash) in blocking buffer. Several washes with Tris-buffered saline/Tween 20 were performed after all of the steps. The western blots were developed using Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate from Pierce (Rockford, IL, USA) and exposed to ECL film membranes (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK). Computer-assisted analysis of bands was performed with a Bio-Rad GS700 system (Hercules, CA, USA), and data processed with a Bio-Rad Molecular Analyst image program using a DELL workstation. Repeated scans were taken for film non-linearity corrections. Equal loading of samples was checked by stripping the blots and re-testing with an antibody against total ERK or Akt. The membranes were stripped by incubation for 30 min at 65°C in stripping buffer (Tris-HCl 62.5 mM, pH 6.7, 2% sodium dodecyl sulfate, 1.5 mM β -mercaptoethanol). The blots were incubated with Tris-buffered saline buffer for 1 h before incubation with primary antibody.

Determination of p21Ras-GTP

Granule cells were serum-deprived for 2 h before treatment. After treatment, cells were lysed at 4°C in a lysis buffer containing 20 mM HEPES, pH 7.5, 0.1 M NaCl, 1% Triton X-100, 10 mM EGTA, 40 mM β -glycerophosphate, 20 mM $MgCl_2$, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM dithiothreitol, 10 μ g/mL aprotinin, 10 μ g/mL leupeptin, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, and 10% glycerol. Lysates were incubated for 30 min with 10 μ g of a glutathione S-transferase (GST) fusion protein including the Ras-binding domain of Raf-1 (RBD) previously bound to glutathione-Sepharose beads (Upstate Biotechnology Inc., Lake Placid, NY, USA), followed by three washes with lysis buffer. Total p21Ras levels in the cell lysates and GTP-bound form of Ras associated with GST-RBD were quantified by western blot analysis using a monoclonal anti-p21Ras antibody (Oncogene Science, San Diego, CA, USA).

MTT reduction assay

Mitochondrial activity was estimated by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) reduction assay after 24 h following maintenance of cells in 5 mM (K5) or 25 mM (K25) KCl. MTT (0.2 mg/mL) was added to cells and after 45 min at 37°C medium was discarded and 100% dimethyl sulfoxide was added to the dishes. After incubation for 15 min at room temperature in darkness, the amount of formazan blue formed after MTT reduction was quantified spectroscopically at 560 nm excitation wavelengths using a Multiskan RC (Labsystems, Helsinki, Finland) microplate reader. As previously shown (Balázs *et al.* 1990), there is a very good correlation between the capacity of cultures to form formazan blue, protein and DNA content, and the proportion of neurones that appeared intact by phase-contrast microscopy.

DNA staining and fluorescence measurement

After different treatments, CGN, cultured in 6-well dishes, were rapidly washed with cold Tris-buffered saline (Tris 0.05 M, NaCl 0.15 M, pH 7.4) and fixed for 10 min in cold 4% paraformaldehyde. After fixation, cells were washed twice with ice-cold Tris-buffered saline, and a drop of mounting medium with DAPI from Vectashield (Burlingame, CA, USA) was added prior to placing the coverslip. Preparations were excited at 360 nm and absorbance recorded at 460 nm using a fluorescence microscope (Leica DMRB) equipped with a Q500MC QuantiMed program. Apoptotic cells were characterized by the presence of condensed and fragmented nuclei, as opposed to diffuse staining observed in non-apoptotic cells. Data shown were obtained from two plates per condition from two to three separate cell preparations.

Results

Hc-TeTx fragment rescues mature CGN from apoptotic cell death

Our previous findings showing effects due to the whole tetanus toxin or to its Hc-TeTx fragment on signalling (Gil *et al.* 2001, 2003; Pelliccioni *et al.* 2001) warranted further investigation on the possible effects on cellular physiology exerted by the Hc fragment, as well as on the pathways responsible for these effects. Formation of MTT product is a

well-established method to assess cellular viability. As expected, switching the granular cells to low potassium (K5) medium resulted in a $44.2\% \pm 7.8\%$ reduction of MTT conversion (Fig. 1a), indicative of cell damage. A modest but

significant increase in MTT conversion ($59.5\% \pm 10.3\%$) was observed when cells were pre-incubated for 30 min with 1 nM Hc-TeTx, prior to potassium withdrawal. This concentration is by far lower than most pharmacological agents used in similar types of studies. In the presence of 10 nM Hc-TeTx, the toxic effect due to potassium withdrawal could be markedly reduced ($85.2\% \pm 7.6\%$). On the other hand, pre-incubation with 100 nM Hc-TeTx also shows an increase ($75.3\% \pm 9.7\%$), this being lower than that produced by 10 nM Hc-TeTx. The neuroprotective effect of Hc-TeTx was also apparent, but also lower, when Hc-TeTx was applied either simultaneously ($57.5\% \pm 4\%$) or after 30 min ($56.9\% \pm 4.2\%$) following low $[K^+]_e$ stress (Fig. 1b). The more potent survival effect observed when CGN are pre-treated for 30 min with Hc fragment is probably due to the necessity that the Hc-TeTx-activated survival pathway was activated before cells go into K5 in order to be fully effective. In experiments using full-length TeTx (10 nM, 30 min pre-treatment before changing to low K), a protection of 60% was obtained (results not shown).

Further evidence for the changes in cell viability and the rescue phenomenon observed in Hc-TeTx-treated cultures, was obtained by nuclear staining with DAPI and fluorescence measurements. As shown in the graphic of Fig 1(c), 16.5% of the cells transferred to the low $[K^+]_e$ medium showed, after 24 h, nuclear fragmentation, a typical phenomenon associated with apoptotic cell death. In contrast, in the presence of Hc-TeTx, only about 10.7% of the cells showed signs of apoptosis. The nuclear condensation in Hc-TeTx pre-treated cells in K25 was not altered with respect to control cells. These values are in good agreement with the effect of low $[K^+]_e$ induced cell damage shown by others (D'Mello *et al.* 1993; Valencia and Morán 2001). It should be noted that the differences in cell viability values as estimated by the MTT assay or by DAPI might not be alike, since the state of cell damage as measured by the mitochondria activity may precede the state of apoptosis (Valencia and Morán 2001; Ho *et al.* 2002).

Hc-TeTx induces phosphorylation of Trk receptor and p21Ras activation

Western blot analysis using an antibody specific for Trk receptors dually phosphorylated in tyrosines 674 and 675 showed that Trk receptors are phosphorylated in K25 conditions, but not in K5 medium (Fig. 2a). On the other hand, 10 nM Hc-TeTx under K5 induce a transient and rapid phosphorylation of the Trk receptor (Fig. 2a), being evident at 10 min (71% respect to the BDNF signal, as determined by film densitometry), but subsequently decreasing. The induction of phosphorylation by BDNF was almost as effective as the induction achieved by K25 (83%). It has been reported that the antibody used for these experiments can detect in addition to phosphorylated TrkA, also phosphorylated TrkB and TrkC, since the epitope is common to all three

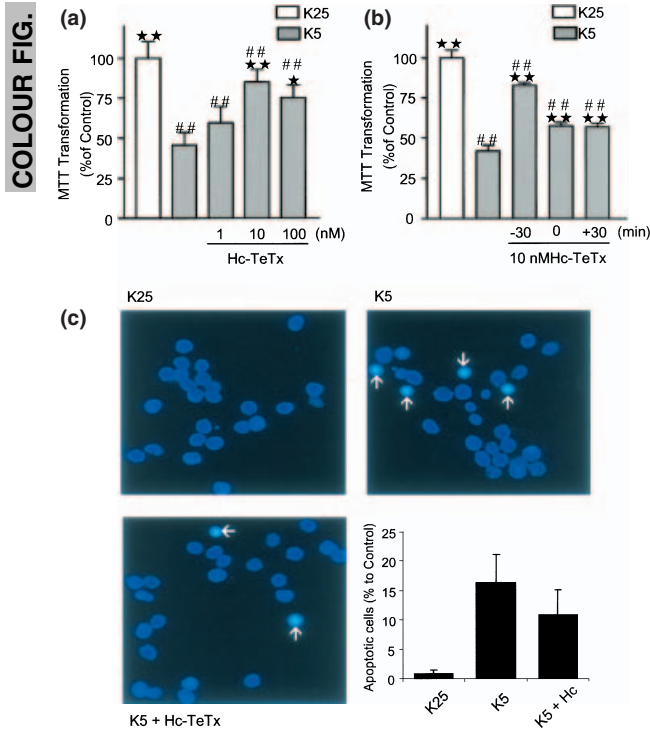
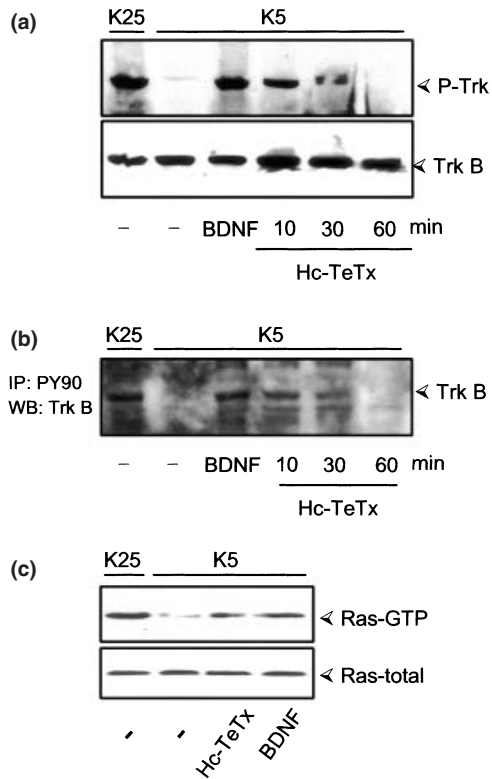


Fig. 1 Effects of the Hc-TeTx fragment on the viability of cultured cerebellar granule neurons switched to a low $[K^+]_e$ medium (5 mM, K5). (a) Cells were grown for 7 days *in vitro* in 25 mM KCl (K25) medium. Hc-TeTx (1 nM to 100 nM) was added 30 min before switching the medium from K25 to K5, and maintained for 24 h. After this time, cell survival was estimated by MTT assay. ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$ when compared with neurons switched to K5 medium; # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ when compared with the corresponding control groups, using one-way ANOVA, followed by Dunnett's post-hoc test for each Hc-TeTx concentration. (b) In the same conditions as (a), the Hc-TeTx fragment (10 nM) was added 30 min before, at the same time or 30 min after potassium deprivation. Results are presented as mean \pm SEM of five to 10 independent experiments presented as a percentage of control cultures. (c) Hc-TeTx avoids nuclear condensation due to potassium withdrawal. CGN were cultured in basal Eagle's medium supplemented with high $[K^+]_e$ (25 mM KCl) and 10% FCS. After 7 days *in vitro*, the cultures were switched to serum-free basal Eagle's medium normally containing 5 mM KCl, supplemented with 20 mM KCl (K25), no additives (K5) or 10 nM Hc-TeTx (K5 + Hc-TeTx). The images show fluorescent imaging of cells by DAPI staining at 24 h after treatment. Note an increased number of cells with nuclear condensation and fragmentation typical of apoptosis in K5 compared with culture switched to K25, and culture incubated with Hc-TeTx in K5. Arrows indicate cells with condensed chromatin. The histogram represents the differences of three experiments, each one of one register up to 10 fields.



receptors. Since it has been shown that CGN cells are devoid of TrkA receptors (Nonomura *et al.* 1996), it would appear that the antibody reacts with TrkB or TrkC receptors. Therefore, we pursued an immunoprecipitation experiment using anti-phosphotyrosine antibody (clone PY20) and subsequent western blotting with anti-TrkB antibody. The results shown in Fig. 2(b) indicate that the phospho-TrkB protein was undetectable when cells were transferred to low $[K^+]_e$ medium alone but was significantly elevated in the presence of either Hc-TeTx (10 nM, 10 min or 30 min) or BDNF (25 ng/mL, 10 min). The total levels of TrkB (probed directly with anti-TrkB antibody) do not change significantly in any of these treatments, even in the CGN cells cultured in the high $[K^+]_e$ medium (data not shown). In the same kind of experiments the activation of p21Ras, i.e. the presence of p21Ras-GTP bound form, was assessed. Being consistent with the detected activation of Trk receptors by Hc-TeTx, an increase in the p21Ras-GTP form is found due to Hc-TeTx after 10 min incubation in absence of depolarization, as well as due to BDNF (25 ng/mL, 10 min) (Fig. 2c).

Hc-TeTx induces phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt signalling pathway

Since it is well established that induction of the PI3K/Akt pathway is associated with cell survival under stress (Yuan and Yankner 2000), Akt phosphorylation, one of the key components of the inositol triphosphate cascade, was examined. As illustrated in Fig. 3(a), a substantial

Fig. 2 Hc-TeTx induces Trk receptor phosphorylation in tyrosines 674 and 675, and activation of p21Ras. (a) CGN were grown for 7 days *in vitro* in a 25 mM KCl medium, then the cells were switched, in the K5 lanes, to a 5 mM KCl serum-free medium for 1 h and incubated with the Hc-TeTx fragment (10 nM) for 0, 10, 30 or 60 min. In the K25 lane, serum-free medium was supplemented with 25 mM potassium. As positive control, BDNF (25 ng/mL) was added for 10 min. Total lysates were separated in a 7.5% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis and subjected to immunoblotting with the anti-Trk phosphorylated in residues $Tyr^{674/675}$ or against anti-TrkB. (b) Induction of Tyr-phosphorylation of TrkB by the Hc-TeTx fragment or by BDNF. Cells were grown for 7 days *in vitro* in 25 mM KCl, then the cells were switched, in the K5 lanes, to a 5 mM KCl serum-free medium for 1 h, and incubated with Hc-TeTx (10 nM) for 10, 30 or 60 min, or with BDNF (25 ng/mL) for 10 min. In the K25 lane, serum-free medium was supplemented with 25 mM potassium. After the respective treatment, the cells were lysated and 0.5 mg of protein were immunoprecipitated using anti-phosphotyrosine antibody (clone PY20). The immunoprecipitated proteins were subjected to sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to nitrocellulose filters, and probed with anti-TrkB antibody. Image shown is representative of three independent experiments. (c) Hc-TeTx-induced p21Ras activation in potassium deprivation. CGN were deprived of serum and potassium for 2 h in the K5 lanes, and then incubated with or without Hc-TeTx (10 nM) or BDNF (25 ng/mL) for 10 min. In K25 lanes, 25 mM potassium was present throughout all the experiment. Then, cell lysates were incubated for 30 min with 10 μ g of a GST-RBD fusion protein, previously bound to glutathione-Sepharose beads. Subsequently, beads were washed three times with lysis buffer and Ras precipitated was analysed by western blot using a monoclonal anti-p21Ras antibody (indicated as Ras-GTP). In order to assess the initial amount of total Ras protein, aliquots of the lysates were taken and analysed by immunoblotting (indicated as Ras-total).

phosphorylation of Akt in Ser 473 takes place in response to increasing concentrations of Hc-TeTx fragment. Quantitative analysis of Akt phosphorylation was performed in cells treated with increasing concentrations of Hc-TeTx (10^{-10} – 10^{-7} M) for 15 min, after switching the cells to the K5 medium for 1 h. The signal intensities of the Akt phosphorylation of different experiments were determined by band densitometry analysis and the ratio of the band intensities was expressed as a percentage of values found in K5-treated cells (Fig. 3a). Since the highest Akt phosphorylation was found at 10 nM Hc-TeTx concentration, cells were treated with or without Hc-TeTx (10 nM) for 10, 30 or 60 min (Fig. 3b) in order to observe time-dependence of the phosphorylation. The signal intensities due to Akt phosphorylation in Ser 473 were determined by densitometric analysis and the ratio of band intensity was expressed as a percentage of values from naive cells. The Akt phosphorylation in low $[K^+]_e$ (K5) conditions increases due to Hc-TeTx when compared to the non-treated cells in K5. The level of phosphorylation with Hc-TeTx in K5 was similar to the Akt phosphorylation found in high $[K^+]_e$ (K25) conditions (Fig. 3b) at short-time. As can be seen, Hc-TeTx was more

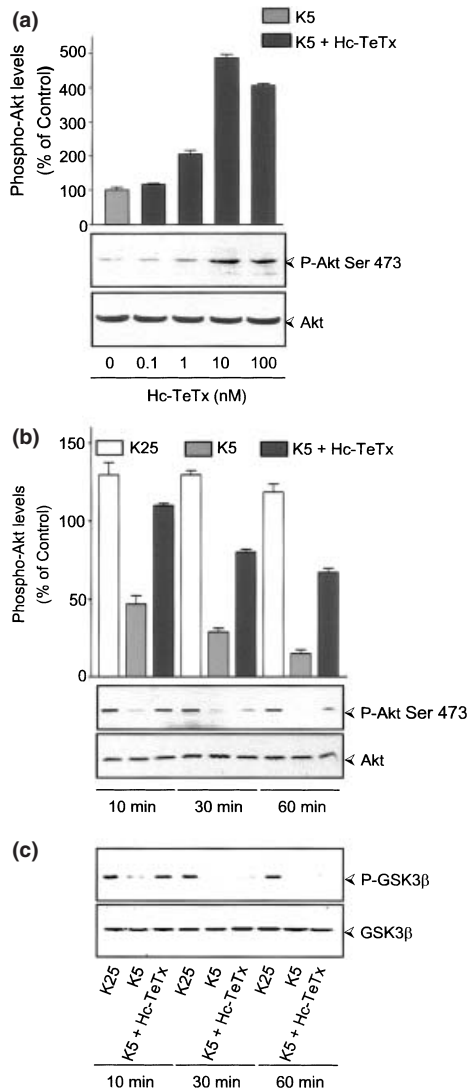


Fig. 3 Hc-TeTx fragment activates Akt in CGN. (a) Concentration-dependence of Hc-TeTx-induced Akt phosphorylation in *Ser*⁴⁷³. Cells were switched to K5 medium for 1 h and then treated for 15 min with increasing concentrations of Hc-TeTx (0–100 nM). Western blots were performed with anti-phospho(*Ser*⁴⁷³)Akt antibody or with anti-Akt antibody. Graphics shows densitometric determination of phospho-Akt levels. The ratio of the band intensity is expressed as a percentage of control. (b) Akt phosphorylation was detected using 10 nM Hc-TeTx at the indicated times in low $[K^+]_e$ (K5) conditions compared with the non-treated cells in K5 and in high $[K^+]_e$ K25 conditions. The signal intensities from western blot analysis (50 μ g protein per lane) were determined by densitometry. The ratio of band intensity was expressed as a percentage of values from naive cells. The analysis was performed in three independent experiments with similar results. Values are the mean \pm SEM (upper). Western blots of anti-Akt antibody (lower) were performed for determining the protein levels. (c) In the same experiments, the levels of phosphorylation of GSK3 (an Akt substrate) in the *Ser*⁹ residue were determined, using anti-phospho-GSK3 and anti-GSK3 antibodies.

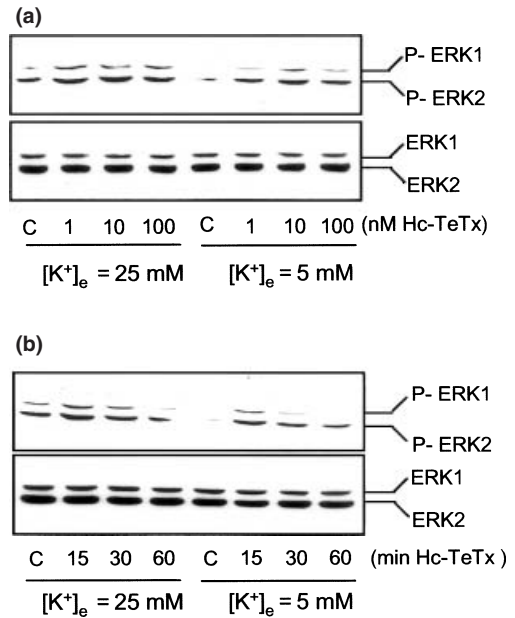


Fig. 4 Phosphorylation of ERK1 and ERK2 members of the mitogen-activated protein kinases (MAPK) family in CGN cells after treatment with Hc-TeTx. Cells were grown for 7 days *in vitro* in 25 mM potassium and deprived for 1 h of serum and potassium in K5 lanes, and only of serum in K25 lanes. Then CGN were switched to serum-free BME containing either 25 mM or 5 mM KCl in the presence of increasing concentrations of Hc-TeTx (10^{-9} M to 10^{-7} M) for 15 min (a) or in the presence of 10 nM HcTeTx for the time indicated (b). Immunoblottings were performed with an antibody that recognizes the dually phosphorylated form of ERK-1 and ERK-2. Equal loading was demonstrated by reprobing the membranes with an antibody recognizing total ERK-1/2.

effective at short-time application. Western blots with anti-Akt antibody were performed to determine the protein levels, demonstrating that the total Akt protein was not modified under the three conditions assayed (K25, K5 and K5 + Hc-TeTx) in the three times determined. Similar results, using an antibody specific for GSK3 β phosphorylated in Ser 9, were found in the phosphorylation of GSK3 β , an Akt substrate (Fig. 4c), showing that Akt activity is enhanced due to Hc-TeTx treatment. This result is in good correlation with the results observed in Fig. 4(b).

Hc-TeTx induces mitogen-activated protein kinase (MAPK) signalling pathway

Phosphorylation of the MAPK family is another important yet ambiguous event in cellular signalling associated with survival, growth regulation and cell differentiation (Gunn-Moore *et al.* 1997; Fukunaga and Miyamoto 1998). As illustrated in Fig. 4, ERK-1/2 remained phosphorylated at basal levels when cells were deprived of growth factors for

1 h and in a medium containing either 5 or 25 mM KCl (Fig. 4, lanes C). Addition for 15 min of various concentrations of Hc-TeTx caused an increase in ERK1 and in ERK 2 dually phosphorylated in Thr 202 and in Tyr 204 (Fig. 4a). The highest level of phosphorylation was obtained at 10 nM Hc-TeTx fragment. In time-course experiments, the maximum stimulation was obtained after 15 min, and thereafter a gradual decrease was noted (Fig. 4b). As can be observed in Figs 4(a) and (b), the basal phosphorylation in K25 medium is higher than in K5 medium (an average of 18% K5 with respect to K25), this being a result commonly described (e.g. Rosen *et al.* 1994). To further validate the Hc-TeTx-mediated stimulation of MAPK and PI3K/Akt signalling cascades, PD98059, a MEK inhibitor, and Wortmannin, a PI3K inhibitor, were used. In addition, the effect of Hc-TeTx on phosphorylation of p90rsk and of CREB, both members of the ERK pathway, were also examined using anti-phospho(*Ser*³⁸⁰)p90rsk, anti-phospho(*Ser*¹³³)CREB antibodies. As shown in Fig. 5, addition of 10 nM Hc-TeTx for 15 min in low $[K^+]_e$ medium enhanced p90rsk and CREB phosphorylation (Fig. 5a). Treatment with 50 μ M PD98059 under these conditions blocked completely ERK1/2 phosphorylation and also reduced significantly p90rsk and CREB phosphorylation. Addition of 100 nM Wortmannin was less effective than PD98059 in blocking phosphorylation due to Hc-TeTx of ERK1/2, p90rsk and CREB. On the other hand, Hc-TeTx-induced cell survival was suppressed by pharmacological inhibition of MEK and PI3K (Fig. 5b). Compared to the 82% of cellular viability, with respect to the K25 control, after toxin addition under K5 medium, both PD98059 and Wortmannin partially blocked (64% and 59%, respectively) the Hc-TeTx-dependent rescue of the CGN cells.

Hc-TeTx prevents the proteolytic activation of pro-caspase-3

Since survival effects are activated following Hc-TeTx addition, experiments addressed to study the appearance of cleavage products of caspase-3 were performed. Time-course experiments on the effect of $[K^+]_e$ deprivation on proteolytic activation of pro-caspase-3 in CGN were carried out (Fig. 6a) and the results were obtained by western blot using antibody against cleaved caspase-3. The results of the analysis of intensities of the bands show a clear and progressive increase in cleaved caspase-3, from a practically non-existing cleaved caspase-3 to a maximal amount observed after 24 h without potassium depolarization. When potassium-deprived cells are incubated in the presence of increasing concentrations of Hc-TeTx, a protection against caspase-3 cleavage is observed, with the maximal inhibition of cleavage at 10 nM Hc-TeTx (Fig. 6b). On the other hand, PD98059 inhibited the effect of the Hc fragment on cleaved-caspase-3 appearance by approximately 40%, and Wortmannin inhibited the effect by approximately 80% (results not

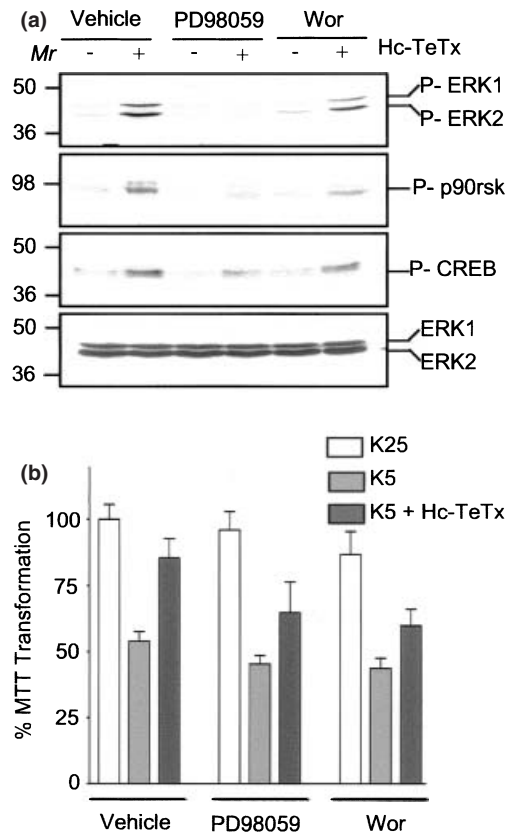


Fig. 5 Involvement of PI3K and MAPK pathways on cell survival. (a) Hc-TeTx-induced phosphorylation of ERK1/2, p90rsk and CREB in a MAPK-dependent and PI3K-independent manner was demonstrated using PD98059 (a MEK inhibitor) and Wortmannin (a PI3K inhibitor), respectively. Cerebellar granule neurone cultures were grown for 7 days *in vitro* in 25 mM KCl, then the cells were deprived of serum and potassium for 1 h and then treated or not treated with Hc-TeTx (10 nM) for 15 min in low $[K^+]_e$. Cultures were also treated with PD98059 (50 μ M), Wortmannin (100 nM), or the vehicle dimethyl sulfoxide (0.1%). Western blots were carried out by using anti-diphospho(*Thr*²⁰²-*Tyr*²⁰⁴)p44/p42 MAPK, anti-phospho(*Ser*³⁸⁰)p90rsk, anti-phospho(*Ser*¹³³)CREB and anti-ERK-1/2 antibodies. (b) Hc-TeTx-induced cell survival suppressed by pharmacological inhibition of MEK and PI3K. CGN grown for 7 days *in vitro* were deprived of serum for 2 h and pre-incubated with Wortmannin (100 nM), PD98059 (50 μ M), or the vehicle dimethyl sulfoxide (0.1%) for 30 min. Cultures were then switched to high (K25) and low potassium (K5) with or without Hc-TeTx (10 nM). After 24 h of incubation, cell viability was determined by MTT assay. Error bars represent the mean \pm SEM ($n = 3$). The MEK and PI3K inhibitors significantly reduced Hc-TeTx enhancement of neuronal survival.

shown). These results point to a shared responsibility of both pathways in the inhibition due to Hc fragment of caspase-3 cleavage, with the Akt pathway having the main role in this inhibition. This dependence of caspase-3 cleavage on both pathways is in agreement with the results observed in Fig. 5(b).

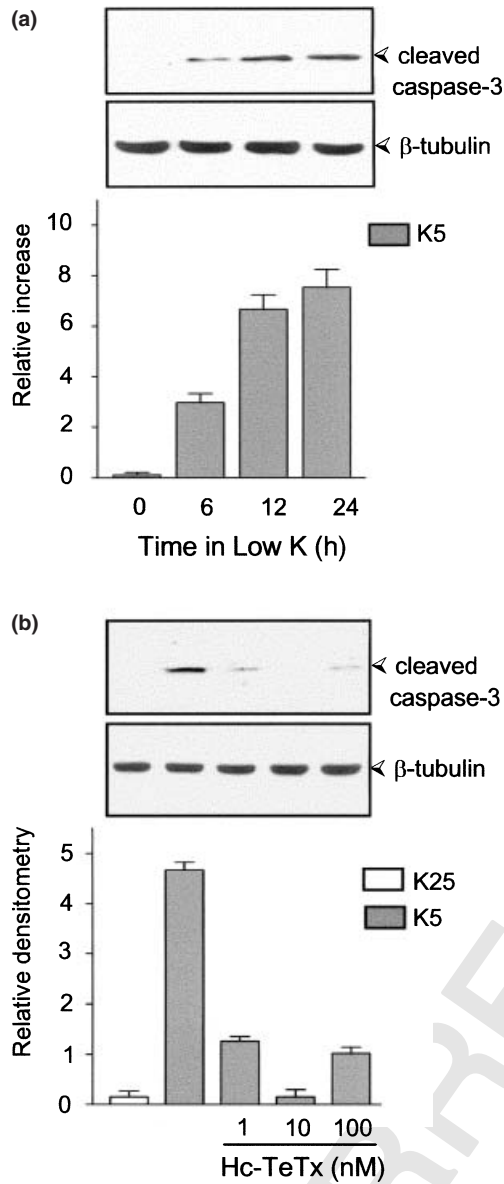


Fig. 6 (a) Time-course of the effect of $[K^+]_e$ deprivation on proteolytic activation of pro-caspase-3 in cerebellar granule neurones (CGN). CGN were grown for 7 days *in vitro* in a 25 mM KCl medium (Control), the cultures were then transferred to a 5 mM KCl medium for a period of time ranging from 0 h to 24 h. Western blots (30 μ g of protein/lane) were revealed using antibody against cleaved caspase-3. The results of the analysis of intensities of the bands were quantified by densitometry and represented as mean \pm SEM of three independent experiments. (b) Concentration–response of Hc-TeTx on proteolytic activation of pro-caspase-3 in low $[K^+]_e$. CGN were switched to high or low $[K^+]_e$ with or without a 30 min Hc-TeTx-pre-treatment at different concentrations (1 nM, 10 nM or 100 nM) and the lysates were obtained at 24 h after treatment. Western blots (30 μ g of protein/lane) were revealed using antibody against cleaved pro-caspase-3. The results of the analysis of intensities of the bands were quantified by densitometry and represented as mean \pm SEM of three independent experiments. In order to show the equal loading between lanes β -tubulin was probed.

Discussion

In the present study, we set the objective to document the molecular consequences of Hc-TeTx fragment interaction with CGN when stress conditions through low extracellular $[K^+]_e$ are applied on the cells. The overall rationale for this study has been the possibility that TeTx acts on neuronal targets by eliciting a number of signalling cascades that may share similar properties to the action of growth factors. From the present data it would appear that the Hc-TeTx shows neuroprotective properties, these being presumably the result of the direct or indirect interaction of the toxin fragment with the TrkB receptor. On the other hand, and taking into account that TrkB is already activated in K25 (Hc-TeTx pre-treatment conditions, see Figs 2a and b), Hc-TeTx activates, most probably, additional signalling besides those activated in high potassium, because the Hc-TeTx exerts a positive role in the presence of K25, which is not seen in K25 alone. The action of Hc-TeTx on the TrkB receptor leads to the activation of at least three major signalling pathways, PI3K/Akt, MEK/MAPK and PLC γ /PKC, in a similar way to BDNF (Nakagawara *et al.* 1994; Nonomura *et al.* 1996; Nuñez and del Peso 1998). Previous reports demonstrated that BDNF and NT-4/5, and NT-3 to a small extent, but not NGF, significantly protect differentiated CGN cells from low K^+ -induced cell death (Kubo *et al.* 1995), as well as from stress-mediated apoptotic death (Skaper *et al.* 1998). Furthermore, it has been demonstrated that PI3K has a crucial role in the prevention of low K^+ -induced apoptosis of CGN (Shimoke *et al.* 1997). In accordance with this observation, it has been demonstrated that CGN cultures express TrkB, and to a lesser extent TrkC, but not TrkA, under depolarizing conditions (Nonomura *et al.* 1996). The survival effects carried out by neurotrophins is similar to that produced by depolarization with a high $[K^+]_e$ medium, and may be due to the influx of calcium into cells through voltage-activated channels (Gallo *et al.* 1987). In addition, tyrosine phosphorylation of TrkB receptors by neurotrophins, NGF and NT-3 in CGN cells was by far higher than TrkC and TrkA receptors. In any case, a demonstration of the interaction of Hc-TeTx with some component of the neurotrophins receptor machinery is lacking, and would shed light over how TeTx can undergo retroaxonal transport inside neurones. On the other hand, it has been established that TeTx interacts, through its Hc fragment, with the neurone membrane in specific microdomains known as ‘lipid rafts’ (Herrerros *et al.* 2001). These are dynamic assemblies of cholesterol and sphingolipids that form in the cellular membranes, being highly enriched in gangliosides (Pike 2003). There is a general agreement that TeTx shows the highest affinity for the polysialogangliosides of the G1b series (Lalli *et al.* 1999), and these gangliosides are known to activate Trk receptors and ERK phosphorylation in rat brain slices (Duchemin *et al.* 2002). Thus, lipid rafts could act as a

platform in which a receptor complex constituted by TeTx, ganglioside and Trk could be formed.

Another novel finding described in the present work is the enhancement by Hc-TeTx treatment of p21Ras in GTP-bound form, i.e. the activated form that leads to downstream signalling (White *et al.* 1995). These observations are in agreement with the relationship found between the amounts of GTP bound to p21Ras and the CGN survival induced by BDNF after potassium withdrawal (Zirrgiebel *et al.* 1995). The p21Ras protein has been described as an essential link in the inhibition of death pathways (Nobes *et al.* 1996), possibly due to the ability of p21Ras to promote signalling through the PI3K and ERK pathways simultaneously but

20 non-redundantly, inhibiting two independent mechanisms of apoptosis, as has been described in rat sympathetic neurones (Xue *et al.* 2000). Interestingly, the same result was found after interleukin-3 deprivation in the Ba/F3 cell line, a mouse interleukin-3-dependent cell line (Kinoshita *et al.* 1997), pointing to the possibility of this dual manner of cell protection as a more general mechanism. Our finding, in experiments using PD98059 or Wortmannin, in which both pathways are responsible for Hc-TeTx-induced survival is in agreement with this view of PI3K and ERK as simultaneous and non-redundant survival pathways. Both these pathways can act over another prominent effect of potassium withdrawal as well as of serum deprivation in CGN, i.e. the appearance of the cleaved caspase-3 subunit, preceding the period of peak neuronal death (Cryns and Yuan 1998). Inhibition of caspase-3 cleavage participates in the survival

21 effects elicited by several factors, such as lithium (Mora *et al.* 2001) or LIGA20 (Marks *et al.* 1998). Since caspases participate in many apoptotic events, such as DNA fragmentation, chromatin condensation, membrane blebbing, and disassembly into apoptotic bodies (Thornberry and Lazebnik 1998), inhibition of caspase-3 cleavage observed in the present work is a good clue about the interference by Hc-TeTx of pathways leading to programmed cell death. The inhibition of the 17 kDa caspase-3 fragment reaches the maximum at 10 nM Hc-TeTx, being partially reverted at 100 nM. This kind of pattern is also seen in the survival potentiation, in the ERK-1/2 activation at K5, and, to a lesser

22 extent, in the Akt phosphorylation in Ser 473. One possible explanation for these results could be the acceleration, at high Hc-TeTx concentrations, of the deactivation rate of the 23 Hc-TeTx-induced pathways, as is seen in the case of PKC when activated by TeTx (Gil *et al.* 1998).

Actually, the action of bacterial toxins on survival pathways is a common feature described in the literature, a lot of them causing apoptosis. Modulation of the host cell-death pathway may be used to abrogate key immune cells that could limit the infection or, alternatively, to facilitate the proliferation of intracellular pathogens (Weinrauch and Zychlinsky 1999). In this way, anthrax lethal factor, also a Zn^{2+} -metalloprotease as is TeTx, causes cell death, as well as

host death, by means of cleavage and inactivation of mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK), being, together with TeTx, the only protein toxin described as acting on the MAPK pathway (Chopra *et al.* 2003). Thus, whilst anthrax toxin causes cell death by MAPKK inactivation, Hc-TeTx would act in the reverse way, inducing cell survival by means of MAPKK activation through a signalling cascade coming from the plasma membrane. If the interpretation to the induction of apoptosis by a bacterial toxin is easy to obtain, i.e. elimination of key defence cells or to provide a safe haven for bacterial proliferation, the interpretation to the host cell survival enhancement performed by a toxin, Hc-TeTx in this case, is difficult to present. Would the retroaxonal transport, so important in the TeTx action, be enhanced in the context of the general activated metabolism in the cell survival conditions? On the other hand, since the impairment of exocytosis has been described to participate in neurological diseases in which apoptosis is present (Ferrer 24 2002), could this promotion of cell survival be a mechanism of compensation for the apoptosis that could be promoted by the inhibition of an essential function for neurones, such as exocytosis? In any case, the role of clostridial neurotoxins and derived molecules as therapeutical tools for the treatment of disorders of neuromuscular basis, or even of tumoral processes, seems to increase constantly (Rossetto *et al.* 2001). Now, the promotion of neuronal survival can be added to the list of possible therapeutical uses. Thus, clostridial neurotoxins seem to be not so bad at the end.

Acknowledgements

This research was supported by Grant SAF2001-2045 from the Ministerio de Educación y Cultura, Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica. We would also like to thank Dr E. Claro for the critical reading of this manuscript.

References

- Aguilera J. and Yavin E. (1990) *In vivo* translocation and down-regulation of protein kinase C following intraventricular administration of tetanus toxin. *J. Neurochem.* **54**, 339–342.
- Balázs R., Hack N. and Jorgensen O. S. (1990) Selective stimulation of excitatory amino acid receptor subtypes and the survival of cerebellar granule cells in culture: effect of kainic acid. *Neuroscience* **37**, 251–258.
- Chopra A. P., Boone S. A., Liang X. and Duesbery N. S. (2003) Anthrax lethal factor proteolysis and inactivation of MAPK kinase. *J. Biol. Chem.* **278**, 9402–9406.
- Cryns V. and Yuan J. (1998) Proteases to die for. *Genes Dev.* **12**, 1551–1570.
- D'Mello S. R., Galli C., Ciotti T. and Calissano P. (1993) Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: Inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **90**, 10989–10993.
- Duchemin A., Ren Q., Mo L., Neff N. H. and Hadjiconstantinou M. (2002) GM1 ganglioside induces phosphorylation and activation of Trk and Erk in brain. *J. Neurochem.* **81**, 696–707.

- Ferrer I. (2002) Synaptic pathology and cell death in the cerebellum in Creutzfeldt-Jakob disease. *Cerebellum* **1**, 213–222.
- Gallo V., Kingsbury A., Balazs R. and Jorgensen O. S. (1987) The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J. Neurosci.* **7**, 2203–2213.
- Gil C., Ruiz-Meana M., Alava M., Yavin E. and Aguilera J. (1998) Tetanus toxin enhances Protein Kinase C activity translocation and increases polyphosphoinositide hydrolysis in rat cerebral cortex preparations. *J. Neurochem.* **70**, 1636–1643.
- Gil C., Chaïb-Oukadour I., Blasi J. and Aguilera J. (2001) Hc fragment (C-terminal portion of the heavy chain) of tetanus toxin activates protein kinase C isoforms and phosphoproteins involved in signal transduction. *Biochem. J.* **356**, 97–103.
- Gil C., Chaïb-Oukadour I. and Aguilera J. (2003) C-terminal fragment of tetanus toxin heavy chain activates Akt and MEK/ERK signalling pathways in a Trk receptor-dependent manner in cultured cortical neurons. *Biochem. J.* **373**, 613–620.
- Gunn-Moore F. J., Williams A. G., Toms N. J. and Tavaré J. M. (1997) Activation of mitogen-activated protein kinase and p70S6 kinase is not correlated with cerebellar granule cell survival. *Biochem. J.* **324**, 365–369.
- Halpern J. L. and Loftus A. (1993) Characterization of the receptor-binding domain of tetanus toxin. *J. Biol. Chem.* **268**, 11188–11192.
- Halpern J. L. and Neale E. A. (1995) Neurospecific binding, internalization, and retrograde axonal transport. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **195**, 221–241.
- Herreros J., Ng T. and Schiavo G. (2001) Lipid rafts act as specialized domains for tetanus toxin binding and internalization into neurons. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2947–2960.
- Ho R., Eggert A., Hishiki T., Minturn J. E., Ikegaki N. and Foster P. (2002) Resistance to chemotherapy mediated by TrkB in neuroblastomas. *Cancer Res.* **62**, 6462–6466.
- Kaplan D. R. and Miller F. D. (2000) Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* **10**, 381–391.
- Kinoshita T., Shirouzu M., Kamiya A., Hashimoto K., Yokoyama S. and Miyajima A. (1997) Raf/MAPK and rapamycin-sensitive pathways mediate the anti-apoptotic function of p21Ras in IL-3-dependent hematopoietic cells. *Oncogene* **15**, 619–627.
- Kubo T., Nonomura T., Enokido Y. and Hatanaka H. (1995) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) can prevent apoptosis of rat cerebellar granule neurons in culture. *Dev. Brain Res.* **85**, 249–258.
- Lalli G. and Schiavo G. (2002) Analysis of retrograde transport in motor neurons reveals common endocytic carriers for tetanus toxin and neurotrophin receptor p75NTR. *J. Cell Biol.* **156**, 233–239.
- Lalli G., Herreros J., Osborne S. L., Montecucco C., Rossetto O. and Schiavo G. (1999) Functional characterisation of tetanus and botulinum neurotoxins binding domains. *J. Cell Sci.* **112**, 2715–2724.
- Marks N., Berg M. J., Guidotti A. and Saito M. (1998) Activation of caspase-3 and apoptosis in cerebellar granule cells. *J. Neurosci. Res.* **52**, 334–341.
- Montecucco C. and Schiavo G. (1994) Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins. *Mol. Microbiol.* **13**, 1–8.
- Mora A., Sabio G., Gonzalez-Polo R. A., Cuenda A., Alessi D. R., Alonso J. C., Fuentes J. M., Soler G. and Centeno F. (2001) Lithium inhibits caspase 3 activation and dephosphorylation of PKB and GSK3 induced by K⁺ deprivation in cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* **78**, 199–206.
- Morán J. and Patel A. J. (1989) Effect of potassium depolarization on phosphate-activated glutaminase activity in primary cultures of cerebellar granule neurons and astroglial cells during development. *Dev. Brain Res.* **46**, 97–105.
- Nakagawara A., Azar C. G., Scavarda N. J. and Brodeur G. M. (1994) Expression and function of Trk-B and BDNF in human neuroblastomas. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 759–767.
- Nobes C. D., Reppas J. B., Markus A. and Tolkovsky A. M. (1996) Active p21Ras is sufficient for rescue of NGF-dependent rat sympathetic neurons. *Neuroscience* **70**, 1067–1079.
- Nonomura T., Kubo T., Oka T., Shimoke K., Yamada M., Enokido Y. and Hatanaka H. (1996) Signaling pathways and survival effects of BDNF and NT-3 on cultured cerebellar granule cells. *Dev. Brain Res.* **97**, 42–50.
- Pelliccioni P., Gil C., Najib A., Sarri E., Picatoste F. and Aguilera J. (2001) Tetanus toxin modulates serotonin transport in rat-brain neuronal cultures. *J. Mol. Neurosci.* **17**, 303–310.
- Pellizzari R., Rossetto O., Schiavo G. and Montecucco C. (1999) Tetanus and botulinum neurotoxins: mechanism of action and therapeutic uses. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **354**, 259–268.
- Pike L. J. (2003) Lipid rafts: bringing order to chaos. *J. Lipid Res.* **44**, 655–667.
- Rosen L. B., Ginty D. D., Weber M. J. and Greenberg M. E. (1994) Membrane epolarization and calcium influx stimulate MEK and MAP kinase via activation of Ras. *Neuron* **12**, 1207–1221.
- Rossetto O., Seveso M., Caccin P., Schiavo G. and Montecucco C. (2001) Tetanus and botulinum neurotoxins: turning bad guys into good by research. *Toxicon* **39**, 27–41.
- Schiavo G., Benfenati F., Poulain B., Rossetto O., de Laureto P. P., Das-Gupta B. R. and Montecucco C. (1992) Tetanus toxin and botulinum-B neurotoxin block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature* **359**, 832–839.
- Shimoke K., Kubo T., Numakawa T., Abiru Y., Enokido Y., Takei N., Ikeuchi T. and Hatanaka H. (1997) Involvement of phosphatidylinositol-3 kinase in prevention of low K⁽⁺⁾-induced apoptosis of cerebellar granule neurons. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **101**, 197–206.
- Skaper S. D., Floreani M., Negro A., Facci L. and Giusti P. (1998) Neurotrophins rescue cerebellar granule neurons from oxidative stress-mediated apoptotic death: selective involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and the mitogen-activated protein kinase pathways. *J. Neurochem.* **70**, 1859–1868.
- Thornberry N. A. and Lazebnik Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science* **281**, 1312–1316.
- Valencia A. and Morán J. (2001) Role of oxidative stress in the apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons. *J. Neurosci. Res.* **64**, 284–297.
- Weinrauch Y. and Zychlinsky A. (1999) The induction of apoptosis by bacterial pathogens. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**, 155–187.
- White M. A., Nicolette C., Minden A., Polverino A., Van Aelst L., Karin M. and Wigler M. H. (1995) Multiple Ras functions can contribute to mammalian cell transformation. *Cell* **80**, 533–541.
- Xue L., Murray J. H. and Tolkovsky A. M. (2000) The Ras/phosphatidylinositol 3-kinase and Ras/ERK pathways function as independent survival modules each of which inhibits a distinct apoptotic signaling pathway in sympathetic neurons. *J. Biol. Chem.* **275**, 8817–8824.
- Yuan J. and Yankner B. A. (2000) Apoptosis in the nervous system. *Nature* **407**, 802–809.
- Zirrgiebel U., Ohga Y., Carter B., Berninger B., Inagaki N., Thoenen H. and Lindholm D. (1995) Characterization of TrkB receptor-mediated signaling pathways in rat cerebellar granule neurons: involvement of protein kinase C in neuronal survival. *J. Neurochem.* **65**, 2241–2250.

4. Resultados anexos al Trabajo III:

El efecto del fragmento Hc-TeTx sobre las isoformas PLC γ -1 y PKC β

En una fase previa a la publicación del trabajo en *The Journal of Neurochemistry*, presentado como aportación bibliográfica número III, se determinó el efecto del fragmento atóxico Hc-TeTx sobre la fosfolipasa C de fosfoinosítidos isoforma PLC γ -1. En cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo, se ha observado que Hc-TeTx activa la PLC γ -1, como se presenta en la Figura 1A del anexo. Esta activación ha sido obtenida reiteradamente por nuestro Grupo tanto con TeTx como con su fragmento Hc-TeTx, tanto en sinaptosomas como en células corticales de cerebro de rata (Gil et al., 2000, 2001; Pelliccioni et al., 2001). La figura 1A muestra como el Hc-TeTx, y el factor neurotrófico BDNF inducen la fosforilación clara de PLC γ -1 en CGN en medio con concentración baja de potasio, K5.

La consecuencia inmediata de la activación/fosforilación de la PLC γ -1 es la translocación/activación encontrada de las isoformas clásicas de la proteína quinasa C (PKC), especialmente la PKC β . Para ver esta translocación inducida por el fragmento Hc-TeTx, se realizaron experimentos de fraccionamiento subcelular que consistieron, como se ha descrito anteriormente, en separar las dos fracciones, soluble y particulada, y ver la redistribución de las proteínas, en este caso la PKC β . La incubación de las NGC con concentraciones de Hc-TeTx de 1 nM, 10 nM y 100 nM en medio de baja concentración de potasio (K5) durante 15 minutos, induce la translocación clara (activación) de la isoforma PKC β obteniéndose un máximo de translocación a concentración de Hc-TeTx de 10 nM (Fig. 1B).

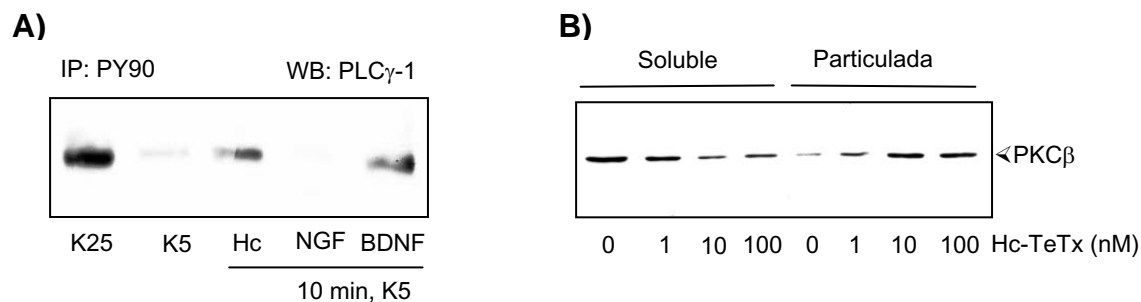


Figura 1. Fosforilación de PLC γ -1 inducida por el fragmento Hc-TeTx y consiguiente translocación de PKC β en CGN. **A)** Determinación de la activación de la PLC γ -1 por inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-fosfotirosina PY-90 y posterior inmunodetección con el anticuerpo anti-PLC γ -1. Las células cultivadas en KCl 25 mM (K25), fueron cambiadas a un medio de KCl 5 mM durante 1 h (K5) e incubadas con BDNF (25 ng/ml) o con NGF (25 ng/ml) como controles positivos, o con Hc-TeTx (10 nM) durante 10 minutos. Después del tratamiento respectivo, se lisaron las células y 0,5 mg de proteína se incubó con anticuerpo contra residuos fosfotirosina (PY-90). Las proteínas después fueron separadas en un gel de SDS-PAGE de 7,5%, transferidas a membranas de nitrocelulosa, y incubadas durante la noche con el anticuerpo anti-PLC γ -1. La gráfica es representativa de tres experimentos independientes. **B)** Translocación de la isoforma PKC β inducida por Hc-TeTx: Las células transferidas a un medio K5 fueron tratadas sin (control) o con 1 nM, 10 nM, y 100 nM de Hc-TeTx durante 15 minutos. Posteriormente, las fracciones soluble (citósol) y particulada (membrana) fueron separadas. Las proteínas de cada tratamiento, fueron resueltas en SDS/PAGE de 10% y transferidas a la membrana de la nitrocelulosa. El análisis por *Western Blott* fue realizado usando anticuerpo anti-PKC β . Cada protocolo experimental fue repetido al menos tres veces obteniéndose resultados similares.

El efecto de los inhibidores de las vías PI-3K/Akt y p21Ras/MAPK sobre la expresión de caspasa-3 en CGN bajo la incubación con Hc-TeTx

Por tal de corroborar y ampliar los resultados del trabajo anteriormente indicado, se ha probado si la inhibición de la caspasa-3 inducida por el fragmento Hc-TeTx es a través de la vía p21Ras/MAPK o de la vía PI-3K/Akt, usando PD98059 y la wormanina como inhibidores selectivos de las dos vías. Como podemos observar en el *Western blott*, así como en la gráfica de densitometría de la Figura 2, el PD98059 inhibe el efecto que el fragmento Hc-TeTx produce en el aspecto de la activación de

caspara-3, inhibición del 40% aproximadamente, mientras que la wormannina hace el mismo efecto pero con una eficacia del 80%.

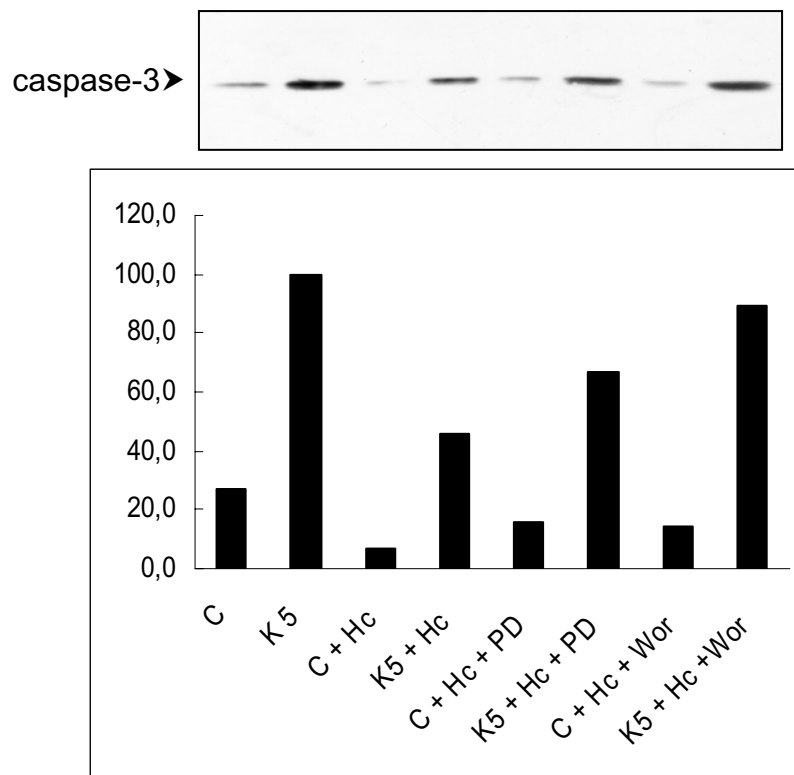


Figura 2. Efecto de los inhibidores PD98059 y Wormanina sobre la expresión de caspasa-3 inducida por Hc-TeTx. Las CGN fueron preincubadas con Wormannina (100 nM), PD98059 (50 μ M), o con el vehículo (DMSO 0,1%) durante 30 minutos. Después las células fueron tratadas como se indica en la figura con o sin Hc-TeTx (10 nM). Los lisados fueron obtenidos después de 24 h. *Western Blott* (30 μ g de proteína/carril) fueron revelados usando el anticuerpo anti-*cleaved* caspasa-3. Los resultados del análisis de las intensidades de las bandas fueron cuantificados por la densitometría.

Trabajo:IV
**C-Terminal Domain of the Heavy Chain of Tetanus
Toxin Attenuate 1-Methyl-4-Phenylpyridinium Toxicity
in Cerebellar Granule Neurons**

Imane Chaïb-Oukadour and José Aguilera

Departament de Bioquímica i de Biologia Molecular, Institut de
Neurociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193,
Spain.

Correspondence to: José Aguilera

Departament de Bioquímica i B. M.

Edifici M, Universitat Autònoma de Barcelona

Bellaterra 08193, Barcelona, Spain

Telf: 3493 581 1673 Fax: 3493 581 1573 E-mail:

jose.aguilera@uab.es

Running title: Hc-TeTx attenuate MPP⁺ toxicity in CGN

Key words: apoptosis; Tetanus toxin; 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺); cerebellar granule neurons; cytochrome c; caspase-3.

Abstract

Exposure of cerebellar granule neurons to higher concentrations of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) results in necrosis whereas exposure to lower concentrations results in apoptosis cell death. Pretreatment of cells with tetanus toxin (TeTx) or with its atoxic C-terminal domain of the heavy chain (Hc-TeTx) markedly attenuates the apoptotic death of these cells induced by MPP⁺. We show that the Hc-TeTx is able to produce neuroprotection against MPP⁺ as assessed by reduction of tetrazolium salts and by chromatin condensation. Bcl-2 family gene products are critical to the integration of cell death stimuli that target the mitochondrion. Proapoptotic Bad has been shown to dissociate from its sequestered site with the molecular chaperone protein 14-3-3 and displace proapoptotic Bax from antiapoptotic Bcl-X_L. Bax subsequently translocates to the mitochondrion and induces cytochrome *c* release and caspase activation. Herein we report the response of the key members of this proposed pathway after MPP⁺ and Hc-TeTx treatment. In control and Hc-TeTx-treated cells, Bad was found constitutively bound to 14-3-3, whereas Bcl-X_L bound Bax. Within damaged cells, MPP⁺ induced the dissociation of Bad from 14-3-3 and the subsequent dimerization of Bad with Bcl-X_L as determined by immunoprecipitation. On the other hand, we showed that the translocation of Bax from the cytosol to the mitochondria, the cytoplasmic concentration of the apoptogenic proteins cytochrome *c* and active caspase 3 were reduced. Hc-TeTx and MPP⁺ cotreatment of CGN with respect to the MPP⁺ treatment, preventing the onset of apoptosis. These data suggest that factors necessary for Hc-TeTx to elicit its neuroprotective effects against MPP⁺ include the inhibition of the Bad cell death pathway.

Introduction

Several models for Parkinson's disease (PD) have been developed over the last two decades, and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) is a good model that induces a form of parkinsonism clinically indistinguishable (Calne and Langston, 1983). Mature cultures of cerebellar granule neurons (CGN) also are susceptible to the neurotoxic effects of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP^+), the active metabolite of the meperidine analogue MPTP (Langston et al., 1983; Marini et al., 1987). MPP^+ -induces apoptosis and kills CGN in cultures via induction of programmed cell death (Dipasquale et al., 1991; Blum et al., 1993), presumably following the activation of an intrinsic cell death program (Raff et al., 1993). MPP^+ blocks the reoxidation of NADH dehydrogenase by coenzyme Q, uncoupling mitochondrial oxidation of NAD^+ -linked substrates, which results in cessation of oxidative phosphorylation (Tipton and Singer, 1993). The cells are subsequently depleted of ATP, and the mitochondrial membrane potential collapses, resulting in cell death.

Recent studies have suggested that oxidative stress plays an important role in the neurodegenerative process of PD (Cassarino et al., 1997; Lee et al., 2000). Generation of reactive oxygen species (ROS) from mitochondrial (Fall and Bennett, 1999) and/or nonmitochondrial sources (Lotharious and O'Malley, 2000) appear to contribute to MPP^+ -induced oxidative stress. Recent cell biological studies have demonstrated that oxidative stress activates a series of cellular factors, which subsequently initiate apoptotic cell death (Maney et al., 1995; Lieberthal et al., 1998). In this respect, MPP^+ promotes mitochondrial cytochrome *c* release (Cassarino et al., 1999) caspase activation (Hartmann et al., 2000), and apoptosis in dopaminergic neurons (Jackson-

Lewis et al., 1995; Viswanath et al., 2001). The release of cytochrome *c* is associated with the translocation to the mitochondria of certain bcl-2-family proteins, such as Bax or Bad (Desagher and Martinou, 2000). Bax may play a central role in mediating mitochondria-dependent apoptosis in neurons (Putcha et al., 1999). Following a death signal, Bax can be translocated from cytosol to mitochondria, which is rapidly followed by cytochrome *c* release. The Bax effect can be prevented by the presence of Bcl-2 or Bcl-X_L proteins in the mitochondria (Gross et al., 1999). Bad is another member of the pro-apoptotic Bcl-2 proteins, which is dephosphorylated during the apoptosis process promoting its translocation to mitochondria, where it binds to Bcl-X_L, inhibiting its death-repressor activity (Zha et al., 1996; Desagher and Martinou, 2000). Phosphorylated Bad is normally sequestered in the cytosol through its binding to 14-3-3 protein.

The C-terminal fragment of the heavy chain of tetanus toxin (Hc-TeTx) was shown recently to be useful in the neuroprotection of CGN against apoptotic death induced by potassium deprivation (Chaïb-Oukadour et al., 2004). Hc-TeTx probably works, like neurotrophins, by activation/phosphorylation of TrkB or TrkC and activating some of the intracellular signal transduction pathways, which include the Ras/mitogen-activated protein kinase (Ras/MAPK), the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI-3K/PKB) and the PLC γ -1/PKC pathways (Chaïb-Oukadour et al., 2004) which appear to activate cell survival mechanisms (Segal and Greenberg, 1996; Nuñez and del Peso, 1998).

In this study, we described whether Hc-TeTx fragment could prevent CGN cultures from MPP⁺ induced apoptosis and the possible mechanism of this process.

Materials and Methods

Sprague-Dawley (OFA) rats were obtained from the *Servei d'Estabulari* of the Universitat Autònoma de Barcelona (Barcelona; Spain). Basal Medium Eagle's (BME), fetal calf serum, culture dishes and penicillin/streptomycin came from Pan Biotechnology GmbH, Fontlab (Barcelona; Spain). MPP⁺, Cytosine arabinoside, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), poly D-lysine, and protease inhibitors were obtained from Sigma (St Louis, MO, USA). 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI) was from Vector Laboratories Inc. (Burlingame, CA; USA). Polyclonal antibodies against cleaved caspase-3 as anti-Bad were supplied from Cell Signaling Technology (Beverly, MA; USA). Anti-mouse and anti-rabbit secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase were from Transduction Laboratories (Lexington, KY; USA). Anti-Bax, anti-Bcl-X_L as anti-14-3-3 β were from Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, USA). Anti-cytochrome *c* (SC 7119) as anti- β tubulin was from PD Pharmingen (San Diego, CA, USA). Electrophoresis reagents were from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA). ECL Plus and all the western blot reagents were purchased from Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK).

Expression and purification of Hc-TeTx fragment

Escherichia coli M15 cells were induced to express a pQE3-derived expression vector (Qiagen; Chatsworth, CA; USA) containing the cDNA for the Hc-TeTx fragment-(His)₆ fusion protein by the addition of isopropyl β -D-thiogalactoside (2 mM, final concentration). Cells were pelleted after 4 h, suspended in 50 mM NaH₂PO₄/300 mM NaCl, pH 8, and sonicated on ice for two 60-sec periods with a probe sonicator. The suspension was centrifuged at

15000 x g for 20 min, and the clear supernatant was applied to a Ni-NTA-agarose precoated column (Qiagen; Chatsworth, CA; USA). Protein purification was carried out following the manufacturer's instruction. Briefly, after a washing step with 50 mM NaH₂PO₄/300 mM CaCl₂/10% glycerol, pH 6, the attached protein was eluted with a 50 mM-300 mM imidazole gradient. One-milliliter fractions were collected and analyzed by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) followed by staining with Coomassie blue. Those fractions containing purified Hc-TeTx were concentrated by centrifugation using ultra free-MC filtration tubes with a molecular weight cut-off of 10000 kDa (Millipore; Bedford, MA; USA), and stored at -80°C.

Cerebellar granule cell culture

Primary cultures of CGNs were obtained from 7- to 8-day-old Wistar rats of either sex as described before (Morán and Patel, 1989). The animals were housed in a temperature-controlled room maintained at 12 h light/dark cycles. The standard laboratory animal food and tap water were available *ad libitum* for the mothers. Briefly, cerebella dissected free of meninges were chopped into small pieces and digested with trypsin (0.025%, 10 min at 37°C) in a Krebs-Ringer buffer solution, pH 7.4, containing bovine serum albumin (0.3%). After addition of soybean trypsin inhibitor (0.5 mg/mL) and DNase (30 UI/ml), the tissue was disrupted by 10 passages through a fine tip plastic transfer pipette. The resulting cell suspension was filtered through a 100-µm nylon cloth, centrifuged and resuspended in BME supplemented with 10% fetal calf serum, 20 mM KCl, 5 mM glucose, 2 mM glutamine, penicillin (50 UI/ml) and streptomycin (50 µg/mL). Then cells were seeded at a density of 1.3 ×

10^6 cells/ml in poly L-lysine-pretreated 24-well or six-well plates and incubated in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C. Cytosine arabinoside (10 μM) was added 24 h after plating to arrest the growth of non-neuronal cells, mostly astrocytes and microglia.

All the experiments were carried out at 7 days in culture in a BME without fetal calf serum supplemented with 20 mM KCl, 2 mM glutamine, 50 U/mL penicillin, and 50 μg/mL streptomycin.

Drug treatment protocol

Cells were exposed to MPP⁺ different concentrations and cell viability was measured 24 h after treatment using the MTT assay. Absorbance at 560 nm in control cultures was used as 100% viability.

DAPI staining

For Fluorescence microscopy visualization of chromatin condensation and nuclei degradation 4',6-diaminodiphenyl-2-phenylindole (DAPI) was used. After different treatments, cells were rapidly washed with TBS (Tris 0.05 M, NaCl 0.15 M, pH 7.4) and fixed for 10 min in 4% paraformaldehyde. After the fixation, the neurons were washed twice with ice-cold TBS, and then stained for 5 min with 10 μg/ml DAPI. Fluorescence images were obtained using a fluorescence microscope (Leica DMRB) equipped with a Q500MC QuantiMed program at 400 nm. With fluorescence collected at 650 nm. Data shown were obtained from two coverslips per condition. These coverslips were obtained, in each case, from two to three separate cell preparations.

Detection of Bax/Cytochrome c translocation by Subcellular Fractionation and Western blot analysis

To detect cytochrome *c* release, attached cells were harvested in 500 μ l of ice-cold buffer A containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, complete protease inhibitor, and 250 mM sucrose after washing once with ice cold phosphate-buffered saline. The cells were incubated for 20 to 30 min on ice and then disrupted by douncing 20 times with a tight pestle (B-type) in a 7-ml weathon douncer. After centrifugation in a microcentrifuge at 800 g for 10 min at 4°C, the supernatants were centrifuged at 20 000 g for 40 min at 4°C. The resulting supernatants are saved as cytosolic extracts at -80°C until further analysis. The pellets containing the mitochondrial fraction were lysed with 100 μ l of buffer B [50 mM HEPES (pH 7.4), 1% (v/v) Nonidet P-40 (NP-40), 10% (v/v) glycerol, 1 mM EDTA, 2 mM dithiothreitol, and complete protease inhibitor]. Samples are vortexed from time to time during the 20 min incubation period on ice. Cellular debris are removed by centrifugation at 20 000 g for 40 min at 4°. The supernatants containing mitochondrial proteins can be stored at -80°C. For phospho-Bad, phospho-Akt, cleaved caspase 3 and total Bax proteins in total cell lysates, cells were washed with cold PBS at 4°C and lysed in a lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 6.8, glycerol 10%, 2% SDS, 10 mM dithiothreitol and 0.005% blue bromophenol. In both, mitochondrial and total lysates proteins (30-50 μ g/condition) were resolved in 15% SDS gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes according to the conventional methods partially modified by Fuentes et al., 2000. Briefly, proteins were transferred (75 V for 90 min) to nitrocellulose membranes using a Mini Trans-Blot Cell apparatus (Bio-Rad). The procedure for immunodetection, including transfer,

blocking of the membrane (90 min at 37°C) with TTBS (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl and 0.5% Tween-20) containing 5% non-fat dried milk and incubation (overnight at 4°C) with the primary antibody (diluted 1: 1000 in TTBS + 5% non-fat dried milk). After washing (twice for 5 min each time with TTBS), membranes were incubated (90 min at room temperature) with peroxidase-conjugated secondary antibodies (1: 5000 in TTBS with 5% non-fat dried milk). After washing (twice for 5 min and once for 10 min), detection of bound antibodies was visualized by chemiluminescence using the ECL-plus reagent.

Immunoprecipitation

The cells were treated as indicated in the figure, dounce homogenized and lysed in buffer containing 50 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton X-100, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β -Glycerolphosphate, 1 mM Na_3VO_4 and complete protease inhibitors, and protein concentration was determined as described above. Protein samples (0.5 mg) were incubated overnight at 4°C with 2 μg of Bad-antibody. Samples were then incubated with 20 μl pansorbin cells for 3 h at 4°C. The protein-bead complex was then washed, collected by centrifugation and samples were boiled in loading buffer and run on 15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis gels, probed with the Bcl-X_L or 14-3-3 antibodies and processed as described for western blotting.

Other methods

Protein concentration was measured according Bradford (1976) for mitochondrial lysates and (Lowry et al., 1951) for total cell lysates using

bovine serum albumin as standard in both. All data were representative of at least three independent neuronal preparations (with comparable results) each one in triplicate.

Results

Protective effects of Hc-TeTx fragment against MPP⁺-induced apoptotic death of CGNs

We investigated the effects of Hc-TeTx fragment on the viability of MPP⁺-treated CGNs. Cultured CGNs were exposed to increasing concentrations of MPP⁺ (10-100 μ M) with and without Hc-TeTx for 24 h and subsequently examined for cell viability. MPP⁺-induced neurotoxicity was attenuated in the presence of Hc-TeTx (Fig. 1).

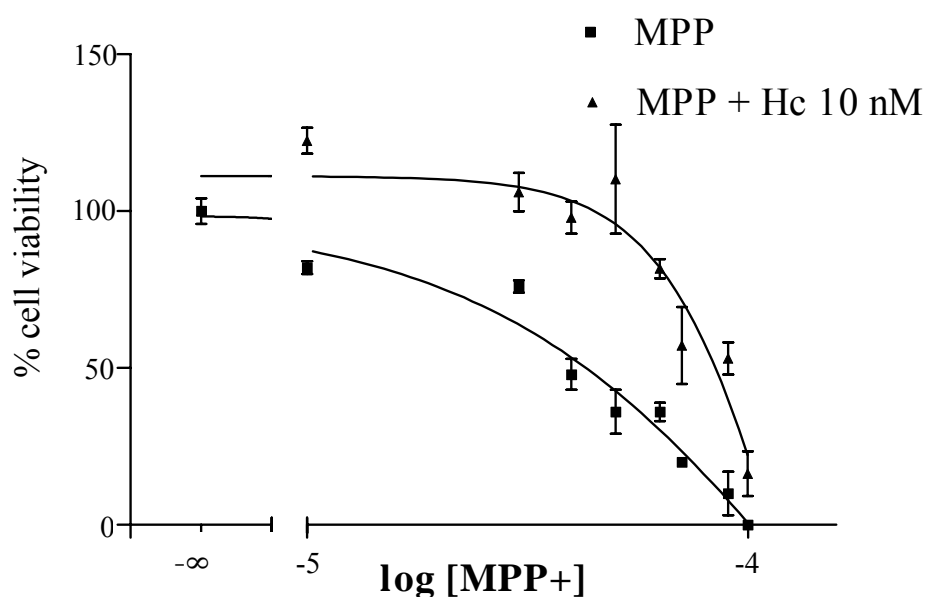


Figure 1. *Quantification of the effects of Hc-TeTx on MPP⁺-treated CGNs.* The Hc-TeTx fragment (10 nM) significantly attenuates MPP⁺-induced apoptosis of CGNs. CGNs were pretreated with Hc-TeTx for 30 min and exposed to increasing concentrations of MPP⁺ (10-100 μ M) for 24h in the absence (\blacksquare) or presence (\blacktriangle) of 10 nM of Hc-TeTx. Values are expressed as percentages of control cultures for each concentration of MPP⁺. Data are mean \pm SEM values of three experiments in triplicate.

The attenuation of MPP⁺-induced neurotoxicity by Hc-TeTx was concentration dependent (data not shown) with a maximum effect in the range 10-100 nM. Also, biochemical features of apoptosis, such as internucleosomal DNA fragmentation, were also markedly attenuated in the presence Hc-TeTx (Fig. 2).

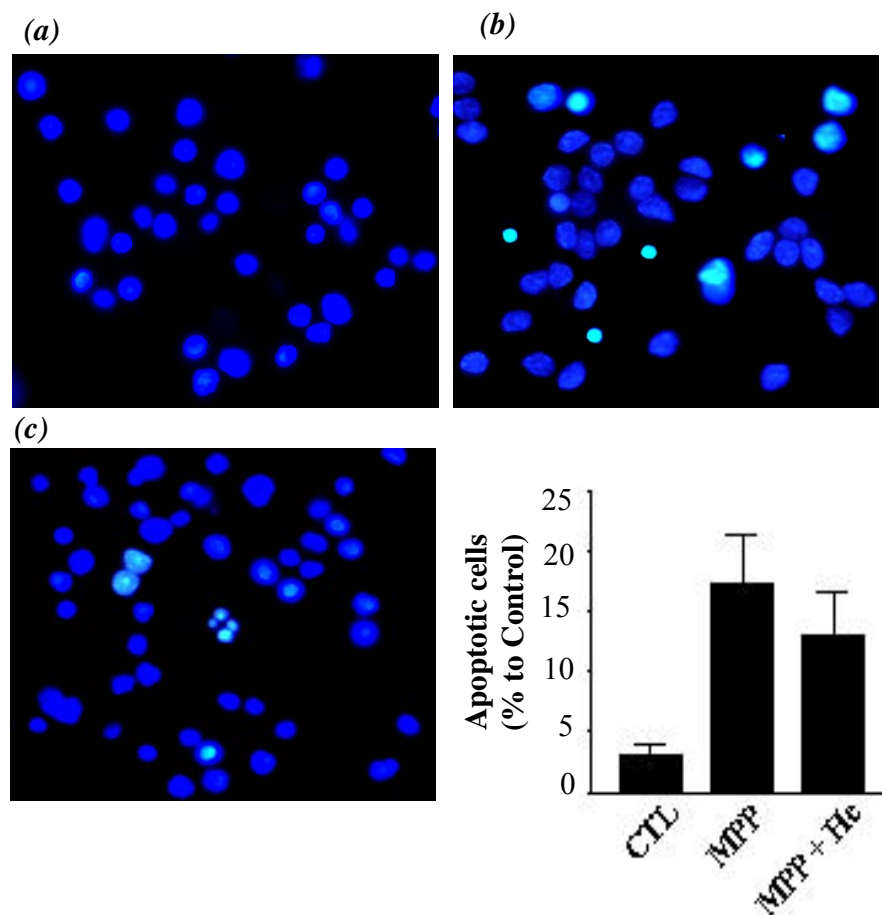


Figure 2. *Effects of Hc-TeTx on MPP⁺-induced apoptosis of CGN.* The pictures show fluorescent imaging of cultures by 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI) staining at 24 h after treatment. Compare untreated control cultures (a) with those treated with 50 μM MPP⁺; (b), and 50 μM MPP⁺ plus Hc-TeTx (10 nM); (c). Notice that Hc-TeTx attenuates MPP⁺-induced apoptosis as revealed by the reduced number of apoptotic nuclei. The histogram represents the statistical differences of three experiments.

Hc-TeTx inhibited Bax translocation and subsequent cytochrome c release-induced by MPP⁺

Mitochondria play a central role in both apoptosis and necrosis through the opening of the mitochondrial permeability transition pore (MPTP). The release of cytochrome *c* from mitochondria is thought to play a central role in some types of apoptosis (Mignotte and Vayssiere, 1998). The addition of MPP⁺ to the mitochondrial fraction showed an inhibition of respiration at complex I (Cleeter et al., 1992), Ca²⁺ efflux and depolarization (Cassarino et al., 1999), and a stimulation of the transition pore and cytochrome *c* release (Packer et al., 1996). In this work, we showed that the addition of MPP⁺ to CGNs induces a translocation of cytochrome *c* from mitochondria to cytosolic fractions in a concentration-dependent manner (Fig. 3A). MPP⁺-induced cytochrome *c* release was inhibited in cytosolic fractions from CGNs pretreated for 30 min and treated for 24 h with 10 nM of Hc-TeTx (Fig. 3B).

As Bad and Bax are Bcl2-related proteins involved in the regulation of cytochrome *c* release from mitochondria in several models of apoptosis (Desagher and Martinou, 2000). We determined, in the first the translocation of Bax from cytosol to the mitochondria in MPP⁺-induced cell death. Untreated cells showed undetectable levels of Bax protein in mitochondrial fraction. However, this protein translocated from cytosol to the mitochondria after MPP⁺ exposure. The exact mechanism by which MPP⁺ contributes to Bax translocation to mitochondria is as yet unknown. Since this early translocation of Bax was parallel with cytochrome *c* release, we next decided to assay whether Bax translocation was inhibited by Hc-TeTx fragment. Figure 3B shows that pretreatment with 10 nM Hc-TeTx partially blocked early MPP⁺-induced Bax translocation.

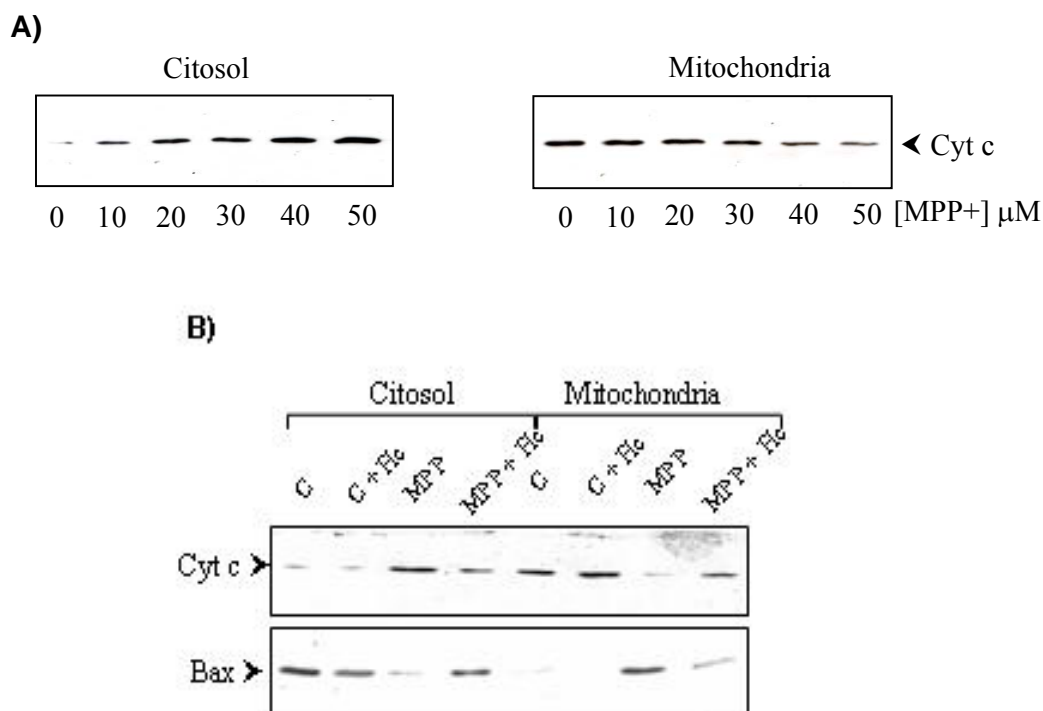


Figure 3. Changes of protein levels of cytochrome c, and Bax in the cytosolic and mitochondrial fractions. CGN cultures were exposed to: **(A)** increasing concentrations of MPP⁺ for 24 h, **(B)** 50 μM MPP⁺ or 50 μM MPP⁺ plus 10 nM Hc-TeTx for 24 h after Hc-TeTx pretreatment. Subsequently, cytosolic and mitochondrial fractions were separated as described in the Materials and Methods section. Proteins from each treatment (10-20 μg protein/lane) were resolved in 15% SDS/PAGE and transferred to the nitrocellulose membrane and probed with cytochrome c and Bax antibodies. Each experiment was repeated three times and similar results were obtained.

Hc-TeTx inhibited dissociation of Bad from 14-3-3 after exposure to MPP⁺

We examined the interaction of Bad with the molecular chaperone 14-3-3 using immunoprecipitation. We immunoprecipitated Bad and then performed Western blotting to detect the presence of 14-3-3. In control cells, we detected a robust constitutive interaction between Bad and 14-3-3 (Fig. 4A). In contrast, binding of 14-3-3 to Bad decreased after exposure to MPP⁺ for 24 h, and semiquantification of protein levels determined that this interaction was

significantly reduced 24 hr after seizures. Pretreatment of the neurons by 10 nM Hc-TeTx maintained the binding of Bad to 14-3-3 even in the presence of MPP⁺.

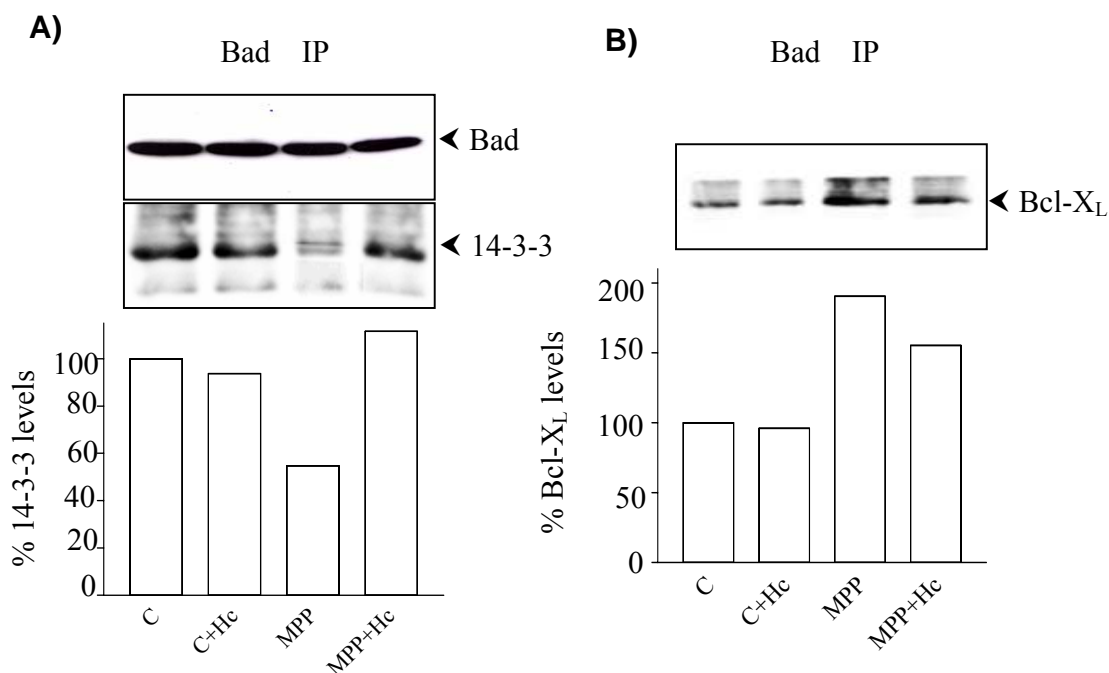


Figure 4. Interaction of Bad with 14-3-3 and Bcl-X_L after Hc-TeTx pretreatment in CGNs exposed to MPP⁺. Cultures were pretreated with 10 nM Hc-TeTx for 30 min and incubated with 50 μ M MPP⁺ or 50 μ M MPP⁺ plus 10 nM Hc-TeTx for 24 h. After the respective treatment, the cells were lysated and 0.5 mg of protein was immunoprecipitated using anti-Bad antibody. The immunoprecipitated proteins were subjected to SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane, and probed with anti-14-3-3 and Bcl-X_L antibodies. Bad bands are shown to confirm equality of antibody loading. The results of the analysis of intensities of the bands were quantified by densitometry.

Hc-TeTx inhibited MPP⁺-induced binding of Bad to Bcl-X_L

To examine whether Bad interacts with Bcl-X_L after MPP⁺ treatment with or without Hc-TeTx, Bad was immunoprecipitated from rat brain and then immunoblotted with the antibody against Bcl-X_L (Fig. 4B). In contrast to 14-3-3, we detected Bcl-X_L at low levels bound to Bad in control cells and Hc-

TeTx treated cells in the presence or absence of MPP⁺. Semiquantification of protein levels determined that, 24h after treatment with MPP⁺, there was a significant increase in levels of Bcl-XL binding to Bad compared with control and Hc-TeTx treated cells. Studies have suggested that binding interactions of Bcl-2 family proteins may be erroneous because of inclusion of detergents in lysis buffer (Hsu and Youle, 1997). Therefore, others groups repeated this immunoprecipitation reaction with or without detergent and determined that NP-40 does not increase the binding of BAD to 14-3-3 (Henshall et al., 2002).

Inhibitory effects of Hc-TeTx fragment against MPP⁺-induced cleavage of caspase-3

Caspase-3 act as a key enzyme for apoptosis. The 32 kDa proenzyme is cleaved by other proteases to generate the active form, wich is composed of 12 kDa and active cleaved 20/17 kDa fragments. Although treatment with MPP⁺ for 24 h markedly induced cleavage and subsequently activation of caspase-3 (Fig. 5a), pretreatment with Hc-TeTx for 30 min inhibited the MPP⁺- induced caspase-3 activation (Fig. 5b).

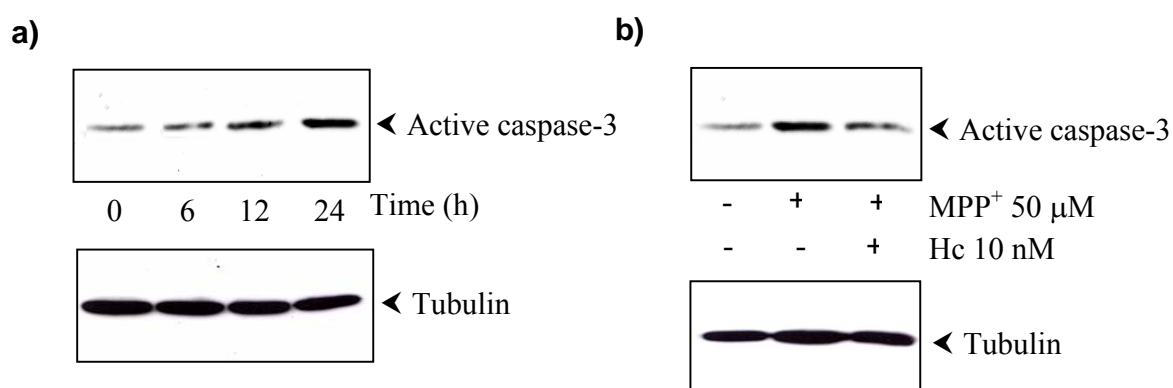


Figure 5. Hc-TeTx inhibition of caspase 3 activation in primary cultures of cerebellar granule cells. CGC cultures were exposed to: (a) 50 μM MPP^+ at the times indicated. (b) The cells were pretreated with 10 nM Hc-TeTx for 30 min and incubated with 50 μM MPP^+ or 50 μM MPP^+ plus 10 nM Hc-TeTx for 24 h. Proteins from each treatment (10-20 μg protein/lane) were resolved in 15% SDS/PAGE and transferred to the nitrocellulose membrane and probed with caspase activated antibody. Each experiment was repeated three times and similar results were obtained.

Discussion

Treatment with MPTP or MPP^+ *in vitro* induces neuronal death. Although some neurotrophic factors are reported to protect against MPP^+ -induced death of neuronal cells such as BDNF protected SHSY5Y dopaminergic neuroblastoma cells against MPP^+ (Spina et al., 1992) and EGF protected against GH3 cell death induced by MPP^+ (Yoshinaga et al., 1998), it has not been established whether neurotrophic factors protect against MPP^+ -induced apoptosis or necrosis. Recently, it has been found that exposure of CGNs to relatively low concentrations of MPP^+ results to apoptosis (Du et al., 1997). Moreover, EGF protected against MPP^+ -induced apoptosis (Yoshinaga et al., 2000). In the present study, we showed the protective effects of Hc-TeTx against MPP^+ -induced apoptotic death. The reasons of this are the following: *in vitro* pretreatment with Hc-TeTx fragment attenuated cell death (Fig. 1), nuclear chromatin condensation induced by MPP^+ (Fig. 2); pretreatment with Hc-TeTx inhibited the translocation of Bax from mitochondria to cytosolic fraction induced cytochrome *c* release (Fig. 3); and activation of caspase-3 (Fig. 5).

Bax is integral to triggering release of cytochrome *c*, a critical factor in the initiation of cell death pathways originating from the mitochondrion (Korsmeyer et al., 2000; von Ahsen et al., 2000; Wei et al., 2001). In our work,

Bax is detected in mitochondrial extract 24 h after incubation with 50 μ M MPP⁺ at the same time as cytochrome *c* release. Pre-incubation of CGNs with Hc-TeTx inhibits both early Bax translocation and cytochrome *c* release. Cytochrome *c* release eventually also triggers caspase-3 activation. Hartmann et al (2000) found caspase-3 might be a vulnerable factor and effector of apoptotic death in dopaminergic neurons in SNc of PD animal model and PD patients. The present study showed that caspase-3 activation was inhibited after pretreatment with Hc-TeTx compared with MPP⁺ treatment, indicating that Hc-TeTx fragment may inhibit activation of caspase-3 during attenuating MPP⁺-induced apoptosis.

Such Bax activation may be initiated or potentiated by another death agonist, Bad (Yang et al., 1995). Through phosphorylation of one or more serine residues (Zha et al., 1996; Lizcano et al., 2000; Tan et al., 2000), Bad resides in an inactive complex with the molecular chaperone 14-3-3 (Zha et al., 1996; Datta et al., 2000; Tan et al., 2000). During apoptosis Bad is dephosphorylated and promotes cell death by binding to Bcl-X_L (Zha et al., 1996). In our work, immunoprecipitation studies confirmed that Bad:14-3-3 complex is constitutively present in control cells and demonstrated dissociation of Bad from 14-3-3 and binding to Bcl-X_L after treatment with MPP⁺. Pre-incubation of CGNs with Hc-TeTx fragment markedly inhibits both early Bad dissociation from 14-3-3 and binding to Bcl-X_L.

We could hypothesize that the mechanism by which Hc-TeTx exerts this antiapoptotic effect is through Bad cell death pathway inhibition.

Akt and Erk are known to phosphorylate Bad at the Ser¹³⁶ (del Peso et al., 1997; Blume-Jensen et al., 1998) and Ser¹¹² (Tan et al., 1999; Scheid et al., 1999) residues. Phosphorylation at these sites promotes binding of Bad to 14-3-3 proteins, sequestering Bad away from the mitochondrial membrane where it

dimerizes with Bcl-X_L to exert its killing effects (Lizcano et al., 2000; Tan et al., 2000; Masters et al., 2001). Bad can bind Bcl-X_L and this fact would contribute to the inhibition of the death-repressor activity of Bcl-X_L, facilitating the Bax-induced cytochrome *c* release and caspase-3 activation.

It has established that Hc-TeTx stimulated tyrosine phosphorylation of Trk receptors in several models, such as rat brain synaptosomes (Gil et al., 2001), cultured cortical neurons (Gil et al., 2003) and CGNs (Chaïb-Oukadour et al., 2004). This stimulation results in activation of Akt and ERK pathways. Both pathways have been implicated in cerebellar granule cell survival by Hc-TeTx against potassium withdrawal-induced apoptosis (Chaïb-Oukadour et al., 2004). Recently publications of our group have reported the activation of Akt and MEK/ERK signaling pathways in a Trk receptor-dependent manner in both culture cortical neurons and in cerebellar granule neurons (Gil et al., 2003; Chaïb-Oukadour et al., 2004) and we described that the [K⁺]_e deprivation-induced apoptosis in CGN are prevented with preincubation of low doses of Hc-TeTx and this prevention is associated to the block of pro-caspase-3 activation, (Chaïb-Oukadour et al., 2004)

In the present work, we have characterized the neuroprotective-signaling pathway of TeTx through its Hc-TeTx fragment in cerebellar granule neurons cultured in 25 mM [K⁺]_e medium and treated with MPP⁺. Hc-TeTx could produce neuroprotection against apoptosis induced by MPP⁺ by activation of Ras/mitogen-activated protein kinase (Ras/MAPK) and the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI-3K/PKB) pathways (Chaïb-Oukadour et al., 2004). The consequences of these activations could be the inhibition of some proteins, e.g. Bad, the mitochondrial release of cytochrome *c*, and the desinhibition of pro-apoptotic elements like the caspase family, particularly pro-caspase-9, which, in the presence of adenine-nucleotides,

becomes activated, resulting in further caspase activation, e.g. caspase-3, which is an important executor of apoptotic death in neurons (Martin and Green, 1995; Tewari et al., 1995; Posmantur et al., 1997).

In conclusion, our results demonstrate that MPP⁺ produces early Bad dissociation from 14-3-3, Bad binding to Bcl-X_L, Bax translocation, cytochrome *c* release and caspase activation, concluding with cell death. All events are blocked by Hc-TeTx, suggesting that the mechanisms implicated in Hc-TeTx-mediated neuroprotection against MPP⁺-induced apoptosis in CGNs are related to inhibition of apoptotic protein (Bad) probably as a result of activation of Akt and ERK pathways.

References

- Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL, Sadoul R, Verna JM. (1993) Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 65(2):135-172. Review.
- Blume-Jensen P, Janknecht R, Hunter T. (1998) The kit receptor promotes cell survival via activation of PI 3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136. *Curr Biol.* 8:779-782.
- Calne DBC, Langston JW (1983) Aetiology of Parkinson's disease. *Lancet* 2: 4155-4159.
- Cassarino DS, Parks JK, Parker WD Jr, Bennett JP Jr.(1999) The parkinsonian neurotoxin MPP⁺ opens the mitochondrial permeability transition pore and releases cytochrome *c* in isolated mitochondria via an oxidative mechanism. *Biochim Biophys Acta.* 1453:49-62.
- Chaïb-Oukadour I, Gil C, Aguilera J (2004) The C-terminal domain of the heavy chain of tetanus toxin rescues cerebellar granule neurons from

- apoptotic death: involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Neurochem.* [epub ahead of print].
- Cleeter MW, Cooper JM, Schapira AH. (1992) Irreversible inhibition of mitochondrial complex I by 1-methyl-4-phenylpyridinium: evidence for free radical involvement. *J Neurochem.* **58**:786-789.
- del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G. (1997) Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science.* **278**:687-689.
- Desagher S, Martinou JC. (2000) Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* **10**:369-377. Review.
- Dipasquale B, Marini AM, Youle RJ (1991) Apoptosis and DNA degradation induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium in neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* **31**:1442-8.
- Du Y, Dodel RC, Bales KR, Jemmerson R, Hamilton-Byrd E, Paul SM. (1997) Involvement of a caspase-3-like cysteine protease in 1-methyl-4-phenylpyridinium-mediated apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *J Neurochem.* **69**:1382-1388.
- Fuentes JM, Lompre AM, Moller JV, Falson P, le Maire M. (2000) Clean Western blots of membrane proteins after yeast heterologous expression following a shortened version of the method of Perini et al. *Anal Biochem.* **285**:276-8.
- Gil C, Chaïb-Oukadour I, Blasi J, Aguilera J (2001) Hc fragment (C-terminal portion of the heavy chain) of tetanus toxin activates protein kinase C isoforms and phosphoproteins involved in signal transduction. *Biochem J* **356**:97-103.

- Gil C, Chaib-Oukadour I, Aguilera J (2003) C-terminal fragment of the tetanus toxin heavy chain activates Akt and MEK/ERK signaling pathways in a Trk receptor-dependent manner in cultured cortical neurons. *Biochem J.* **373**:613-620.
- Hartmann A, Hunot S, Michel PP, Muriel MP, Vyas S, Faucheux BA, Mouatt-Prigent A, Turmel H, Srinivasan A, Ruberg M, Evan GI, Agid Y, Hirsch EC. (2000) Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**:2875-2880.
- Henshall DC, Araki T, Schindler CK, Lan JQ, Tiekoter KL, Taki W, Simon RP. (2002) Activation of Bcl-2-associated death protein and counter-response of Akt within cell populations during seizure-induced neuronal death. *J Neurosci.* **22**:8458-8465.
- Hsu YT, Youle RJ. (1997) Nonionic detergents induce dimerization among members of the Bcl-2 family. *J Biol Chem.* **272**:13829-13834.
- Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH. (2000) Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ.* **7**:1166-1173. Review.
- Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. (1983) Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science.* **219**:979-980.
- Lizcano JM, Morrice N, Cohen P. (2000) Regulation of BAD by cAMP-dependent protein kinase is mediated via phosphorylation of a novel site, Ser155. *Biochem J.* **349**:547-557.
- LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* **193**:265-275.

- Marini AM, Schwartz JP, Korpin IJ (1987) The neurotoxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium in cultured cerebellar granule cells. *J Neurosci.* **9**:3665-3672.
- Martin SJ, Geen DR (1995) Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell* **82**:349-352.
- Masters SC, Yang H, Datta SR, Greenberg ME, Fu H. (2001) 14-3-3 inhibits Bad-induced cell death through interaction with serine-136. *Mol Pharmacol.* **60**:1325-1331.
- Mignotte B, Vayssiere JL. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Eur J Biochem.* **252**:1-15. Review.
- Moran J, Patel AJ. (1989) Effect of potassium depolarization on phosphate-activated glutaminase activity in primary cultures of cerebellar granule neurons and astroglial cells during development. *Brain Res Dev Brain Res.* **46**:97-105.
- Núñez G, del Peso L (1998) Linking extracellular survival signals and the apoptotic machinery. *Curr Opin Neurobiol.* **8**:613-618.
- Packer MA, Miesel R, Murphy MP. (1996) Exposure to the parkinsonian neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) and nitric oxide simultaneously causes cyclosporin A-sensitive mitochondrial calcium efflux and depolarisation. *Biochem Pharmacol.* **51**:267-273.
- Posmantur R, McGinnis K, Nadimpalli R, Gilbertsen RB, Wang KKW (1997) Characterization of CPP32-like protease activity following apoptotic challenge in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Neurochem.* **68**:2328-2337.
- Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD (1993) Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science.* **262**:695-700. Review.

- Scheid MP, Schubert KM, Duronio V. (1999) Regulation of bad phosphorylation and association with Bcl-x(L) by the MAPK/Erk kinase. *J Biol Chem.* **274**:31108-31113.
- Segal RA, Greenberg ME (1996) Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci.* **19**:463-489.
- Spina MB, Squinto SP, Miller J, Lindsay RM, Hyman C. (1992) Brain-derived neurotrophic factor protects dopamine neurons against 6-hydroxydopamine and N-methyl-4-phenylpyridinium ion toxicity: involvement of the glutathione system. *J Neurochem.* **59**:99-106.
- Tan Y, Ruan H, Demeter MR, Comb MJ. (1999) p90(RSK) blocks bad-mediated cell death via a protein kinase C-dependent pathway. *J Biol Chem.* **274**:34859-34867.
- Tan Y, Demeter MR, Ruan H, Comb MJ. (2000) BAD Ser-155 phosphorylation regulates BAD/Bcl-XL interaction and cell survival. *J Biol Chem.* **275**:25865-25869.
- Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Dixit VM (1995) Yama/CPP32 β , a mammalian homologue of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell.* **81**:801-809.
- Tipton KF, Singer TP (1993) Advances in our understanding of the mechanisms of the neurotoxicity of MPTP and related compounds. *J Neurochem.* **61**:1191-206. Review.
- von Ahsen O, Renken C, Perkins G, Kluck RM, Bossy-Wetzler E, Newmeyer DD (2000) Preservation of mitochondrial structure and function after Bid- or Bax-mediated cytochrome c release. *J Cell Biol.* **150**:1027-1036.

- Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*. **292**:727-730.
- Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ. (1995) Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell*. **80**:285-291.
- Yoshinaga N, Murayama T, Nomura Y. (1998) Death by a dopaminergic neurotoxin, 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) and protection by EGF in GH3 cells. *Brain Res*. **794**:137-142.
- Yoshinaga N, Murayama T, Nomura Y. (2000) Apoptosis induction by a dopaminergic neurotoxin, 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP(+)), and inhibition by epidermal growth factor in GH3 cells. *Biochem Pharmacol*. **60(1)**:111-120.
- Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ. (1996) Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell*. **87(4)**:619-628.

DISCUSIÓN

IV. Discusión general

Las neurotoxinas clostridiales (CNTs) a través de su actividad metaloproteásica producen varias patologías graves como son el tétanos y el botulismo. Sin embargo, las neurotoxinas son estructuras proteicas complejas que han adquirido la capacidad de actuar en distintos sistemas a través de diferentes mecanismos de acción, a parte de la actividad hidrolítica mencionada. Al principio de los años 70 se sugirió la potencialidad de las BoNTs para usos terapéuticos, siendo la corrección del estrabismo, por aplicación de dosis subletales de BoNT/A, la primera patología experimentada con éxito absoluto frente a las estrategias terapéuticas utilizadas hasta el momento (Scott, 1980; 1981). A través de los años se han ido incrementando los usos terapéuticos de las CNTs principalmente a todas aquellas patologías en las que se produce contractura muscular local o desequilibrio muscular: disfagias, distonía cervical, blefaroespasmos, etc. (Jankovic, 1996).

Nuestro Grupo en trabajos desarrollados entre los años 1995 y 2000 demostró la potencialidad terapéutica de la toxina tetánica y de su fragmento Hc-TeTx, neurotoxina no considerada domesticable como fármaco debido a sus características de transportabilidad a través del transporte retroaxonal y la posibilidad de realizar saltos transsinápticos. La TeTx, a dosis muy bajas inhibe la captación de serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) en preparaciones enriquecidas en sinaptosomas de tejido nervioso de rata (Inserte et al., 1999; Najib et al., 1999; Pelliccioni et al., 2001). El mecanismo de acción descrito en estos trabajos, se basa en la inhibición por fosforilación en serinas del transportador específico de serotonina (SERT) por acción indirecta de la TeTx. Puesto que tanto la TeTx activa, como sus formas no activas, tales como la *sc*-TeTx, o el fragmento atóxico Hc-TeTx producen la misma acción de inhibición, se propone el uso terapéutico del fragmento Hc-TeTx como fármaco con

actividad similar a *los inhibidores selectivos del transporte de serotonina* (SSRIs) de los que en la actualidad destaca la fluoxetina (*Prozac*), antidepresivo ampliamente utilizado en patologías o alteraciones relacionadas con el comportamiento (Najib et al., 2000).

Si bien el fragmento Hc-TeTx, no ha sido utilizado como fármaco, los resultados *in vitro* sugieren probarlo para determinar su eficacia como fármaco específico del SNC, fármaco de larga duración y de probable aplicación periférica. El mecanismo de acción publicado por nuestro Grupo demuestra que la toxina o sus formas atóxicas, a través de receptores de membrana ligados a la vía de señalización PLC γ /PKC, posiblemente receptores de membrana con actividad tirosina quinasa, producen: Fosforilación /autofosforilación de TrkA, fosforilación/translocación /activación de PLC γ -1, translocación/activación de isoformas *clásicas* y *nuevas* de PKC, y por último, fosforilación en serinas y inhibición del SERT (Najib et al., 1999, 2000, Pelliccioni et al., 2001).

Estos trabajos son la antesala del presente proyecto de tesis doctoral. Si la toxina tetánica a través de su dominio carboxi-terminal de la cadena pesada, Hc-TeTx, actúa sobre un receptor de membrana con capacidad de activar los mecanismos de transducción de señales anteriormente indicados, posiblemente participará en otros mecanismos activadores o inhibidores que pudieran ser importantes para la viabilidad de las células nerviosas, dianas en animales superiores de la neurotoxina.

La TeTx es un producto natural con elevada capacidad neurotóxica, junto con las neurotoxinas clostridiales, encabezan la clasificación de toxicidad. Esta capacidad de producir la muerte en organismos superiores es responsabilidad de mecanismos que trabajarían sinérgicamente. Como se ha mencionado en capítulos anteriores, la TeTx es una endopeptidasa dependiente de Zn²⁺ cuyo sustrato principal es la sinaptobrevina 2 (VAMP2, *vessicular associated membrane protein 2*). Esta acción

hidrolítica es la responsable principal de la toxicidad, ya que bloquea la liberación vesicular del neurotransmisor en las terminales sinápticas, pero también se han descrito otros efectos de la TeTx sobre diversos enzimas, no explicables por esta acción proteásica, como la activación de la actividad transglutaminasa (Facchiano et al., 1993) o la acción sobre la PKC. Los primeros trabajos realizados en macrófagos y la médula espinal de rata, que estudiaban la acción de la TeTx sobre mecanismos de transducción de señales, describían una disminución general de la expresión de PKC (Ho y Klemper., 1988). Sin embargo en trabajos simultáneos llevados a cabo por nuestro Grupo, se describieron activación de PKC y como consecuencia elevación paralela de los niveles de serotonina en cerebros prenatales de rata tratados con TeTx (Aguilera et al., 1990; 1993). En el mismo sentido, se presentaron evidencias experimentales de que la administración intraventricular de TeTx en ratas adultas induce la translocación y la *down-regulation* de la PKC (Aguilera y Yavin., 1990), y que el tratamiento de cultivos primarios de neuronas corticales de cerebro de rata con TeTx aumenta la actividad PKC y la hidrólisis de fosfoinosítidos (Gil et al., 1998).

Más recientemente, y motivo de esta tesis doctoral, hemos observado que las características moduladoras de la TeTx encontradas por nuestro Grupo pasan por la modificación del patrón de fosforilación del receptor del factor de crecimiento nervioso (TrkA), la fosforilación /activación de la fosfolipasa C γ -1 (PLC γ -1), y la consecuente activación /translocación y *down-regulation* de las isoformas *clásicas* y *nuevas* de PKC; así como la fosforilación de las ERK1/2 (*extracellular regulated kinase*, de 44 y 42 kDa, respectivamente), en sinaptosomas de encéfalo de rata. Para estos trabajos, se han utilizando técnicas de inmunoprecipitación con anti-PTyr, y análisis por *Western blot* con anti-trkA, anti-PLC γ -1 y anti-ERK1/2 (Gil et al., 2000).

Además, nuestro Grupo ha demostrado, que con una potencia similar a la de la TeTx, el fragmento Hc-TeTx activa el mecanismo de transducción de señal que tiene su inicio en receptores con actividad tirosina quinasa (Trk) tanto en sinaptosomas, como en cultivo primario de neuronas corticales de cerebro de rata. En este sentido, se ha demostrado la fosforilación en el residuo Tyr^{490} de TrkA por la TeTx y por el fragmento Hc-TeTx en sinaptosomas de cerebro de rata (Fig. 3, Trabajo I). Posteriormente, hemos observado en neuronas corticales fosforilación del Trk en los residuos Tyr^{674}/Tyr^{675} tanto por TeTx como por Hc-TeTx, dando inicio en estas células a la activación de la misma cascada de transducción de señal descrita por las neurotrofinas como son las vías p21Ras/MAPK, y PI-3K/Akt (Fig. 2 y 3, Trabajo II), ya que la activación dual de dichas vías en neuronas es a través de la activación de los receptores Trk de las neurotrofinas (Kaplan et al., 2000). Estos efectos son dependientes de la interacción de la neurotoxina con la membrana celular y no son dependientes de la actividad catalítica metaloproteásica, puesto que el fragmento atóxico Hc-TeTx, responsable de la unión a la membrana presináptica, puede activar las mismas señales que la TeTx.

En los cultivos primarios de neuronas corticales de cerebro, utilizados en parte del presente estudio, el receptor TrkA no podría ser detectado sin recurrir a técnicas de transfección, ya que dicho receptor no se expresa en esta línea celular, que tan sólo expresan los receptores TrkB y TrkC (Kume et al., 2000). Por tanto la activación del receptor TrkB fue estudiada, usando su agonista endógeno BDNF como control positivo. En este caso, no se detectó la fosforilación de los receptores neurotróficos en Tyr^{490} , al tratar los cultivos con TeTx o con el fragmento Hc-TeTx (Fig. 2, Trabajo II), indicando como poco probable que las proteínas Shc participen en la señalización.

El conjunto de estos resultados, sobre todo los referentes a la alteración de los mecanismos de transducción iniciados en receptores con actividad tirosina quinasa, nos llevó a pensar que el fragmento Hc-TeTx, carente de toxicidad, podría tener un posible efecto neuroprotector frente a la muerte celular, ya que dicho fragmento actúa en dianas neuronales activando las mismas cascadas de señalización que los factores de crecimiento, factores con clara implicación en mecanismos de supervivencia celular (Kubo et al., 1995; Nonomura et al., 1996; Bonni et al., 1999; Kume et al., 2000; Zhong et al., 2004).

Para llevar a cabo el objetivo de demostrar la bondad de la TeTx, o su forma atóxica, como agente neuroprotector, se ha utilizado la muerte apoptótica en cultivo de neuronas granulares de cerebelo (CGN) como uno de los modelos de muerte más estandarizados. Existen evidencias de que la muerte apoptótica tiene lugar en diversos estados neuropatológicos como las enfermedades de Parkinson y de Alzheimer, o como consecuencia de otros procesos como la isquemia/anoxia cerebral. El concepto de que la muerte neuronal que se observa en dichas circunstancias puede ser, en una importante proporción, de naturaleza apoptótica, ha llevado a intentar investigar los mecanismos subyacentes en la apoptosis neuronal con el fin de poder diseñar estrategias terapéuticas que logren paliar los efectos de dichas patologías.

Los cultivos primarios de CGN son un modelo ampliamente extendido en el estudio de la apoptosis neuronal (Ito, 1984a). Son cultivos muy homogéneos, donde las células sólo logran sobrevivir *in vitro* si el medio de cultivo contiene una elevada concentración de potasio ($[K^+]_e = 25 \text{ mM}$; K25). A concentraciones de potasio más fisiológicas ($[K^+]_e = 5 \text{ mM}$; K5), las neuronas granulares mueren por activación de los procesos programados de apoptosis (D'Mello et al., 1993). Aunque se conocen poco los mecanismos implicados en la programación de la muerte

neuronal, aún se conoce menos el mecanismo por el cual una elevada concentración de potasio permite la supervivencia de estas neuronas. Una de las hipótesis de trabajo propuestas, indica que la despolarización inducida por elevada $[K^+]_e$ provocaría la liberación de péptidos, que actuando a través de sus receptores podrían aumentar la concentración intracelular de AMPc. Este aumento en la concentración del nucleótido cíclico sería un elemento clave en la cascada celular de supervivencia generada por una elevada $[K^+]_e$.

El hecho de que los fenómenos apoptóticos descritos hasta la fecha se hayan correspondido con la disminución de la viabilidad de los cultivos, viabilidad registrada por los niveles de reducción de MTT (Mosmann, 1983), nos ha permitido estudiar de una manera sencilla los efectos tanto de la TeTx como los del fragmento Hc-TeTx sobre estos cultivos. Registrar los niveles de reducción de MTT nos ha sido útil para determinar la viabilidad celular, tanto a la hora de registrar la muerte máxima por apoptosis en CGN deprivadas de potasio como a la hora de registrar la protección frente a dicha muerte con factores neurotróficos y con la neurotoxina.

Las medidas de viabilidad celular con MTT nos ha permitido por tanto describir las características neuroprotectoras del fragmento Hc-TeTx (Fig. 1, Trabajo III) probablemente como resultado de la interacción directa o indirecta del fragmento Hc-TeTx con los receptores tirosina quinasa de membrana, puesto que se ha observado aumento claro de la fosforilación de los receptores Trk en K5 en respuesta al fragmento Hc-TeTx (Fig. 2a, Trabajo III). Esta fosforilación de Trk en la Tyr⁶⁷⁴/Tyr⁶⁷⁵ con el fragmento Hc-TeTx a tiempos cortos podría ser responsable de los efectos de supervivencia que promueve el fragmento Hc-TeTx en K5. El anticuerpo utilizado en estos experimentos reconoce, además de TrkA fosforilado, las formas fosforiladas de TrkB y TrkC ya que el epítipo es común para los

tres receptores neurotróficos, y como que las CGN no expresan receptores TrkA (Nonomura et al. 1996), el anticuerpo indicará sólo la presencia o no de los receptores TrkB y TrkC. Por otra parte, en experimentos de inmunoprecipitación usando anticuerpo anti-fosfotirosina (PY20) y posterior inmunodetección con anticuerpo específico anti-TrkB se observó fosforilación de TrkB en células pre-tratadas con Hc-TeTx (10 nM; 10-30 min) en bajas $[K^+]_e$ (5 mM) (Fig. 2b, Trabajo III).

En protocolos similares se observó también la activación de la proteína G monomérica p21Ras en su forma unida a GTP, una de las primeras etapas en las cascadas de transducción de señal posterior a la activación de un receptor Trk (White et al., 1995). Esta activación es registrada de forma subsecuente y prácticamente simultánea a la fosforilación de TrkB/TrkC. Como se puede observar en la Figura 2c del trabajo III, el fragmento Hc-TeTx (10 nM) indujo aumento en la forma p21Ras-GTP en K5 después de 10 minutos de incubación, utilizando siempre el BDNF como control positivo (25 ng/ml, 10 minutos), puesto que está demostrada la relación de la unión de p21Ras unido a GTP y la supervivencia de las CGN inducida por BDNF en células deprivadas de potasio (Zirrgiebeland and Lindholm, 1996).

La activación de los receptores de membrana con actividad tirosina quinasa dan lugar a la activación de varias vías de señalización, entre las que destacan la iniciada en p21Ras que dará lugar a la activación de las quinasas dependientes de mitógenos (MAPK), y la vía mediada por la fosfoinosítido 3-quinasa (PI-3K) y por la *Ser/Thr* quinasa Akt (revisado por: Patapoutian y Reichardt, 2001). En el actual estudio, hemos observado que las dos vías descritas están implicadas en los mecanismos de neuroprotección inducidos por el fragmento Hc-TeTx, ya que se ha observado que dicho fragmento atóxico es capaz de inhibir la defosforilación de Akt (Fig. 3b, Trabajo III) y de las ERK1/2 (Fig. 4,

Trabajo III) inducidas por el cambio de K25 a K5. Los datos presentados por nuestro Grupo y por otros autores indican que el cambio al medio K5 induce la defosforilación, y por lo tanto la inactivación, de Akt (D'Mello et al., 1997; Skaper et al., 1998; Mora et al., 2001) y de ERK1/2 (Zhong et al., 2004). De ahí que sea lógico suponer que la fosforilación y activación de las dos vías inhibiera este tipo de muerte apoptótica. Por otra parte, el hecho de que la inhibición de ambas vías con inhibidores específicos, PD98095 y Wormannina (inhibidores específicos de MEK y PI-3K, respectivamente) disminuye en cierta medida la viabilidad de los cultivos, indica su implicación en la neuroprotección inducida por el fragmento Hc-TeTx (Fig. 5b, Trabajo III).

Se ha demostrado que PI-3K tiene un papel crucial en la prevención de la apoptosis inducida por bajas concentraciones de potasio en CGN (Shimoke et al. 1997; Dudek et al., 1997). La vía que induce la activación de PI-3K y de Akt después de la activación de los receptores Trk está siendo ampliamente estudiada. Después de la autofosforilación del receptor se produce la fosforilación de Shc y la translocación a membrana de diversas proteínas adaptadoras, éstas junto con p21Ras, interaccionan y activan a PI-3K, enzima que cataliza la fosforilación de fosfoinositoles de membrana. Los productos generados interaccionan con Akt, a través de su dominio plecstrina, ocasionando su translocación a la membrana plasmática donde es completamente activada gracias a la fosforilación de dos de sus residuos: *Thr*³⁰⁸ y *Ser*⁴⁷³ (Alessi et al, 1996). Una vez activada, Akt fosforila e inactiva proteínas implicadas directamente en la inducción de apoptosis, como son GSK-3 β , BAD o miembros de la familia *Forkhead* de factores de transcripción.

También se ha descrito que la vía de p21Ras/MAPK es esencial en la inhibición de la apoptosis en el mismo tipo de cultivo por el BDNF (Bonni et al., 1999) mediante p90Rsk. Rsk, un sustrato relevante de MAPK,

induce, por una parte, la fosforilación y inhibición de la proteína pro-apoptótica Bad, y por otra parte, la expresión de genes de supervivencia por el factor de transcripción CREB. En nuestros cultivos, como podemos comprobar en la Figura 5a del Trabajo III, la activación de Rsk y CREB inducida por el fragmento Hc-TeTx es a través de las quinasas MAPK, ya que el efecto de la fosforilación de estas últimas es bloqueado por el inhibidor PD98095. Esto sugiere que los efectos protectores del fragmento Hc-TeTx en células granulares de cerebelo de rata pueden implicar la activación de las mismas vías de supervivencia mediadas por el factor neurotrófico BDNF.

Otra manera de determinar el efecto neuroprotector del fragmento Hc-TeTx, es la inhibición de la proteólisis de la pro-caspasa-3, puesto que las caspasas participan en muchos acontecimientos apoptóticos, tales como en la fragmentación del DNA, en la condensación de la cromatina, y en la formación de cuerpos apoptóticos (Thornberry and Lazebnik, 1998). En el presente trabajo, se ha observado la inhibición total de la hidrólisis de pro-caspasa-3 en presencia Hc-TeTx a concentración 10 nM (Fig. 6b, Trabajo III). Esta es una buena pista sobre la interferencia que puede ejercer la Hc-TeTx con las vías que conducen a la muerte programada de la célula. Este efecto fue bloqueado por los inhibidores PD98059 y Wormanina (Fig. 2, Anexos del Trabajo III), lo que sugiere que dicho fragmento activa en primer lugar Akt, así como las ERK1/2, conduciendo a la inhibición de la expresión de caspasa-3, siendo la activación de la primera más relevante en esta inhibición (80 %). Sin embargo, no podemos descartar la acción de las ERK1/2, ya que su inhibición disminuye el efecto del fragmento Hc-TeTx en aproximadamente un 40 %. De hecho, resultados de otro Grupo (Linseman et al., 2002) apoyarían estos resultados al indicar que la Akt tiene un papel prominente en la activación de la pro-caspasa-3.

Asimismo, estos resultados señalan de nuevo que las vías PI-3K/Akt y p21Ras/MAPK juegan un papel importante en la supervivencia mediada por el fragmento Hc-TeTx en neuronas granulares de cerebelo de rata.

Por otra parte, otros resultados han mostrado la activación de la vía PLC γ /PKC en las mismas condiciones de concentraciones bajas de potasio. En la Figura 1 de los anexos del Trabajo III, observamos fosforilación de la PLC γ -1 seguida por una translocación de la isoforma PKC β en respuesta al fragmento Hc-TeTx. Este hecho, junto con la reversión parcial de la viabilidad de los cultivos con los inhibidores de PI-3K y de MAPK, nos lleva a pensar que la vía PLC γ /PKC podría estar implicada también en la supervivencia mediada por el fragmento Hc-TeTx.

En el actual trabajo, también hemos tratado de estudiar el posible efecto neuroprotector que el fragmento Hc-TeTx pudiera tener en las CGN cultivadas en K25 y tratadas con MPP⁺ y, en su caso, intentar determinar los mecanismos de acción implicados. En este contexto, hemos observado que el tratamiento previo de CGN con la TeTx y con el dominio atóxico Hc-TeTx atenúa marcadamente la muerte apoptótica de estas neuronas inducida por MPP⁺, según lo determinado por la reducción de las sales del tetrazolium (MTT) (Fig. 1, Trabajo IV) y por la condensación de cromatina (Fig. 2, Trabajo IV).

En este tipo de estímulo de muerte celular que apuntan a las mitocondrias, los productos del gen de la familia Bcl-2 juegan un papel importante. La proteína proapoptótica Bad se disocia de su “secuestro” con la proteína 14-3-3 y se une a Bcl-X_L induciendo la translocación de Bax a la mitocondria, la posterior liberación del citocromo *c* al citosol y la activación de la pro-caspas-3. En este trabajo, hemos intentado determinar la respuesta de cada uno de estos elementos después del tratamiento con MPP⁺ y con Hc-TeTx. Asimismo, como se puede observar en la Figura 4A del trabajo IV, en las células control y en las células tratadas con Hc-TeTx,

Bad fue encontrado constitutivamente unido a 14-3-3, mientras en las células dañadas, MPP⁺ indujo la disociación de Bad de 14-3-3 y la subsecuente dimerización de esta con Bcl-X_L (Fig. 4B, Trabajo IV). También, hemos demostrado que la translocación de Bax a la mitocondria y la liberación citoplasmática del citocromo *c* fueron reducidas en las células pretratadas con Hc-TeTx, previniéndose así el inicio de la apoptosis.

Por otra parte, la activación de la pro-caspasa-3, efector de la muerte apoptótica en neuronas dopaminérgicas de la SNC (Hartmann et al., 2000), inducida por el MPP⁺ (Fig. 5a, Trabajo IV) también se ha visto inhibida después del pretratamiento con el Hc-TeTx (Fig. 5b, Trabajo IV).

En conclusión, entre los factores necesarios para que el fragmento Hc-TeTx ejerza sus efectos neuroprotector en la intoxicación con MPP⁺ se incluye la inhibición de la vía de muerte Bad. Esta inhibición podría ser la consecuencia de la activación previa de las vías de transducción de señal anteriormente mencionadas: las vía p21Ras/MAPK y PI-3K/Akt.

Podemos concluir finalmente que la toxina tetánica puede ser domesticada para usos terapéuticos a través de su fragmento Hc-TeTx. Sin embargo, quedan pendientes nuevas metas de estudio que dará mayor potencialidad a este uso, como son determinar los fragmentos aminoacídicos que confieren afinidad a los receptores neurotróficos y las posibles propuestas de modificación para una mayor eficacia y especificidad en la prevención de enfermedades neurológicas específicas.

CONCLUSIONES

V. Conclusiones

En la presente tesis doctoral se ha llevado a cabo el estudio de la acción de la toxina tetánica y de su fragmento Hc-TeTx sobre los mecanismos de transducción de señales ligados a receptores con actividad tirosina quinasa como son las vías de transducción: p21Ras/MAPK, PI-3K/Akt y PLC γ /PKC. Las acciones obtenidas con TeTx y Hc-TeTx han sido comparadas con las acciones producidas por las neurotrofinas NGF y BDNF, que inducen la activación de las vías indicadas mediante su interacción directa con los receptores TrkA y TrkB, respectivamente.

Así las conclusiones que podemos extraer de los estudios realizados en una primera parte del trabajo en sinaptosomas y en cultivos primarios de neuronas corticales de cerebro de rata son las siguientes:

- El fragmento Hc-TeTx actúa de forma idéntica a la TeTx sobre las vías neurotróficas, sin manifestar la acción neurotóxica metaloproteásica de la toxina natural de la cual carece.
- El fragmento Hc-TeTx actúa con similar potencia que el factor de crecimiento nervioso (NGF), tanto sobre el receptor TrkA como sobre elementos de sus mecanismos de transducción asociados: MAPK/ERK1/2, PLC γ -1 y isoformas PKC, en sinaptosomas de encéfalo de rata.
- El fragmento Hc-TeTx y la TeTx inducen la fosforilación de los receptores Trk en las tirosinas Tyr⁶⁷⁴/Tyr⁶⁷⁵ en cultivos primarios de neuronas corticales. La potencia de la TeTx en este punto parece ser superior a la del fragmento Hc-TeTx.

- El fragmento Hc-TeTx y la TeTx activan las vías de transducción indicadas a través de la activación y/o fosforilación de los siguientes factores:
 - La vía PI-3K/Akt, observándose la fosforilación de Akt en *Ser*⁴⁷³ y en *Thr*³⁰⁸ y la fosforilación de GSK-3 β en *Ser*⁹.
 - La vía p21Ras/MAPK, induciendo la fosforilación de Raf en *Ser*²⁵⁹, de MEK1/2 en *Ser*²¹⁷, de ERK1/2 en *Thr*²⁰² y en *Tyr*²⁰⁴, de p90Rsk en *Ser*³⁸⁰ y de CREB en *Ser*¹³³.
 - La vía PLC γ /PKC, induciendo la fosforilación de PLC γ -1 en tirosinas y la activación/translocación de algunas isoformas de PKCs.
- El uso del inhibidor específico AG879 de receptores Trk demuestra que la acción previamente descrita de la TeTx y del fragmento Hc-TeTx sobre la fosforilación de Akt, ERK y PLC γ -1 es totalmente dependiente de dichos receptores, puesto que concentraciones bajas del inhibidor suprime la fosforilación de los tres efectores.

En la segunda parte del trabajo, llevada a cabo en cultivos de neuronas granulares de cerebelo de rata, las conclusiones que podemos extraer son las siguientes:

- El fragmento Hc-TeTx produce neuroprotección frente a la apoptosis inducida en condiciones no despolarizantes, potasio 5 mM, en células granulares de cerebelo de rata, promoviendo los mismos mecanismos de supervivencia activados por el BDNF, ya que se observa un aumento claro y rápido de la fosforilación del receptor TrkB en K5 después del tratamiento con el Hc-TeTx seguido por la activación de p21Ras así

como la fosforilación de las ERK1/2; p90Rsk y el factor de transcripción CREB.

- En las mismas condiciones de concentración baja de potasio, la vía PI-3K/Akt también es activada por el fragmento Hc-TeTx, tal como se demuestra por la fosforilación de Akt y de su sustrato directo GSK-3 β .
- El fragmento atóxico Hc-TeTx también inhibe la activación de la pro-caspasa-3, ejecutor importante de la muerte apoptótica en neuronas.
- Por otra parte, el efecto neuroprotector inducido por el fragmento Hc-TeTx parece depender de las dos vías anteriormente mencionadas: p21Ras/MAPK, PI3K/Akt, ya que el uso de los inhibidores selectivos de estas vías, PD98059 y Wormannina, afecta la viabilidad de los cultivos y la inhibición de la activación de la pro-caspasa-3 inducidas por el Hc-TeTx.
- En otros modelos de muerte apoptótica, p.e. la inducida por MPP⁺, también se ha demostrado el efecto neuroprotector del fragmento Hc-TeTx, disminuyendo la muerte celular y la condensación de cromatina.
- En el proceso apoptótico inducido por el MPP⁺ se produce la translocación de Bax de la fracción citosólica a la fracción mitocondrial, la liberación de citocromo *c* en el citoplasma así como la activación de la pro-caspasa-3. Este proceso apoptótico es inhibido por el fragmento Hc-TeTx.

Asimismo, el dato más relevante del presente trabajo es que un péptido, recombinante, atóxico, con una vida media alta y con tropismo específico hacia las células nerviosas, es capaz de activar los receptores neurotróficos desencadenando los mismos mecanismos de supervivencia que los factores de crecimiento frente a la muerte celular. Si además a estas propiedades añadimos las propiedades demostradas para este fragmento de unión específica a las terminaciones nerviosas periféricas, capacidad de entrar en ellas por endocitosis, viajar retroaxonalmente y realizar saltos trans-sinápticos, podemos proponer que se trata de un fármaco poderoso de aplicación periférica frente a enfermedades neurodegenerativas.

BIBLIOGRAFÍA

VII. Bibliografía

- Adams JD Jr., Klaidman LK. and Leung AC.** (1993) MPP+ and MPDP+ induced oxygen radical formation with mitochondrial enzymes. *Free Radic Biol Med.* **15**:181-186.
- Aguilera J., Heredero J. and Gonzalez Sastre F.** (1987) Tetanus intoxication causes an increment of serotonin in the central nervous system. *Experientia.* **43**: 410-412.
- Aguilera J. and Gonzalez E.** (1988) Identification systems. An application: cell osmotic water permeability in a kidney tubule. *Acta Cient Venez.***39**: 147-150.
- Aguilera J. and Yavin E.** (1990). In vivo translocation and down-regulation of protein kinase C following intraventricular administration of tetanus toxin. *J. Neurochem.* **54**: 339-342.
- Aguilera J., López LA. and Yavin E.** (1990). Tetanus intoxication causes an increment of serotonin levels in the perinatal rat brain. *FEBS Lett.* **263**: 61-65.
- Aguilera J., Lopez LA. and Gonzalez-Sastre F.** (1991) Stereotaxic injection of tetanus toxin in rat central nervous system causes alteration in normal levels of monoamines. *J Neurochem.***56**: 733-738.
- Ahmad M., Srinivasula SM., Wang L., Talanian RV., Litwack G., Fernandes-Alnemri T. and Alnemri ES.** (1997) CRADD, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2, and FasL/tumor necrosis factor receptor-interacting protein RIP. *Cancer Res.* **57**:615-619.
- Ahn NG., Campbell JS., Seger R., Jensen AL., Graves LM. and Krebs EG.** (1993) Metabolic labeling of mitogen-activated protein kinase kinase in A431 cells demonstrates phosphorylation on serine and threonine residues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**(11):5143-5147.
- Alessi DR., Saito Y., Campbell DG., Cohen P., Sithanandam G., Rapp U., Ashworth A., Marshall CJ. and Cowley S.** (1994) Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *EMBO J.* **13**:1610-1619.
- Alessi DR., Andjelkovic M., Caudwell B., Cron P., Morrice N., Cohen P. and Hemmings BA.** (1996) Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* **15**:6541-6551.
- Alessi DR.** (2001) Discovery of PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction. Colworth Medal lecture. *Biochem Soc Trans.* **29**:1-14.
- Altin JG. and Bradshaw RA.** (1990) Production of 1,2-diacylglycerol in PC12 cells by nerve growth factor and basic fibroblast growth factor. *J Neurochem.***54**:1666-1676.
- Angenstein F., Greenough WT. and Weiler IJ.** (1998) Metabotropic glutamate receptor-initiated translocation of protein kinase p90rsk to polyribosomes: a possible factor regulating synaptic protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**:15078-15083.
- Antonsson B. and Martinou JC.** (2000) The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res.* **256**:50-57. Review.

- Armstrong RC., Aja TJ., Hoang KD., Gaur S., Bai X., Alnemri ES., Litwack G., Karanewsky DS., Fritz LC. and Tomaselli KJ.** (1997) Activation of the CED3/ICE-related protease CPP32 in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis but not necrosis. *J Neurosci.* **17**:553-562.
- Auger KR., Carpenter CL., Cantley LC. and Varticovski L.** (1989) Phosphatidylinositol 3-kinase and its novel product, phosphatidylinositol 3-phosphate, are present in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **264**:20181-20184.
- Barbacid M., Lamballe F., Pulido D. and Klein R.** (1991) The trk family of tyrosine protein kinase receptors. *Biochim Biophys Acta.* **1072**:115-127. Review.
- Barde YA., Lindsay RM., Monard D. and Thoenen H.** (1978) New factor released by cultured glioma cells supporting survival and growth of sensory neurones. *Nature.* **74**:818.
- Barde YA., Edgar D. and Thoenen H.** (1980) Sensory neurons in culture: changing requirements for survival factors during embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **77**:1199-1203.
- Barde YA., Edgar D. and Thoenen H.** (1982) Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* **1**:549-553.
- Barker PA., Lomen-Hoerth C., Gensch EM., Meakin SO., Glass DJ. and Shooter EM.** (1993) Tissue-specific alternative splicing generates two isoforms of the trkA receptor. *J Biol Chem.* **268**:15150-15157.
- Barres BA., Raff MC., Gaese F., Bartke I., Dechant G. and Barde YA.** (1994) A crucial role for neurotrophin-3 in oligodendrocyte development. *Nature.* **367**:371-375.
- Barrett GL. and Bartlett PF.** (1994) The p75 nerve growth factor receptor mediates survival or death depending on the stage of sensory neuron development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**:6501-6505.
- Barth EM., Korsching S. and Thoenen H.** (1984) Regulation of nerve growth factor synthesis and release in organ cultures of rat iris. *J Cell Biol.* **99**:839-843.
- Barton K., Muthusamy N., Chanyangam M., Fischer C., Clendenin C. and Leiden JM.** (1996) Defective thymocyte proliferation and IL-2 production in transgenic mice expressing a dominant-negative form of CREB. *Nature.* **379**:81-85.
- Beitner-Johnson D. and Millhorn DE.** (1998) Hypoxia induces phosphorylation of the cyclic AMP response element-binding protein by a novel signaling mechanism. *J Biol Chem.* **273(31)**:19834-19839.
- Benedetti M., Levi A. and Chao MV.** (1993) Differential expression of nerve growth factor receptors leads to altered binding affinity and neurotrophin responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**:7859-78563.
- Berkemeier LR., Winslow JW., Kaplan DR., Nikolics K., Goeddel D. and Rosenthal A.** (1991) Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron* **7**:857-866

- Berninger B., Garcia DE., Inagaki N., Hahnel C. and Lindholm D.** (1993) BDNF and NT-3 induce intracellular Ca²⁺ elevation in hippocampal neurones. *Neuroreport*. **4**:1303-1306.
- Bertolotto C. Maulon L, Filippa N, Baier G, Auberger P.** (2000) Protein kinase C theta and epsilon promote T-cell survival by a rsk-dependent phosphorylation and inactivation of BAD. *J Biol Chem*. **275**:37246-37250.
- Biffo S., Offenhauser N., Carter BD. and Barde YA.** (1995) Selective binding and internalisation by truncated receptors restrict the availability of BDNF during development. *Development*. **121**:2461-2470.
- Bijur GN., De Sarno P. and Jope RS.** (2000) Glycogen synthase kinase-3 beta facilitates staurosporine- and heat shock-induced apoptosis. Protection by lithium. *J Biol Chem*. **275**:7583-7590.
- Birren SJ., Lo L. and Anderson DJ.** (1993) Sympathetic neuroblasts undergo a developmental switch in trophic dependence. *Development*. **119**:597-610.
- Bizzini B., Stoeckel K. and Schwab M.** (1977) An antigenic polypeptide fragment isolated from tetanus toxin: chemical characterization, binding to gangliosides and retrograde axonal transport in various neuron systems. *J Neurochem*. **28**:529-542.
- Bizzini B., Grob P., Glicksman MA. and Akert K.** (1980) Use of the B-IIb tetanus toxin derived fragment as a specific neuropharmacological transport agent. *Brain Res*. **193**:221-227.
- Black JD. and Dolly JO.** (1986a) Interaction of ¹²⁵I-labeled botulinum neurotoxins with nerve terminals. I. Ultrastructural autoradiographic localization and quantitation of distinct membrane acceptors for types A and B on motor nerves. *J Cell Biol*. **103**:521-534.
- Black JD. and Dolly JO.** (1986b). Interaction of ¹²⁵I-labeled botulinum neurotoxins with nerve terminals. II. Autoradiographic evidence for its uptake into motor nerves by acceptor-mediated endocytosis. *J. Cell. Biol*. **103**: 535-544.
- Blaustein RO., Germann WJ., Finkelstein A. and DasGupta BR.** (1987) The N-terminal half of the heavy chain of botulinum type A neurotoxin forms channels in planar phospholipid bilayers. *FEBS Lett*. **226**:115-120.
- Bollag G. and McCormick F.** (1991) Differential regulation of rasGAP and neurofibromatosis gene product activities. *Nature*. **351**:576-579.
- Bonni A., Brunet A., West AE., Datta SR., Takasu MA. and Greenberg ME.** (1999) Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and - independent mechanisms. *Science*. **286**:1358-1362.
- Boquet P. and Duflot E.** (1982) Tetanus toxin fragment forms channels in lipid vesicles at low pH. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **79**:7614-7618.
- Borasio GD., John J., Wittinghofer A., Barde YA., Sendtner M. and Heumann R.** (1989) ras p21 protein promotes survival and fiber outgrowth of cultured embryonic neurons. *Neuron*. **2**:1087-1096.
- Borasio GD., Markus A., Heumann R., Ghezzi C., Sampietro A., Wittinghofer A. and Silani V.** (1996) Ras p21 protein promotes survival

- and differentiation of human embryonic neural crest-derived cells. *Neuroscience*. **73**(4):1121-1127.
- Bowen C., Spiegel S. and Gelmann EP.** (1998) Radiation-induced apoptosis mediated by retinoblastoma protein. *Cancer Res.* **58**:3275-3281. Review
- Brunet A., Bonni A., Zigmund MJ., Lin MZ., Juo P., Hu LS., Anderson MJ., Arden KC., Blenis J. and Greenberg ME.** (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. **96**:857-868.
- Bunone G., Mariotti A., Compagni A., Morandi E. and Della Valle G.** (1997) Induction of apoptosis by p75 neurotrophin receptor in human neuroblastoma cells. *Oncogene*. **14**:1463-1470.
- Burgering BM. and Coffey PJ.** (1995) Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature*. **376**:599-602.
- Bustamante J., Tovar BA., Montero G. and Boveris A.** (1997) Early redox changes during rat thymocyte apoptosis. *Arch. Biochem. Biophys.* **337**: 121 - 128.
- Bustamante J, Bersier G, Romero M, Badin RA, Boveris A.** (2000) Nitric oxide production and mitochondrial dysfunction during rat thymocyte apoptosis. *Arch Biochem Biophys.* **376**:239-247.
- Carpenter CL. and Cantley LC.** (1990) Phosphoinositide kinases. *Biochemistry*. **29**:11147-11156. Review.
- Carpenter CL., Duckworth BC, Auger KR., Cohen B., Schaffhausen BS. and Cantley LC.** (1990) Purification and characterization of phosphoinositide 3-kinase from rat liver. *J Biol Chem.* **265**:19704-19711.
- Carswell EA., Old LJ., Kassel RL., Green S., Fiore N. and Williamson B.** (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA.* **72**:3666-3670.
- Carter AN. and Downes CP.** (1992) Phosphatidylinositol 3-kinase is activated by nerve growth factor and epidermal growth factor in PC12 cells. *J Biol Chem.* **267**:14563-14567.
- Carter BD., Zirrgiebel U. and Barde YA.** (1995) Differential regulation of p21ras activation in neurons by nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem.* **270**:21751-21757.
- Casaccia-Bonnet P., Carter BD., Dobrowsky RT. and Chao MV.** (1996) Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. *Nature*. **383**:716-719.
- Castagna M., Takai Y., Kaibuchi K., Sano K., Kikkawa U. and Nishizuka Y.** (1982) Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.* **157**: 7847-7851.
- Cecconi F., Alvarez-Bolado G., Meyer BI., Roth KA. and Gruss P.** (1998) Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. *Cell*. **94**:727-37.
- Chapman BS.** (1995) A region of the 75 kDa neurotrophin receptor homologous to the death domains of TNFR-I and Fas. *FEBS Lett.* **374**:216-220.

- Cheema SS., Barrett GL. and Bartlett PF.** (1996) Reducing p75 nerve growth factor receptor levels using antisense oligonucleotides prevents the loss of axotomized sensory neurons in the dorsal root ganglia of newborn rats. *J Neurosci Res.* **46**:239-245.
- Cheema ZF, Wade SB, Sata M, Walsh K, Sohrabji F, Miranda RC.** (1999) Fas/Apo [apoptosis]-1 and associated proteins in the differentiating cerebral cortex: induction of caspase-dependent cell death and activation of NF-kappaB. *J Neurosci.* **19**:1754-1770.
- Chen RH., Sarnecki C. and Blenis J.** (1992) Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol.* **12**:915-927.
- Chen RH., Abate C. and Blenis J.** (1993) Phosphorylation of the c-Fos transrepression domain by mitogen-activated protein kinase and 90-kDa ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**:10952-10956.
- Chiba K., Trevor AJ. and Castagnoli N Jr.** (1985) Active uptake of MPP+, a metabolite of MPTP, by brain synaptosomes. *Biochem Biophys Res Commun.* **128**:1228-1232.
- Chinnaiyan AM., Tepper CG., Seldin MF., O'Rourke K., Kischkel FC., Hellbardt S., Krammer PH., Peter ME. and Dixit VM.** (1996) FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem.* **271**:4961-4965.
- Chun HS., Gibson GE., DeGiorgio LA., Zhang H., Kidd VJ. and Son JH.** (2001) Dopaminergic cell death induced by MPP(+), oxidant and specific neurotoxicants shares the common molecular mechanism. *J Neurochem.* **76**:1010-1021.
- Clary DO., Weskamp G., Austin LR. and Reichardt LF.** (1994) TrkA cross-linking mimics neuronal responses to nerve growth factor. *Mol Biol Cell.* **5**:549-563.
- Cobb MH. and Goldsmith EJ.** (1995) How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem* **270**:14843-14846. Review.
- Coen L., Osta R., Maury M. and Brulet P.** (1997) Construction of hybrid proteins that migrate retrogradely and transynaptically into the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 9400-9405.
- Collingridge GL. and Davies J.** (1980) Reversible effects of low doses of tetanus toxin on synaptic inhibition in the substantia nigra and turning behaviour in the rat. *Brain Res.* **185**:455-459.
- Cordon-Cardo C., Tapley P., Jing SQ., Nanduri V., O'Rourke E., Lamballe F., Kovary K., Klein R., Jones KR. and Reichardt LF.** (1991) The trk tyrosine protein kinase mediates the mitogenic properties of nerve growth factor and neurotrophin-3. *Cell.* **66**:173-183.
- Coughlin MD. and Collins MB.** (1985) Nerve growth factor-independent development of embryonic mouse sympathetic neurons in dissociated cell culture. *Dev Biol.* **110**:392-401.
- Craven CJ. and Dawson DJ.** (1973) The chain composition of tetanus toxin. *Bioch. Biophys. Acta.* **317**: 277-285.

- Critchley DR., Habig WH. and Fishman PH.** (1986) Reevaluation of the role of gangliosides as receptors for tetanus toxin. *J. Neurochem.* **47**: 213-222.
- Cross DA., Alessi DR., Cohen P., Andjelkovich M. and Hemmings BA.** (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature.* **378**:785-789.
- Cross DA., Culbert AA., Chalmers KA., Facci L., Skaper SD. and Reith AD.** (2001) Selective small-molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity protect primary neurones from death. *J. Neurochem.* **77**:94-102.
- Cull-Candy SG., Howe JR. and Ogden DC.** (1988) Noise and single channels activated by excitatory amino acids in rat cerebellar granule neurones. *J Physiol.* **400**:189-222.
- Curtis R., Adryan KM., Stark JL., Park JS., Compton DL., Weskamp G., Huber LJ., Chao MV., Jaenisch R. and Lee KF.** (1995) Differential role of the low affinity neurotrophin receptor (p75) in retrograde axonal transport of the neurotrophins. *Neuron.* **14**:1201-1211.
- D'Mello SR., Galli C., Ciotti T. and Calissano P.** (1993) Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**:10989-10993.
- D'Mello SR., Borodezt K. and Soltoff SP.** (1997) Insulin-like growth factor and potassium depolarization maintain neuronal survival by distinct pathways: possible involvement of PI 3-kinase in IGF-1 signaling. *J Neurosci.* **17**:1548-1560.
- Daily D., Vlamis-Gardikas A, Offen D, Mittelman L, Melamed E, Holmgren A, arzilai A.** (2001) Glutaredoxin protects cerebellar granule neurons from dopamine-induced apoptosis by activating NF-kappa B via Ref-1. *J Biol Chem.* **276**:1335-1344.
- Dash PK., Hochner B. and Kandel ER.** (1990) Injection of the cAMP-responsive element into the nucleus of Aplysia sensory neurons blocks long-term facilitation. *Nature.* **345**:718-721.
- Dash PK., Karl KA., Colicos MA., Prywes R. and Kandel ER.** (1991) cAMP response element-binding protein is activated by Ca²⁺/calmodulin- as well as cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**:5061-5065.
- Datta SR., Dudek H., Tao X., Masters S., Fu H., Gotoh Y. and Greenberg ME.** (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell.* **91**(2):231-241.
- Datta SR., Katsov A., Hu L., Petros A., Fesik SW., Yaffe MB. and Greenberg ME.** (2000) 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol Cell.* **6**:41-51.
- Davis RJ.** (1994) MAPKs: new JNK expands the group. *Trends Biochem Sci.* **19**:470-473. Review.
- de Paiva A., Poulain B., Lawrence GW., Shone CC., Tauc L. and Dolly JO.** (1993) A role for the interchain disulfide or its participating thiols in the internalization of botulinum neurotoxin A revealed by a toxin derivative

- that binds to ecto-acceptors and inhibits transmitter release intracellularly. *J Biol Chem.* **268**:20838-20844.
- Dechant G., Biffo S., Okazawa H., Kolbeck R., Pottgiesser J. and Barde YA.** (1996) Expression and binding characteristics of the BDNF receptor chick trkB. *Development.* **119**:545-558.
- Deisseroth K., Heist EK. and Tsien RW.** (1998) Translocation of calmodulin to the nucleus supports CREB phosphorylation in hippocampal neurons. *Nature.* **392**:198-202.
- del Peso L., Gonzalez-Garcia M., Page C., Herrera R. and Nunez G.** (1997) Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science.* **278**:687-689.
- Di Monte D., Jewell SA., Ekstrom G., Sandy MS. and Smith MT.** (1986) 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) cause rapid ATP depletion in isolated hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* **137**:310-315.
- DiCicco-Bloom E., Friedman WJ. and Black IB.** (1993) NT-3 stimulates sympathetic neuroblast proliferation by promoting precursor survival. *Neuron.* **11**(6):1101-1111.
- Diehl JA., Cheng M., Roussel MF. and Sherr CJ.** (1998) Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.* **12**:3499-3511.
- DiStefano PS., Friedman B., Radziejewski C., Alexander C., Boland P., Schick CM., Lindsay RM. and Wiegand SJ.** (1992) The neurotrophins BDNF, NT-3, and NGF display distinct patterns of retrograd axonal transport in peripheral and central neurons. *Neuron.* **8**:983-993.
- Dolly JO., Black J., Williams RS. and Melling J.** (1984) Acceptors for botulinum neurotoxin reside on motor nerve terminals and mediate its internalization. *Nature.* **307**:457-460.
- Donovan JJ. and Middlebrook JL.** (1986) Ion-conducting channels produced by botulinum toxin in planar lipid membranes. *Biochemistry.* **25**:2872-2876.
- Dostaler SM., Ross GM., Myers SM., Weaver DF., Ananthanarayanan V. and Riopelle RJ.** (1996) Characterization of a distinctive motif of the low molecular weight neurotrophin receptor that modulates NGF-mediated neurite growth. *Eur J Neurosci.* **8**:870-879.
- Downward J.** (1998) Ras signalling and apoptosis. *Curr Opin Genet Dev.* **8**:49-54. Review.
- Du K. and Montminy M.** (1998) CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J Biol Chem.* **273**:32377-32379.
- Du Y., Dodel RC., Bales KR., Jemmerson R., Hamilton-Byrd E. and Paul SM.** (1997) Involvement of a caspase-3-like cysteine protease in 1-methyl-4-phenylpyridinium-mediated apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *J Neurochem.* **69**(4):1382-1388.
- Duan H. and Dixit VM.** (1997) RAIDD is a new 'death' adaptor molecule. *Nature.* **385**:86-89.

- Duband-Goulet D., Courvalin JC. and Buendia B.** (1998) LBR, a laminin and lamin binding protein from the inner nuclear membrane, is proteolyzed at late stages of apoptosis. *J Cell Sci.* **111**: 1441-1451.
- Dudek H., Datta SR., Franke TF., Birnbaum MJ., Yao R., Cooper GM., Segal RA., Kaplan DR. and Greenberg ME.** (1997) Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science.* **275**:661-665.
- Durkop H., Latza U., Hummel M., Eitelbach F., Seed B. and Stein H.** (1992) Molecular cloning and expression of a new member of the nerve growth factor receptor family that is characteristic for Hodgkin's disease. *Cell.* **68**:421-427.
- Ehrhard PB., Erb P., Graumann U. and Otten U.** (1993) Expression of nerve growth factor and nerve growth factor receptor tyrosine kinase Trk in activated CD4-positive T-cell clones. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**(23):10984-10988.
- Emsley P., Fotinou C., Black I., Fairweather NF., Charles IG., Watts C., Hewitt E. and Isaacs NW.** (2000) The structures of the H(C) fragment of tetanus toxin with carbohydrate subunit complexes provide insight into ganglioside binding. *J Biol Chem.* **275**:8889-8894.
- Ernfors P., Ibanez CF., Ebendal T., Olson L. and Persson H.** (1990) Molecular cloning and neurotrophic activities of a protein with structural similarities to nerve growth factor: developmental and topographical expression in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87**:5454-5458.
- Erpel T., Superti-Furga G. and Courtneidge SA.** (1995) Mutational analysis of the Src SH3 domain: the same residues of the ligand binding surface are important for intra- and intermolecular interactions. *EMBO J.* **14**:963-975.
- Fabian JR., Daar IO. and Morrison DK.** (1993) Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase. *Mol Cell Biol.* **13**:7170-7179.
- Fabian JR., Vojtek AB., Cooper JA. and Morrison DK.** (1994) A single amino acid change in Raf-1 inhibits Ras binding and alters Raf-1 function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**(13):5982-5986.
- Facchiano F., Valtorta F., Benfenati F. and Luini A.** (1993). The transglutaminase hypothesis for the action of tetanus toxin. *TIBS.* **18**: 327-329.
- Facci L., Stevens DA. and Skaper SD.** (2003) Glycogen synthase kinase-3 inhibitors protect central neurons against excitotoxicity. *Neuroreport.* **14**:1467-1470.
- Fall CP. and Bennett JP Jr.** (1998) MPP⁺ induced SH-SY5Y apoptosis is potentiated by cyclosporin A and inhibited by aristolochic acid. *Brain Res.* **811**:143-146.
- Fall CP. and Bennett JP Jr.** (1999) Characterization and time course of MPP⁺ - induced apoptosis in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Neurosci Res.* **55**:620-628.

- Farinas I., Jones KR., Backus C., Wang XY. and Reichardt LF.** (1994) Severe sensory and sympathetic deficits in mice lacking neurotrophin-3. *Nature*. **369**:658-661.
- Figueiredo D., Turcotte C., Frankel G., Li Y., Dolly O., Wilkin G., Marriott D., Fairweather N. and Dougan G.** (1995) Characterization of recombinant tetanus toxin derivatives suitable for vaccine development. *Infect Immun.* **63**:3218-3221.
- Figueiredo DM., Hallewell RA., Chen LL., Fairweather NF., Dougan G., Savitt JM., Parks DA. and Fishman PS.** (1997) Delivery of recombinant tetanus-superoxide dismutase proteins to central nervous system neurons by retrograde axonal transport. *Exp Neurol* **145**: 546-554.
- Finkbeiner S., Tavazoie SF., Maloratsky A., Jacobs KM., Harris KM. and Greenberg ME.** (1997) CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron*. **19**:1031-1047.
- Force T., Bonventre JV., Heidecker G., Rapp U., Avruch J. and Kyriakis JM.** (1994) Enzymatic characteristics of the c-Raf-1 protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **91**:1270-1274.
- Fotinou C., Emsley P., Black I., Ando H., Ishida H., Kiso M., Sinha KA., Fairweather NF. and Isaacs NW.** (2001) The crystal structure of tetanus toxin Hc fragment complexed with a synthetic GT1b analogue suggests cross-linking between ganglioside receptors and the toxin. *J Biol Chem*. **276**:32274-32281.
- Frade JM., Rodriguez-Tebar A. and Barde YA.** (1996) Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature*. **383**:166-168.
- Frame S. and Cohen P.** (2001) GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J*. **359**:1-16. Review.
- Friesen C., Herr I., Krammer PH. and Debatin KM.** (1996) Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nat Med*. **2**:574-577.
- Fulda S., Sieverts H., Friesen C., Herr I. and Debatin KM.** (1997) The CD95 (APO-1/Fas) system mediates drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Cancer Res*. **57**:3823-3829.
- Galli C., Meucci O., Scorziello A., Werge TM., Calissano P. and Schettini G.** (1995) Apoptosis in cerebellar granule cells is blocked by high KCl, forskolin, and IGF-1 through distinct mechanisms of action: the involvement of intracellular calcium and RNA synthesis *J Neurosci*. **15**:1172-1179.
- Gallo V., Kingsbury A., Balazs R. and Jorgensen OS.** (1987) The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J Neurosci*. **7**:2203-2213.
- Gardner AM., Vaillancourt RR., Lange-Carter CA. and Johnson GL.** (1994) MEK-1 phosphorylation by MEK kinase, Raf, and mitogen-activated protein kinase: analysis of phosphopeptides and regulation of activity. *Mol Biol Cell*. **5**:193-201.

- Garner AS. and Large TH.** (1994) Isoforms of the avian TrkC receptor: a novel kinase insertion dissociates transformation and process outgrowth from survival. *Neuron*. **13**:457-472.
- Garrington TP. and Johnson GL.** (1999) Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol*. **11**:211-218. Review.
- Ghoda L., Lin X. and Greene WC.** (1997) The 90-kDa ribosomal S6 kinase (pp90rsk) phosphorylates the N-terminal regulatory domain of I κ B α and stimulates its degradation in vitro. *J Biol Chem*. **272**:21281-21288.
- Ghosh A., Carnahan J. and Greenberg ME.** (1994) Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science*. **263**:1618-1623.
- Ghosh S., May MJ. and Kopp EB.** (1998) NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*. **16**:225-260. Review.
- Gil C, Ruiz-Meana M., Álava M., Yavin E. and Aguilera J.** (1998). Tetanus toxin enhances protein kinase C activity translocation and increases polyphosphoinositide hydrolysis in rat cerebral cortex preparations. *J. Neurochem*. **70**: 1636-1643.
- Gil C, Chaib-Oukadour I., Pellicioni P. and Aguilera J.** (2000). Activation of signal transduction pathways involving TrkA, PLC γ -1, PKC isoforms and ERK-1/2 by tetanus toxin. *FEBS Lett*. **481**: 177-182.
- Gil C., Chaib-Oukadour I., Blasi J. and Aguilera J.** (2001). Hc fragment (C-terminal of the heavy chain) of tetanus toxin activates protein kinase C isoforms and phosphoproteins involved in signal transduction. *Bioch. J*. **356**: 97-103.
- Gil C., Chaib-Oukadour I. and Aguilera J.** (2003) C-terminal fragment of tetanus toxin heavy chain activates Akt and MEK/ERK signalling pathways in a Trk receptor-dependent manner in cultured cortical neurons. *Biochem J*. **373**:613-620.
- Gille H., Kortenjann M., Thomae O., Moomaw C., Slaughter C., Cobb MH. and Shaw PE.** (1995) ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation. *EMBO J*. **14**:951-962.
- Ginty DD., Bonni A. and Greenberg ME.** (1994) Nerve growth factor activates a Ras-dependent protein kinase that stimulates c-fos transcription via phosphorylation of CREB. *Cell*. **77**:713-725.
- Gleichmann M., Weller M. and Schulz JB.** (2000) Insulin-like growth factor-1-mediated protection from neuronal apoptosis is linked to phosphorylation of the pro-apoptotic protein BAD but not to inhibition of cytochrome c translocation in rat cerebellar neurons. *Neurosci Lett*. **282**:69-72.
- Goldberg RL., Costa T., Habif WH., Kohn LD. and Hardegree MC.** (1981) Characterization of fragment C and tetanus toxin binding to rat brain membranes. *Mol. Pharmacol*. **20**: 565-570.
- Gomez C., Reiriz J., Pique M., Gil J., Ferrer I. and Ambrosio S.** (2001) Low concentrations of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion induce caspase-

- mediated apoptosis in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Neurosci Res.* **63**:421-428.
- Gonzalez GA. and Montminy MR.** (1989) Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell.* **59**:675-680.
- Gonzalez GA., Yamamoto KK., Fischer WH., Karr D., Menzel P., Biggs W 3rd., Vale WW. and Montminy MR.** (1989) A cluster of phosphorylation sites on the cyclic AMP-regulated nuclear factor CREB predicted by its sequence. *Nature.* **337**:749-752.
- Gonzalez-Polo RA., Mora A., Clemente N., Sabio G., Centeno F., Soler G. and Fuentes JM.** (2001) Mechanisms of MPP(+) incorporation into cerebellar granule cells. *Brain Res Bull.* **56**:119-123.
- Goodman Y., Bruce AJ., Cheng B. and Mattson MP.** (1996) Estrogens attenuate and corticosterone exacerbates excitotoxicity, oxidative injury, and amyloid beta-peptide toxicity in hippocampal neurons. *J Neurochem.* **66**:1836-1844.
- Gotoh Y., Nishida E., Yamashita T., Hoshi M., Kawakami M. and Sakai H.** (1990) Microtubule-associated-protein (MAP) kinase activated by nerve growth factor and epidermal growth factor in PC12 cells. Identity with the mitogen-activated MAP kinase of fibroblastic cells. *Eur J Biochem.* **193**:661-669.
- Green DR. and Reed JC.** (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science.* **281**:1309-1312. Review.
- Green PS., Bishop J. and Simpkins JW.** (1997) 17 alpha-estradiol exerts neuroprotective effects on SK-N-SH cells. *J Neurosci.* **17**:511-515.
- Greene LA., Shooter EM. and Varon S.** (1969) Subunit interaction and enzymatic activity of mouse 7S nerve growth factor. *Biochemistry.* **8**:3735-3741.
- Greene LA. and Shooter EM.** (1980) The nerve growth factor: biochemistry, synthesis, and mechanism of action. *Annu Rev Neurosci.* **3**:353-402. Review.
- Gross A., McDonnell JM. and Korsmeyer SJ.** (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* **13**:1899-1911. Review.
- Gross A., Yin XM., Wang K., Wei MC., Jockel J., Milliman C., Erdjument-Bromage H., Tempst P. and Korsmeyer SJ.** (1999) Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem.* **274**:1156-1163.
- Gundersen CB. and Howard BD.** (1978) The effects of botulinum toxin on acetylcholine metabolism in mouse brain slices and synaptosomes. *J Neurochem.* **31**:1005-1013.
- Habermann E., Welhöner HH. and Rker KO.** (1977) Metabolic fate of ¹²⁵-tetanus toxin in the spinal cord of rats and cats with early local tetanus. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **299**: 187-196.
- Habermann E., Bigalke H. and Heller I.** (1981) Inhibition of synaptosomal choline uptake by tetanus toxin and botulinum A toxin. Partial dissociation

- of fixation and effect of tetanus toxin. *Naunyn- Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **316**: 135-142.
- Habermann E. and Albus U.** (1986) Interaction between tetanus toxin and rabbit kidney. A comparison with rat brain preparations. *J. Neurochem.* **46**: 1219-1226.
- Hacker G.** (2000) The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.* **301**: 5-17.
- Hallböök F., Ibáñez CF. and Persson H.** (1991) Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron.* **6**:845-858.
- Hallböök F., Ibáñez CF., Ebendal T. and Persson H.** (1993) Cellular localization of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNA expression in the early chicken embryo. *Eur J Neurosci.* **5**:1-14.
- Halpern JL. and Loftus A.** (1993) Characterization of the receptor-binding domain of tetanus toxin. *J Biol Chem.* **268**:11188-11192.
- Halpern JL. and Neale EA.** (1995) Neurospecific binding, internalization, and retrograde axonal transport. *Curr Top Microbiol Immunol.* **195**:221-241. Review.
- Hantzopoulos PA., Suri C., Glass DJ., Goldfarb MP. and Yancopoulos GD.** (1994) The low affinity NGF receptor, p75, can collaborate with each of the Trks to potentiate functional responses to the neurotrophins. *Neuron.* **13**:187-201.
- Harper GP. and Thoenen H.** (1980) Nerve growth factor: biological significance, measurement, and distribution. *J Neurochem.* **34**: 5-16. Review.
- Helting TB. and Zwisler O.** (1977b) Structure of tetanus toxin. II. Toxin binding to ganglioside. *J. Biol. Chem.* **252**: 194-196.
- Hempstead BL., Patil N., Thiel B. and Chao MV.** (1990) Deletion of cytoplasmic sequences of the nerve growth factor receptor leads to loss of high affinity ligand binding. *J Biol Chem.* **265**:9595-9598.
- Hempstead BL., Martin-Zanca D., Kaplan DR., Parada LF. and Chao MV.** (1991) High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature.* **350**:678-683.
- Henkemeyer M., Rossi DJ., Holmyard DP., Puri MC., Mbamalu G., Harpal K., Shih TS., Jacks T. and Pawson T.** (1995) Vascular system defects and neuronal apoptosis in mice lacking ras GTPase-activating protein. *Nature.* **377**:695-701.
- Herrera B., Fernandez M., Alvarez AM., Roncero C., Benito M., Gil J. and Fabregat I.** (2001) Activation of caspases occurs downstream from radical oxygen species production, Bcl-xL down-regulation, and early cytochrome C release in apoptosis induced by transforming growth factor beta in rat fetal hepatocytes. *Hepatology.* **34**:548-556.
- Herrerros J., Lalli G. and Schiavo G.** (2000) C-terminal half of tetanus toxin fragment C is sufficient for neuronal binding and interaction with a putative protein receptor. *Biochem J.* **347**:199-204.

- Herreros J., Lalli G., Montecucco C. and Schiavo G.** (2000) Tetanus toxin fragment C binds to a protein present in neuronal cell lines and motoneurons. *J Neurochem.* **74**:1941-1950.
- Herreros J., Ng T. and Schiavo G.** (2001) Lipid rafts act as specialized domains for tetanus toxin binding and internalization into neurons. *Mol Biol Cell.* **12**(10):2947-2960.
- Ho J.L. and Klemmner M.S.** (1988). Diminished activity of PKC in tetanus toxin-treated macrophages and in the spinal cord of mice manifesting generalized tetanus intoxication. *J. Infect. Dis.* **157**: 925-933.
- Hoch DH., Romero-Mira M., Ehrlich BE., Finkelstein A., DasGupta BR. and Simpson LL.** (1985) Channels formed by botulinum, tetanus, and diphtheria toxins in planar lipid bilayers: relevance to translocation of proteins across membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **82**:1692-1696.
- Hochman A., Sternin H., Gorodin S., Korsmeyer S., Ziv I., Melamed E. and Offen D.** (1998) Enhanced oxidative stress and altered antioxidants in brains of Bcl-2-deficient mice. *J Neurochem.* **71**:741-748.
- Hockberger PE., Tseng HY. and Connor JA.** (1987) Immunocytochemical and electrophysiological differentiation of rat cerebellar granule cells in explant cultures. *J Neurosci.* **7**:1370-1383.
- Hofer M., Pagliusi SR., Hohn A., Leibrock J. and Barde YA.** (1990) Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J.* **9**:2459-2464.
- Hohn A., Leibrock J., Bailey K. and Barde YA.** (1990) Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature.* **344**:339-341.
- Hsu H., Huang J., Shu HB., Baichwal V. and Goeddel DV.** (1996) TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity.* **4**:387-396.
- Hsu H., Xiong J. and Goeddel DV.** (1995) The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell.* **81**:495-504.
- Hu Q., Klippel A., Muslin AJ., Fantl WJ. and Williams LT.** (1995) Ras-dependent induction of cellular responses by constitutively active phosphatidylinositol-3 kinase. *Science.* **268**:100-102.
- Huang EJ. and Reichardt LF.** (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci.* **24**:677-736. Review.
- Huber LJ. and Chao MV.** (1995) A potential interaction of p75 and trkA NGF receptors revealed by affinity crosslinking and immunoprecipitation. *J Neurosci Res.* **40**:557-563.
- Ibáñez CF., Ebendal T. and Persson H.** (1991) Chimeric molecules with multiple neurotrophic activities reveal structural elements determining the specificities of NGF and BDNF. *EMBO J.* **10**:2105-2110.
- Ibáñez CF., Ebendal T., Barbany G., Murray-Rust J., Blundell TL. and Persson H.** (1992) Disruption of the low affinity receptor-binding site in

- NGF allows neuronal survival and differentiation by binding to the trk gene product. *Cell* **69**:329-341
- Ibáñez CF., Ilag LL., Murray-Rust J. and Persson H.** (1993) An extended surface of binding to Trk tyrosine kinase receptors in NGF and BDNF allows the engineering of a multifunctional pan-neurotrophin. *EMBO J.* **12**:2281-2293
- Inoue M., Kishimoto A., Takai Y. and Nishizukak Y.** (1977) Studies on a cyclic nucleotide independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain. *J. Biol Chem.* **252**: 7610-7616.
- Inserte J., Najib A., Pelliccioni P., Gil C. and Aguilera J.** (1999) Inhibition by tetanus toxin of sodium-dependent, high-affinity [3H]5-hydroxytryptamine uptake in rat synaptosomes. *Biochem Pharmacol.* **57**:111-120.
- Isackson PJ., Nisco SJ. and Bradshaw RA.** (1987) Expression of the alpha subunit of 7S nerve growth factor in the mouse submandibular gland. *Neurochem Res.* **12**:959-966.
- Israel A.** (2000) The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF-kappaB?. *Trends Cell.* **10**: 129-133.
- Itano Y. and Nomura Y.** (1995) 1-methyl-4-phenyl-pyridinium ion (MPP+) causes DNA fragmentation and increases the Bcl-2 expression in human neuroblastoma, SH-SY5Y cells, through different mechanisms. *Brain Res.* **704**:240-245.
- Ito M.** (1984a) Granule cells, en *The Cerebellum and Neuronal Control. Science.* **286**:1358-1362.
- Jaiswal RK., Moodie SA., Wolfman A. and 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**:6944-6953.
- Jankovic J.** (1996) Pretarsal injection of botulinum toxin for blepharospasm and apraxia of eyelid opening. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* **60**:704.
- Jing S., Tapley P. and Barbacid M.** (1992) Nerve growth factor mediates signal transduction through trk homodimer receptors. *Neuron* **9**:1067-1079.
- Joel PB., Smith J., Sturgill TW., Fisher TL., Blenis J. and Lannigan DA.** (1998) pp90rsk1 regulates estrogen receptor-mediated transcription through phosphorylation of Ser-167. *Mol Cell Biol.* **18**(4):1978-1984.
- Johanson SO., Crouch MF. and Hendry IA.** (1995) Retrograde axonal transport of signal transduction proteins in rat sciatic nerve. *Brain Res.* **690**:55-63.
- Johnson D., Lanahan A., Buck CR, Sehgal A., Morgan C., Mercer E., Bothwell M. and Chao M.** (1986) Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell.* **47**:545-554.
- Jung Y., Miura M. and Yuan J.** (1996) Suppression of interleukin-1 beta-converting enzyme-mediated cell death by insulin-like growth factor. *J Biol Chem.* **271**: 5112-5117.
- Kalz HJ. and Welhöner HH.** (1990) The uptake of tetanus toxin into NG108-15 neuroblastoma-glioma hybrid cells may occur both through the clathrin-

- dependent and the clathrin-independent path of adsorptive endocytosis. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **342**: R17.
- Kaplan DR., Hempstead BL., Martin-Zanca D., Chao MV. and Parada LF.** (1991a) The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science* **252**:554-558
- Kaplan DR. and Stephens RM.** (1994) Neurotrophin signal transduction by the Trk receptor. *J Neurobiol.***25**:1404-1417. Review.
- Kaplan DR. and Miller FD.** (2000) Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* **10**, 381-391.
- Kaplan DR., Martin-Zanca D. and Parada LF.** (1991b) Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk proto-oncogene product induced by NGF. *Nature* **350**:158-160
- Karin M. and Ben-Neriah Y.** (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol.* **18**:621-663.Review.
- Kaufmann SH., Desnoyers S., Ottaviano Y., Davidson NE. and Poirier GG.** (1993) Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* **57**: 3976-3985.
- Kerr JF., Wyllie AH. and Currie A.R.** (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* **26**: 239-257
- Kitamura Y., Kakimura J. and Taniguchi T.** (1998) Protective effect of talipexole on MPTP-treated planarian, a unique parkinsonian worm model. *Jpn J Pharmacol.* **78**:23-29.
- Klein R., Jing S., Nanduri V., O'Rourke E. and Barbacid M.** (1991a) The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell* **65**:189-197
- Klein R., Nanduri V., Jing S., Lamballe F., Tapley P., Bryant S., Cordon-Cardo C., Jones K. R., Reichardt L. F. and Barbacid M.** (1991b) The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell* **66**:395-403
- Klevenyi P., Andreassen O., Ferrante RJ., Schleicher JR Jr., Friedlander RM. and Beal MF.** (1999) Transgenic mice expressing a dominant negative mutant interleukin-1beta converting enzyme show resistance to MPTP neurotoxicity. *Neuroreport.* **10**:635-638.
- Klippel A., Reinhard C., Kavanaugh WM., Apell G., Escobedo MA. and Williams LT.** (1996) Membrane localization of phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient to activate multiple signal-transducing kinase pathways. *Mol Cell Biol.***16**:4117-4127.
- Klippel A., Kavanaugh WM., Pot D. and Williams LT.** (1997) A specific product of phosphatidylinositol 3-kinase directly activates the protein kinase Akt through its pleckstrin homology domain. *Mol Cell Biol.***17**:338-344.
- Kokaia Z., Bengzon J., Metsis M., Kokaia M., Persson H. and Lindvall O.** (1993) Coexpression of neurotrophins and their receptors in neurons of the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A.***90**:6711-6715.

- Kosako H., Gotoh Y., Matsuda S., Ishikawa M. and Nishida E.** (1992) Xenopus MAP kinase activator is a serine/threonine/tyrosine kinase activated by threonine phosphorylation. *EMBO J.* **11**:2903-2908.
- Kroemer G., Petit PX., Zamzami N., Vayssière JL. and Mignote B.** (1995) The biochemistry of programmed cell death. *FASSEB J.* **9**:1277 - 1287. Review.
- Kroemer G., Dallaporta B. and Resche-Rigon M.** (1998) The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol.* **60**: 619-642.
- Krueger MJ., Sablin SO., Ramsay R. and Singer TP.** (1993) Reactivation of NADH dehydrogenase (complex I) inhibited by 1-methyl-4-(4'-alkylphenyl)pyridinium analogues: a clue to the nature of the inhibition site. *J Neurochem.* **61**:1546-1548.
- Kubo T., Nonomura T., Enokido Y. and Hatanaka, H.** (1995) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) can prevent apoptosis of rat cerebellar granule neurons in culture. *Dev. Brain Res.* **85**, 249-258.
- Kulik G., Klippel A. and Weber MJ.** (1997) Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. *Mol Cell Biol.* **17**(3):1595-1606.
- Kume T., Nishikawa H., Tomioka H., Katsuki H., Akaike A., Kaneko S., Maeda T., Kihara T. and Shimohama, S.** (2000) p75-mediated neuroprotection by NGF against glutamate cytotoxicity in cortical cultures. *Brain Res.* **852**: 279–289
- Kyriakis JM. and Avruch J.** (1996) Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *J Biol Chem.* **271**:24313-24916.
- Lacy DB. and Stevens RC.** (1999) Sequence homology and structural analysis of the clostridial neurotoxins. *J Mol Biol.* **291**:1091-1104.
- Lalli G., Herreros J., Osborne SL., Montecucco C., Rossetto O. and Schiavo G.** (1999) Functional characterisation of tetanus and botulinum neurotoxins binding domains. *J. Cell. Sci.* **112**:2715-2724.
- Lamballe F., Klein R. and Barbacid M.** (1991) trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* **66**:967-979
- Lamballe F., Tapley P. and Barbacid M.** (1993) trkC encodes multiple neurotrophin-3 receptors with distinct biological properties and substrate specificities. *EMBO J.* **12**:3083-3094.
- Lange-Carter CA. and Johnson GL.** (1994) Ras-dependent growth factor regulation of MEK kinase in PC12 cells. *Science.* **265**:1458-1461.
- Lasher RS. and Zagon IS.** (1972) The effect of potassium on neuronal differentiation in cultures of dissociated newborn rat cerebellum. *Brain Res.* **41**(2):482-488.
- Lavin MF., Watters D. and Song Q.** (1996) Role of protein kinase activity in apoptosis. *Experientia.* **52**:979-994.
- Lee KF., Li E., Huber LJ., Landis SC., Sharpe AH., Chao MV. and Jaenisch R.** (1992) Targeted mutation of the gene encoding the low affinity NGF

- receptor p75 leads to deficits in the peripheral sensory nervous system. *Cell*. **69**:737-749.
- Lee KF., Bachman K., Landis S. and Jaenisch R.** (1994) Dependence on p75 for innervation of some sympathetic targets. *Science*. **263**:1447-1449.
- Lee KF., Davies AM. and Jaenisch R.** (1994) p75-deficient embryonic dorsal root sensory and neonatal sympathetic neurons display a decreased sensitivity to NGF. *Development*. **120**:1027-1033.
- Lee SB. and Rhee SG.** (1995). Significance of PIP2 hydrolysis and regulation of phospholipase C isoenzymes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**: 183-1189.
- Leivers SJ., Paterson HF. and Marshall CJ.** (1994) Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature*. **369**:411-414.
- Leibrock J., Lottspeich F., Hohn A., Hofer M., Hengerer B., Masiakowski P., Thoenen H. and Barde YA.** (1989) Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature*. **341**:149-152.
- Leist M., Volbracht C., Fava E. and Nicotera P.** (1998) 1-Methyl-4-phenylpyridinium induces autocrine excitotoxicity, protease activation, and neuronal apoptosis. *Mol Pharmacol.* **54**:789-801.
- Le-Niculescu H., Bonfoco E., Kasuya Y., Claret FX., Green DR. and Karin M.** (1999) Withdrawal of survival factors results in activation of the JNK pathway in neuronal cells leading to Fas ligand induction and cell death. *Mol Cell Biol.* **19**:751-763.
- Levi A., Shechter Y., Neufeld EJ. and Schlessinger J.** (1980) Mobility, clustering, and transport of nerve growth factor in embryonal sensory cells and in a sympathetic neuronal cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **77**:3469-3473.
- Levi A. and Alemá S.** (1991) The mechanism of action of nerve growth factor. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **31**:205-28. Review.
- Levi G., Aloisi F., Ciotti MT. and Gallo V.** (1984) Autoradiographic localization and depolarization-induced release of acidic amino acids in differentiating cerebellar granule cell cultures. *Brain Res.* **290**:77-86.
- Lin B., Williams-Skipp C., Tao Y., Schleicher MS., Cano LL., Duke RC. and Scheinman RI.** (1999) NK- κ B functions as both a proapoptotic and antiapoptotic regulatory factor within a single cell type. *Cell Death Differ.* **6**:570-582.
- Lin KI., DiDonato JA., Hoffmann A., Hardwick JM. and Ratan RR.** (1998) Suppression of steady-state, but not stimulus-induced NF-kappaB activity inhibits alphavirus-induced apoptosis. *J Cell Biol.* **141**:1479-1487.
- Lincz LF.** (1998) Deciphering the apoptotic pathway: all roads lead to death. *Immunol Cell Biol.* **76**: 1-19.
- Lindsay RM., Wiegand SJ., Altar CA. and DiStefano PS.** (1994) Neurotrophic factors: from molecule to man. *Trends Neurosci.* **17**:182-190. Review.
- Linseman DA., Phelps RA., Bouchard RJ., Le SS., Laessig TA., McClure ML. and Heidenreich KA.** (2002) Insulin-like growth factor-I blocks Bcl-

- 2 interacting mediator of cell death (Bim) induction and intrinsic death signaling in cerebellar granule neurons. *J Neurosci.* **22**:9287-9297.
- Lizcano JM., Morrice N. and Cohen P.** (2000) Regulation of BAD by cAMP-dependent protein kinase is mediated via phosphorylation of a novel site, Ser155. *Biochem J.* **349**:547-557.
- Loeb DM., Maragos J., Martin-Zanca D., Chao MV., Parada LF. and Greene LA.** (1991) The trk proto-oncogene rescues NGF responsiveness in mutant NGF-nonresponsive PC12 cell lines. *Cell.***66**:961-966.
- Loeb DM., Tsao H., Cobb MH. and Greene LA.** (1992) NGF and other growth factors induce an association between ERK1 and the NGF receptor, gp140prototrkr. *Neuron.* **9**:1053-1065.
- Loeb DM. and Greene LA.** (1993) Transfection with trk restores "slow" NGF binding, efficient NGF uptake, and multiple NGF responses to NGF-nonresponsive PC12 cell mutants. *J Neurosci.***13**:2919-2929.
- Lonze BE., Riccio A., Cohen S. and Ginty DD.** (2002) Apoptosis, axonal growth defects, and degeneration of peripheral neurons in mice lacking CREB. *Neuron.* **34**:371-385.
- Lu B.** (2003) BDNF and activity-dependent synaptic modulation. *Learn Mem.***10**:86-98. Review.
- Lu Z., Liu D., Hornia A., Devonish W., Pagano M. and Foster DA.** (1998) Activation of protein kinase C triggers its ubiquitination and degradation. *Mol Cell Biol.* **18**:839-845.
- MacDonald JI. and Meakin SO.** (1996) Deletions in the extracellular domain of rat trkA lead to an altered differentiative phenotype in neurotrophin responsive cells. *Mol Cell Neurosci.***7**:371-390.
- Maggirwar SB, Sarmiere PD, Dewhurst S, Freeman RS.** (1998) Nerve growth factor-dependent activation of NF-kappaB contributes to survival of sympathetic neurons. *J Neurosci.* **18**:10356-10365.
- Mahadeo D., Kaplan L., Chao MV. and Hempstead BL.** (1994) High affinity nerve growth factor binding displays a faster rate of association than p140trk binding. Implications for multi-subunit polypeptide receptors. *J Biol Chem.***269**:6884-6891.
- Maisonpierre PC., Belluscio L., Squinto S., Ip NY., Furth ME., Lindsay RM. and Yancopoulos GD.**
(1990) Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science.* **247**:1446-5141.
- Majno G. and Joris I.** (1995) Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol.* **146**:3-15. Review.
- Manning KA., Erichsen JT. and Evinger C** (1990) Retrograde transneuronal transport properties of fragment C of tetanus toxin. *Neurosci.* **34**: 251-263.
- Mantamadiotis T., Lemberger T., Bleckmann SC., Kern H., Kretz O., Martin Villalba A., Tronche F., Kellendonk C., Gau D., Kapfhammer J., Otto C., Schmid W. and Schutz G.** (2002) Disruption of CREB function in brain leads to neurodegeneration. *Nat Genet.* **31**:47-54.

- Marais R., Wynne J. and Treisman R.** (1993) The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell*. **73**:381-393.
- Marte BM. and Downward J.** (1997) PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends Biochem Sci.* **22**:355-358.
- Martin-Zanca D., Hughes SH. and Barbacid M.** (1986) A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. *Nature.* **319**:743-748.
- Martin-Zanca D., Oskam R., Mitra G., Copeland T. and Barbacid M.** (1989) Molecular and biochemical characterization of the human *trk* proto-oncogene. *Mol Cell Biol.* **9**:24-33.
- Martin-Zanca D., Barbacid M. and Parada LF.** (1990) Expression of the *trk* proto-oncogene is restricted to the sensory cranial and spinal ganglia of neural crest origin in mouse development. *Genes Dev.* **4**:683-694.
- Marxen P., Fuhrmann U. and Bigalke H.** (1989) Gangliosides mediate inhibitory effects of tetanus and botulinum A neurotoxins on exocytosis in chromaffin cells. *Toxicon.* **27**:849-859.
- Mattson MP, Culmsee C, Yu Z, Camandola S.** (2000) Roles of nuclear factor kappaB in neuronal survival and plasticity. *J Neurochem* **74**:443-46. Review.
- McCormick F.** (1994) Activators and effectors of ras p21 proteins. *Curr Opin Genet Dev.* **4**:71-76. Review.
- McCroskey LM., Hatheway CL., Fenicia L., Pasolini B. and Aureli P.** (1986) Characterization of an organism that produces type E botulinum toxin but which resembles *Clostridium butyricum* from the feces of an infant with type E botulism. *J Clin Microbiol.* **23**:201-202.
- McCroskey LM., Hatheway CL., Woodruff BA., Greenberg JA. and Jurgenson P.** (1991) Type F botulism due to neurotoxicogenic *Clostridium baratii* from an unknown source in an adult. *J Clin Microbiol.* **29**:2618-2620.
- McCubrey JA., Stratford-May W., Duronio V. and Mufson A.** (2000) Serine/threonine phosphorylation in cytokine signal transduction. *Leukemia.* **14**:9-21.
- McDonald N., Lappato R., Murray-Rust J., Gunning J., Wlodower A. and Blundell TL.** (1991) New protein fold revealed by a 2.3-Å resolution crystal structure of nerve growth factor. *Nature.* **354**: 411-414.
- Meakin SO. and Shooter EM.** (1991) Molecular investigations on the high-affinity nerve growth factor receptor. *Neuron.* **6**:153-163.
- Meakin SO. and Shooter EM.** (1991) Tyrosine kinase activity coupled to the high-affinity nerve growth factor-receptor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**:5862-5866.
- Meakin SO. and Shooter EM.** (1992) The nerve growth factor family of receptors. *Trends Neurosci.* **15**:323-331. Review.
- Meckler RL., Baron R. and McLachlan EM.** (1990) Selective uptake of C-fragment of tetanus toxin by sympathetic preganglionic nerve terminals. *Neuroscience* **36**: 823-829.

- Meier P. and Evan G.** (1998) Dying like flies. *Cell*. **95**:295-298. Review.
- Menestrina G., Forti S. and Gambale F.** (1989) Interaction of tetanus toxin with lipid vesicles. Effects of pH, surface charge, and transmembrane potential on the kinetics of channel formation. *Biophys J*. **55**:393-405.
- Merlio JP., Ernfors P., Kokaia Z., Middlemas DS., Bengzon J., Kokaia M., Smith ML., Siesjo BK., Hunter T. and Lindvall O.** (1993) Increased production of the TrkB protein tyrosine kinase receptor after brain insults. *Neuron*.**10**:151-164.
- Meyer-Franke A., Wilkinson GA., Kruttgen A., Hu M., Munro E., Hanson MG Jr., Reichardt LF. and Barres BA.** (1998) Depolarization and cAMP elevation rapidly recruit TrkB to the plasma membrane of CNS neurons. *Neuron*. **21**:681-693.
- Middlemas DS., Lindberg RA. and Hunter T.** (1991) trkB, a neural receptor protein-tyrosine kinase: evidence for a full-length and two truncated receptors. *Mol Cell Biol*.**11**:143-153.
- Miller TM., Tansey MG., Johnson EM Jr. and Creedon DJ.** (1997) Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity blocks depolarization- and insulin-like growth factor I-mediated survival of cerebellar granule cells. *J Biol Chem*. **272**:9847-9853.
- Mochida S., Saisu H., Kobayashi H. and Abe T.** (1995) Impairment of syntaxin by botulinum neurotoxin cl, or antibodies inhibits acetylcholine release but not Ca²⁺ channel activity. *Neuroscience*.**65**: 905-915. *Mol Cell Neurosci*. **6**:97-105.
- Montecucco C.** (1986) How do tetanus and botulinum toxin bind to neuronal membranes? *Trends Biochem Sci*. **11**: 314-317.
- Montecucco C., Papini E., Schiavo G., Padovan E. and Rossetto O.** (1992) Ion channel and membrane translocation of diphtheria toxin. *FEMS Microbiol Immunol*. **5**:101-111. Review.
- Montecucco C. and Schiavo G.** (1995) Structure and function of tetanus and botulinum neurotoxins. *Q Rev Biophys*. **28**: 423-72.
- Montesano R., Roth J., Robert A. and Orci I.** (1982) Non-coated membrane invaginations are involved in binding and internalisation of cholera and tetanus toxins. *Nature*. **296**: 651-653.
- Moore AN., Waxham MN. and Dash PK.** (1996) Neuronal activity increases the phosphorylation of the transcription factor cAMP response element-binding protein (CREB) in rat hippocampus and cortex. *J Biol Chem*. **271**:14214-14220.
- Mora A., Sabio G., Gonzalez-Polo RA., Cuenda A., Alessi DR., Alonso JC., Fuentes JM., Soler G. and Centeno F.** (2001) Lithium inhibits caspase 3 activation and dephosphorylation of PKB and GSK3 induced by K⁺ deprivation in cerebellar granule cells. *J Neurochem*. **78**:199-206.
- Morrison DK., Heidecker G., Rapp UR. and Copeland TD.** (1993) Identification of the major phosphorylation sites of the Raf-1 kinase. *J Biol Chem*. **268**:17309-17316.

- Mosmann T.** (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. **65**:55-63.
- Muller M., Strand S., Hug H., Heinemann EM., Walczak H., Hofmann WJ., Stremmel W., Krammer PH. and Galle PR.** (1997) Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. *J Clin Invest* **99**:403-413.
- Murata M., Nagai M., Fujita M., Ohmori M. and Takahara J.** (1997) Calphostin C synergistically induces apoptosis with VP-16 in lymphoma cells which express abundant phosphorylated Bcl-2 protein. *Cell Mol Life Sci*. **53**:737-743.
- Muroya K, Hattori S, Nakamura S.** (1992) Nerve growth factor induces rapid accumulation of the GTP-bound form of p21ras in rat pheochromocytoma PC12 cells. *Oncogene*. **7**:277-281.
- Murray NR. and Fields AP.** (1997) Atypical protein kinase C iota protects human leukemia cells against drug-induced apoptosis. *J Biol Chem*. **272**:27521-27524.
- Najib A., Pelliccioni P., Gil C. and Aguilera J.** (1999) Clostridium neurotoxins influence serotonin uptake and release differently in rat brain synaptosomes. *J Neurochem*. **72**:1991-1998.
- Najib A., Pelliccioni P., Gil C. and Aguilera J.** (2000) Serotonin transporter phosphorylation modulated by tetanus toxin. *FEBS Lett*. **486**:136-142.
- Nakagawara A., Arima-Nakagawara M., Scavarda NJ., Azar CG., Cantor AB. and Brodeur GM.** (1993) Association between high levels of expression of the TRK gene and favourable outcome in human neuroblastoma. *N Engl J Med*. **328**:847-854.
- Nakagawara A., Azar CG., Scavarda NJ. and Brodeur GM.** (1994) Expression and function of Trk-B and BDNF in human neuroblastomas. *Mol. Cell Biol*. **14**, 759-767.
- Nardi N., Avidan G., Daily D., Zilkha-Falb R. and Barzilai A.** (1997) Biochemical and temporal analysis of events associated with apoptosis induced by lowering the extracellular potassium concentration in mouse cerebellar granule neurons. *J Neurochem*. **68**:750-759.
- Neri LM., Milani D., Bertolaso L., Stroschio M., Bertagnolo V. and Capitani S.** (1994) Nuclear translocation of phosphatidylinositol 3-kinase in rat pheochromocytoma PC 12 cells after treatment with nerve growth factor. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. **40**:619-626.
- Nevins JR.** (1992) E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science*. **258**:424-429.
- New L., Zhao M, Li Y., Bassett WW., Feng Y., Ludwig S., Padova FD., Gram H. and Han J.** (1999) Cloning and characterization of RLPK, a novel RSK-related protein kinase. *J Biol Chem*. **274**:1026-1032.
- Ng NF. and Shooter EM.** (1993) Activation of p21ras by nerve growth factor in embryonic sensory neurons and PC12 cells. *J Biol Chem*. **268**:25329-25333.

- Nishida E. and Gotoh Y.** (1993) The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends Biochem Sci.* **18**:128-131. Review.
- Nishizuka Y.** (1995) Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* **9**: 484-496.
- Nobes CD. and Tolkovsky AM.** (1995) Neutralizing anti-p21ras Fabs suppress rat sympathetic neuron survival induced by NGF, LIF, CNTF and cAMP. *Eur J Neurosci.* **7**:344-350.
- Nonomura T., Kubo T., Oka T., Shimoke K., Yamada M., Enokido Y. and Hatanaka H.** (1996) Signaling pathways and survival effects of BDNF and NT-3 on cultured cerebellar granule cells. *Dev. Brain Res.* **97**, 42-50.
- Nuñez G, del Peso L** (1998) Linking extracellular survival signals and the apoptotic machinery. *Cur Opin Neurobiol.* **8**:613-618.
- Nusse R.** (1997) A versatile transcriptional effector of Wntless signaling. *Cell.* **89**:321-323.
- O'Hare MJ., Hou ST., Morris EJ., Cregan SP., Xu Q., Slack RS. and Park DS.** (2000) Induction and modulation of cerebellar granule neuron death by E2F-1. *J Biol Chem.* **275**:25358-25364.
- Obermeier A., Halfter H., Wiesmuller KH., Jung G., Schlessinger J. and Ullrich A.** (1993) Tyrosine 785 is a major determinant of Trk--substrate interaction. *EMBO J.* **12**:933-941.
- Obermeier A., Lammers R., Wiesmuller KH., Jung G., Schlessinger J. and 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**:22963-22966.
- Ohmichi M., Decker SJ. and Saltiel AR.** (1992) Activation of phosphatidylinositol-3 kinase by nerve growth factor involves indirect coupling of the trk proto-oncogene with src homology 2 domains. *Neuron.* **9**:769-777.
- Ohmichi M., Decker SJ., Pang L. and Saltiel AR.** (1992) Inhibition of the cellular actions of nerve growth factor by staurosporine and K252A results from the attenuation of the activity of the trk tyrosine kinase. *Biochemistry.* **31**:4034-4039.
- Ohmichi M., Pang L., Ribon V., Gazit A., Levitzki A. and Saltiel AR.** (1993) The tyrosine kinase inhibitor tyrphostin blocks the cellular actions of nerve growth factor. *Biochemistry.* **32**:4650-4658.
- Oppenheim RW.** (1989) The neurotrophic theory and naturally occurring motoneuron death. *Trends Neurosci.* **12**:252-255. Review.
- Papini E., Rappuoli R., Murgia M. and Montecucco C.** (1993) Cell penetration of diphtheria toxin. Reduction of the interchain disulfide bridge is the rate-limiting step of translocation in the cytosol. *J Biol Chem.* **268**:1567-1574.
- Park JH. and Levitt L.** (1993) Overexpression of mitogen-activated protein kinase (ERK1) enhances T-cell cytokine gene expression: role of AP1, NF-AT, and NF-KB. *Blood.* **82**:2470-2477.

- Parton RG., Ocleford CD. and Critchley DR.** (1987). A study of the mechanism of internalisation of tetanus toxin by primary mouse spinal cord cultures. *J. Neurochem.* **49**: 1057-1068.
- Patapoutian A. and Reichardt LF.** (2001) Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol.* **11**:272-280. Review.
- Patil N., Lacy E. and Chao MV.** (1990) Specific neuronal expression of human NGF receptors in the basal forebrain and cerebellum of transgenic mice. *Neuron.* **4**:437-447.
- Payne DM., Rossomando AJ., Martino P., Erickson AK., Her JH., Shabanowitz J., Hunt DF., Weber MJ. and Sturgill TW.** (1991) Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J.* **10**:885-892.
- Pelicci G., Lanfrancone L., Grignani F., McGlade J., Cavallo F., Forni G., Nicoletti I., Grignani F., Pawson T. and Pelicci PG.** (1992) A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell.* **70**:93-104.
- Pelliccioni P., Gil C., Najib A., Sarri E., Picatoste F. and Aguilera J.** (2001) Tetanus toxin modulates serotonin transport in rat-brain neuronal cultures. *J Mol Neurosci.* **17**:303-310.
- Peraldi P., Frodin M., Barnier JV., Calleja V., Scimeca JC., Filloux C., Calothy G. and Van Obberghen E.** (1995) Regulation of the MAP kinase cascade in PC12 cells: B-Raf activates MEK-1 (MAP kinase or ERK kinase) and is inhibited by cAMP. *FEBS Lett.* **357**:290-296.
- Peréz P., Coll PM., Hempstead BL., Martin-Zanca D. and Chao MV.** (1995) NGF binding to the trk tyrosine kinase receptor requires the extracellular immunoglobulin-like domains.
- Philpott DJ., Yamaoka S., Israel A. and Sansonetti PJ.** (2000) Invasive *Shigella flexneri* activates NF-kappa B through a lipopolysaccharide-dependent innate intracellular response and leads to IL-8 expression in epithelial cells. *J Immunol.* **165**:903-914.
- Piccione E., Case RD., Domchek SM., Hu P., Chaudhuri M., Backer JM., Schlessinger J. and Shoelson SE.** (1993) Phosphatidylinositol 3-kinase p85 SH2 domain specificity defined by direct phosphopeptide/SH2 domain binding. *Biochemistry.* **32**:3197-3202.
- Pike LJ.** (2003) Lipid rafts: bringing order to chaos. *Journal of Lipid Research.* **44**: 655-667.
- Ramsay RR., Dadgar J., Trevor A. and Singer TP.** (1986) Energy-driven uptake of N-methyl-4-phenylpyridine by brain mitochondria mediates the neurotoxicity of MPTP. *Life Sci.* **39**:581-588.
- Reed JC.** (1994) Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol.* **124**:1-6. Review.
- Rhee SG. and Choi KD.** (1992) Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isozymes. *J Biol Chem.* **267**:12393-12396. Review.
- Riccio A., Ahn S., Davenport CM., Blendy JA. and Ginty DD.** (1999) Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons. *Science.* **286**:2358-2361.

- Rodriguez-Tebar A., Dechant G., Gotz R. and Barde YA.** (1992) Binding of neurotrophin-3 to its neuronal receptors and interactions with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *EMBO J.* **11**:917-922.
- Rodriguez-Viciano P., Warne PH., Dhand R., Vanhaesebroeck B., Gout I., Fry MJ., Waterfield MD. and Downward J.** (1994) Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature.* **370**:527-532.
- Rohrer H., Heumann R. and Thoenen H.** (1988) The synthesis of nerve growth factor (NGF) in developing skin is independent of innervation. *Dev Biol.* **128**:240-244.
- Rommel C., Clarke BA., Zimmermann S., Nunez L., Rossman R., Reid K., Moelling K., Yancopoulos GD. and Glass DJ.** (1999) Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt. *Science.* **286**:1738-1741.
- Rosenfeld R., Philo JS., Haniu M., Stoney K., Rohde MF., Wu GM., Narhi LO., Wong C., Boone T. and Hawkins NN.** (1993) Sites of iodination in recombinant human brain-derived neurotrophic factor and its effect on neurotrophic activity. *Protein Sci.* **2**:1664-1674.
- Rozakis-Adcock M., McGlade J., Mbamalu G., Pelicci G., Daly R., Li W., Batzer A., Thomas S., Brugge J. and Pelicci PG.** (1992) Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases. *Nature.* **360**:689-692.
- Rummel A., Bade S., Alves J., Bigalke H. and Binz T.** (2003) Two carbohydrate binding sites in the H(CC)-domain of tetanus neurotoxin are required for toxicity. *J Mol Biol.* **326**:835-847.
- Ryden M., Murray-Rust J., Glass D., Ilag LL., Trupp M., Yancopoulos GD., McDonald NQ. and Ibáñez CF.** (1995) Functional analysis of mutant neurotrophins deficient in low-affinity binding reveals a role for p75LNGFR in NT-4 signalling. *EMBO J.* **14**:1979-1990.
- Sachs L. and Lotem J.** (1993) Control of programmed cell death in normal and leukemic cells: new implications for therapy. *Blood* **82**: 15 – 21. Review.
- Sala C., Rudolph-Correia S. and Sheng M.** (2000) Developmentally regulated NMDA receptor-dependent dephosphorylation of cAMP response element-binding protein (CREB) in hippocampal neurons. *J Neurosci.* **20**:3529-3536.
- Sánchez V., Lucas M., Sanz A. and Goberna R.** (1992) Decreased protein kinase C activity is associated with programmed cell death (apoptosis) in freshly isolated rat hepatocytes. *Biosci Report.* **12**:199-206.
- Sandvig K., Garred O., Prydz K., Kozlov JV., Hansen SH. and van Deurs B.** (1992) Retrograde transport of endocytosed Shiga toxin to the endoplasmic reticulum. *Nature.* **358**:510-512.
- Saporito MS., Thomas BA. and Scott RW.** (2000) MPTP activates c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK) and its upstream regulatory kinase MKK4 in nigrostriatal neurons in vivo. *J Neurochem.* **75**:1200-1208.
- Scheid MP. and Duronio V.** (1998) Dissociation of cytokine-induced phosphorylation of Bad and activation of PKB/akt: involvement of MEK

- upstream of Bad phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**:7439-7444.
- Schiavo G., Papini E., Genna G. and Montecucco C.** (1990) An intact interchain disulfide bond is required for the neurotoxicity of tetanus toxin. *Infect Immun.* **58**:4136-4141.
- Schiavo G., Demel R. and Montecucco C.** (1991) On the role of polysialoglycosphingolipids as tetanus toxin receptors. A study with lipid monolayers. *Eur J Biochem.***199**:705-711.
- Schiavo G., Ferrari G., Rosetto O. and Montecucco C.** (1991) Tetanus toxin receptor. Specific cross-linking of tetanus toxin receptors. A study with lipid monolayers. *Eur. J. Biochem.* **199**: 705-711.
- Schlessinger J. and Ullrich A.** (1992) Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases.
- Schneider R. and Schweiger M.** (1991) A novel modular mosaic of cell adhesion motifs in the extracellular domains of the neurogenic trk and trkB tyrosine kinase receptors. *Oncogene.***6**:1807-1811.
- Scott AB.** (1980) Botulinum toxin injection into extraocular muscles as an alternative to strabismus surgery. *Ophthalmology.* **87**:1044-1049.
- Scott AB.** (1980) Botulinum toxin injection into extraocular muscles as an alternative to strabismus surgery. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus.* **17**:21-25.
- Scott AB.** (1981) Botulinum toxin injection of eye muscles to correct strabismus. *Trans Am Ophthalmol Soc.* **79**:734-770. Review.
- Schouten GJ., Vertegaal AC., Whiteside ST., Israel A., Toebes M., Dorsman JC., vander Eb AJ. and Zantema A.** (1997) IkappaB alpha is a target for the mitogen-activated 90 kDa ribosomal S6 kinase. *EMBO J.* **16**:3133-3144.
- Schulz JB., Weller M. and Klockgether T.** (1996) Potassium deprivation-induced apoptosis of cerebellar granule neurons: a sequential requirement for new mRNA and protein synthesis, ICE-like protease activity, and reactive oxygen species. *J Neurosci.* **16**:4696-4706.
- Schwab ME., Suda K. and Thoenen H.** (1979) Selective retrograde transsynaptic transfer of a protein, tetanus toxin, subsequent to its retrograde axonal transport. *J. Cell Biol.* **82**: 798-810.
- Schwab ME., Heumann R. and Thoenen H.** (1982) Communication between target organs and nerve cells: retrograde axonal transport and site of action of nerve growth factors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.***46** :125-34.
- Segal RA. and Greenberg ME.** (1996) Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci.***19**:463-489. Review.
- Shapiro RE., Specht CD., Collins BE., Woods AS., Cotter RJ. and Schnaar RL.** (1997) Identification of a ganglioside recognition domain of tetanus toxin using a novel ganglioside photoaffinity ligand. *J Biol Chem.***272**:30380-30386.
- Shelton DL. and Reichardt LF.** (1986) Studies on the expression of the beta nerve growth factor (NGF) gene in the central nervous system: level and regional distribution of NGF mRNA suggest that NGF functions as a

- trophic factor for several distinct populations of neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **83**:2714-2718.
- Shelton DL., Sutherland J., Gripp J., Camerato T., Armanini MP., Phillips HS., Carroll K., Spencer SD. and Levinson AD.** (1995) Human trks: molecular cloning, tissue distribution, and expression of extracellular domain immunoadhesins. *J Neurosci*. **15**:477-491.
- Shieh PB. and Ghosh A.** (1999) Molecular mechanisms underlying activity-dependent regulation of BDNF expression. *J Neurobiol.* **41**:127-134. Review.
- Shimoke K., Kubo T., Numakawa T., Abiru Y., Enokido Y., Takei N., Ikeuchi T. and Hatanaka H.** (1997) Involvement of phosphatidylinositol-3 kinase in prevention of low K(+)-induced apoptosis of cerebellar granule neurons. *Brain Res Dev Brain Res.* **101**:197-206.
- Shimoke K. and Kudo M.** (2002) 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine has a transient proliferative effect on PC12h cells and nerve growth factor additively promotes this effect: possible involvement of distinct mechanisms of activation of MAP kinase family proteins. *Brain Res Dev Brain Res.* **133**:105-114.
- Shone CC., Hambleton P. and Melling J.** (1987) A 50-kDa fragment from the NH₂-terminus of the heavy subunit of Clostridium botulinum type A neurotoxin forms channels in lipid vesicles. *Eur J Biochem.* **167**:175-180.
- Simpson LL.** (1980) Kinetic studies on the interaction between botulinum toxin type A and the cholinergic neuromuscular junction. *J Pharmacol Exp Ther.* **212**:16-21.
- Simpson LL.** (1983) Ammonium chloride and methylamine hydrochloride antagonize clostridial neurotoxins. *J Pharmacol Exp Ther.* **225**:546-552.
- Skaper SD., Floreani M., Negro A., Facci L. and Giusti P.** (1998) Neurotrophins rescue cerebellar granule neurons from oxidative stress-mediated apoptotic death: selective involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurochem.* **70**:1859-1868.
- Skolnik EY., Margolis B., Mohammadi M., Lowenstein E., Fischer R., Drepps A., Ullrich A. and Schlessinger J.** (1991) Cloning of PI3 kinase-associated p85 utilizing a novel method for expression/cloning of target proteins for receptor tyrosine kinases. *Cell.* **65**:83-90.
- Smeyne RJ., Klein R., Schnapp A., Long LK., Bryant S., Lewin A., Lira SA. and Barbacid M.** (1994) Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene. *Nature.* **368**:246-249.
- Smith AP., Greene LA., Fish HR., Varon S. and Shooter EM.** (1969) Subunit equilibria of the 7S nerve growth factor protein. *Biochemistry.* **8**:4918-4926.
- Sohur US., Chen CL., Hicks DJ., Yull FE. and Kerr LD.** (2000) Nuclear factor-kappaB/Rel is apoptogenic in cytokine withdrawal-induced programmed cell death. *Cancer Res.* **60**:1202-1205.
- Soltoff SP., Rabin SL., Cantley LC. and Kaplan DR.** (1992) Nerve growth factor promotes the activation of phosphatidylinositol 3-kinase and its association with the trk tyrosine kinase. *J Biol Chem.* **267**:17472-17477.

- Spiegel S., Foster D. and Kolesnick R.** (1996) Signal transduction through lipid second messengers. 1 *Curr Opin Cell Biol* **8**:159-167. Review.
- Srinivasula SM., Ahmad M., Fernandes-Alnemri T. and Alnemri ES.** (1998) Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol.Cell.* **1**:949-957.
- Srivastava AK. and Pandey SK.** (1998) Potential mechanism(s) involved in the regulation of glycogen synthesis by insulin. *Mol Cell Biochem.***182**:135-141. Review.
- Stanger BZ., Leder P., Lee TH., Kim E. and Seed B.** (1995) RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell.* **81**:513-523.
- Staub GC., Walton KM., Schnaar RL., Nichols T., Baichwal R., Sandberg K. and Rogers TB.** (1986) Characterization of the binding and internalization of tetanus toxin in a neuroblastoma hybrid cell line. *J Neurosci.***6**:1443-1451.
- Stephens RM., Loeb DM., Copeland TD., Pawson T., Greene LA. and Kaplan DR.** (1994) Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLC-gamma 1 to mediate NGF responses. *Neuron.***12**:691-705.
- Stöckel K., Schwab M. and Thonen H.** (1975) Comparison between the retrograde axonal transport of nerve growth factor and tetanus toxin in motor, sensory and adrenergic factor and tetanus toxin in motor, sensory and adrenergic neurons. *Brain Res.* **99**: 1-16.
- Stokoe D., Macdonald SG., Cadwallader K., Symons M. and Hancock JF.** (1994) Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane. *Science.* **264**:1463-1467.
- Strohmaier C., Carter BD., Urfer R., Barde YA. and Dechant G.** (1996) A splice variant of the neurotrophin receptor trkB with increased specificity for brain-derived neurotrophic factor. *EMBO J.***15**:3332-3337.
- Su B. and Karin M.** (1996) Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Curr Opin Immunol.* **8**:402-411. Review.
- Südhof TC. and Jahn R.** (1991) Proteins of synaptic vesicles involved in exocytosis and membrane recycling. *Neuron.***6**:665-677. Review.
- Südhof TC.** (1995) The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature.***375**:645-653. Review.
- Sutherland C., Leighton IA. and Cohen P.** (1993) Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochem J.* **296** :15-19.
- Sutherland C. and Cohen P.** (1994) The alpha-isoform of glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle is inactivated by p70 S6 kinase or MAP kinase-activated protein kinase-1 in vitro. *FEBS Lett.* **338**:37-42.
- Sutton RB., Fasshauer D., Jahn R. and Brunger AT.** (1998) Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature.* **395**:347-353.

- Szeberenyi J., Erhardt P., Cai H. and Cooper GM.** (1992) Role of Ras in signal transduction from the nerve growth factor receptor: relationship to protein kinase C, calcium and cyclic AMP. *Oncogene*. **7**:2105-2113.
- Tagliabata G., Hibbert CJ., Hutton LA., Werrbach-Perez K. and Perez-Polo JR.** (1996) Suppression of p140trkA does not abolish nerve growth factor-mediated rescue of serum-free PC12 cells. *J Neurochem*. **66**:1826-1835.
- Takai Y., Kishimoto A., Inoue M. and Nishizuka Y.** (1977) Studies on acyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. I. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum. *J. Biol. Chem.* **252**: 7603-7609.
- Takai Y., Kishimoto A., Kikkawa U., Mori T. and Nishizuka Y.** (1979) Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **91**: 1218-1224.
- Tanaka K., Nagata E., Suzuki S., Dembo T., Nogawa S. and Fukuuchi Y.** (1999) Immunohistochemical analysis of cyclic AMP response element binding protein phosphorylation in focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* **818**:520-526.
- Taniuchi M., Clark HB., Schweitzer JB. and Johnson EM Jr.** (1988) Expression of nerve growth factor receptors by Schwann cells of axotomized peripheral nerves: ultrastructural location, suppression by axonal contact, and binding properties. *J Neurosci.* **8**:664-681.
- Tatton NA. and Kish SJ.** (1997) In situ detection of apoptotic nuclei in the substantia nigra compacta of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice using terminal deoxynucleotidyl transferase labelling and acridine orange staining. *Neuroscience.* **77**:1037-1048.
- Taubenfeld SM., Wiig KA., Bear MF. and Alberini CM.** (1999) A molecular correlate of memory and amnesia in the hippocampus. *Nat Neurosci.* **2**:309-310.
- Thoenen H. and Barde YA.** (1980) Physiology of nerve growth factor. *Physiol Rev.* **60**:1284-1335. Review.
- Thoenen H.** (1991) The changing scene of neurotrophic factors. *Trends Neurosci.* **14**:165-170
- Thompson CB.** (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* **267**: 1456-1462.
- Thornberry NA.** (1998) Caspases: key mediators of apoptosis. *Chem Biol.* **5**:R97-103. Review.
- Thornberry NA. and Lazebnik Y.** (1998) Caspases: enemies within. *Science.* **281**:1312-1316. Review.
- Timm DE., Ross AH. and Neet KE.** (1994) Circular dichroism and crosslinking studies of the interaction between four neurotrophins and the extracellular domain of the low-affinity neurotrophin receptor. *Protein Sci.* **3**:451-458.
- Ting AT., Pimentel-Muinos FX. and Seed B.** (1996) RIP mediates tumor necrosis factor receptor 1 activation of NF-kappaB but not Fas/APO-1-initiated apoptosis. *EMBO J.* **15**:6189-6196.

- Toker A., Meyer M., Reddy KK., Falck JR., Aneja R., Aneja S., Parra A., Burns DJ., Ballas LM. and Cantley LC.** (1994) Activation of protein kinase C family members by the novel polyphosphoinositides PtdIns-3,4-P2 and PtdIns-3,4,5-P3. *J Biol Chem.* **269**:32358-32367.
- Traverse S. and Cohen P.** (1994) Identification of a latent MAP kinase kinase in PC12 cells as B-raf. *FEBS Lett.* **350**:13-18.
- Treanor JJ., Schmelzer C., Knusel B., Winslow JW., Shelton DL., Hefti F., Nikolics K. and Burton LE.** (1995) Heterodimeric neurotrophins induce phosphorylation of Trk receptors and promote neuronal differentiation in PC12 cells. *J Biol Chem.* **270**:23104-23110.
- Troy CM., Stefanis L, Prochiantz A., Greene LA. and Shelanski ML.** (1996) The contrasting roles of ICE family proteases and interleukin-1beta in apoptosis induced by trophic factor withdrawal and by copper/zinc superoxide dismutase down-regulation. *Proc Natl Acad Sci USA.* **93**: 5635-5640.
- Tsujimoto Y., Finger LR., Yunis J., Nowell PC. and Croce CM.** (1984) Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science.* **226**:1097-1099.
- Tsujimoto Y., Cossman J., Jaffe E. and Croce CM.** (1985) Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science.* **228**:1440-1443.
- Tully T.** (1997) Regulation of gene expression and its role in long-term memory and synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**:4239-4241.
- Ullrich A. and Schlessinger J.** (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell.* **61**:203-212. Review.
- Umland TC., Wingert LM., Swaminathan S., Furey WF., Schmidt JJ. and Sax M.** (1997) Structure of the receptor binding fragment HC of tetanus neurotoxin. *Nat Struct Biol.* **4**:788-792.
- Urfer R., Tsoulfas P., Soppet D., Escandon E., Parada LF. and Presta LG.** (1994) The binding epitopes of neurotrophin-3 to its receptors trkC and gp75 and the design of a multifunctional human neurotrophin. *EMBO J.* **13**: 5896-5909
- Van Heyningen W.E.** (1963). The fixation of tetanus toxin, strychnine, serotonin and other substances by ganglioside. *J. Gen. Microbiol.* **31**: 375-389.
- Vander Heiden MG. and Thompson CB.** (1999) Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nat Cell Biol.* **1**:E209-16. Review.
- Vanhaesebroeck B. and Alessi DR.** (2000) The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J.* **346**:561-576. Review.
- Vaux DL., Haecker G. and Strasser A.** (1994) An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* **76**: 777-788.
- Vaux DL. and Korsmeyer SJ.** (1999) Cell death in development. *Cell.* **96**:245-254. Review.
- Vila M., Jackson-Lewis V., Vukosavic S., Djaldetti R., Liberatore G., Offen D., Korsmeyer SJ. and Przedborski S.** (2001) Bax ablation prevents dopaminergic neurodegeneration in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-

- tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**:2837-2842.
- Villalba M., Bockaert J. and Journot L.** (1997) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP-38) protects cerebellar granule neurons from apoptosis by activating the mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) pathway. *J Neurosci.* **17**:83-90.
- Vojtek AB. and Der CJ.** (1998) Increasing complexity of the Ras signaling pathway. *J Biol Chem.* **273**:19925-19928. Review.
- von Bartheld CS., Williams R., Lefcort F., Clary DO., Reichardt LF., 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**:2995-3008.
- Wadsworth JD., Desai M., Tranter HS., King HJ., Hambleton P, Melling J., Dolly JO. and Shone CC.** (1990) Botulinum type F neurotoxin. Large-scale purification and characterization of its binding to rat cerebrocortical synaptosomes. *Biochem J.* **268**:123-128.
- Walton M., Woodgate AM., Muravlev A., Xu R., During MJ. and Dragunow M.** (1999) CREB phosphorylation promotes nerve cell survival. *J Neurochem.* **73**:1836-1842.
- Walton MR. and Dragunow I.** (2000) Is CREB a key to neuronal survival? *Trends Neurosci.* **23**:48-53. Review.
- Wang CY., Cusack JC Jr., Liu R. and Baldwin AS Jr.** (1999) Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kappaB. *Nature Med.* **5**:412-417.
- Wang J., Auger KR., Jarvis L., Shi Y. and Roberts TM.** (1995) Direct association of Grb2 with the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem.* **270**:12774-12780.
- Watson A., Eilers A., Lallemand D., Kyriakis J., Rubin LL. and Ham J.** (1998) Phosphorylation of c-Jun is necessary for apoptosis induced by survival signal withdrawal in cerebellar granule neurons. *J Neurosci.* **18**:751-762.
- Welsh GI. and Proud CG.** (1993) Glycogen synthase kinase-3 is rapidly inactivated in response to insulin and phosphorylates eukaryotic initiation factor eIF-2B. *Biochem J.* **294** :625-629.
- Weng G., Markus MA., Markus A., Winkler A. and Borasio GD.** (1996) p21ras supports the survival of chick embryonic motor neurones. *Neuroreport.* **7**:1077-1081.
- Widmer HR., Kaplan DR., Rabin SJ., Beck KD., Hefti F. and Knusel B.** (1993) Rapid phosphorylation of phospholipase C gamma 1 by brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in cultures of embryonic rat cortical neurons. *J Neurochem.* **60**:2111-2123.
- Wiesmuller L. and Wittinghofer F.** (1994) Signal transduction pathways involving Ras. Mini review. *Cell Signal.* **6**:247-267. Review.
- Williamson LC. and Neale EA.** (1994) Bafilomycin A1 inhibits the action of tetanus toxin in spinal cord neurons in cell culture. *J Neurochem.* **63**:2342-1345.

- Williamson LC., Bateman KE., Clifford JC. and Neale EA.** (1999) Neuronal sensitivity to tetanus toxin requires gangliosides. *J Biol Chem.* **274**:25173-25180.
- Wolf BB. and Green DR.** (1999) Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem.* **274**: 20049-20052.
- Wolfman A. and Macara IG.** (1990) A cytosolic protein catalyzes the release of GDP from p21ras. *Science.* **248**:67-69.
- Wong EV., Schaefer AW., Landreth G. and Lemmon V.** (1996) Involvement of p90rsk in neurite outgrowth mediated by the cell adhesion molecule L1. *J Biol Chem.* **271**:18217-18223.
- Wonnacott S. and Marchbanks RM.** (1976) Inhibition by botulinum toxin of depolarization-evoked release of (¹⁴C)acetylcholine from synaptosomes in vitro. *Biochem J.* **156**:701-712.
- Wu CL., Classon M., Dyson N. and Harlow E.** (1996) Expression of dominant-negative mutant DP-1 blocks cell cycle progression in G1. *Mol Cell Biol.* **16**:3698-3706.
- Xia Z., Dickens M., Raingeaud J., Davis RJ. and Greenberg ME.** (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science.* **270**:1326-1331.
- Xing J., Ginty DD. and Greenberg ME.** (1996) Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science.* **273**:959-963.
- Yamagishi S., Matsumoto T., Yokomaku D., Hatanaka H., Shimoke K., Yamada M. and Ikeuchi T.** (2003) Comparison of inhibitory effects of brain-derived neurotrophic factor and insulin-like growth factor on low potassium-induced apoptosis and activation of p38 MAPK and c-Jun in cultured cerebellar granule neurons. *Brain Res Mol Brain Res.* **119**:184-191.
- Yan Q., Elliott JL., Matheson C., Sun J., Zhang L., Mu X., Rex KL. and Snider WD.** (1993) Influences of neurotrophins on mammalian motoneurons in vivo. *J Neurobiol.* **24**:1555-1577.
- Yang J., Liu X., Bhalla K., Kim CN., Ibrado AM., Cai J., Peng TI., Jones DP. and Wang X.** (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science.* **275**:1129-1132.
- Yavin E., Yavin Z., Habing WH., Hardegree MC. and Kohn LD.** (1981). Tetanus toxin association with developing neuronal cell cultures. Kinetic parameters and evidence for ganglioside-mediated internalization. *J. Biol. Chem.* **256**: 7014-7022.
- Zha J., Harada H., Yang E., Jockel J. and Korsmeyer SJ.** (1996) Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L) *Cell.* **87**:619-628.
- Zhang HM, Yuan J, Cheung P, Luo H, Yanagawa B, Chau D, Stephan-Tozy N, Wong BW, Zhang J, Wilson JE, McManus BM, Yang D.** (2003) Overexpression of interferon-gamma-inducible GTPase inhibits coxsackievirus B3-induced apoptosis through the activation of the

phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and inhibition of viral replication. *J Biol Chem.* **278**:33011-33019.

Zhao Y., Bjorbaek C., Weremowicz S., Morton CC. and Moller DE. (1995) RSK3 encodes a novel pp90rsk isoform with a unique N-terminal sequence: growth factor-stimulated kinase function and nuclear translocation. *Mol Cell Biol.* **15**:4353-4363.

Zhao Y, Bjorbaek C, Moller DE. (1996) Regulation and interaction of pp90(rsk) isoforms with mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem.* 1996 Nov 22;271(47):29773-9.

Zhong J., Deng J., Huang S., Yang X. and Lee WH. (2004) High K⁺ and IGF-1 protect cerebellar granule neurons via distinct signalling pathways. *J Neurosci Res.* **75**:794-806.

Zirrgiebel U. and Lindholm D. (1996) Constitutive phosphorylation of TrkC receptors in cultured cerebellar granule neurons might be responsible for the inability of NT-3 to increase neuronal survival and to activate p21 Ras. *Neurochem Res.* **21**:851-859.

Agradecimientos

Agradecimientos

Por fin los agradecimientos. La primera página que lee todo el mundo pero la última que he escrito yo. El trabajo ya está hecho, y sólo queda dejar constancia de todo lo que debo a tanta gente. Por otra parte, como no he sido nunca capaz de escribir algo original sobre agradecimientos, no me preocuparé de que quede una página única e interesante. Sólo intentaré transmitir mis sentimientos hacia todos los que han hecho posible que esté ahora terminando este trabajo.

Para casi todos los que hacemos algo relacionado con la investigación, es fundamental una labor colectiva, aunque muchas veces los que han contribuido no sean en absoluto conscientes de ello, y lo mismo ocurre con los que no han contribuido. En el caso de esta tesis, debería decir que he sido yo sola quien he dado forma concreta a un esfuerzo realizado durante cuatro años.

En primer lugar, y no por ello más o menos importante, le agradezco a José Aguilera por dejarme formar parte de su grupo, por darme la oportunidad de hacer esta Tesis, por confiar plenamente en mis capacidades y por sus consejos literarios.

A Carles Gil, por haberme enseñado lo básico que se puede saber en un laboratorio para poder arrancar.

De forma especial quiero agradecer a todos mis compañeros del departamento, pasados y presentes, su apoyo, amistad, compañía, haber hecho más agradable el trabajo cotidiano, recordándoles que *sólo se pierde la lucha que se abandona*. Sin ellos, estos años habrían sido muy diferentes.

Agradecimientos

También quiero recordar a mis compañeros que ya se fueron:

Patricia y Najib, lamento no haberme tenido la suerte de trabajar con vosotros mucho tiempo, pero siempre os agradeceré vuestra simpatía, ayuda, apoyo, interés y sobretodo amistad. Sin duda os echo de menos.

Anna, Cristina Malagelada, Jordi Gómez, me habéis servido de estímulo para seguir adelante en momentos de duda, todos habéis acabado siendo más que compañeros.

Raúl, además de compañero, creo que puedo considerarte como un buen amigo que no me guarda rencor ninguno.

Belén no sólo te tengo un gran aprecio sino que te quiero mucho. De verdad me impresiona tu gran capacidad de hacerte querer. He disfrutado todo momento que hemos pasado juntas dentro y fuera del departamento.

Del resto, quisiera nombrar de forma puntual a Xavi, porque empezamos juntos esta aventura. Gracias por ser como eres, por mantener la calma, la paciencia y sobretodo por guardar siempre las formas. Esto hace de ti un tío muy interesante. Me alegro mucho de conocerte y ánimo en la recta final.

A Alberto y a Mar, quien me iba a decir que ibais a ser mi punto de referencia. Alberto, la cabeza sentada y madura del departamento, gracias por tus sabios consejos, tu interés y tu apoyo. Yo creo que al final te he podido demostrar que puedo tener una paciencia infinita. Mar, porque has sabido estar ahí siempre que te he necesitado. Tengo que reconocer al final que ese carácter agrio que tienes se puede convertir en dulzura y generosidad cuando quieres.

A Noe por las veces que me has preguntado como iba la cosa, a Cristina Gutiérrez por tu eficacia en mantener la sala de cultivos en condiciones a pesar de los pesares, a Alex por tu sentido del humor, a Sandra por tu fuerza y sobretodo voluntad, a Alfredo por el tiempo que dedicas a preparar esos montajes tan profesionales, a Eli por tu alegría y tu

Agradecimientos

manera de ver la vida, a Vicky por darme la oportunidad de volver a tener una compañera en el laboratorio. Lástima que el tiempo fue muy corto, y a William por hacerme enfadar y reír a la vez, espero que algún día lea tus agradecimientos.

No quisiera dejarme a los jóvenes: Nahuai, Bruna, David (pido disculpas por si me he olvidado de alguno). Gracias por recordarme las energías que tenía al empezar.

También debo mencionar, por ser tan buenos funcionarios, por su eficiencia en el trabajo, y por su ayuda, a Melchor y a Oscar. A ti Melchor, por encima de tu calidad profesional está tu calidad humana que me has demostrado a lo largo de estos años. Siempre tendré un grato recuerdo de ti.

Por supuesto, también me debo y debo este trabajo a mis padres, que me han apoyado en cada decisión que he tomado en mi vida, siempre sin hacer preguntas y siempre con una confianza ciega en mí. Ellos merecen mi reconocimiento ya que desde hace casi veintiséis años vienen desarrollando otra tesis bastante más dura que ésta. Gracias por el esfuerzo que han realizado durante toda su vida para proporcionarme la educación que ahora culmino. Quién nos iba a decir a mi padre y a mí, aquellos años, cuando me ayudaba a construir mis primeras frases, que hoy escribiría toda una tesis. No podría dejar de agradecer a mis hermanos las alegrías y tantas cosas que juntos convivimos durante nuestra niñez y adolescencia. ¡Ellos saben que les adoro!

Y como no a mis tíos, en este caso quiero concretar una cosa, tíos tengo muchos pero a los que me refiero son mis tíos de aquí (Emma y Mohamed), a ellos les estaré agradecida durante toda mi vida. Con vosotros me he sentido tan bien como en casa. Gracias por haberme adoptado sin condiciones y sin medidas. Gracias por preocuparos tanto por mí, por hacerme sentir que lo que hacía os importaba y mucho, por ese cariño y

Agradecimientos

afecto que me habéis dado. A ti mi tío, por ser tan bueno aunque te cuesta a veces mostrarlo pero yo sé que lo eres, por estar ahí siempre que te he necesitado, por quererme a tu manera. A ti Naïma por ser como eres, única como te he dicho siempre. A ti mi tía, me resulta difícil resumir en tan pocas frases todo lo que te tengo que agradecer. Tú has vivido, sufrido, disfrutado y acompañado el desarrollo de este trabajo, y sin tu presencia esto seguro habría sido peor, o posiblemente no habría sido. Gracias por ser mi amiga y madre a la vez. Por encima de todo esto está tu bondad que hace de ti una persona muy especial para mí.

No quiero olvidar a Omar. Él es precioso, quiero decirle una vez más que le quiero. A él va dedicada esta tesis.

Y por último, a toda la familia que siempre me hace la misma pregunta, ¿qué voy a ser de grande?

Más en general, (la lista sería inmensa), cabe citar a todos aquellos que me animaron a embarcarme en esta aventura, y a los que me apoyaron una vez estaba en ella. A todos los que me preguntaron una -y mil- veces cómo iba la cosa, a los que se interesaron por cuándo acababa, a los que hacían lo que podían por presionar a mi perezosa voluntad para que avanzase, y a todos que han comprendido mi tardanza. Todos ellos han hecho posible que me sienta razonablemente orgullosa de este trabajo.

Gracias a esta tesis que me ha enseñado que no hay límites, que lo que me proponga lo puedo lograr y que sólo depende de mí.