



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante
Dr. Ricardo B. Maccioni
Facultad de Ciencias
Universidad de Chile
CBB Instituto Milenio

Profesor Co-Patrocinante
Dra. Iona Concha
Instituto de Bioquímica
Facultad de Ciencias

**INTERACCIÓN DE BETA Y DELTA CATENINA CON EL
COMPLEJO cdk/p35 EN CÉLULAS NEURONALES**

Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar al
grado de *Licenciado en
Bioquímica* y Título Profesional de
Bioquímico

SERGIO IVÁN CORTES CID

VALDIVIA – CHILE

2005

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco en primer lugar a mis queridos padres, quienes han sido y serán siempre, los gestores del potencial profesional que seré en el futuro.

Agradezco a mi tutor Prof. Dr. Ricardo B. Maccioni por su guía, apoyo y crítica durante el desarrollo de esta tesis y formación profesional.

Agradezco a mis compañeros y amigos del laboratorio, con los cuales compartí muy buenos momentos durante el transcurso de esta tesis, tanto en el ámbito profesional como del necesario esparcimiento.

Agradezco al gobierno de Chile por hacer posible el desarrollo científico de nuestro país, mediante iniciativas aventuradas y que demuestran gran confianza en la capacidad de creatividad e innovación de nuestros científicos.

Agradezco también a los miembros de mi comisión por sus comentarios y sugerencias durante el desarrollo de esta tesis.

*Dedicado a mis amados Padres, Sergio y Emilia,
por su apoyo incondicional,
y a Marisel, por estar siempre ahí.*

*Prefiera siempre aumentar sus aspiraciones en vez de sus recursos. Cuando usted tiene mas
aspiraciones que recursos, el resultado es la innovación. Pero, si tiene más recursos que
aspiraciones, nada nuevo sucede "*
C.K. Parhalad

*"Tenemos que rechazar todo lo que nos limite"
Juan Salvador Gaviota*

INDICE DE CONTENIDOS

	Página
AGRADECIMIENTOS	
INDICE DE CONTENIDOS	i
INDICE DE FIGURAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	v
1 RESUMEN	1
1 SUMMARY	3
2 INTRODUCCION	5
2.1 El sistema beta catenina	8
2.2 Delta catenina	13
2.3 Hipótesis	16
3 MATERIALES	17
3.1 Reactivos químicos.	17
3.2 Material Biológico	18
4 METODOS	
4.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS	19
4.2 Análisis de Western Blot	19
4.3 Preparación de placas con polilisina para cultivos de neurona de hipocampo de rata	20
4.4 Cultivos primarios de hipocampo de rata	20
4.5 Cultivos de célula de Neuroblastoma N2A	21
4.6 Ensayo de actividad quinasa	21
4.7 Inmunofluorescencia	22
4.8 Inmunoprecipitación de proteínas	23
4.9 Determinación de proteínas	23
	24

4.10 Overlay.	
4.11 Obtención de extractos proteicos	25
4.12 Purificación de proteína microtubular	25
4.13 Purificación de proteína Tau a partir de cerebro de bovino(según protocolo de Grundke-iqbal et al., 1986 modificaciones de Farias et al., 1992)	27
5 RESULTADOS	29
5.1 Distribución de cdk5 y beta catenina en células neuronales.	29
5.2 Interacción del sistema cdk5/p35 con beta catenina.	30
5.3 Fosforilación de beta catenina por el sistema cdk5/P35	35
5.4 Interacción de cdk5 con delta catenina y PS1 en células neuronales	36
5.4.1 Expresión de delta catenina en células neuronales	36
5.4.2 Localización e interacción de cdk5/P35 con delta catenina en células neuronales	37
5.5 Interacción de cdk5/p35 con PS1 y PS2	40
6. DISCUSIÓN	44
7. BIBLIOGRAFÍA	51

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Esquema que muestra la participación de beta catenina en fenómenos de adhesión celular.	9
Figura 2	Funcionalidad que posee beta catenina en la célula. Factor de transcripción, molécula de adhesión y participación en la formación del citoesqueleto	12
Figura 3	Co-localización subcelular de cdk5 y beta catenina en células de hipocampo de rata.	31
Figura 4	Co-localización de beta catenina y cdk5 en células de neuroblastoma N2A.	32
Figura 5	Interacción de cdk5 y p35 con beta catenina en extractos de cerebro de rata y Fosforilación de beta catenina por cdk5/p35.	33
	Panel A.- Co-inmunoprecipitación de cdk5 con beta catenina en extractos de cerebro de rata.	
	Panel B.- Co-inmunoprecipitación de p35 con beta catenina en extractos de cerebro de rata.	
	Panel C .- Fosforilación de beta catenina por cdk5/p35 <i>in vitro</i> .Roscovitina 5 milimolar.	
Figura 6	Inmunodetección de beta y delta catenina en células nerviosas	37
	Panel A.- inmunodetección de beta catenina y delta catenina en células corticales.	
	Panel B.- Expresión de beta y delta catenina en células de neuroblasto diferenciadas por 0, 24 y 48 horas con dibutilil-c AMP.	
Figura 7	Co-localización de p35 y delta catenina en células de hipocampo de rata.	39

Figura 8	Interacción de Cdk5/p35 con delta catenina. Panel A, B: Inmunoprecipitación de delta catenina y Cdk5 en extractos de cerebro de rata y neuroblastoma N2A. Panel C: Co-inmunoprecipitación de producto hidrolizado de p35 y gsk3b con delta catenina	42
Figura 9	Co-precipitación de la proteína p35 y PS1 en extracto de cerebro de rata	43
Figura 10	Función de la proteína beta catenina en las etapas de proliferación y diferenciación	47

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	: Adenosin trifosfato
BSA	: Albúmina de suero de bovino
DMEM	: Medio modificado de aguila Dulbecco
DTT	: Ditiotreitól
EGTA	: Acido etilenglicol-bis-(2 aminoetileter-N',N',N',N' Tetraacetico.
EA	: Enfermedad de Alzheimer
EDTA	: ácido etilendiaminotetracético
ECL	: Reactivo para revelar , reacción de la peroxidada.
IgG	: Inmunoglobulina G
HEPES	: acido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico.
MEM	: Medio mínimo esencial
PMSF	: Fluoruro de sulfonilmetano
PSA	: Persulfato de Amonio
SDS	: dodecilsulfato de sodio
TEMED	: NNN',N'-tetrametilenetilendiamina
Tris	: tris(hidroximetil)-aminometano
PBS	: Tampon fosfato salino
N2	: Suplemento nutritivo para cultivos celulares
db	: Dibutilil
cAMP	: Adenosin mono fosfato cíclico
FITC	: Fluoresceína isotiocianato
TRITC	: Tetrametil rodamina

APP : Proteína precursora amiloide
ECL : Aumentador de Quimioluminiscencia

1. RESUMEN

El sistema cdk5/p35 participa en el proceso de desarrollo neurítico, diferenciación neuronal y en la patología del Alzheimer cuando el complejo pierde su regulación. Nuestro laboratorio y otros grupos de investigación demostraron, que bajo determinados estímulos, cdk5/p35 incrementa su actividad quinasa en células neuronales y miocitos. Este evento ha sido asociado con la hiperfosforilación de proteínas que regulan la organización del citoesqueleto. Al iniciarse en proceso de diferenciación cdk5 incrementa su expresión y es modificada post-traduccionalmente. Una vez activa esta quinasa participa en el control de la actividad de proteínas implicadas directamente en los cambios celulares durante la diferenciación.

Investigaciones previas han demostrado que beta catenina, una proteína que interactúa con proteínas caderinas, forma complejos que participan en la adhesión celular. En esta tesis logramos identificar una interacción directa entre beta catenina con el sistema cdk5 /p35, que participaría en la fosforilación de esta proteína. Su directa interacción estaría implicada en la disminución de adhesión de células neuronales. Es importante mencionar que la interacción entre el complejo cdk5/p35 y beta-catenina podría contribuir en los cambios de adhesión que ocurren en el proceso de diferenciación neuronal. En este trabajo además observamos que el complejo cdk5/p35 se asocia a delta-catenina, una proteína localizada en el soma y dendritas de las células nerviosas. Adicionalmente, utilizando ensayos de actividad quinasa observamos que delta catenina es un sustrato del sistema cdk5/p35. Estas observaciones sugieren un mecanismo de regulación de beta y delta catenina por cdk5/p35, en el cual esta

quinasa regularía fenómenos de redistribución y degradación de estas proteínas en el proceso de diferenciación. Esta investigación plantea también la integración de procesos que participan en eventos de detención del ciclo celular y diferenciación.

SUMMARY

The cdk5/p35 system participates in neuritic development and neuronal differentiation, and it has been shown that abnormalities in the regulation of this system may lead to neurodegeneration associated with Alzheimer's disease. Our laboratory and other research groups demonstrated, that under changes in certain signaling mechanisms, cdk5/p35 increases its kinase activity in neuronal cells and myocytes. This event appears to be linked with hyperphosphorylations of cytoskeletal proteins mainly. When cell differentiation is triggered, cdk5 increases its expression and is post-translationally modified. Once it is activated, cdk5 participates in the control of the activity of protein kinases implicated in cellular changes during cell differentiation.

Previous investigations have shown that beta-catenin, a cadherin interacting protein, form complexes that participate in cell adhesion phenomena. In this thesis we have identified a direct interaction between beta-catenin and the cdk5/p35 system, involved in the phosphorylation of this protein. This interaction seems to lead to a decrease in neuronal adhesion. It is important to indicate that the interaction between the cdk5/p35 complex and beta-catenin may contribute to the changes that occur in neuronal differentiation process. Furthermore, in this thesis work we demonstrated that cdk5/p35 associates to delta-catenine, another protein localized in the soma and dendrites of neuronal cells. In addition, by using kinase activity assays we observed that delta-catenin is a substrate for the cdk5/p35 system. These findings suggest a regulatory mechanism of beta and delta catenine by cdk5/p35, by which this kinase regulates the redistribution and degradation of these proteins during cell differentiation. This

investigation provides data that support an integration of the processes that participate in cellular events during cell cycle and differentiation.

2.- INTRODUCCION

Los factores que gobiernan la vida y muerte celular están comandados por la regulación celular de procesos tales como expresión y procesamiento de genes, traducción de los mRNAs y modificaciones post-traduccionales de las proteínas. La activación y regulación de estos procesos están dados en función de los requerimientos celulares, por ejemplo desde la regulación de la vida media de un mensajero a la localización precisa de una proteína en la membrana celular.

La comprensión de los eventos que regulan estos fenómenos implica la capacidad de localizar un proceso en un momento preciso, como también los factores de expresión génica e interacción proteína–proteína que lo regulan. De esta forma un evento de gran interés biomédico y biotecnológico es el mecanismo que regula la diferenciación. Con el advenimiento de la biología molecular, se han desarrollado nuevas tecnologías cuyo fin último radica en verificar las funciones *in vivo* de determinadas proteínas, o los cambios en la expresión de distintos genes en respuesta a situaciones experimentales que imitan el desarrollo normal de los sistemas vivos.

La quinasa dependiente de ciclina 5 (cdk5) es un miembro de la familia de serina/ treonina quinasas (cdks). Como en muchos otros sistemas de quinasas, esta enzima necesita de una proteína activadora. En este caso no es una ciclina tradicional sino un factor que ha sido caracterizado como p35 (Lew et al., 1994).

Se conoce que cdk5/p35 es requerido en un gran número de procesos biológicos, como por ejemplo :

- Función crítica en el desarrollo neuronal y patrones axonales (Smith et al., 2001)
- Posible regulación de la dinámica de actina por la vía de señalización Rac/Pac (Nikolic et al ., 1998)
- Único complejo quinásico que tendría actividad en neuronas normales post-mitóticas como las del sistema nervioso central, ya que los activadores, p35 y p39, se expresarían en este periodo (Tsai et al., 1993; Humbert et al., 2000)
- La supresión completa del gen de cdk5 , en ratones knock out , es letal alrededor del nacimiento, debido a que el proceso de laminación de la corteza cerebral, hipocampo y cerebelo es defectuosa (Ohshima et al., 1996).
- Participa en la liberación de vesículas sinápticas (Fletcher et al., 1999) y participa en la vía de transducción de señales de la dopamina (Bibb et al., 1999)

Diversas investigaciones han demostrado que el complejo cdk5/p35 incrementa su actividad quinasa en células neuronales y miocitos, evento que ha sido asociado con la fosforilación de proteínas que regulan la organización del citoesqueleto. La actividad anormal de cdk5 estaría implicada en la patogénesis de la Enfermedad de Alzheimer. Bajo condiciones normales, en las neuronas, la fosforilación de la proteína **tau** aparece como un evento normal , que se requiere para la modulación de esta proteína de los microtúbulos, involucrada en polaridad neuronal y en el desarrollo del sistema nervioso central en mamíferos. Cdk5 ha sido caracterizada como una serina-treonina proteína quinasa dirigida a prolina que contribuye a la fosforilación de la proteína tau en

humanos en Ser 202, Thr 205, Ser 235 y Ser 404 (Maccioni et al., 2001). Adicionalmente se ha descrito que la fosforilación endógena de cdk5 en el residuo de tirosina 15, contribuye a su actividad. Este fenómeno es bastante peculiar ya que se ha descrito que en cdk5 convencionales esta fosforilación inhibe la actividad (Zukerberg et al., 2001; Sharma et al., 1999). Entre las proteínas blanco de esta quinasa se encuentran los isotipos de tau, lo cuales forman parte importante de la regulación de la plasticidad del citoesqueleto. Esta proteína sufre fosforilación por cdk5 en epítopes específicos claves en la regulación de la unión de tau al citoesqueleto (Maccioni et al., 2001). Tau es clave en el evento de estabilización de los microtúbulos y modulación de la plasticidad celular durante la formación de neuritas en la diferenciación de neuroblastoma (Saragoni et al., 2000). En la enfermedad de Alzheimer, que es uno de los principales tipos de demencia en la vejez, el sistema cdk5/p35 se encuentra desregulado, y por tanto realiza una función descontrolada hiperfosforilando de forma anómala a la proteína tau. Esta, al hiperfosforilarse, sufriría cambios en su conformación y actividad biológica y genera agregados proteicos anómalos en el cerebro, que son los llamados filamentos helicoidales pareados (PHFs), compuestos principalmente por las variantes hiperfosforiladas de la proteína tau (Alvarez et al., 2001). Estudios sugieren que, como fue mencionado anteriormente, cdk5 está involucrada en la diferenciación celular (Muñoz et al., 2000) y su actividad es inducida durante la miogénesis (Lazaro et al., 1997). Sin embargo, los mecanismos de cómo esta actividad estaría regulada durante la diferenciación celular, no han sido dilucidados aún. Es importante mencionar que cdk5, y su activador p35, han sido encontrados en otros tipos celulares, como lo son los monocitos (Chen et al., 2001), dándole a este complejo

quinásico, quizás una funcionalidad mas universal, un aspecto que es de la mayor importancia dilucidar.

2.1. El sistema de la beta catenina

Recientes investigaciones han indicado que esta quinasa interacciona con beta catenina en células transfectadas y en líneas celulares de la corteza cerebral (Kesavapany et al., 2001).

Las uniones adherentes, célula-célula más comunes, están conformadas por un complejo de proteínas en el cual participan miembros de la familia de caderinas E-, N- y P (Marrs y Nelson, 1996). Las caderinas poseen todas un dominio citoplasmático altamente conservado al cual se une un grupo de proteínas conocidas como cateninas (Ozawa et al., 1998).

Las cateninas (α , β , γ , δ , p120 ctn) son proteínas citoplasmáticas relacionadas, por presentar motivos “*arm*”, que son repeticiones de 42 aminoácidos, implicados en la interacción proteína-proteína (Peifer et al., 1994). Estas proteínas son componentes de las uniones adherentes, donde forman una estructura citoplasmática compleja, que permite contactar, en la mayoría de los casos, caderinas al citoesqueleto de actina (Yap et al., 1997) (**Figura 1**). También pueden estar presentes en funciones de expresión de genes, ya que se pueden translocar al núcleo activando la transcripción de genes del ciclo celular (Reynolds et al., 1994; Shibamoto et al., 1995; Staddon et al., 1995).

Beta catenina es una proteína de gran importancia en procesos de migración, adhesión y de proliferación celular, está compuesta por un extremo NH₂-terminal de aproximadamente 130 aminoácidos seguidos por 12 secuencias repetidas en *tandem*

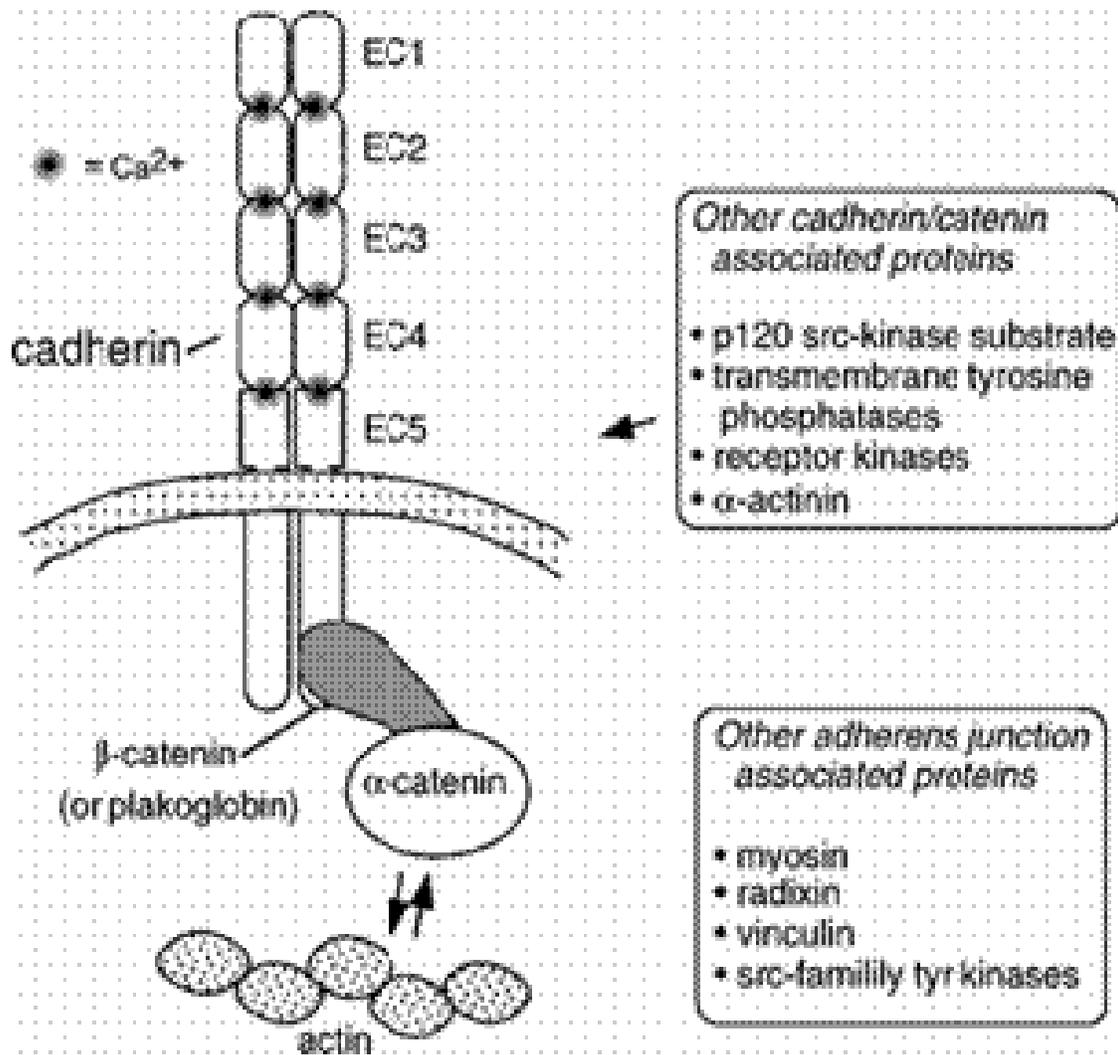


Figura 1. Participación de beta-catenina en fenómenos de adhesión celular. Modelo esquemático en el cual se observa un complejo proteico asociado a la membrana celular y su participación dentro de la formación del citoesqueleto. Las caderinas interactúan citoplasmáticamente con beta catenina y esta a su vez con esqueletos formados de actina, dando un rol importantísimo a esta unión proteica y también a la estructura celular. (Yap et al., 1997)

de 42 aminoácidos, y un extremo carboxilo terminal de 100 aminoácidos. Las regiones COO- y NH₂- terminales son de carácter ácido, mientras que la región de repeticiones denominada dominio *armadillo* posee un carácter básico (Kemler, 1993; Wodarz et al., 1998). Esta proteína se caracteriza por sufrir una serie de cambios post-traduccionales que regulan su función en los compartimientos citoplasmático y nuclear de una célula. Se ha determinado que beta catenina interactúa con caderina promoviendo las señalizaciones desde el medio extracelular a proteínas integrales del citoesqueleto de actina. Por otra parte esta proteína, en estado fosforilado en tirosina 645, interactúa con el factor de transcripción TCF/LEF y transloca al núcleo (Miller y Moon, 1996; Willer y Nusse, 1998). Esta asociación regula la activación de una variedad de genes implicados en la división celular. Se ha descrito que el complejo beta catenina-TCF/LEF produce el incremento de la transcripción del gen c-myc y ciclina D1, las cuales son proteínas claves en la regulación de los procesos de división y diferenciación celular. La inducción descontrolada de este proceso origina la proliferación anormal y el cáncer (Polakis, 2000).

Recientes investigaciones han revelado una conexión entre el sistema cdk5, una de las proteínas claves que regulan el proceso de diferenciación neuronal y beta catenina, originando gran interés en las comunicaciones moleculares que pueden estar implicadas en la regulación de la diferenciación (Homayouni y col., 2000; Kwon et al., 2000; Kesavapany et al., 2001). Utilizando sistemas de doble híbrido han revelado que p35, uno de los activadores de cdk5, es capaz de asociarse con β -catenina, y esta interacción estaría implicada en fenómenos regulatorios de migración neuronal. Sin embargo aun no se ha dilucidado completamente los mecanismos que regulan este

fenómeno, ni los efectos de la posible fosforilación de beta catenina mediada por cdk5, en el fenómeno de diferenciación neuronal. Este mecanismo asociado con la regulación de la interacción de beta catenina con proteínas de membrana, tales como, caderinas o presenilinas, hace posible que la modificación de beta catenina por cdk5 incremente la población de beta catenina citoplasmática libre, y así esta proteína puede tomar caminos de degradación por proteosomas, translocación al núcleo u otra función desconocida (Kesavapany et al., 2001).

Beta catenina es también, un componente importante de la vía de señalización de Wnt (Willert et al., 1998; Wodarz et al., 1998) en etapas tempranas del desarrollo, permitiendo la comunicación de célula a célula durante una importante parte del desarrollo del sistema nervioso central. En esta vía (**Figura 2**) al activarse el receptor *frz*, desactiva una proteína serina treonina llamada GSK-3 β y esta proteína es la responsable de la estabilidad de beta-catenina. Cuando GSK-3 β está activa, fosforila a beta-catenina en múltiples sitios, blanco para la ubiquitinización y degradación proteosomal. (Kosik.,1999).

Cuando por el contrario la quinasa no está activa (como en la señalización de Wnt) la catenina está estable y entonces puede transportarse al núcleo y co-activar la familia de factores de transcripción Tcf/LEF, funcionando entonces también como factor de transcripción, controlando a la célula en la vía de desarrollo programado y expresión de genes.

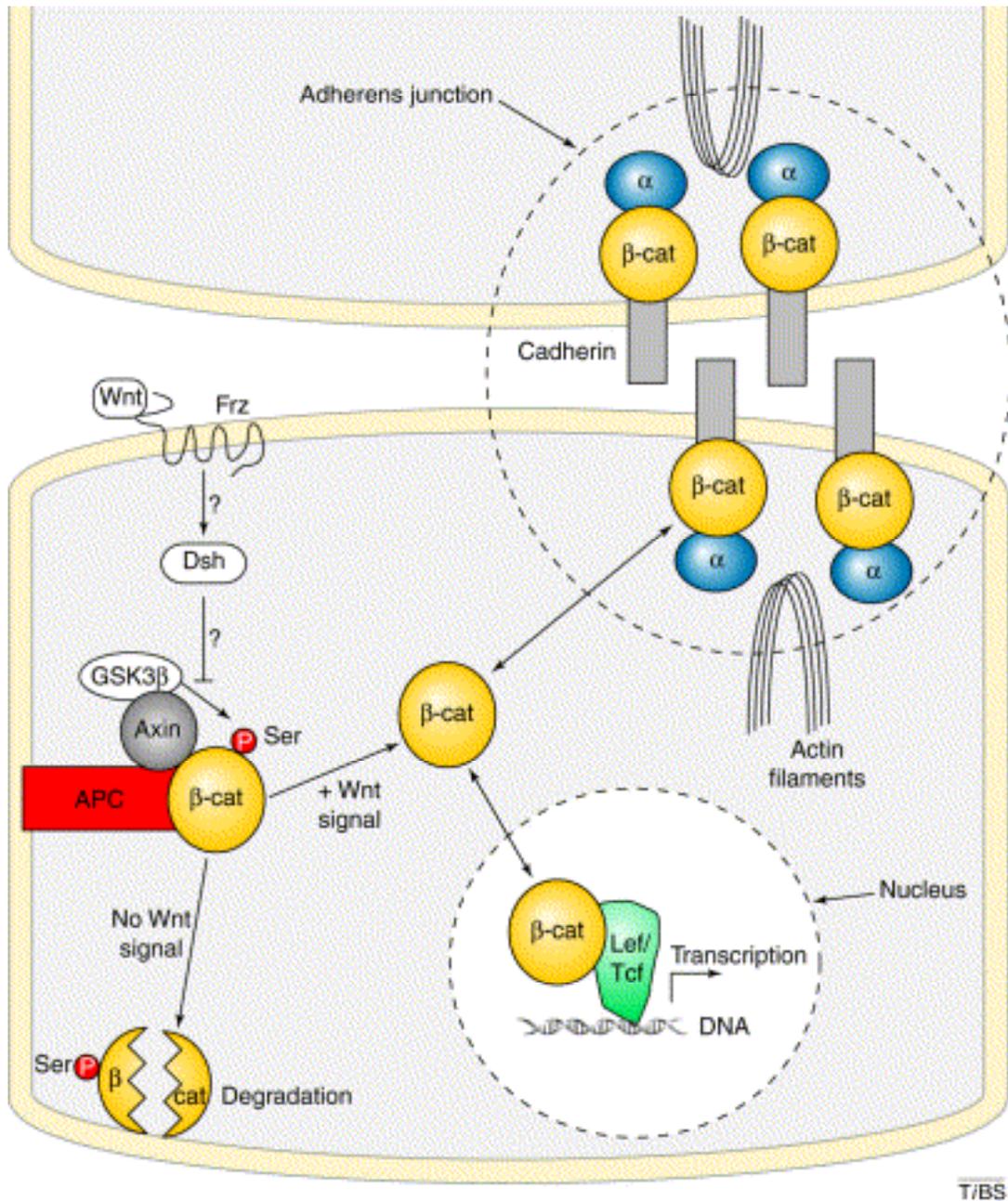


Figura 2 . Funcionalidad que posee beta catenina en la célula .Esquema en el cual se muestra la participación de beta cateninaa en adhesión celular donde forma los complejos de asociación que comunican el medio extracelular con el citoesqueleto de actina. Además se observa su participación como transactivador del factor de transcripción TCF en el núcleo. Los niveles de beta catenina son regulados por la vía de señalización Frizzled, donde incrementos de señalización desencadenan la degradación de beta catenina por el proteosoma.(Daniels et al., Trends Biochem Sci. 2001 Nov;26(11):672-8)

2.2. el sistema de delta catenina.

Es una proteína de alta homología con beta catenina. Se han descrito sitios de fosforilación por Abl, los cuales contribuirían en la participación de esta proteína en procesos que regulan el citoesqueleto de actina. Recientes estudios han demostrado que delta catenina participaría en el balance entre la elongación y arborización de las dendritas. Su localización es específica de células neuronales, específicamente en el soma y las dendritas (Martinez et al., 2003).

delta-catenina es un miembro de la subfamilia p120^{ctn}, la cual contiene 10 motivos *arm* y ha sido identificada como sustrato de fosforilación por tirosinas quinasas. Es una proteína homóloga a placofilina y con capacidad de unirse a la región *loop* de presenilina-1 (Paffenholz y Franke, 1997; Zhou et al., 1997). Análisis bioinformático de la secuencia completa de delta-catenina, permitió encontrar dos sitios probablemente fosforilables por Abl (tirosina quinasa no asociada a receptor) en los residuos de tirosina 292 y 429; un tracto poliprolínico, que podría servir de interacción con profilina; y una región de polilisinas que puede representar una señal de localización nuclear (Lu et al., 1999).

Estudios de hibridización *in situ* y análisis por *Northern blot* muestran que δ -catenina está casi exclusivamente expresado en sistema nervioso (Paffenholz y Franke, 1997; Zhou et al., 1997). delta-catenina colocaliza con N-caderina y beta-catenina en los puntos de contacto célula-célula. El dominio *arm* fue suficiente para permitir la localización e interacción con caderina (Lu et al., 1999). La interacción involucra contacto directo de delta-catenina, con una región de justa-membrana de 41 aminoácidos, que contiene una secuencia aminoacídica altamente conservada en el

dominio COOH-terminal de las caderinas (Lu et al., 1999). Por otra parte se ha demostrado que delta-catenina participa en la migración de células MDCK, inducidas con un factor de la hormona del crecimiento (Lu et al., 1999). El patrón de expresión de delta-catenina en neocortex de cerebro de embriones de ratón en desarrollo, se observa una expresión diferencial del mRNA a nivel del neuroepitelio, la zona ventricular proliferativa y en la placa cortical (Ho et al., 2000).

El gen humano de δ -catenina mapea en el cromosoma 5p15.2. Una deleción de esta región cromosómica se ha asociado con el síndrome de cri-Duchat (CDCS). δ -catenina ha sido implicada en el fenotipo de retardo mental característico de esta patología (Medina et al., 2000). Este antecedente nos indica claramente que delta-catenina como una proteína neuronal, no cumple un rol redundante. Por el contrario cumple un rol clave a nivel del desarrollo del sistema nervioso y en el establecimiento de conexiones dendríticas maduras en la adultez.

Considerando la expresión específica de delta-catenina en el sistema nervioso, su interacción N-caderina, la relocalización dinámica de la expresión de delta-catenina durante el desarrollo de la placa cortical y los antecedentes expuestos que describen un rol para delta-catenina en movilidad celular, se propone que δ -catenina está relacionada con procesos de migración neuronal inducida por la glicoproteína de matriz extracelular relina. La relación del sistema cdk5/p35 y las cateninas presenta un mecanismo de regulación bastante interesante de investigar ya que comunica dos procesos claves en la vida celular: proliferación y diferenciación.

Dentro de los posibles sustratos de cdk5, las presenilinas, proteínas integrales de membrana con 8 dominios de de transmembrana, juegan,al parecer, un rol fundamental

en la patología de la enfermedad de Alzheimer, aunque su función no está totalmente dilucidada. Estas proteínas cuando se encuentran mutadas, provocan un aumento en el micro-procesamiento del APP (proteína precursora amiloide), resultando en la secreción del péptido amiloide con mayor capacidad de autoagregación, $A\beta(1-42)$, presentándose un aumento en la formación de la placa amiloide y cambios patológicos en el sistema nervioso. También las presinilinas se han asociado a la interacción con cateninas. Por ende proponemos la existencia de algún tipo de interacción de dichas proteínas con cdk5/p35.

En este trabajo de tesis se plantearan dos objetivos principales, que nos llevarán a dilucidar este sistema biológico de alta complejidad:

(i) Investigar en profundidad la regulación de cdk5 por el sistema de proteínas funcionales similares a los factores p35 y p39, y el papel regulatorio de otras proteínas que interactúan con cdk5, como presenilinas 1 y 2, y además de proteínas que poseen unión a actina, como son β y δ catenina.

Este objetivo deriva de la hipótesis que los efectos de $A\beta$ en neuronas del hipocampo y que conducen a la muerte neuronal son mediados por la activación de la cdk5, y que su desregulación constituye una etapa crítica en la vía hacia la muerte neuronal en la EA (Maccioni et al., 2001).

(ii) Determinar los aspectos regulatorios de la interacción de cdk5 con p35 o con p25, el producto de proteólisis de ésta por calpaína (Kusakawa et al., 2000) a nivel *in vivo* y en células neuronales en cultivo sometidas a estrés fisiológico.

En uno de los últimos estudios que se dieron a conocer acerca de los posibles sustratos de cdk5/p35, se muestra que este complejo sería activo en la membrana del

aparato de Golgi, donde estaría asociado a fracción insoluble a detergente que contiene actina. Específicamente fosforilaría a una proteína detectada en la membrana del Golgi, α -PAK, como también interactuaría, con una pequeña GTPasa denominada Cdc42, mostrando con esto, que cdk5/p35 tendría una nueva localización subcelular, sugiriendo así un rol de ésta en el tráfico a través de la membrana durante el crecimiento neuronal (Paglini et al., 2001).

2.3. HIPÓTESIS

De acuerdo a antecedentes previos, en esta tesis se propone la siguiente hipótesis:

“Existe una interacción de las proteínas beta y delta catenina con el complejo quinásico cdk5/p35”.

OBJETIVO GENERAL

- Investigar los aspectos regulatorios del sistema cdk5/p35 en la actividad neuronal, con énfasis en procesos de diferenciación neuronal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar la interacción entre el sistema cdk5 y beta y delta catenina

- Evaluar los patrones de interacción entre el sistema cdk5/p35 con presenilinas 1 y 2 (PS1 y PS2).

3.-MATERIALES

3.1 Reactivos químicos

De SIGMA-Chemical: HEPES ,db-cAMP, EDTA, gelatina, albúmina sérica bovina (BSA), aprotinina, PMSF, SDS, Tritón X-100, Trizma base, paraformaldehído, acrilamida, bisacrilamida, TEMED, nitrocelulosa, PSA(Persulfato de Amonio), DTT, MnCl₂, MgCl₂ , NaCl₂.

Segundos anticuerpos para estudios de inmunofluorescencia:

- Segundo anticuerpo “*anti-conejo*” marcado con rodamina (TRITC)
- Segundo anticuerpo “*anti-ratón*” marcado con Fluoresceína (FITC)
- Segundo anticuerpo “*anti-ratón*” marcado con rodamina (TRITC)
- Segundo anticuerpo “*anti-conejo*” marcado con Fluoresceína (FITC)

De GIBCO-BRL: Medio esencial mínimo de cultivo(MEM) para células de cultivo primario de hipocampo. Medio de cultivo N2 (transferrina 100 µg/mL, insulina 5 µg/mL, progesterona 20 nM, putrescina 100 µM, dióxido de selenio 30 nM , piruvato de sodio 1 mM , ovoalbúmina 0.1%). Medio de cultivo DMEM (Eagle´s modified Dulbecco´s médium). Suero fetal de bovino (FBS), reactivo TRIZOL, L-glutamina , cicloheximida , NP-40 , glicerol.

De Santa Cruz Biotechnology: Anticuerpo monoclonal anti-cdk5 (J-3), anticuerpo policlonal anti-cdk5 (C-8), anticuerpo policlonal anti-p35 (N-19 y N-20), anticuerpo policlonal anti beta catenina (H-102), anticuerpo policlonal anti-presinilina 1 (N-19), anticuerpo policlonal anti- presinilina 2 (C-20) .

De Bio-Rad: Molecular Imager FX , reactivo de Bradford.

De Perkin –Elmer: ECL (reactivo para revelar la reacción de peroxidasa), ATP, GTP , c AMP.

De Calbiochem: roscovitina, inhibidor de cdk5

De Signal Transduccion BD: Anticuerpo monoclonal anti-delta catenina

De Merck: EGTA , MES.

De Amersham Pharmacia: Columna de afinidad con glutation , unido a sepharosa

3.2 Material biológico

En la investigación se utilizaron: (i) hipocampos disectados de cerebro fetal de rata de 18 días de gestación, (ii) cerebros completos de bovino adulto para purificar proteínas neuronales, (iii) cerebro de rata adulta, (iv) cerebros completo de embrión de rata y (v) Cultivos de células de neuroblastoma N2a. Las ratas fueron obtenidas del Bioterio de ratas del Instituto Milenio CBB, y de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

También como parte de la investigación se utilizaron unos clones recombinantes donados por el Dr Harrish Pant , Laboratorio de Neuroquímica, Laboratorio de Sistemas adaptadosof Adaptive Systems, National Institute of Neurological Disorders and Stroke, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA.

4.- METODOS

4.1.- Electroforesis de geles de acrilamida en SDS

La separación de las proteínas para su posterior transferencia a membranas de nitrocelulosa , se realizo en geles de poliacrilamida (Laemli, 1970) , utilizándose una concentración de acrilamida 10-12%, dependiendo del tamaño y naturaleza de las proteína que se debía separar.

Para teñir los geles , se usó una solución de azul de Coomasie R250 0,25 % en metanol 50% y ácido acético 10%. Para desteñir el gel, se utilizó una solución de metanol 25% y ácido acético 10%.

4.2.-Análisis de Western Blot

Los análisis de inmunodetección por *Western blot* fueron realizados en muestras proteicas, tanto de extractos totales de cerebro de feto de rata de 18 días como de inmunoprecipitados de proteínas tales como : cdk5, beta-catenina, delta-catenina, p35, presenilinas 1 y 2 (PS1 y PS2). (Alvarez et al.,2001)

Estas muestras fueron separadas en geles de poliacrilamida 10-12% (SDS-PAGE) y luego electrotransferidas en cámara húmeda a membranas de nitrocelulosa. Posteriormente las muestras bloqueadas en leche al 5% en solución PBS 1x por una hora, incubadas con el primer anticuerpo a la dilución necesaria en PBS-BSA 5% por una hora y media a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Luego de esto las membranas de nitrocelulosa fueron lavadas 2 veces por 15 min con una solución PBS-Tween 0,1%, incubadas en anticuerpo secundario en PBS-BSA 5% por 1 hora. Es importante mencionar las diluciones en que se usaban los anticuerpos; primarios se

usaban en 1:100 y 1:200 y los secundarios en 1:1500 y 1:2000. Posteriormente se lavaron nuevamente con una solución PBS-Tween 0,1% tres veces por 10 minutos m. La membrana se incubó en ECL por 5-10 min, y finalmente se reveló en el equipo **Molecular Imager FX de Bio-Rad.**

4.3.-Preparación de placas con polilisina para cultivo de neuronas de hipocampo de rata

Placas (p60) se trataron con una solución de polilisina de 0,25 mg/ml y se dejaron a 37°C por dos horas. Luego de esto, se lavaron cuatro veces con agua estéril, para eliminar la toxicidad, y se dejaron en medio MEM 10, hasta que se fueron utilizadas para sembrar los cultivos hipocampales.

4.4.-Cultivos primarios de hipocampo de rata

Los hipocampos de embriones se obtuvieron como se describe en Banker and Cowan (1977) a partir de fetos de ratas Sprague-Dawley de 18 días de gestación. La disgregación hipocampal se llevó a cabo por medio de un tratamiento enzimático con tripsina a 37°C, y las células así obtenidas se sembraron (cultivo primario) sobre cubre-objetos recubiertos con el elemento de MEC poli-L-Lisina 0,01 % (PL). La siembra de las células se realizó en medio “ *Minimum Essential Medium*” (MEM) suplementado con 10% de suero (MEM-10) y se esperó a que la totalidad de las células se adhiriera a la matriz para luego cambiar el MEM-10 por MEM suplementado con N2 (transferrina 100 µg/mL, insulina 5 µg/mL, progesterona 20 nM, putrescina 100 µM, dióxido de selenio 30

nM, piruvato de sodio 1 mM y ovoalbúmina 0,1 %). Las células se incubaron durante 4-5 días para después ser utilizadas en posteriores experimentos.

4.5.-Cultivos de células de neuroblastoma N2A

Las células de neuroblastoma N2A, pueden ser inducidas a una diferenciación con el consecuente crecimiento de múltiples procesos neuríticos después de la adición de db-cAMP al medio de cultivo. Estas crecieron en placas Petri con DMEM y suplementado con de suero fetal de bovino 5%, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 U/ml. Las células crecieron bajo condiciones de humedad con 5% de CO₂ y a 37°C. El crecimiento neurítico fue promovido por cambio de medio de cultivo a las células por DMEM con Suero Fetal de Bovino 0,25% y la adición de db-cAMP 5mM .

Después del tratamiento a la 12, 24 y 48 horas las células exhibieron una diferenciación morfológica, con grandes procesos neuríticos (Muñoz et al. 2000). Para los experimentos con cicloheximida las células de neuroblastoma N2A fueron tratadas con 10 ng/ml de cicloheximida en presencia o ausencia de db-cAMP.

4.6.- Ensayo de actividad quinasa

Para el ensayo quinasa *in vitro*, los inmunoprecipitados fueron lavados una vez con tampón (HEPES 50 mM, MgCl₂ 10mM , MnCl₂ 5mM, DTT 1Mm, pH 7.5) más ATP 1μM no-radioactivo. Las esferas de agarosa lavadas fueron incubadas con el buffer quinasa conteniendo 2,5μg de Histona H1 mas ATP 5μCi (γ³²P) en un volumen final 50 μl por 30 minutos a 30°C. Después de la incubación las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE y auto radiografía. (Alvarez et al.,2001)

4.7.-Inmunofluorescencia

Las células hipocampales fueron colocadas en cubreobjetos de vidrio (30.000 a 40.000 células por cubreobjeto) , cubiertos por una capa de poli-L lisina a una concentración de 0,25 mg/ml, después de 4-5 días en medio de cultivo N2. Posteriormente se les dio un lavado suave con PBS, y fueron fijadas con 4 % sacarosa 4 % paraformaldehído a 37°C , y permeabilizadas con 0,2% Triton X-100 en PBS.

Posteriormente se incubaron los cubreobjetos con el primer anticuerpo a dilución recomendada, se lavaron con PBS 1x 3 veces por 5 minutos, luego se incubaron con el segundo anticuerpo marcado (fluoresceína o rodamina conjugado), previamente centrifugado para eliminar los cristales de sales, a una concentración de 1:200 para FITC (fluoresceína) y 1:400 para TRITC (rodamina).(Pigino *et al.* 1997 y Paglini *et al.* 1998). Las incubaciones con el primer anticuerpo fueron de 1 a 3 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. El análisis fue realizado mediante Microscopía Confocal en un microscopio Zeiss modelo META de la Unidad de Microscopías Avanzadas (UMA) del Instituto Milenio de Estudios Avanzados y Biotecnología, Facultad de ciencias, Universidad de Chile.

4.8.-Inmunoprecipitacion de proteínas

Es importante señalar de que la concentración mínima para poder realizar una inmunoprecipitación es de 200 µg de proteína. Se realizó una pre-incubación del extracto proteico con proteína A (para anticuerpos policlonales) o Proteína G (para

anticuerpos monoclonales) en medio con 50 % PBS 1x , en una concentración de 10 µl por cada 400 µl de extracto proteico.

Se centrifugó a 500g durante 5 minutos, rescatando el sobrenadante. Posteriormente se agregó por cada 400 µl del lisado proteico de 0,1–1 ul de anticuerpo primario, dejándolo reposar por tres horas a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C . Finalmente terminado el proceso anterior, se agregó 10 ul de proteína A o proteína G según el caso y se incubó 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C . Posteriormente, se centrifuga 10 minutos a 500g por 15 a 20 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante, y se lavó 4 veces con 500 µl de RIPA (NaCl 150mM , NP-40 o IGEPAL al 1%, deoxicolato de sodio, SDS 0,1%, Tris 50 mM e inhibidores de proteínas).

4.9.-Determinación de proteínas

Este análisis se realizó (Bradford *et al* 1976), utilizando para la medición de cada muestra, 795 µl de H₂O, 200 µl de solución de Bradford y 5 µl de muestra proteica. La determinación de la concentración de proteínas se realizó a través de la medición de la absorbancia a 594 nm y construyendo una curva de calibración con BSA para determinar la pendiente o interpolar los valores de las mediciones realizadas. La formula utilizada para calcular la concentración es la siguiente :

$$Y = m * X$$

En donde :

Y = Absorbancia dada por el equipo

m = Pendiente dada por la curva

X = Concentración de la muestra

El espectrofotómetro utilizado para la medición de absorbancia fue el HP- 8452E de Hewlet Packard.

4.10.-Experimento de Overlay

Las muestras se separaron en un gel de poliacrilamida al 10% y luego de ser transferidas a una membrana de nitrocelulosa, fueron bloqueadas en 2 % PBS-BSA por 1 hora a temperatura ambiente(Saragoni et al.,2000). Luego se lavó la membrana 1 vez por 10 min en PBS 1x, y posteriormente se incubó durante toda la noche a 4°C con la proteína de interés, en este caso la quinasa dependiente de ciclina cdk5 unida a GST proteína de fusión, a una concentración de 1mg/ml.Las proteínas cdk5, p35 y beta-catenina fueron obtenidas a través de recombinación y los clones utilizados fueron donados por el Dr. Harrish Pant, del Nacional Institute of Health (NIH), 9000 Rockville pike, Bethesda, Maryland. La proteína de fusión cdk5-GST y beta catenina-GST fueron obtenidas en el Laboratorio del Dr. Maccioni donde se realizó la tesis.

Una vez terminada la incubación con la proteína antes mencionada, se lavó 2 veces por 10 min con PBS-Tween 0,1% y se volvió a incubar, esta vez con el primer anticuerpo monoclonal anti-cdk5 a una dilución de 1: 200 durante toda la noche a 4°C . Se lavó la membrana tres veces por 10 minutos con PBS-Tween 0,1% y se incubó con el segundo anticuerpo anti-ratón a una dilución de 1:1500, todo esto en PBS-BSA 2 %

por una hora a temperatura ambiente. Se lavó tres veces por 10 minutos con PBS-Tween 0,1% y finalmente se incubó por 10 minutos con agitación suave con el sistema ECL, para posteriormente revelar en el equipo Molecular Imager FX .

4.11.-Obtención de Extractos Proteicos

Los extractos proteicos se obtuvieron de cerebro total de fetos de ratas con 18 días de preñez , se homogeneizaron en buffer de lisis (NP-40 0,5 % ; Hepes 10 mM pH 7,4; MgCl₂ 3mM ; KCl 40 mM; Inhibidores de proteasas (PMSF 1mM, leupeptina 10 mg/ml, aprotinina 0,5 mg/ml y pepstastina A 0,7 mg/ml). Posteriormente se centrifugaron a 20.000 g, con la finalidad de eliminar los agregados de DNA y restos de membranas, y así trabajar solo con las proteína disueltas en el sobrenadante. Es importante mencionar de que el uso de este tampón de lisis, es principalmente debido a que la mitad de las proteínas con las cuales se trabajo son de membrana (p35, PS1, PS2). Una vez separado el sobrenadante, se miden proteínas por el método de Bradford (Bradford *et al* , 1976).

4.12.-Purificación de Proteína Microtubular

Se utilizaron generalmente dos cerebros de bovino completos mantenidos en hielo, se limpian cuidadosamente, se les quitá las meninges y se siguió el procedimiento (Maccioni *et al*. 1989). Se homogenizaron los cerebros en una juguera (2 ciclos completos) en un medio que contenía: Tampón MES 0,1M pH6.8 en frio, glicerol 1 M, e inhibidores de proteasas aprotinina 1 mg/ml, pepstatina 1 mg/ml, leupeptina 1 mg/ml, MgCl₂ 1 mM, y PMSF 10 g/ml en un total de 250 ml. Se centrifugó a 9000 rpm

x 60 min a 4°C en centrifuga Sorvall rotor GSA (RC5). Se midió el volumen de sobrenadante obtenido, y se ajustó la solución a glicerol 2,5 M, GTP 1mM, EGTA 0.5 mM, Inhibidores de proteasas. Posteriormente este sobrenadante se sometió a ciclos de polimerización/ despolimerización para extraer los microtúbulos y desde allí purificar la tubulina. Se incubó la solución durante 30 min a 37°C (formación de microtúbulos, primera polimerización), agitando muy suave para mezclar. Se centrifugó a 30000 rpm durante 60 min a 30°C en centrifuga Combi rotor 647.5 (capachos de 65 ml). Se resuspendieron los *pellets* en frío a 4°C (utilizando el menor volumen posible, no más de 55 ml repartidos en todos los pellets) en solución MES 0.1 M pH 6,8, EGTA 0,5 mM, MgCl₂ 1.5 mM. Se resuspendieron los pellets con pipeta pasteur, teniendo cuidado, de no tomar pellet que se quede en la pipeta, y así perder muestra. Luego se homogenizaron suavemente en un homogenizador de vidrio Dounce por 15 min a 4°C (etapa de despolimerización). Se centrifugó a 40000 rpm por 45 min a 4°C en centrifuga Combi rotor T880. El sobrenadante obtenido se ajustó a la siguiente solución: glicerol 4 M, GTP 1 mM, MgCl₂ 1mM, inhibidores de proteasas. Se incubó por 30 min a 37 °C (2ª polimerización). Se centrifugó a 40000 rpm por 45 min a 30 °C en rotor T880 (usando 8 capachos). Se extrajo el sobrenadante dejando los pellets (2º ciclo de polimerización) que se trataron con N₂ líquido y se guardaron en *ultrafreezer* a -75°C. Antes de cada purificación de tubulina o de MAPs se sometió la preparación a un tercer ciclo y luego a los procedimientos cromatográficos.

4.13.- Purificación de Proteína tau a partir de cerebro de bovino

Este experimento se realizó según protocolo de Grundke-Iqbal *et al.*, 1986 con modificaciones de Farias *et al.*, 1992.

Se purifica a partir de proteína microtubular de segundo ciclo. El pellet obtenido en el segundo ciclo de polimerización-depolimerización se coloca con una espátula en el homogeneizador Dounce y se le agregan tres volúmenes de una solución que contiene: MES 0.1 M pH 2.7 (4°C), MgCl₂ 0.5 mM, EGTA 1.0 mM, EDTA 0.1 mM, NaCl 1.75 mM, DTT 2mM (stock 100 mM) e inhibidores de proteasas mencionados en el protocolo anterior. Se homogeniza a 4°C y se incuba a la misma temperatura durante 15 min. Una vez depolimerizados los microtúbulos, la suspensión se hierve por 5 min a baño maría con el fin de desnaturar y precipitar la tubulina y otros contaminantes. En estas condiciones se mantienen activas Tau y MAP-2.

La solución obtenida se centrifuga a 20.000 rpm por 20 min, en el rotor T-880. a 4°C, se recupera el sobrenadante (tau) y se le agrega ácido perclórico hasta alcanzar una concentración final de 2.5% ($V_{\text{HClO}_4} = V_{\text{SOBRENADANTE}} * 0.037$) para separar Tau de las MAPs termoestables. El pellet se resuspende en MES 0.1 M pH 6.8 y se analiza su contenido por SDS-PAGE. Se centrifuga a 20.000 rpm por 20 min. a 4°C, en el rotor AH-650. Se recupera el sobrenadante y se dializa contra un tampón Tris 2.5 mM pH 7.6, realizando 2 a 4 cambios, manteniendo siempre en refrigeración (4°C) con agitación constante durante 24 horas. El dializado se concentra en Amicon o con Sacarosa (sobre una cama de azúcar común y corriente se coloca una película de sacarosa, se coloca la bolsita de diálisis y se cubre con sacarosa) para posteriormente disolverlo en tampón MES 0.1 M pH 6.8. Se obtiene tau con una pureza de 90 -96%, lo

que debe ser confirmado por SDS-PAGE (Laemmli,1970). En todas las muestras obtenidas se debe determinar la concentración de proteínas (Lowry *et al.*, 1951; Maccioni *et al.*, 1985; Vera *et al.*, 1989). Se tomaron las siguientes precauciones técnicas: 1.- Las bolsitas de diálisis se mantenían a 4°C. 2.- Se preparó alrededor de 800 mL de tampón TRIS 2,5 mM pH 7,6. 3.- La agitación de la bolsita de diálisis se hacía suavemente estando completamente sumergida de modo que ambas caras de la bolsita estén en contacto con el buffer.

5.-RESULTADOS

El complejo formado por la proteína quinasa dependiente de ciclina, cdk5, y su activador, p35, está involucrado en diversos procesos biológicos, dentro de los que se encuentran, la fosforilación de la proteína tau, de gran relevancia en la organización del citoesqueleto, también posee una función esencial dentro de la migración neuronal y la configuración laminar de la corteza cerebral. Cdk5 es una proteína quinasa que se encuentra en cerebro donde es activada por p35 (es importante mencionar que existen p25, p39, p67, como posibles activadores), y que cumple también, una función clave en el proceso de diferenciación neuronal. Hasta ahora no se conocen en detalle los aspectos regulatorios de su activación y acción sobre sus diferentes sustratos. Los sustratos posibles que se analizan son las Presenilinas 1 y 2, y las cateninas beta y delta.

5.1 Distribución de cdk5 y beta-catenina en células neuronales.

Para estudiar la localización subcelular de cdk5 y beta-catenina en células del sistema nervioso, utilizamos cultivos de hipocampo de embrión de rata E18. Estos cultivos fueron utilizados para realizar experimentos de doble inmunofluorescencia para las proteínas cdk5 y beta catenina con un anticuerpo anti-beta-catenina policlonal y un anticuerpo monoclonal anti-cdk5. Las señales de estos anticuerpos fueron detectadas por medio de anticuerpos secundarios conjugados a FITC y TRITC respectivamente, los resultados de estos estudios fueron analizados posteriormente por medio de microscopia confocal.

En la **Figura 3** se observa que cdk5 y beta-catenina co-localizan en las células de hipocampo de embrión de rata. Las regiones en amarillo muestran el composito indicando la co-localización subcelular de estas proteínas, principalmente en la membrana celular.

El analisis individual de estas proteinas revela que cdk5 se localiza homogeneamente en las celulas, mientras que beta-catenina se localiza principalmente en la membrana plasmatica.

Adicionalmente, utilizando inmunofluorescencia se identificó la localización subcelular de cdk5 y beta-catenina, en células de neuroblastoma que se encuentran en proliferación y diferenciadas con db-cAMP por 48 hrs. En estos resultados se observa la distribución homogénea de cdk5 en toda la célula, y en el caso de beta catenina se observa una distribución mayoritaria en la membrana plasmática y en los sitios de contacto célula-célula. Por otra parte estas observaciones muestran que beta catenina y cdk5 co-localizan en la membrana plasmatica (**Figura 4**). Por medio de co-inmunoprecipitación de beta catenina utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido a cdk5 se demostró la interacción de estas dos proteínas en cerebro de rata en estado fetal y adulto (**Figura 5A**) como se analiza en detalle en en el punto 5.2 . Por otra parte estudios de expresión de la proteína beta-catenina en estas células no mostraron cambios significativos durante el proceso de diferenciación.

5.2 Interacción del sistema cdk5/p35 con beta catenina.

Para la investigación la interacción de cdk5 y beta catenina en células neuronales se realizaron experimentos de co-inmunoprecipitación seguido por ensayos

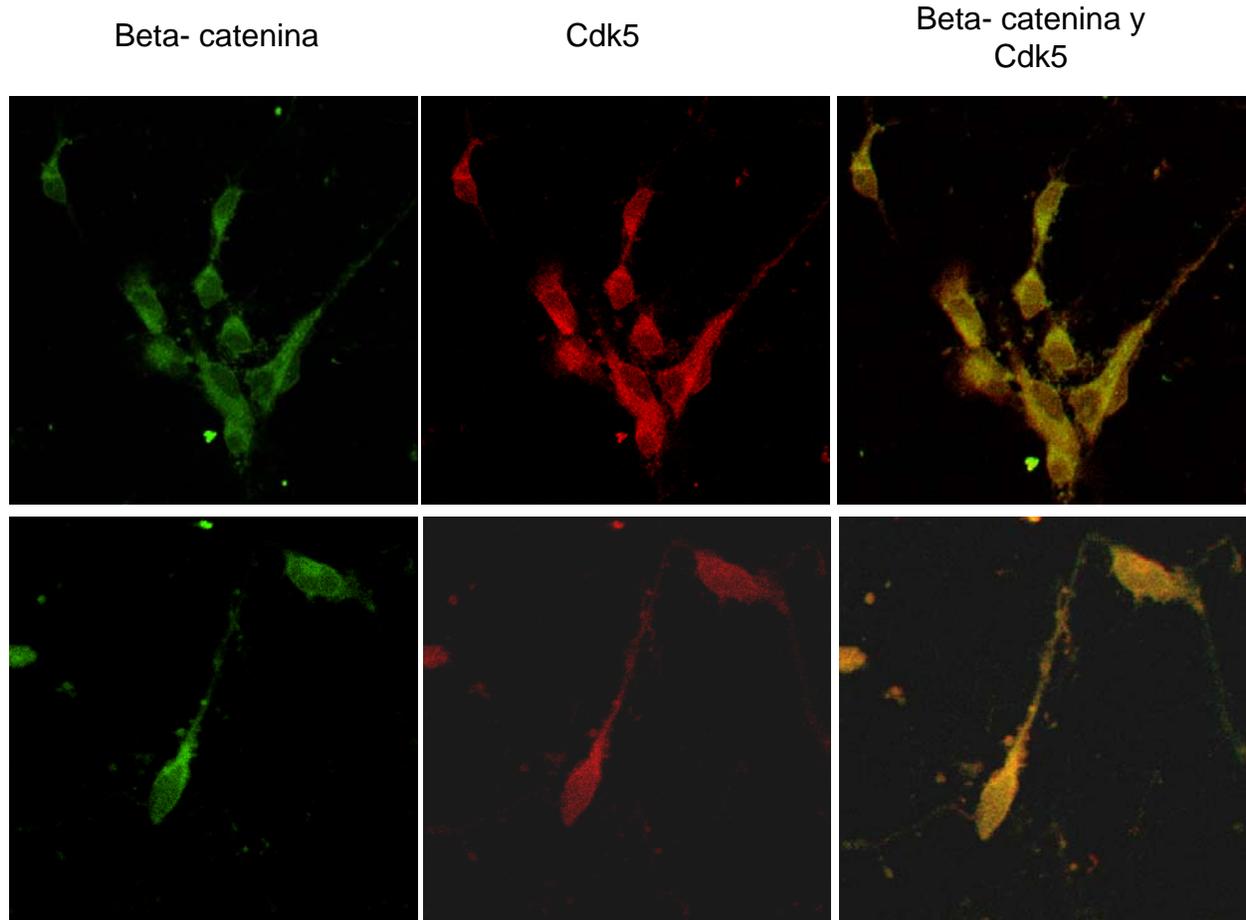


Figura 3. Colocalización subcelular de Cdk5 y beta catenina en células de Hipocampo de rata. Celulas de Hipocampo de rata, tratadas con anticuerpos primarios contra beta catenina y cdk5, y anticuerpos secundarios conjugados a fluoresceina (beta catenina) y rodamina (cdk5).En color rojo tinción de cdk5 y en color verde beta catenina y en color amarillo se observa la colocalización de estas proteínas

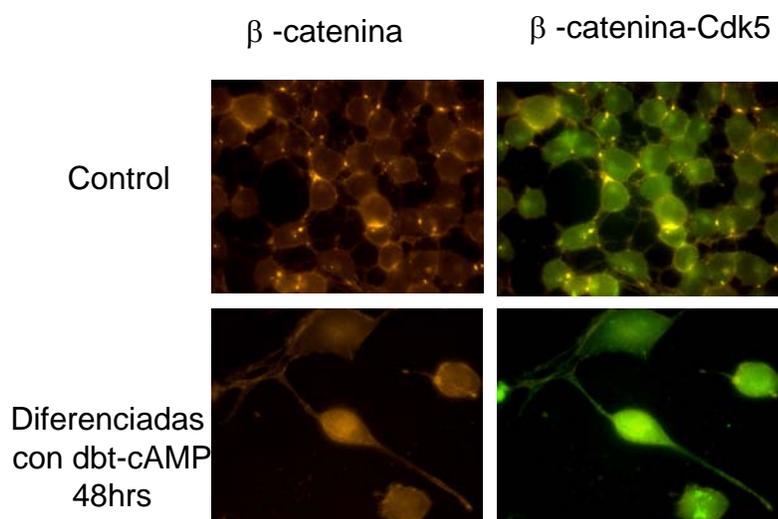


Figura 4. Colocalización de beta-catenina y Cdk5 en células de neuroblastoma N2A. Celulas de neuroblastoma tratadas con anticuerpos primarios contra beta catenina y cdk5, y anticuerpos secundarios conjugados a fluoresceina (cdk5) y rodamina (beta catenina).En rojo tinción para beta catenina y en verde para cdk5, en amarillo se observa la colocalización de ambas proteínas

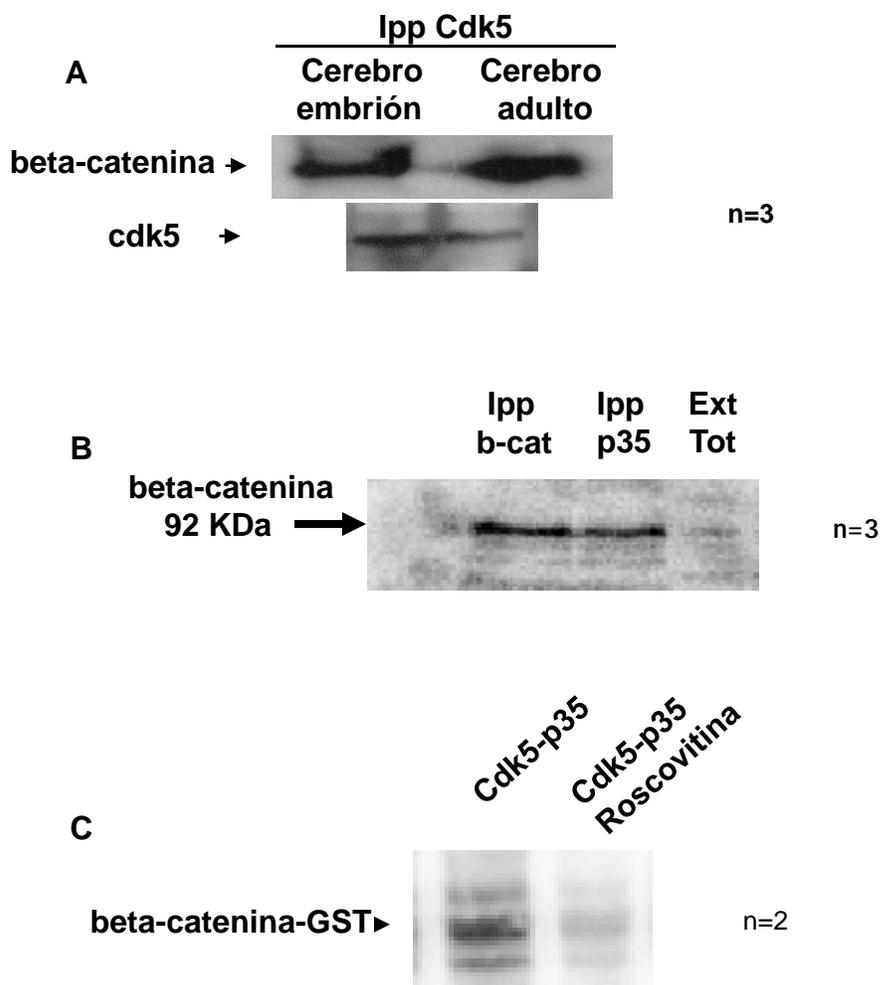


Figura 5. Interacción de cdk5 y p35 con beta catenina en extractos de cerebro de rata y Fosforilacion de beta catenina por cdk5/p35. Panel A.- Co-inmunoprecipitación de Cdk5 con beta catenina en extractos de cerebro de rata tanto en estadios embrionarios E18, como en cerebro adulto. Panel B. Co-inmunoprecipitación de P35 con beta catenina en extractos de cerebro de rata. Panel C.- Fosforilación de beta catenina por Cdk5/p35 *in vitro*. Roscovitina 5 mM un inhibidor de Cdk5, se utilizó como inhibidor de la reacción.

de inmunodetección de los complejos. La proteína cdk5 fue inmunoprecipitada (Kesavapany et al., 2000) de extractos totales de cerebro de embrión de rata E18. Los inmunoprecipitados fueron fraccionados en geles SDS-PAGE y transferidos a una membrana de nitrocelulosa. Para inmunodetectar la presencia de beta-catenina en los inmunocomplejos, las membranas fueron incubadas con un anticuerpo policlonal dirigido a beta-catenina. Se observó una señal de aproximadamente 92 kDa, peso que corresponde a la masa molecular de beta-catenina. **(Figura 5 A)**. A partir de esta observación demostramos que estas proteínas interactúan en células neuronales.

De la misma forma se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación de p35 en extractos de neuronas hipocámpales de rata. Utilizando un anticuerpo policlonal anti-p35 se inmunoprecipitaron los complejos a partir de extractos de células neuronales. La inmunodetección de beta-catenina reveló que la proteína p35 interactúa con beta-catenina. Esto demuestra que tanto cdk5 como p35 se encuentran asociados a beta-catenina **(Figura 5B)**.

Es importante mencionar que el experimento de overlay y las purificaciones de proteínas microtubulares, fue realizado y pensado con el fin de establecer una interacción específica de cdk5 a beta-catenina y posteriormente, también a tau, como tercer elemento. La proteína tau, es una proteína microtubular, que posee 6 isoformas tanto en humanos como en bovinos, su peso molecular varía entre 45 y 55 kDa, y es sustrato normal de cdk5. Esto nos podría haber hecho pensar que de alguna forma la unión a beta-catenina de cdk5 podría regular la fosforilación de esta quinasa con su sustrato tau. Asumimos entonces que el que no se obtuvieran resultados que nos demostraran interacción cdk5 y beta-catenina, y posteriormente de cdk5 con tau se

debía principalmente porque las concentraciones que se obtenían, de tau, como de proteínas de fusión, cdk5 y beta catenina, no eran las adecuadas para el éxito del experimento. Se realizaron experimentos de overlay, para dilucidar una posible interacción entre las proteínas con un n=3, tanto como para cdk5 y beta catenina, y cdk5 y proteína tau. Para cada experimento de overlay, en el que participaba la proteína tau, se realizaron purificaciones particulares.

5.3 Fosforilación de beta catenina por el sistema cdk5/p35

Por otra parte fue de gran relevancia determinar si la proteína beta catenina es sustrato del complejo cdk5/p35. Con el fin de analizar si cdk5/p35 fosforila beta-catenina se realizaron ensayos de actividad quinasa *in vitro*. Las proteínas cdk5 y p35 fueron obtenidas a través de recombinación. La beta-catenina fusionada a GST fue purificada por medio de una columna de afinidad con glutatión unido a Sepharosa, proteína obtenida en el Laboratorio del Dr Maccioni. Posteriormente cdk5-GST y p35-GST fueron incubadas por 30 minutos a 4°C en presencia de ATP para que se origine la formación del complejo. Luego la enzima cdk5/p35 se utilizó para fosforilar beta-catenina -GST *in vitro*, utilizando [³²P] γ ATP para identificar la fosforilación de la proteína. Nuestros resultados demuestran la fosforilación de beta-catenina por cdk5 específica, ya que utilizando roscovitina 5 μM, un inhibidor de cdk5 e inhibidor de la reacción, se produce la disminución de la marca del fosfato radioactivo, debido a la disminución de la fosforilación específica. **(Figura 5C).**

5.4 Interacción de cdk5 con delta-catenina y PS1 en células neuronales .

5.4.1 Expresión de delta catenina en células neuronales

Se ha demostrado previamente por medio de inmunofluorescencia doble, que los únicos miembros de la familia de cateninas que estarían asociadas y co-localizando con PS1, serían beta y delta catenina, pero no con alfa ni gamma catenina (Leveske, et al. 1999). En nuestro laboratorio se ha demostrado que el sistema cdk5/p35 cumple un papel importante en el mecanismo de neurotoxicidad mediado por A β (Alvarez et al., 1999), de esta forma nos interesó analizar si existía una regulación mediada por cdk5/p35 sobre las proteínas delta catenina y presenilina 1.

Delta catenina es una proteína implicada en fenómenos de adhesión y en la formación de dendritas, adicionalmente interactúa con PS1, una proteína involucrada en el origen de la enfermedad de Alzheimer.

Al analizar la expresión de esta proteína en células corticales diferenciadas entre 0 y 10 días observamos que esta proteína incrementa su expresión entre el segundo y tercer día de crecimiento (**Figura 6A**). Adicionalmente utilizando inmunodetección de

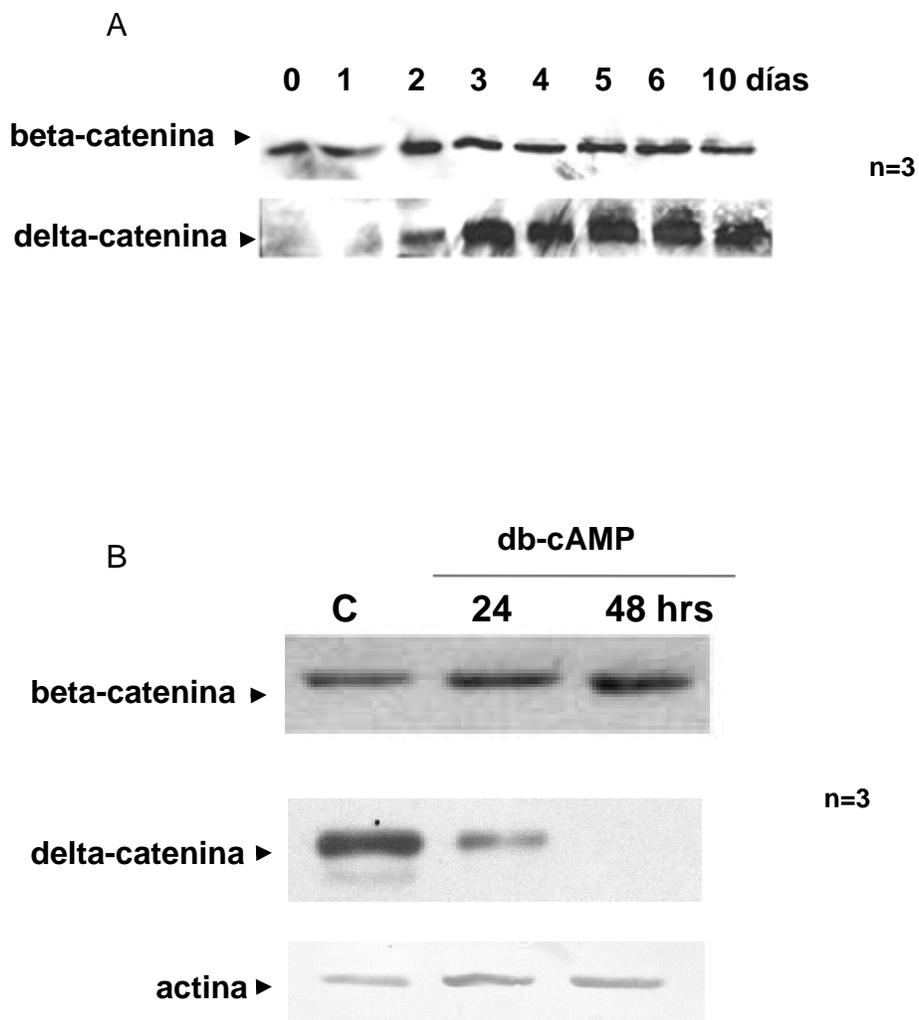


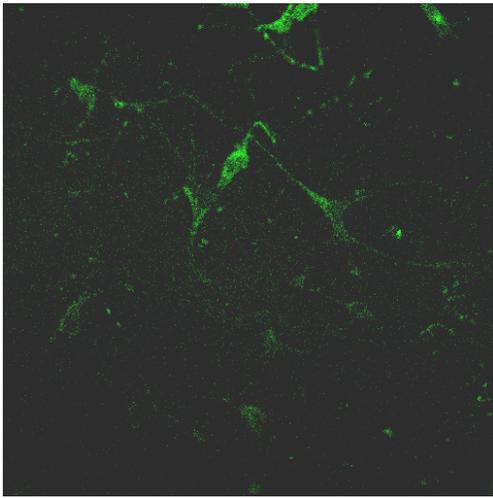
Figura 6. Inmunodetección de beta y delta catenina en células nerviosas. **Panel A:** Inmunodetección de beta catenina y delta catenina en células corticales de embrión de rata diferenciadas de 0 a 10 días. **Panel B:** Inmunodetección de beta y delta catenina en células de neuroblastoma N2A diferenciadas por 0, 24 y 48 hrs con db-cAMP 5mM.

delta-catenina en células N2A diferenciadas con db-cAMP observamos que los niveles de esta proteína disminuían a medida que se diferencia la células, donde a las 48 hrs de diferenciación no se observa la presencia de delta catenina. Beta-catenina en tanto no cambió su expresión en forma significativa, esto principalmente planteado, luego de tener un n=3 de este experimento (**Figura 6B**). Curiosamente en las células de neuroblastoma N2A diferenciadas con db-cAMP se produce una disminución de los niveles de delta-catenina, este fenómeno posiblemente esta asociado con el fenotipo que originan las células N2A diferencias, el cual se ha demostrado por medio del uso de marcadores moleculares que correspondería a una diferenciación de tipo axonal (Fowler et al., 2001).

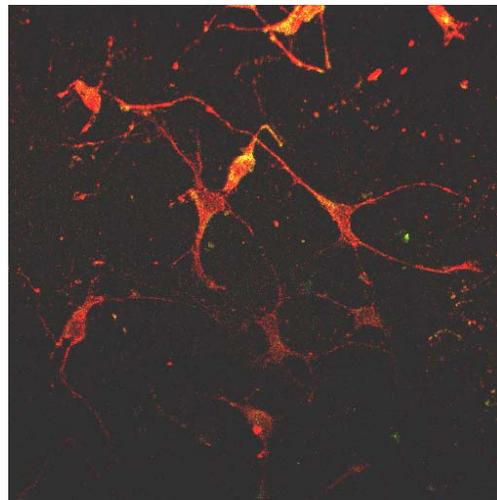
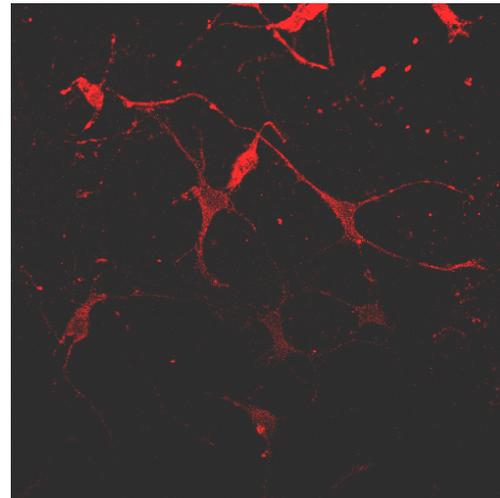
5.4.2 Localización e Interacción de cdk5/p35 con delta catenina en células neuronales

Para analizar si las proteínas delta catenina y p35 co-localizaban se realizaron ensayos de inmunolocalización en células de hipocampo de embrión de rata, a partir de estas observaciones demostramos que estas proteínas co-localizan principalmente en la región del soma de la neurona. Además ambas proteínas presentan una distribución subcelular homogénea en las células hipocampales. (**Figura 7**). A partir de extractos de cerebro de rata adulto y de células de neuroblastoma N2A se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación de delta-catenina y cdk5. De esta forma extractos de proteínas fueron incubados con un anticuerpo monoclonal dirigido a delta catenina y los inmunocomplejos fueron fraccionados en geles de SDS-PAGE. Al realizar la inmunodetección de cdk5 en estos complejos observamos que estas

p35



delta-catenina



p35 y delta-catenina

Figura 7. Colocalización de p35 y delta catenina en células de hipocampo de rata. Células de Hipocampo de rata tratadas con anticuerpos primarios contra delta catenina y p35, y anticuerpos secundarios conjugados a fluoresceína (p35) y rodamina (delta catenina). En color rojo la proteína delta catenina, en color verde la proteína p35 y en color amarillo la colocalización de estas proteínas.

proteínas están asociadas (**Figura 8 A**). Es importante mencionar que el control negativo para el Inmunoprecipitado es solo la Inmunoglobulina, de tal forma de asegurarse de que no existen interacciones inespecíficas. Adicionalmente se realizó el experimento inverso en el cual se utilizó un anticuerpo dirigido a Cdk5 para formar los inmunocomplejos en las células neuronales. En este experimento se observó un resultado similar, donde Cdk5 estaría interactuando con delta catenina (**Figura 8 B**).

Además en este estudio se utilizaron células hipocampales de cerebro de embrión de rata, así extractos de estas células fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo dirigido a la proteína p35. Cuando se inmunodetectó delta catenina en los inmunocomplejos fraccionados en geles de SDS-PAGE se observó que el peso molecular de la proteína no corresponde al esperado, sino a un menor tamaño, este resultado fue repetitivo, posiblemente este fenómeno se produce debido a que la proteína delta-catenina presente en células de hipocampo se hidroliza por alguna circunstancia, conservando su epítipo para el anticuerpo. Este experimento se repitió dos veces dando el mismo resultado, por lo cual no quisimos ahondar más en el tema para no desviarnos de nuestro objetivo(**Figura 8 C**).

5.5 Interacción de cdk5/p35 con PS1 y PS2

Para investigar la interacción de Cdk5 y p35 con las proteínas PS1 y PS2 ambas involucradas en la patogénesis de Alzheimer realizamos experimentos de coinmunoprecipitación en extractos de células de hipocampo de rata. Cuando se realizó detección de la interacción de Cdk5 con PS1 y PS2 por medio de esta estrategia experimental no se observó asociación de la quinasa con estas proteínas. Sin embargo cuando se realizaron experimentos de co-inmunoprecipitación de PS1 con p35 se

observo asociación entre estas proteínas. En la **Figura 9** se observa la co-inmunoprecipitación de PS1 a partir de extractos de cerebro de rata, los inmunocomplejos fraccionados se inmunodetectaron con el anticuerpo P35 policlonal. En experimentos de interacción entre las proteínas p35 y PS2 no se observaron resultados positivos.

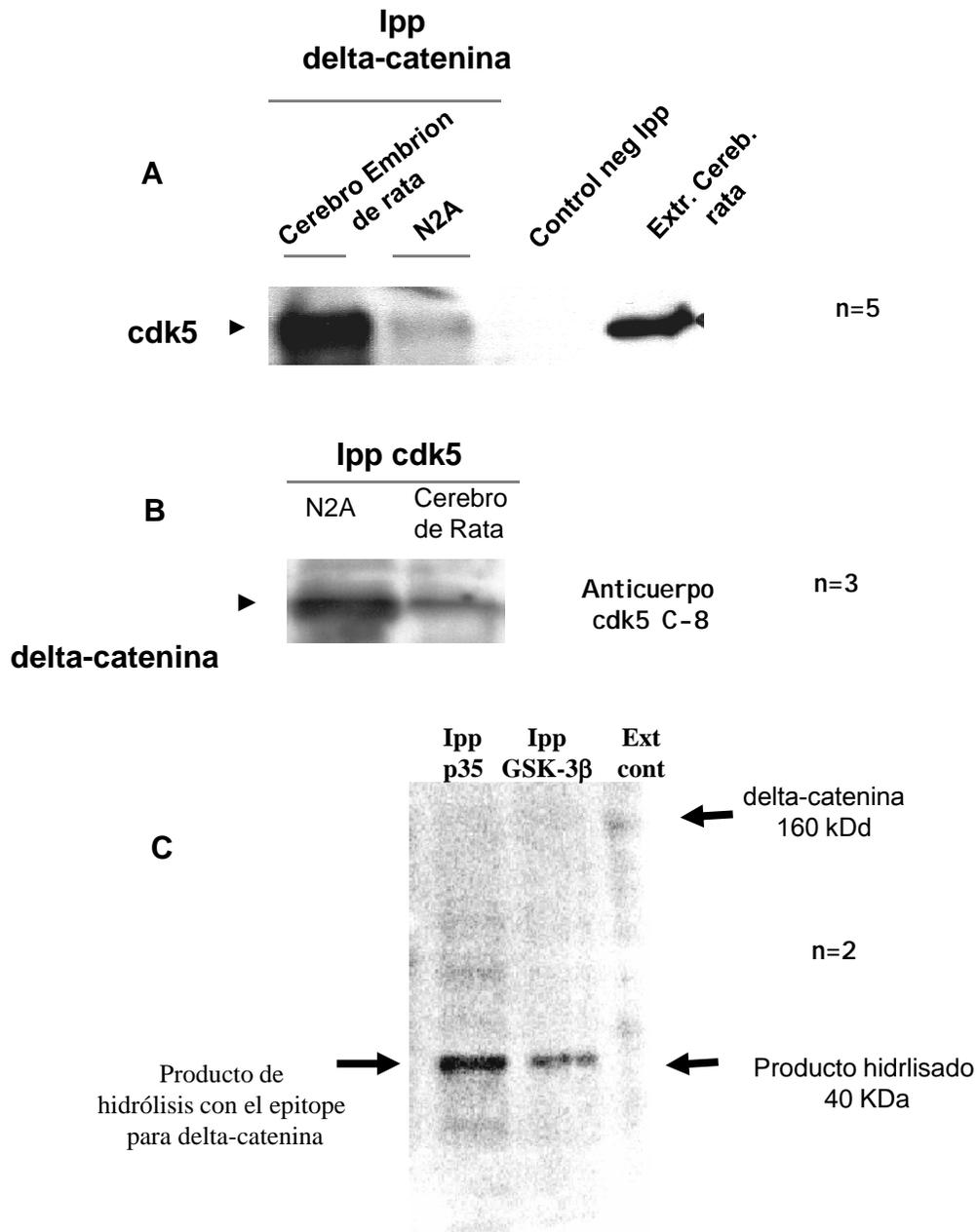


Figura 8. Interacción de Cdk5/p35 con delta catenina. Panel A, B: Co-inmunoprecipitación de delta catenina y cdk5 en extractos de cerebro de rata y neuroblastoma N2A. Los inmunoprecipitados fueron fraccionados en un gel de SDS-PAGE y posteriormente transferidos en membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron inmunodetectadas utilizando un anticuerpo dirigido a cdk5 y delta catenina respectivamente. **Panel C:** Co-inmunoprecipitación de p35 y GSK-3 β con delta catenina. Al parecer el complejo resultante de la coimmunoprecipitación sufre una degradación, existiendo el epitope del anticuerpo, pero no al peso molecular esperado.

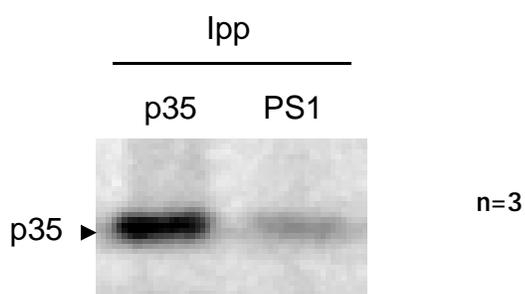


Figura 9. Interacción entre Presenilina 1 y el activador neuronal p35. Co-precipitación de la proteína p35 junto a PS1, en extractos de cerebro de rata. Las proteínas inmunoprecipitadas fueron separadas en un gel de SDS-PAGE y posteriormente transferidos en membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron inmunodetectadas utilizando un anticuerpo dirigido a p35.

6.- DISCUSION

Los mecanismos que regulan la función cerebral implican un conjunto de factores tanto intra como extra celulares que actúan en forma coordinada para mantener la homeostasis de las diferentes sub-poblaciones de células neuronales en el tejido nervioso. Es de gran relevancia investigar cuales son las funciones claves que se desarrollan en una célula neuronal, en relación con los mecanismos de polaridad celular, en la guía axonal, así como en la diferenciación y migración celular.

Se han identificado un conjunto de proteínas que participarían en procesos asociados a migración y adhesión neuronal, estas moléculas cumplen funciones importantes en la organización de la corteza cerebral. En este proceso se define la migración de células desde una región cerebral en los estadios E11, denominada zona ventricular, a zonas más externas del cerebro. En este proceso se ha demostrado que las células que se ubican en la zona ventricular poseen altos niveles de N-caderina, una proteína clave en la formación de complejos de adhesión celular. Posteriormente cuando comienza la migración neuronal, los niveles de esta proteína decaen dramáticamente, permitiendo así, que las células que van a dar origen a la placa cortical pierdan adhesión y se favorezca la migración.

Recientes investigaciones han demostrado que en este proceso participaría la proteína cdk5. Esta enzima junto a su activador p35 regularía procesos implicados en los cambios de interacción de beta catenina a N-caderina.

La proteína quinasa dependiente de ciclina cdk5, y su activador neuronal p35, han sido involucrados en diferentes funciones en el sistema nervioso central,

incluyendo crecimiento y guía en la formación de los axones, fasciculación y migración neuronal durante el desarrollo cortical. Así se ha demostrado que su actividad es crucial para el funcionamiento adecuado de mecanismos subcelulares que participan en el desarrollo de neuronas.

Por otra parte nuestro laboratorio ha demostrado que el sistema de la quinasa cdk5 incrementa su actividad en células tratadas con beta amiloide ($A\beta$), alteración que estaría directamente relacionada a cambios en la fosforilación de la proteína tau, y posiblemente otras proteínas del citoesqueleto. Adicionalmente, es interesante destacar que cdk5 estaría alterando la regulación de la proteína beta- catenina neuronal, ya que se ha observado que en enfermos de Alzheimer los niveles totales de la proteína beta- catenina decaen en esta patología.(Alvarez et al, 2001)

En este trabajo de tesis investigamos la participación de el sistema cdk5/p35 en la regulación de beta y delta-catenina y de las presenilinas, proteínas implicadas en sistemas que regulan los cambios de adhesión celular.

Como estrategia para estudiar la relación funcional de cdk5/p35 y estas proteínas, utilizamos en este estudio experimentos de co-inmunoprecipitación de proteínas y co-localización de estas proteínas en células de hipocampo de embrión de rata. Este enfoque experimental nos permitió demostrar la interacción y localización subcelular de estas proteínas.

Cuando realizamos experimentos de co-inmunoprecipitacion de cdk5 y p35 en extractos de cerebro total de rata en estadio fetal y adulto, tanto cdk5, como p35 evidenciaron una interacción con β -catenina. Estas observaciones son concordantes

con estudios que demostraron la asociación directa de beta-catenina por medio de doble híbrido (Kwon et al., 2000)

La interacción entre p35 y β -catenina, y entre cdk5 y β -catenina, como lo muestra nuestros resultados en **Figura 5A Y 5B** además de la co-localización entre beta-catenina y cdk5 en células de hipocampo de rata y células de neuroblastoma N2a diferenciadas con dbt-cAMP (**Figuras 3 y 4**), nos sugiere que beta-catenina se asocia en la membrana plasmática con del complejo cdk5/ p35. Por otra parte la asociación funcional entre N-caderina y beta-catenina, como se muestra en el esquema de la **Figura 10**, nos sugiere que el complejo cdk5/p35, podría jugar un rol regulatorio en la adhesión celular mediada por N-caderina. Otra función probable que se le puede atribuir a la interacción entre cdk5/p35 y β -catenina está relacionada con la vía de transducción de señales de wingless (Wnt), en la cual β -catenina es un componente de gran importancia en la regulación de la expresión génica de algunos genes implicados en el desarrollo. En ausencia de Wnt, β -catenina es fosforilada en un sitio ubicado en la región N-terminal por la serina-treonina quinasa GSK-3 β (Yost *et al.*,1996; Ikeda *et al.*,1998). Además esta fosforilación participa en el incremento de afinidad de beta catenina a un complejo que contiene axina y la proteína “*adenomatous polyposis coli*” (APC) como se muestra en la Figura 1 (Kikuchi, 2000).

Beta-catenina interactúa, y es fosforilada además en los residuos de tirosina por la familia Src de tirosinas quinasas (Daniel y Reynolds, 1997). Esta modificación postraduccional induce a la pérdida de interacción de beta-catenina con proteínas de la familia de las caderinas.

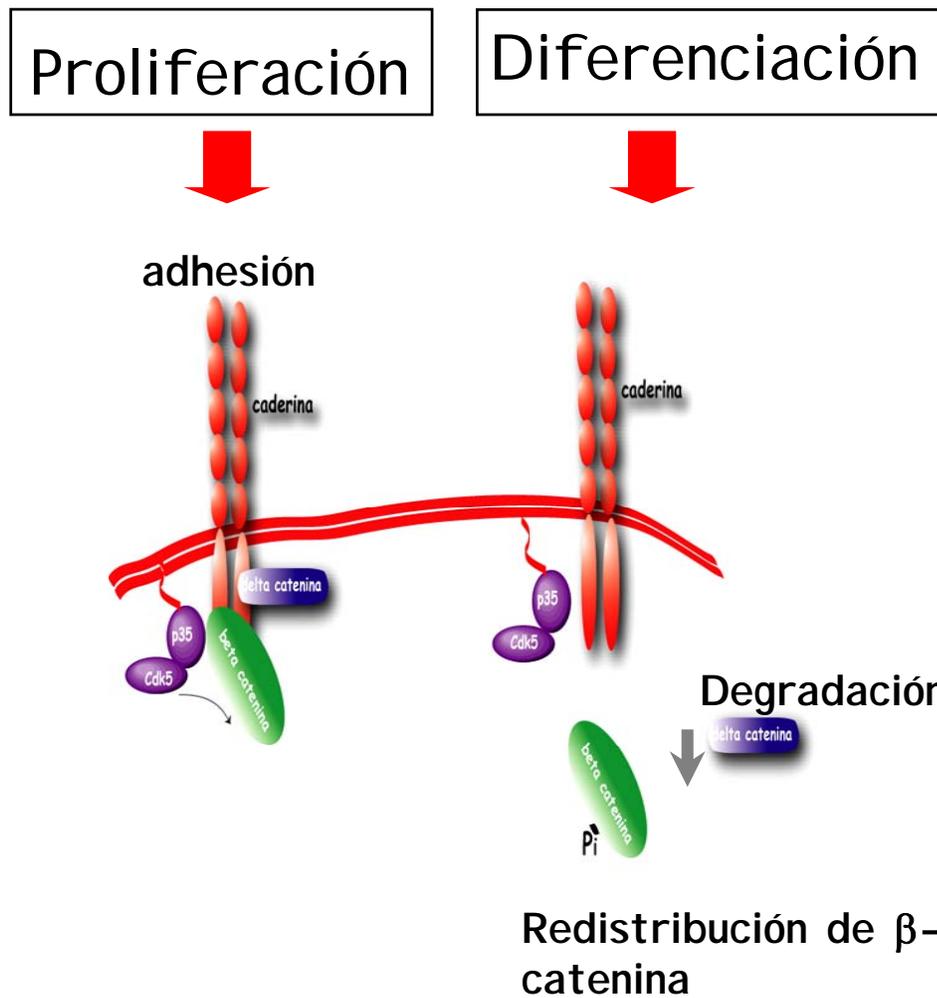


Figura 10. Función de la proteína beta catenina en etapas de proliferación y diferenciación. Modelo que muestra la participación que tendría la proteína beta catenina, actuando como sustrato para el complejo quinasico cdk5/p35, en las etapas de proliferación y diferenciación. Munoz et al., 2003 *J Cell Biochem.* 89:539-49

De esta forma la modificación post-traducciona de beta-catenina jugaría un papel relevante en los fenómenos de distribución subcelular y metabolismo de esta proteína. Mediante ensayos de actividad quinasa *in vitro* hemos demostrado que beta-catenina es sustrato de cdk5/p35, este resultado nos indica que la quinasa cdk5 estaría implicada en el metabolismo de esta proteína **(Figura 10)**

Sin lugar a duda el estudio de los sitios específicos fosforilados en beta catenina por cdk5 son de gran relevancia para la comprensión del efecto de esta modificación sobre beta-catenina. Como discutía previamente cdk5 es una quinasa que incrementa su actividad en células del hipocampo de embrión de rata tratadas con beta-amiloide. Además diversas investigaciones han demostrado que los niveles de su activador p35 se encuentran alterados en cerebros de pacientes con Alzheimer. El hallazgo que demuestra que cdk5 fosforila beta-catenina puede estar ligado directamente a la disminución de los niveles de beta catenina en enfermos de Alzheimer. De esta forma sería importante analizar si los sitios fosforilados por cdk5 están participando en la interacción de esta proteína a la Axina o APC, proteínas que se unen a beta-catenina para participar en el mecanismo de degradación mediado por proteosoma.

En este trabajo de tesis estudiamos además a delta catenina una proteína que se expresa exclusivamente en el tejido nervioso, y se localiza en el soma y en las dendritas de las neuronales. Además resultados de nuestro laboratorio han demostrado que co-localiza con la proteína p35 .

Cuando neuronas corticales de embrión de rata son diferenciadas no se observan cambios de expresión de beta catenina, pero claramente podemos ver un incremento de la expresión de delta-catenina en los primeros dos días de

diferenciación, fenómeno directamente relacionado con el incremento en la arborización y el número de dendritas en las neuronas (**Figura 6A**). Curiosamente en células de neuroblastoma N2A que son diferenciadas con dbt-cAMP se produce una disminución de los niveles de delta-catenina, fenómeno que posiblemente está asociado con el fenotipo que originan las células N2A diferenciadas. Este fenotipo, se ha demostrado por medio del uso de marcadores moleculares, correspondería a una diferenciación de tipo axonal (Fowler et al., 2001) (**Figura 6B**). Adicionalmente observamos que cuando sobre-expresamos p35 en células de neuroblastoma N2A se produce una disminución de los niveles de delta catenina, fenómeno que estaría implicando al complejo cdk5/p35 en un proceso de degradación de delta catenina, posiblemente vía fosforilación de esta proteína. De esta forma estas observaciones nos sugieren un sistema de regulación en el cual cdk5/p35 participaría en la redistribución de delta-catenina desde el axón a compartimentos somatodendríticos.

En suma, podemos postular que beta y delta catenina serían fosforiladas por el sistema cdk5/p35, evento que participaría en la disminución de la interacción de estas proteínas por caderinas. Las poblaciones de beta y delta catenina posteriormente serían posiblemente degradadas. De esta forma se produciría la reorganización de los focos de adhesión, evento necesario para la formación de neuritas.

Presenilina 1 y 2 son proteínas localizadas en la membrana celular, y en compartimentos vesiculares, tales como el aparato de Golgi. Ambas proteínas son de gran relevancia, ya que han sido relacionadas con la patogénesis del Alzheimer. Investigaciones donde se han analizado los genes que codifican para estas proteínas han demostrado que existen mutaciones en Presenilina están implicadas en la

enfermedad de Alzheimer de origen hereditaria, adicionalmente PS1 es uno de los principales componentes de la beta secretasa, proteína que modifica proteolíticamente la proteína precursora de amiloide APP (Zhang et al., 2000).

En nuestro trabajo fue de gran relevancia investigar la posible interacción de cdk5/p35 con PS1 Y PS2, ya que estas proteínas también estarían implicadas en fenómenos que regulan la adhesión celular y proliferación (Czech et al, 2000). Además investigaciones han demostrado que tanto beta y delta catenina se asocian a PS1 (Kesavapany et al., 2001 ; Tanahashi et al., 1999).

Utilizando ensayos de co-inmunoprecipitación de p35 a partir de extractos de cultivos primarios de hipocampo de rata, observamos que p35 se asocia a PS1. A partir de este resultado podemos sugerir que el complejo cdk5/p35 participaría en la regulación de PS1, por otra parte cuando realizamos ensayos de coimmunoprecipitación de p35 con PS2 no observamos asociación entre estas proteínas.

Un trabajo reciente ha descrito un mecanismo de degradación de beta-catenina en el cual esta implicada PS1, el mecanismo consiste en que la interacción de PS1 sería un paso limitante en un mecanismo alternativo de degradación de beta catenina. En base a estos resultados es interesante pensar que beta catenina estaría siendo regulada por este sistema de recambio proteico, donde se formaría un complejo de cdk5/p35, PS1 y beta catenina en la membrana plasmática, y que su destino final sea la regulación por degradación. Cabe destacar que este fenómeno sería un mecanismo finamente regulado, ya que se conoce bastante bien, que las sub-poblaciones de beta catenina que se encuentran en la membrana plasmática, citoplasma y nucleo mantienen un fino equilibrio (Kesavapany et al., 2001).

La relación entre el activador neuronal de cdk5 , p35 y PS1, es muy interesante , ya que estas tres proteínas están involucradas en una cadena de acontecimientos que derivan finalmente en la enfermedad de Alzheimer. PS1 es la que regula el procesamiento de APP (proteína precursora del amiloide), permitiendo que las γ -secretasas produzcan $A\beta$ 1-40/1-42 y al igual que PS2, provoca cambios un aumento γ -secretasas que hidrolizan la proteína precursora del amiloide (APP) (Czech et al ., 2000)

En esta tesis se estudió la interacción de Cdk5/p35 con tres proteínas asociadas a la adhesión celular, y a los mecanismos que se encuentran desregulados en la enfermedad de Alzheimer. Nuestras conclusiones generales a partir de estos resultados son:

El sistema cdk5/p35 se encuentra asociado a beta-catenina y delta-catenina, además cdk5 fosforila beta catenina y esta modificación puede estar asociada a los mecanismos de recambio de esta proteína en la célula.

P35 el activador de cdk5 interactúa con PS1, pero no con PS2, esta asociación de proteínas posiblemente está asociada a la formación de complejos en la membrana de entre PS1-beta catenina y cdk5.

El sistema cdk5/p35 localizado en la membrana plasmática puede participar en la modificación de el metabolismo de proteínas que se encuentran desreguladas en la enfermedad de Alzheimer.

7.- Bibliografía

Alvarez A, Munoz JP, Maccioni RB.2001. A Cdk5-p35 stable complex is involved in the beta-amyloid-induced deregulation of Cdk5 activity in hippocampal neurons. *Exp Cell Res.* 2001 Apr 1;264(2):266-74.

Chen F, Studzinski GP (2001) Expression of the neuronal cyclin-dependent kinase 5 activator p35Nck5a in human monocytic cells is associated with differentiation. *Blood* 97:3763-7

Czech C, Tremp G, Pradier L. 2000. Presenilins and Alzheimer's disease: biological functions and pathogenic mechanisms. *Prog Neurobiol.* 2000 Mar;60(4):363-84

He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW (1998) Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281:1509-12

Ho C, Zhou J, Medina M, Goto T, Jacobson M, Bhide PG, Kosik KS.2000. delta-catenin is a nervous system-specific adherens junction protein which undergoes dynamic relocalization during development. *J Comp Neurol.* 2000 May 1;420(2):261-76.

Homayouni R, Curran T. (2000).Cortical development: Cdk5 gets into sticky situations.

Curr Biol 10:R331-R334

Humbert, S., Dhavan, R., and Tsai, L. (2000) p39 activates cdk5 in neurons, and is associated with the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 113: 975-83

Hume AN, Collinson LM, Rapak A, Gomes AQ, Hopkins CR, Seabra MC 2001Rab27a regulates the peripheral distribution of melanosomes in melanocytes. *J Cell Biol* 152:795-808

Ikeda S, Kishida S, Yamamoto H, Murai H, Koyama S, Kikuchi A (1998) . Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin.

EMBO J 17:1371-84

Kusakawa, G.I, Saito, T., Onuki, R., Ishiguro, K., Kishimoto, T. and Hisanaga, S. (2000) Calpain-dependent proteolytic cleavage of the p35 cyclin dependent kinase 5 activator to p25. *J. Biol. Chem.* 275: 17166-17172

Lazaro JB, Kitzmann M, Poul MA, Vandromme M, Lamb NJ, Fernandez A (1997) Cyclin dependent kinase 5, cdk5, is a positive regulator of myogenesis in mouse C2 cells. *J Cell Sci* 110 :1251-60

Kemler R.1993. From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet.* 1993 Sep;9(9):317-21.

Kesavapany S, Lau KF, McLoughlin DM, Brownlees J, Ackerley S, Leigh PN, Shaw CE, Miller CC. (2001) p35/cdk5 binds and phosphorylates beta-catenin and regulates beta-catenin/presenilin-1 interaction. *Eur J Neurosci* 13:241-247

Kikuchi A. Regulation of beta-catenin signaling in the Wnt pathway.(2000)
Biochem Biophys Res Commun 268:243-8

Kosik KS.1999. A partnership that delivers. *Nat Med.* 1999 Feb;5(2):149-50.

Kwon YT, Gupta A, Zhou Y, Nikolic M, Tsai LH. (2000) Regulation of N-cadherin-mediated adhesion by the p35-Cdk5 kinase.*Curr Biol* 10:363-372

Kusakawa, G.I, Saito, T., Onuki, R., Ishiguro, K., Kishimoto, T. and Hisanaga, S. (2000) Calpain-dependent proteolytic cleavage of the p35 cyclin dependent kinase 5 activator to p25. *J. Biol. Chem.* 275: 17166-17172

Lazaro JB, Kitzmann M, Poul MA, Vandromme M, Lamb NJ, Fernandez A (1997) Cyclin dependent kinase 5, cdk5, is a positive regulator of myogenesis in mouse C2 cells. *J Cell Sci* 110 :1251-60

Lew J, Huang QQ, Qi Z, Winkfein RJ, Aebersold R, Hunt T, Wang JH (1994) A brain-specific activator of cyclin-dependent kinase 5. *Nature* ;371:423-6

Lu Q, Paredes M, Medina M, Zhou J, Cavallo R, Peifer M, Orecchio L, Kosik KS. 1999. delta-catenin, an adhesive junction-associated protein which promotes cell scattering. *J Cell Biol.* 1999 Feb 8;144(3):519-32.

Maccioni, RB, Maccioni RB, Otth C, Concha II, Munoz JP. (2001) The protein kinase Cdk5. Structural aspects, roles in neurogenesis and involvement in Alzheimer's pathology. *Eur J Biochem*, 268:1518-1527

Maccioni, R.B. (2001b) Cdk5: Minireview Series. *Eur. J. Biochem.* 268: 1517-1518

Marrs JA, Nelson WJ. 1996. Cadherin cell adhesion molecules in differentiation and embryogenesis. *Int Rev Cytol.* 1996;165:159-205.

Martinez MC, Ochiishi T, Majewski M, Kosik KS. 2003. Dual regulation of neuronal morphogenesis by a delta-catenin-cortactin complex and Rho. *J Cell Biol.* 2003 Jul 7;162(1):99-111.

Medina M, Marinescu RC, Overhauser J, Kosik KS.2000. Hemizygoty of delta-catenin (CTNND2) is associated with severe mental retardation in cri-du-chat syndrome. *Genomics*. 2000 Jan 15;63(2):157-64.

Miller JR, Moon RT (1996) Signal transduction through beta-catenin and specification of cell fate during embryogenesis. *Genes Dev* 10:2527-39

Muñoz, J. Alvarez, A. and Maccioni, R.B. (2000a) Increase in the expression of the cyclin-dependent protein kinase cdk5 during neuritic development in neuroblastoma cells. *NeuroReport* 11: 2133-2138

Nikolic M, Chou MM, Lu W, Mayer BJ, Tsai LH .1998 The p35/Cdk5 kinase is a neuron-specific Rac effector that inhibits Pak1 activity. *Nature* 395:194-8

Ozawa M, Kemler R.1998. The membrane-proximal region of the E-cadherin cytoplasmic domain prevents dimerization and negatively regulates adhesion activity. *J Cell Biol*. 1998 Sep 21;142(6):1605-13.

Paglini G, Pigino G, Kunda P, Morfini G, Maccioni R, Quiroga S, Ferreira A, Caceres A (1998) Evidence for the participation of the neuron-specific CDK5 activator P35 during laminin-enhanced axonal growth. *J Neurosci* 18:9858-69

Paffenholz R, Franke WW.1997. Identification and localization of a neurally expressed member of the plakoglobin/armadillo multigene family *Differentiation*. 1997 Aug;61(5):293-304..

Peifer M, Pai LM, Casey M.1994. Phosphorylation of the Drosophila adherens junction protein Armadillo: roles for wingless signal and zeste-white 3 kinase. *Dev Biol*. 1994 Dec;166(2):543-56.

Pigino, G, Paglini G, Ulloa L, Avila J, Caceres A (1997) Analysis of the expression, distribution and function of cyclin dependent kinase 5 (cdk5) in developing macroneurons. *J Cell Sci* 110: 257-70

Polakis P.2000. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev*. 2000 Aug 1;14(15):1837-51.

Reynolds AB, Daniel J, McCrea PD, Wheelock MJ, Wu J, Zhang Z.1994. Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cas associates with E-cadherin complexes. *Mol Cell Biol*. 1994 Dec;14(12):8333-42.

Rosales, J.L., Nodwell, M.J., Johnston, R.N., Lee, K.Y (2000) Cdk5/p25(nck5a) interaction with synaptic proteins in bovine brain. *J Cell Biochem* 78:151-9

Saragoni L, Hernandez P, Maccioni RB.2000. Differential association of tau with subsets of microtubules containing posttranslationally-modified tubulin variants in neuroblastoma cells. *Neurochem Res.* 2000 Jan;25(1):59-70.

Sharma P, Sharma M, Amin ND, Albers RW, Pant HC.1999. Regulation of cyclin-dependent kinase 5 catalytic activity by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Sep 28;96(20):11156-60.

Shibamoto S, Hayakawa M, Takeuchi K, Hori T, Miyazawa K, Kitamura N, Johnson KR, Wheelock MJ, Matsuyoshi N, Takeichi M, et al.1995. Association of p120, a tyrosine kinase substrate, with E-cadherin/catenin complexes. *J Cell Biol.* 1995 Mar;128(5):949-57.

Smith DS, Greer PL, Tsai LH . Cdk5 on the brain. 2001. *Cell Growth Differ* 12:277-83

Staddon JM, Smales C, Schulze C, Esch FS, Rubin LL.1995. p120, a p120-related protein (p100), and the cadherin/catenin complex. *J Cell Biol.* 1995 Jul;130(2):369-81.

Tanahashi H, Tabira T. 1999. Isolation of human delta-catenin and its binding specificity with presenilin 1. *Neuroreport.* 1999 Feb 25;10(3):563-8.

Tsai LH, Takahashi T, Caviness VS Jr, Harlow E.1993Activity and expression pattern of cyclin-dependent kinase 5 in the embryonic mouse nervous system.*Development* Dec;119:1029-40

Willert K, Nusse R (1998) Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Curr Opin Genet Dev* 8:95-102

Wodarz A, Nusse R (1998) Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 114:59-88

Yost C, Farr GH 3rd, Pierce SB, Ferkey DM, Chen MM, Kimelman D (1998) GBP, an inhibitor of GSK-3, is implicated in *Xenopus* development and oncogenesis. *Cell* 93:1031-41

Zhang Z, Nadeau P, Song W, Donoviel D, Yuan M, Bernstein A, Yankner BA.2000. Presenilins are required for gamma-secretase cleavage of beta-APP and transmembrane cleavage of Notch-1. *Nat Cell Biol.* 2000 Jul;2(7):463-5.

Zhou J, Liyanage U, Medina M, Ho C, Simmons AD, Lovett M, Kosik KS.1997. Presenilin 1 interaction in the brain with a novel member of the Armadillo family. *Neuroreport.* 1997 May 27;8(8):2085-90.

Zukerberg LR, Patrick GN, Nikolic M, Humbert S, Wu CL, Lanier LM, Gertler FB, Vidal M, Van Etten RA, Tsai LH (2000) Cables links Cdk5 and c-Abl and facilitates Cdk5 tyrosine phosphorylation, kinase upregulation, and neurite outgrowth. *Neuron* 26:633-46