

VCH-FG
MAG-B
V722E
C.1

"El papel de PRPK en la fosforilación de p53, la regulación de Rab35, y su contribución a la elongación axonal"

Tesis

Entregada A La

Universidad De Chile

En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos

Para Optar Al Grado De

Magister en Ciencias Biológicas

Facultad De Ciencias

Por

DAVID LEONARDO VILLARROEL CAMPOS.

Enero 2014

Director de Tesis Dr:

Christian González-Billault



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

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

David Leonardo Villarroel Campos

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 3 de diciembre del 2013.

Director de Tesis:
Dr. Christian González-Billault

[Handwritten signature]
.....
[Handwritten signature]
.....
[Handwritten signature]
.....



Comisión de Evaluación de la Tesis

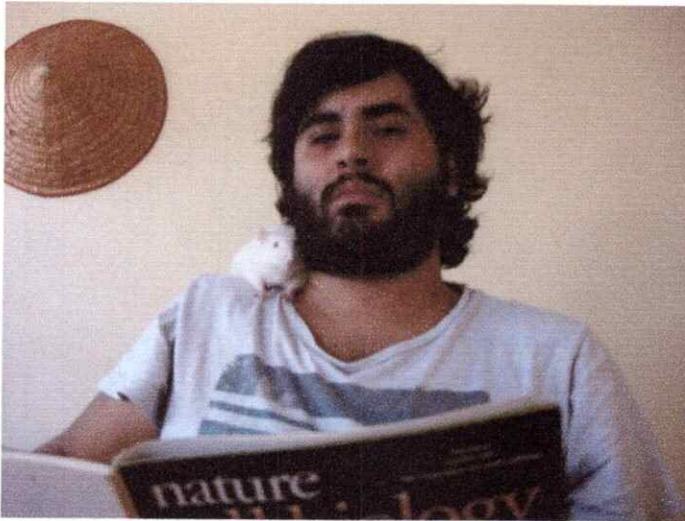
Dr. Álvaro Glavic

Dra. Alejandra Álvarez

“porque ya, los axones son más cortos. . . so what?”

Álvaro Glavic PhD, enero de 2012.

Sobre la importancia de estudiar temas atingentes a toda la biología, y no sólo problemas puntuales, con aproximaciones reduccionistas.



No me queda claro la concatenación de eventos que generó que un liquidador de seguros nacido en Coyhaique y una profesora proveniente de Chillán se conocieran en Punta Arenas, pero una de las consecuencias de esos eventos, es

que yo nací en esa ciudad, en agosto de 1987. Allí estudié en la Escuela República de Croacia y en el Liceo Juan Bautista Contardi, ambas instituciones públicas. Luego de 18 años disfrutando de la calidad de vida de Magallanes, vine a la Universidad de Chile a estudiar Ing. en Biotecnología molecular. Mis intereses académicos se decantaron por el estudio de la morfogénesis neuronal y más recientemente por el aporte del tráfico subcelular a este proceso. Siendo el futuro tan incierto como es, intuyo que si en 40 años más leo esta tesis me voy a reír mucho, espero que sus yo futuros también.

AGRADECIMIENTOS

Tal como la ciencia impacta al entramado social completo al que el investigador pertenece, llevar a cabo una investigación requiere del apoyo emocional e intelectual de las personas que nos rodean, pero rara vez se reconoce a quienes nos acompañan en este camino. Esta sección de ninguna manera hace justicia a todas las personas que influyeron en la realización de esta tesis, sin embargo me debo remitir a este espacio para agradecerles.

Mi mamá y mi papá siempre me dijeron que había que hacer las cosas bien, sin importar a lo que uno se dedicara. Les agradezco por haberme dado la libertad de elegir caminos no canónicos de desarrollo profesional y por estar siempre disponibles para ayudar, aconsejar y guiar, cuando se requiere.

Que el mundo tenga los colores y tonalidades que percibo, se debe indudablemente a la compañía de Dafne Franz, un camino que recorreremos juntos, rodeados de gatos, muchos gatos, miles de ellos. Dafne logró que abandonara los horarios de trabajo ridículos y las decisiones con total ausencia de sentido común (más o menos), gracias por estar siempre ahí.

Mis compañeros de laboratorio hacen que esto no parezca un trabajo, sino que un entretenido campamento de verano con equipos sofisticados y reactivos ultra-caros, agradezco particularmente a Cristina Olmos, Daniel Bórquez Daniel Henríquez y Sebastián Álvarez por el día a día del lab. También fueron de vital importancia Lorena Saragoni, quien me enseñó cómo lidiar con las infinitas mañías de nuestro confocal, y José Wojnacki, de quien aprendí las bases del procesamiento de imágenes.

Por último, agradezco a Christian González-Billault por confiar en el proyecto, ofrecer la locación y las herramientas para llevar a cabo el trabajo, y a Mitsunori Fukuda en Japón, por enviarnos constructos claves para la tesis.

ÍNDICE DE MATERIAS

Lista de Abreviaturas.....	vi
Resumen.....	viii
Abstract.....	ix
Introducción.....	1
Materiales y Métodos.....	15
Resultados.....	22
Discusión.....	39
Conclusiones.....	53
Bibliografía.....	54
Anexos.....	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 La reducción de la longitud axonal inducida por PRPK depende de su actividad quinasa.....	25
Fig. 2 PRPK WT fenocopia la aparición de células binucleadas generadas por Rab35 S22N.....	27
Fig. 3 Rab35 WT rescata el fenotipo de reducción en el número de filopodios promedio por célula, inducido por PRPK WT.....	30
Fig. 4 PRPK reduce la actividad de Cdc42 en líneas celulares y neuronas en cultivo.....	32
Fig. 5 Rab35 promueve la elongación axonal, y rescata el fenotipo de axones más cortos inducido por PRPK, en neuronas en cultivo.....	34
Fig. 6 PRPK DN y Rab35 WT revierten el fenotipo asociado a la pérdida de función de MAP1B.....	36
Fig. 7 Disminución de la masa de Rab35 inducida por PRPK WT y por la pérdida de función de MAP1B.....	37
Fig. 8- Modelo representativo del mecanismo molecular por el cual PRPK reduce la elongación axonal.....	52
Anexo 1.....	62
Anexo 2.....	63
Anexo 3.....	64
Anexo 4.....	65
Anexo 5.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPK:	5' AMP-activated protein kinase
aPKC:	Atypical protein kinase C
ARF6:	ADP-ribosylation factor 6
ARNO:	ARF nucleotide-binding site opener
ATM:	Ataxia telangiectasia mutated
ATP:	Adenosín trifosfato
ATR:	Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
BSA:	Bovine serum albumin
CBP/p300:	CREB-binding protein/p300
Cdc42:	Cell division control protein 42 homolog
CDK5:	Cyclin-dependent Kinase 5
cDNA:	ADN complementario
CHK:	Checkpoint kinase
DHPG:	(S)-3,5-Dihidroxifenil-glicina
DNA-PK:	DNA-dependent protein kinase
DYRK1A:	Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A
EB3:	End-binding protein 3
EPAC:	Exchange protein directly activated by cAMP
ERK1/2:	Extracellular-signal-regulated kinases 1/2
FOXO:	Forkhead box O3
FRET:	Förster resonance energy transfer
GAP:	GTPase-Activating Proteins
GAP43:	Growth Associated Protein 43
GDP:	Difosfato de guanosina
GEF:	Guanine nucleotide exchange factors
GTP:	Trifosfato de guanosina
His ₆ :	Epítipo de 6 Histidinas
IL-2:	Interleuquina 2
LKB1:	liver kinase B1
LUT:	Look-up table
mRNA:	ARN mensajero
mTOR:	mammalian Target of Rapamycin
NUAK1:	NUAK family SNF1-like kinase 1
OSGEP:	O-sialoglycoprotein endopeptidase
PAR3:	Partitioning defective 3 homolog
PAR6:	Partitioning defective 6 homolog
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PI(4)P5:	Fosfatidil-inositol 4-fosfato 5
PI3K:	Phosphatidylinositide 3-kinase

PVDF:	polifluoruro de vinilideno
Rac1:	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
Rap1B:	Ras-related protein Rap-1b
RhoA:	Ras homolog gene family, member A
RIPA:	Radio-Immunoprecipitation Assay
T ⁶ A:	N6-threonicarbamoyl-adenosina
TIAM1:	T-cell lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1
tRNA:	ARN de transferencia

RESUMEN

La asimetría morfológica, bioquímica y fisiológica de las neuronas sustenta el flujo de información direccionado y la conectividad del sistema nervioso, siendo de gran importancia el surgimiento de esta polaridad neuronal durante el desarrollo embrionario, en especial la determinación y crecimiento del axón. Diversas vías de señalización conformadas por determinantes, mediadores y moduladores de polaridad han sido descritas, las que coinciden en la regulación del transporte de elementos dentro de la célula y el control de la dinámica del citoesqueleto. En este contexto, nuestro laboratorio se ha interesado en los roles de la proteína asociada a microtúbulos 1 B (MAP1B) durante el desarrollo neuronal, que son independientes de su actividad estabilizadora de los microtúbulos, identificando nuevos interactores de MAP1B, entre ellos la proteína quinasa p53-related protein kinase (PRPK). Estudios previos de nuestro laboratorio sobre las funciones de esta proteína, demostraron que la sobreexpresión de la quinasa de *D. melanogaster* reduce la elongación del axón de neuronas de embriones de rata en cultivo. Por lo tanto quisimos investigar si este efecto también es generado por la PRPK de ratón, y entender la señalización involucrada. Nuestros resultados muestran que la PRPK de ratón disminuye la longitud axonal en una manera dependiente de su actividad quinasa, pero independiente del estado de fosforilación de la serina 15 de p53, el único sustrato descrito hasta la fecha para la quinasa, en mamíferos. Además el incremento en la expresión de PRPK fenocopia la pérdida de función de la GTPasa Rab35 en la progresión de la citoquinesis, formación de filopodios, regulación de la actividad de Cdc42 y elongación axonal. Por lo tanto sugerimos que el mecanismo molecular de esta regulación involucra la reducción de los niveles de expresión de Rab35 por PRPK WT, lo que puede ser inhibido por MAP1B.

ABSTRACT

The morphological, biochemical and physiological asymmetry of neurons sustain the directional information flux and wiring in the nervous system, being the emergence of this neuronal polarity of central importance during the embryonic development, specially the axonal determination and growth. Several signaling pathways have been described, formed by determinants, mediators and modulators of polarity, these pathways converge in the regulation of traffic of element inside the cell and in the regulation of cytoskeletal dynamic. In this context, our group has been interested in the microtubule independent roles of microtubule associated protein 1 B (MAP1B) during neuronal development, identifying new MAP1B interactors, as the p53-related protein kinase PRPK. Previous work by our group had shown that *D. melanogaster* PRPK overexpression reduces axonal elongation in hippocampal embryonic rat neurons in culture, so we wanted to study if this effect is shared by mouse PRPK, and to link this function to some signaling pathway. Our results show that mouse PRPK decreases axonal length in a way that depends on its kinase activity, but that it is independent from p53 Ser15 phospho-state, the only substrate described for the kinase in mammals. Additionally, PRPK phenocopies Rab35 loss of function in cytokinesis progression, filopodia formation, regulation of the Cdc42 activity and in axonal elongation. The molecular mechanism of this regulation involves the reduction of the Rab35 expression levels due to PRPK overexpression, which could be inhibited by MAP1B.

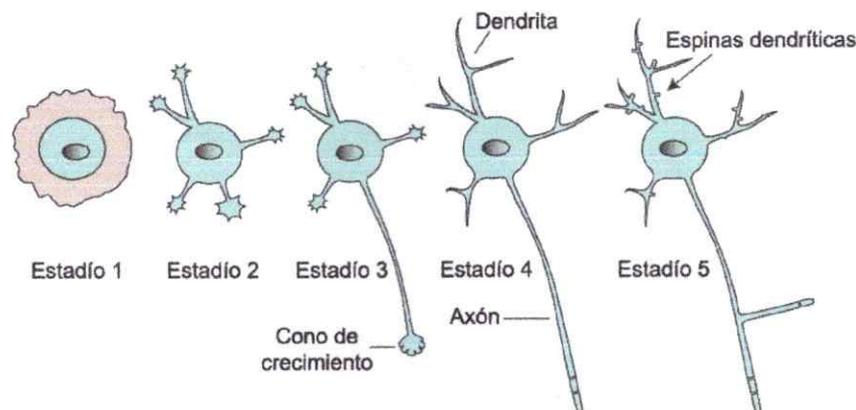
INTRODUCCIÓN

La relación adaptativa bidireccional entre la morfología y la función celular es observada en una gran variedad de células, incluyendo las neuronas, pues su característica más distintiva es una alta polarización morfológica, bioquímica y fisiológica. Las neuronas maduras presentan un axón largo y delgado, además de una o varias dendritas de menor longitud y mayor calibre que el axón, con numerosas ramificaciones. Esta asimetría permite un flujo de información unidireccional en el sistema nervioso, que canónicamente consiste en la recepción e integración de múltiples *inputs* sinápticos en las dendritas, y la propagación de una señal eléctrica a través del axón, acoplada al *input* inicial, hacia las células u órganos blanco.

La generación y mantención de la polaridad neuronal *in vivo* ocurren de manera simultánea durante la migración neuronal en el desarrollo del sistema nervioso, cuando emergen desde la neurona post-mitótica varios procesos equivalentes entre sí, desde los cuales se determinará el axón (Barnes y Polleux, 2009). Cabe señalar que el establecimiento de la polaridad neuronal consta de tres fases, iniciándose con la aparición de la primera neurita desde el soma, continuando con la especificación del axón, caracterizada por el rápido crecimiento de una de las neuritas, y finalizando con la adquisición de una identidad morfológica y molecular en los dominios neuronales que se forman: el compartimento axonal y el somatodendrítico (Caceres y col., 2012).

El establecimiento de la polaridad neuronal se puede reproducir en cultivos de neuronas aisladas (Banker y Cowan, 1977; Craig y Banker, 1994), permitiendo caracterizar y estudiar dicho fenómeno *in vitro*, e identificar algunos determinantes de polaridad y sus efectores. Luego que las neuronas se adhieren al sustrato en cultivo, desarrollan un lamelipodio que rodea la periferia celular, desde donde emergerán las neuritas menores, esta etapa se denomina estadio 1.

Entre 12 y 18 hrs. *in vitro*, varias neuritas menores protruyen desde el cuerpo celular, generando una neurona aun no polarizada, cuyos procesos, equivalentes entre sí, muestran una reducida tasa neta de elongación; esta fase de la maduración del cultivo constituye el estadio 2. Desde aproximadamente el primer día *in vitro* (DIV), una de las neuritas menores comienza a elongar a una tasa mayor que las demás, convirtiéndose en el axón prospectivo, etapa que se conoce como estadio 3. Este punto marca la ruptura definitiva de la polaridad, y pone de manifiesto la importancia de la regulación espacio-temporal de la elongación neurítica y axonal, en la mantención de esta asimetría. Cerca del día 7 *in vitro*, se alcanza el estadio 4, con la elongación de las neuritas menores restantes, las que dan origen a las dendritas. En esta etapa, varias dendritas crecen al mismo tiempo, a una tasa de elongación menor que la exhibida por el axón. Finalmente en el estadio 5, se produce la maduración dendrítica, con la formación de estructuras especializadas en el establecimiento de contactos sinápticos, llamadas espinas dendríticas (Dotti y col., 1988; Arimura y Kaibuchi, 2007). Una caracterización gráfica del desarrollo de la polaridad neuronal en cultivo, se muestra en el esquema 1.



Esquema 1. Desarrollo de la polaridad de neuronas hipocampales de embriones de rata en cultivo. Se indica la progresión de la maduración neuronal acorde a los estadios y especializaciones morfológicas. Modificado de Tahirovic y Bradke, 2009.

Se ha sugerido recientemente, que los mecanismos moleculares que controlan el establecimiento de la polaridad neuronal se clasifiquen jerarquizados, en determinantes, mediadores y moduladores de la polarización (Cheng y Poo, 2012). Los determinantes de polaridad, se caracterizan por ser suficientes y necesarios para determinar el axón, además de exhibir una acumulación en la neurita que lo genera previo a la aparición de cualquier característica axonal, y responder ante factores polarizantes extracelulares. Los mediadores corresponden a componentes de vías de señalización reguladas por los determinantes, a modo de efectores, mientras que los moduladores, pueden modificar estas cascadas de señalización en varios niveles, y no son regulados por factores polarizantes. Por lo tanto, existen elementos que regulan la especificación del axón, mientras que sus efectores promueven o inhiben la elongación axonal (Polleux y Snider, 2010; Cheng y Poo, 2012).

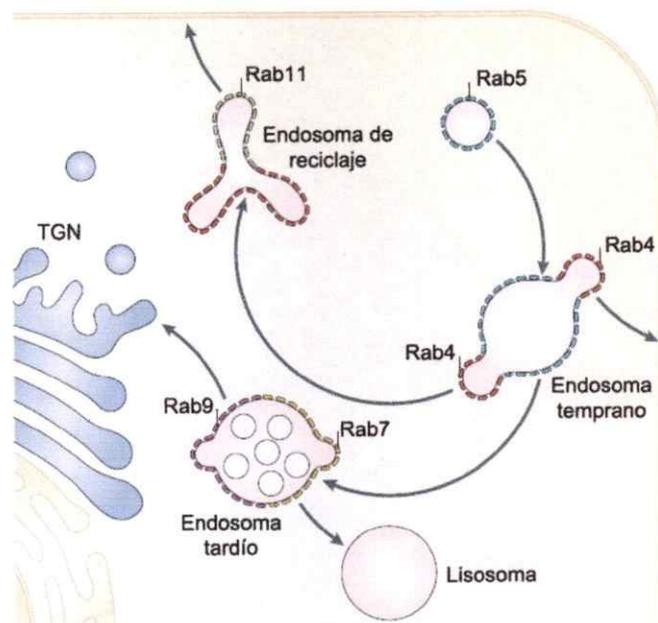
Las vías de señalización involucradas en el establecimiento de la polaridad neuronal, ampliamente revisadas (Arimura y Kaibuchi, 2007; Barnes y Polleux, 2009; Cheng y Poo, 2012), coinciden en dos aspectos fundamentales: que sus efectores controlan la elongación axonal a través de la regulación tanto del transporte vectorial de elementos entre los compartimentos subcelulares, como del control de la dinámica del citoesqueleto (Lalli, 2012). Un ejemplo de cómo el tráfico direccionado de mediadores puede potenciar la elongación axonal, está dado por el transporte preferencial hacia el terminal axonal, a través de kinesina 2, del complejo formado por las proteínas PAR3-PAR6-aPKC, que media la activación de la GTPasa Rac1 y a través de ese evento, el control del citoesqueleto y el desarrollo del axón (Nishimura y col., 2004; Nishimura y col., 2005). Otra proteína promotora de la elongación axonal es CRMP2 (acrónimo de Collapsin Response Mediator Protein) (Inagaki y col., 2001), que actúa a través de su actividad facilitadora del ensamblaje de microtúbulos (Fukata y col., 2002). CRMP2 se asocia a la kinesina 1 y es transportada hacia el axón en crecimiento (Kimura y col., 2005). De hecho, el dominio motor de kinesina 1 (KIF5), se acumula en el axón en

desarrollo, y puede ser usado como un marcador temprano de especificación axonal (Jacobson y col., 2006).

Los anteriores son algunos ejemplos de cómo la destinación y el transporte de cargos específicos hacia el axón en crecimiento, regula positivamente su elongación por sobre el resto de las neuritas menores, sin embargo, no es el único rol que cumple el tráfico de elementos, durante el crecimiento axonal. Otra función del transporte intracelular consiste en proveer un suministro continuo de membrana plasmática hacia el axón en crecimiento (Futerman y Banker, 1996; Bloom y Morgan, 2011). Si bien el compartimento vesicular desde donde se destina membrana hacia el axón no está completamente identificado, los principales candidatos propuestos para ello son el compartimento trans-Golgi (TGN, por trans-golgi network) y la red de endosomas (Sann y col., 2009).

El sistema endosomal consiste en un conjunto de compartimentos endomembranosos que cumplen roles en el transporte de moléculas biosintetizadas hacia la membrana plasmática, y en su internalización desde la superficie (Yap y Winckler, 2012). Los diferentes tipos de endosomas fueron originalmente clasificados según el tiempo que se requería para que se enriquecieran con algún receptor endocitado, pero actualmente, se identifican según las proteínas que se insertan en sus membranas, en especial las GTPasas de la familia Rab (Zerial y McBride, 2001; Stenmark, 2009). Tradicionalmente, se reconocen endosomas tempranos, endosomas tardíos, endosomas de reciclaje y lisosomas (Mukherjee y col., 1997). Los endosomas tempranos exhiben Rab5 en su membrana, mientras que los endosomas tardíos, poseen Rab7 (Chavrier y col., 1990; Hutagalung y Novick, 2011). A medida que transcurre la maduración de los endosomas, Rab5 es removida de la membrana y Rab7 se incorpora desde el citoplasma, esta conversión de Rabs es importante para la progresión del transporte de los cargos (Rink y col., 2005).

Las moléculas que no siguen la ruta hacia el endosoma tardío, son destinadas hacia los endosomas de reciclaje, los cuales son positivos para Rab11 (Ullrich y col., 1996). Hay que tener en cuenta que aunque existen Rabs características en los diversos tipos de endosomas, esto no implica que sean las únicas, ya que se han descrito microdominios de Rabs, como los de Rab4 y Rab5 en los endosomas tempranos (Sonnichsen y col., 2000), o los de Rab7 y Rab9 en los endosomas tardíos (Barbero y col., 2002). En el esquema 2, se presenta un resumen de la composición de los principales endosomas y el destino de sus cargos.



Esquema 2. Composición del sistema endosomal en una célula no polarizada. Se indican las diferentes Rabs que se integran en la membrana de los endosomas, formando microdominios. Modificado de Stenmarck, 2009.

La incorporación de membrana en la superficie celular desde los endosomas de reciclaje es especialmente relevante dada la regulación a nivel local que son capaces de controlar, y en consecuencia se ha propuesto que Rab11 tiene un papel en la elongación neurítica y axonal, aunque no existe total claridad sobre si dicha actividad la lleva a cabo Rab11-GTP (Ascano y col., 2009) o Rab11-GDP (Shirane y Nakayama, 2006). Las últimas evidencias parecen indicar

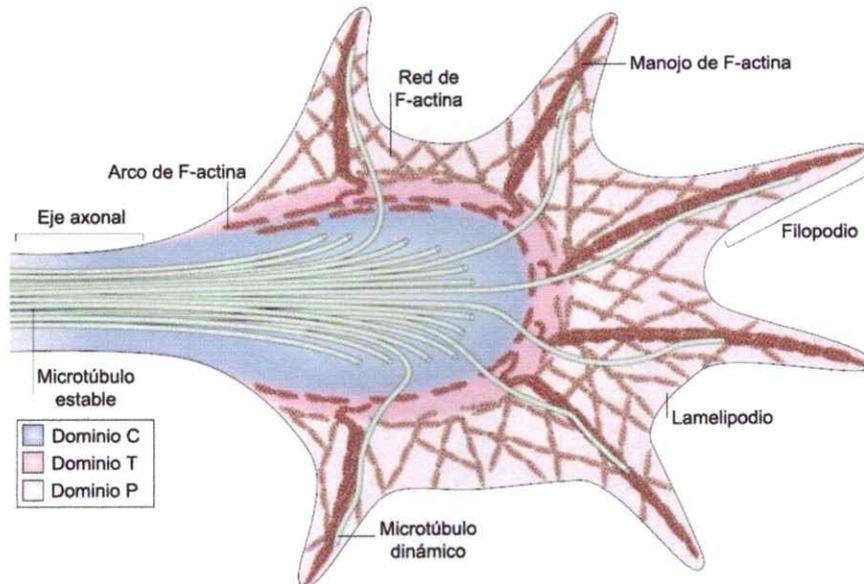
que es Rab11-GTP quien promueve la elongación axonal en cultivos de neuronas corticales embrionarias de ratón, cuya actividad sería dependiente de la proteína quinasa Cdk5 (Takano y col., 2012).

En resumen, el transporte intracelular es importante en la promoción de la elongación axonal, ya sea actuando a través del tráfico selectivo de mediadores de polaridad neuronal hacia la neurita con la mayor tasa de elongación, o proporcionando un suministro de membrana, que le permite a la neurona incrementar su superficie axonal.

El otro proceso en que las vías de señalización que se activan durante la elongación axonal confluyen, es el control de la dinámica del citoesqueleto. El papel del citoesqueleto en la morfogénesis celular se propuso casi simultáneamente con las primeras observaciones en neuronas en cultivo (Kirschner y Mitchison, 1986), y acorde con ello, se ha descrito que el uso de compuestos químicos que estabilizan los microtúbulos, como el taxol, o que depolimerizan los filamentos de actina, como la citocalasina D inducen la formación de axones en neuronas en cultivo (Bradke y Dotti, 1999; Witte y col., 2008).

La dinámica del citoesqueleto sustenta los cambios morfológicos del cono de crecimiento, una región de gran motilidad en la parte distal del axón y las neuritas, que posee una importancia central durante la elongación axonal (Tahirovic y Bradke, 2009; Dent y col., 2011). En el cono de crecimiento se distingue un dominio periférico (P), que contiene principalmente largos manojos de filamentos de actina (F-actina), llamados filopodios, y una red altamente ramificada de actina polimerizada, constituyendo un lamelipodio. La región más proximal al axón en el cono de crecimiento, es el dominio central (C), que recibe manojos de microtúbulos desde el eje del axón, además de organelos y vesículas (Dent y Gertler, 2003; Lowery y Van Vactor, 2009). En la interface de los dominios C y P, se encuentra el dominio de transición (T), donde se ubica una estructura de actomiosina que forma un anillo contráctil, el que impide la invasión a dominios periféricos del axón de la mayoría de los microtúbulos

(Schaefer y col., 2002). El esquema 3 muestra un resumen de la organización del citoesqueleto en el cono de crecimiento.



Esquema 3. Estructura del cono de crecimiento. Se presentan los dominios que conforman el cono, además de las poblaciones de microtúbulos y arreglos de F-actina. Modificado de Lowery y Van Vactor, 2009.

Durante la elongación del axón, el citoesqueleto de actina exhibe dos cualidades que sustentan los movimientos exploratorios del cono de crecimiento: el flujo retrógrado de actina y el “treadmilling” (Lowery y Van Vactor, 2009). El flujo retrógrado consiste en un transporte continuo de F-actina desde el borde exterior del dominio P hacia la zona central del cono de crecimiento, generando una fuerza que se opone a la elongación axonal (Lin y Forscher, 1995). El *treadmilling* es el fenómeno en que los filamentos de actina polimerizan en un extremo a una tasa similar a la depolimerización en el extremo opuesto, lo que mantiene su longitud constante y permite su movimiento en una dirección, generando una fuerza en el sentido de la elongación axonal (Lowery y Van Vactor, 2009), por lo tanto, el equilibrio entre estas dos fuerzas es una forma en que se regula si el axón elonga o se mantiene estacionario.

Además del control de los filamentos de actina, el cono de crecimiento requiere de la regulación de la dinámica de los microtúbulos para elongar (Tanaka y col., 1995). Se ha observado que algunos microtúbulos dinámicos son capaces de penetrar en el dominio P, previo a la elongación axonal. Algunos de estos microtúbulos son capturados por proteínas asociadas a filamentos de actina en los filopodios, y estabilizados, sirviendo de guía para el resto de los microtúbulos que componen un manojo. Este manojo, bajo estas condiciones, puede polimerizar e invadir los dominios T y P, favoreciendo la elongación axonal (Gordon-Weeks, 2004; Conde y Caceres, 2009; Stuessi y Bradke, 2011). En resumen, el crecimiento del axón requiere de un control concertado de la dinámica del citoesqueleto de actina y los microtúbulos, en especial, en el cono de crecimiento.

El comportamiento dinámico de los filamentos de actina es regulado a través de la acción de proteínas que median su nucleación, que se asocian a sus extremos, que unen monómeros de actina, que rompen los filamentos, que generan manojos o entrecruzan los filamentos y que anclan la F-actina a regiones específicas de la membrana plasmática (Dent y Gertler, 2003). Varias de las proteínas que median esta plétora de efectos están bajo el control de GTPasas pequeñas de la familia Rho, como Rac1, Cdc42 y RhoA (Jaffe y Hall, 2005; Gonzalez-Billault y col., 2012). En términos generales, Rac1 induce la formación de lamelipodios, Cdc42 de filopodios y RhoA genera fibras de estrés (en células no neuronales) y colapso del cono de crecimiento neuronal, siendo las dos primeras promotoras de la elongación axonal y la última un regulador negativo durante el desarrollo (Nobes y Hall, 1995; Govek y col., 2005).

En el caso de los microtúbulos, el control de su actividad está en íntima relación con la regulación de su inestabilidad dinámica, la que se correlaciona con modificaciones postraduccionales, como la acetilación o destirosinación de la tubulina, que caracteriza a los microtúbulos más estables ante la depolimerización con nocodazol, mientras que los microtúbulos tirosinados exhiben un comportamiento más dinámico, con una vida media más

corta y una rápida depolimerización mediada por nocodazol (Brown y col., 1993; Janke y Bulinski, 2011). En el control de la dinámica y estabilidad de los microtúbulos también participan proteínas que se asocian a estos polímeros, conocidas como MAPs (por *microtubule-associated proteins*). En el extremo (+) de los microtúbulos (el que se polimeriza más rápido y que experimenta los ciclos de catástrofe y rescate), se unen proteínas del grupo +TIP (en inglés: *plus-end tracking proteins*), las que decoran preferentemente microtúbulos en fase de polimerización (Akhmanova y Steinmetz, 2008). Otro grupo de MAPs, conocidas como estructurales, se asocian con los microtúbulos y los estabilizan. En este grupo encontramos a MAP1A, MAP1B, MAP2 y Tau (Dehmelt y Halpain, 2005; Halpain y Dehmelt, 2006).

Finalmente, dada la importancia de la conversación cruzada que exhibe el citoesqueleto de actina y los microtúbulos durante la elongación axonal, existe interés por describir las moléculas que pueden propiciar la interacción de ambos. Por ejemplo, se ha descrito que la proteína de unión a actina Drebrin interacciona con EB3, una proteína de la familia +TIP, durante la invasión de microtúbulos dinámicos en el dominio P del cono de crecimiento, y que la interrupción de esta interacción inhibe la neuritogénesis (Geraldo y col., 2008). Más llamativa aun es la capacidad de asociación con microtúbulos y F-actina, en una sola molécula, como es el caso de MAP1B (Riederer, 2007).

MAP1B es la primera MAP que se expresa durante el desarrollo del sistema nervioso (Tucker y Matus, 1988; Cheng y col., 1999). Se sintetiza como una poliproteína, que sufre un procesamiento proteolítico, dando origen a la cadena pesada o HC (por heavy chain) y a la cadena liviana o LC1 (por light chain 1) (Hammarback y col., 1991). La HC se asocia con LC1, con la cadena liviana derivada de MAP1A (LC2), y con la cadena liviana LC3, que es expresada independientemente de MAP1A y MAP1B (Halpain y Dehmelt, 2006). Tanto la HC como LC1 tienen dominios de unión a microtúbulos y actina (Noble y col., 1989; Zauner y col., 1992; Togel y col., 1998; Cueille y col., 2007). MAP1B estabiliza microtúbulos, pero a diferencia de

MAP2 o tau, no induce la formación de manojos ni elimina su inestabilidad dinámica (Takemura y col., 1992; Vandecandelaere y col., 1996). Con respecto a la asociación con actina, se desconoce si es dependiente o no, del estado de fosforilación de MAP1B (Pedrotti y Islam, 1996; Cueille y col., 2007).

El *knock down* de MAP1B afecta la elongación neurítica y axonal en líneas celulares y neuronas en cultivo (Brugg y col., 1993; DiTella y col., 1996), mientras que su degradación selectiva en un costado del cono de crecimiento, mediante microCALI (*chromophore-assisted laser inactivation*), induce la retracción del lamelipodio en dicha zona y el giro del axón en la dirección opuesta (Mack y col., 2000). Todos esos antecedentes indican que MAP1B favorece la elongación axonal, y en efecto, tanto el ratón *knock out*, como el hipomorfo para MAP1B presentan un retardo en la elongación axonal, entre otras alteraciones en el sistema nervioso (Meixner y col., 2000; Gonzalez-Billault y col., 2001). El mecanismo propuesto para el rol promotor de la elongación axonal de MAP1B, consiste en que la proteína mantendría una población de microtúbulos estables en el eje del axón (Bouquet y col., 2004) y otra población de microtúbulos que conservan su inestabilidad dinámica, en el cono de crecimiento (Goold y col., 1999). También se ha descrito que MAP1B promueve la elongación axonal, mediando la activación de Rac1 a través de la interacción con su GEF Tiam1 (Montenegro-Venegas y col., 2010; Henriquez y col., 2012), en una actividad que no depende del rol estabilizador de microtúbulos de MAP1B. Tiam1 no es el único interactor de MAP1B que posee funciones no relacionadas con la estabilización de microtúbulos, ya que también se han descrito otras interacciones de MAP1B con GEFs, como PDZRhoGEF (Longhurst y col., 2006) y EPAC1 (Borland y col., 2006), o interacciones con proteínas adaptadoras involucradas en la transducción de señales, como $\alpha 1$ -sintrofina (Fuhrmann-Stroissnigg y col., 2012). El creciente número de interactores de MAP1B sugiere que existen nuevas funciones para esta proteína, que no se relacionan con su actividad clásica como MAP.

En este contexto, nuestro laboratorio llevó a cabo un ensayo de doble híbrido, usando LC1 como cebo, para encontrar nuevos interactores de MAP1B-LC1, que pudieran sugerir nuevas funciones. De entre los posibles interactores que arrojó el experimento, elegimos estudiar una proteína quinasa llamada p53-related protein kinase, o TP53 Regulating Kinase (abreviada PRPK o TP53RK).

PRPK fue originalmente identificada en linfocitos T citotóxicos activados por IL-2, como una quinasa que fosforila la serina 15 de p53 (Abe y col., 2001), residuo que también es fosforilado por otras quinasas, como ATM (Banin y col., 1998; Canman y col., 1998), ATR (Tibbetts y col., 1999), Chk1 y Chk2 (Shieh y col., 2000), DNA-PK (Lees-Miller y col., 1992), DYRK1A (Park y col., 2010), LKB1/NUAK1 (Zeng y Berger, 2006; Hou y col., 2011), AMPK (Jones y col., 2005), ERK1/2 (Persons y col., 2000), p38 (Kim y col., 2002) y CDK5 (Lee y col., 2007).

En mamíferos, el único sustrato de PRPK descrito hasta la fecha es p53, sin embargo, la proteína homóloga de PRPK en levaduras, llamada Bud32 (Facchin y col., 2003), es capaz de fosforilar caseína, osteopontina y de autofosforilarse, en ensayos *in vitro* (Stocchetto y col., 1997), además de fosforilar a la glutaredoxina Grx4p *in vivo* (Peggion y col., 2008). Cabe señalar que la actividad de PRPK/Bud32 está filogenéticamente conservada, ya que la PRPK de humano rescata parcialmente el fenotipo de reducción en la tasa de crecimiento, de *S. cerevisiae* nula para Bud32 ($\Delta bud32$) y a su vez, Bud32 es capaz de fosforilar a p53 de humano, aun cuando las levaduras carecen de un homólogo de p53 (Facchin y col., 2003).

Las alteraciones en el crecimiento de *S. cerevisiae* $\Delta bud32$ (Stocchetto y col., 1997), son reproducidas por larvas y adultos de *D. melanogaster* expresando un interferente contra PRPK de *Drosophila melanogaster* (dPRPK), los cuales muestran un tamaño reducido del cuerpo y de los órganos, relacionando a PRPK con la transducción de la vía PI3K/mTOR (Ibar y col., 2013).

La fosforilación de PRPK sobre p53 requiere una fosforilación previa sobre PRPK, llevada a cabo por Akt/PKB en el residuo serina 250 de la secuencia de humano (Facchin y col., 2007), en una forma similar a la fosforilación de Bud32 por Sch9p, el homólogo de Akt en levadura, lo que aumenta la preferencia de sustrato de Bud32 hacia Grx4p, (Peggion y col., 2008).

La actividad quinasa de PRPK/Bud32 es importante para su función, pero se presume que también puede actuar a través de otros mecanismos, ya que mutantes con una actividad catalítica reducida o nula (Facchin y col., 2002) son capaces de rescatar parcialmente el fenotipo de $\Delta bud32$ en levaduras (Lopreiato y col., 2004). Por lo tanto esta quinasa podría ejercer otras funciones, posiblemente a través de sus interactores.

El análisis del interactoma de PRPK, muestra que forma parte de un complejo altamente conservado evolutivamente, llamado KEOPS/EKC (*Kinase, Endopeptidase and Other Proteins of small Size/Endopeptidase-like and Kinase associated to transcribed Chromatin*), con funciones descritas en la mantención de la estructura de los telómeros (Downey y col., 2006), la regulación de la transcripción (Kisseleva-Romanova y col., 2006) y en la modificación t⁶A de los tRNA (Srinivasan y col., 2011). PRPK también interacciona con proteínas IMD (*Inosine Monophosphate Dehydrogenase*) (Lopreiato y col., 2004) y con Rab35 (Abe y col., 2006).

En el contexto de la elongación axonal, entre los interactores de PRPK descritos, Rab35 cobra especial relevancia, ya que controla una ruta rápida de reciclaje de endosomas (Kouranti y col., 2006), la correcta terminación de la citoquinesis (Dambournet y col., 2011; Chesneau y col., 2012) y además regula el citoesqueleto de actina, a través de su efector fascin, una proteína que induce manojos de filamentos de actina (Zhang y col., 2009). Rab35 también activa indirectamente a la GTPasa Cdc42 (Chevallier y col., 2009), a través de un mecanismo aun no descrito (Chua y col., 2010), y es capaz de inducir la elongación neurítica en células PC12 diferenciadas con NGF (Chevallier y col., 2009; Kanno y col., 2010). De esta manera, Rab35



combina el control del tráfico de endosomas de reciclaje con una regulación sobre el citoesqueleto de actina y la neuritogénesis.

Nuestra elección de estudiar el rol de PRPK en la elongación axonal se basó en el rol no transcripcional propuesto para p53, en la mantención del cono de crecimiento: por un lado p53 acetilado en el residuo lisina 320 tendría un rol promotor de la elongación axonal, a través de su función activadora de la transcripción (Di Giovanni y col., 2006; Tedeschi y Di Giovanni, 2009), pero también se ha descrito un rol independiente de la transcripción, ya que p53 fosforilado en la serina 15 se acumula en la parte distal del axón, lo que evitaría el colapso del cono de crecimiento axonal. Esta sería una actividad independiente de la transcripción, ya que su inhibición química por pifitrina- α o pifitrina- μ induciría el colapso del cono de crecimiento en una escala temporal de minutos (Qin y col., 2009). Como MAP1B también interacciona con p53 e inhibe su actividad transcripcional (Lee y col., 2008), propusimos que un complejo MAP1B/PRPK/p53 promovía la elongación axonal. Dado que PRPK tiene una actividad filogenéticamente conservada, en un trabajo previo (Villaroel-Campos 2011), utilizamos dPRPK para sobreexpresar la quinasa desde un vector de expresión de mamíferos, en neuronas de rata en cultivo y medir el aumento en el largo axonal, pero inesperadamente ocurrió el efecto contrario, ya que dPRPK indujo una reducción significativa de la longitud axonal.

En el presente trabajo, buscamos determinar si este cambio fenotípico se reproduce al sobreexpresar PRPK de ratón en neuronas en cultivo, si el efecto es dependiente de la actividad quinasa de PRPK sobre p53, o de algún tipo de interacción molecular o epistática con Rab35.

Como sólo se ha descrito un sustrato para PRPK en mamíferos, la hipótesis original de este trabajo era que **"PRPK, a través del rol no transcripcional de p53, actúa como un regulador negativo de la elongación axonal"**. Sin embargo, los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis, que se extendieron más allá de la participación de p53, nos hacen

proponer una nueva hipótesis que vincula la función de PRPK con la de Rab35. La nueva hipótesis es: **“PRPK regula negativamente a Rab35, reprimiendo su rol promotor de la elongación axonal”**.

El objetivo general consiste en determinar si existe un retardo en la longitud axonal inducida por la sobreexpresión de PRPK, y si este cambio fenotípico deursa a través de Rab35, o de la actividad quinasa de PRPK sobre p53. Los objetivos específicos se detallan a continuación:

Objetivo específico 1: Estudiar los cambios fenotípicos derivados de expresar las diferentes formas de PRPK, p53 y Rab35, en neuronas hipocampales de embriones de rata en cultivo.

Objetivo específico 2: Dilucidar la existencia de una posible relación epistática de PRPK y Rab35 en la elongación del axón.

MATERIALES Y MÉTODOS

Vectores de expresión

El plasmidio codificante para PRPK WT de ratón fue adquirido desde Origene (MC207760, en vector pCMV6-Entry), los vectores que codifican para Rab35 WT, Rab35 Q67L Rab35 S22N (clonados en pmStr-C1) y pGEX-RBD35 fueron proporcionados por Mitsunori Fukuda PhD, Universidad de Tohoku, Sendai, Japón. El constructo pRK5myc-Rab35 fue cedido por John F. Presley PhD, Universidad de McGill, Quebec, Canadá. La sonda FRET Raichu para Cdc42 fue proporcionada por Alfredo Cáceres PhD, Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra, Córdoba, Argentina. El vector pEGFP-N1-Lifeact fue enviado por Roland Wedlich-Soeldne PhD, Max Planck Institute of Biochemistry, Martinsried, Alemania, y el plasmidio pmKate2-C1, fue cedido por Dmitry Chudakov PhD, Evrogen JSC, Moscú, Rusia. Las mutantes de PRPK S241D y PRPK D174N fueron generadas según se describe a continuación: Como la mutación S241D se ubica cerca del extremo C-terminal de la proteína, se amplificó por PCR la secuencia de PRPK desde el vector pCMV6-Entry, con el partidador forward (Fwd) 5'-AATTGGATCCATGGCTGGTGTGTCCTCGGAG-3' y el partidador reverse (Rev) mutagénico 5'-AATTAAGCTTCTACCCGACCATGTCC-3', que incorporan sitios de restricción para BamHI y HindIII respectivamente, y un codón *missmatch*, que se muestra destacado, y se clonó en el plasmido pCMV-Tag2 (Stratagene), que añade un tag FLAG en el extremo N-terminal. La mutante PRPK D174N se generó mediante el kit QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies), acorde a las instrucciones del fabricante, utilizando los partidores Fwd 5'-CACATCGTGCTCATCAACTTTGGGCT-3' y Rev 5'-GACAAAGCTCAGCCCAAAGTTGATCA-3', que incorporan una base en *missmatch* destacada, desde el plasmido pCMV6-Entry. Además, se clonó PRPK WT en el vector pCMV-

Tag2, desde el vector pCMV6-Entry, amplificando la secuencia con el partidor Fwd 5'-AATTGGATCCATGGCTGGTGTGTCCTCGGAG-3' que introduce un sitio de restricción para BamHI, y el Rev, con una secuencia de restricción para HindIII, 5'-AATTAAGCTTCTACCCGACCATGGACCGCTTTCG-3'. Los vectores resultantes, pCMV-Tag2-PRPK WT y pCMV6-Entry-PRPK D174N se utilizaron para amplificar las secuencias de PRPK por PCR, usando los partidores Fwd 5'-AATTGAATTCATGGCTGGTGTGTCCT-3', con un sitio de restricción para EcoRI, y el Rev 5'-AATTGGATCCCTACCCGACCATGGAC-3', con un sitio para BamHI, ambos amplificados (PRPK WT y D174N) se clonaron en el vector pmKate2-C, que genera una proteína de fusión con mKate2, una proteína fluorescente de emisión en el espectro rojo lejano (Shcherbo y col., 2009).

La secuencia de p53 WT de rata, se obtuvo desde cDNA de cerebro de *Rattus norvegicus*, y se insertó en el vector pCMV-Tag2, usando los siguientes partidores: Fwd 5'-CAAGGGATCCATGGAGGATTCACAGTCG-3', con un sitio de restricción para BamHI, y Rev 5'-CAAGGAATTCGTCTGAGTCAGGCCCCAC-3', con una secuencia de corte para EcoRI. El vector pCMV-Tag2-p53 WT se usó para obtener las formas mutantes de p53, S15D y S15A, mediante PCR con los partidores mutagénicos que se detallan: Fwd_{S15D} 5'-AAAGGATCCATGGAGGATTCACAGTCGGATATGAGCATCGAGCTCCCTCTGGATCAGGAG-3', con las bases en *missmatch* resaltadas en azul y, partidor Fwd_{S15A} 5'-AAAGGATCCATGGAGGATTCACAGTCGGATATGAGCATCGAGCTCCCTCTGGCTCAGGAG-3', ambos con secuencias de corte para BamHI. El partidor Rev, con secuencia de corte por EcoRI: 5'-CGGGGAATTCGTCTGAGTCAGGCCCCACTTTCTTGATCATTTGG-3', tanto p53 S15D como p53 S15A se clonaron en el vector pCMV-Tag2. Los constructos generados fueron secuenciados en MacroGen Inc, Corea del Sur y/o en el Centro de Biotecnología de la Universidad de Chile. Los mapas de los vectores pCMV-Tag2 y pmKate2-C se muestran en el anexo 1, y un resumen de los constructos generados en este trabajo, en la tabla 1.

cDNA	Vector	Tag	Ubicación del Tag
PRPK WT	pCMV-Tag2	FLAG	N-terminal
PRPK D174N	pCMV6-Entry	Ninguno	N-terminal
PRPK S241D	pCMV-Tag2	FLAG	N-terminal
p53 WT	pCMV-Tag2	FLAG	N-terminal
p53 S15D	pCMV-Tag2	FLAG	N-terminal
p53 S15A	pCMV-Tag2	FLAG	N-terminal
PRPK WT	pmKate2-C	mKate2	N-terminal
PRPK D174N	pmKate2-C	mKate2	N-terminal

Tabla 1. Resumen de los constructos generados durante el transcurso de este trabajo. Se detalla el vector en que las secuencias codificantes fueron clonadas, y la ubicación del Tag.

Anticuerpos y reactivos

En este trabajo se ocuparon los siguientes anticuerpos: anti-p53 (1C12) hecho en ratón y anti-p-p53 S15 en conejo (#2524 y #9284, Cell Signaling), anti-PRPK hecho en conejo (ab37606, Abcam), anti-PRPK producido en conejo (SAB1300461, Sigma), anti-Rab35 producido en conejo (#9690, Cell Signaling), anti- β III-tubulina/Tuj1 hecho en ratón (#G712A, Promega), anti-Cdc42 producido en conejo (#07-1466, Millipore), anti- α -FLAG hecho en ratón (clon M2, #F18041, Sigma), anti- α -tubulina producido en ratón (T6199, Sigma), anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón o conejo, acoplados a peroxidasa de rábano (Jackson laboratories) y anticuerpos secundarios conjugados con Alexa-488, Alexa-546, Alexa-633 y Alexa 647 (Invitrogen). También se utilizó Faloidina Acti-Stain 488 y 555 (Cytoskeleton), y Faloidina conjugada con Alexa 546 (Invitrogen), además de la sonda Topro-3 642/661 (Invitrogen).

Cultivos celulares y transfección.

Las líneas celulares N1E-115 y COS-7 se crecieron en DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco) suplementado con 5% suero fetal bovino (FBS) y 1% penicilina/streptomizina/anfotericina, a 37 °C y 5% CO₂. Los cultivos de neuronas hipocampales

embrionarias de rata se llevaron a cabo como se ha descrito (Kaech y Banker, 2006). Se sembraron 40.000 células sobre *covers* lavados con ácido nítrico y tratados con poli-L-lisina (Sigma), en placas de 24 pocillos. Tras su adhesión al sustrato, fueron transfectadas usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante. La sonda FRET para Cdc42 se transfectó tras 1 DIV y los constructos de p53 se transfectaron siguiendo el protocolo de Qin y colaboradores (Qin y col., 2009). Las cotransfecciones de plasmidios se hicieron agregándolos en una relación 1:4, lo que asegura ~ 98% de cotransfección.

Inmunoblotting

Las células o el tejido derivado de cerebro fueron lisados usando buffer RIPA con un cóctel de inhibidores de proteasas (Roche), 1 mM PMSF, 5 mM de NaF, 1 mM de Na_3VO_4 y 20nM de caliculina. Las muestras fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS, cargando 40 μg de proteínas para muestras estándar y 60 μg para detectar PRPK y Rab35 endógenas. Las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF, la que se bloquearon con TBS-Tween 0,05%, BSA 5% e incubadas con los anticuerpos primarios y secundarios apropiados, consecutivamente. Las proteínas fueron detectadas con un sistema quimiolumincente (ECL pico o femto, Thermo Scientific) usando films auto-radiográficos.

Inmunocitoquímica

Las líneas celulares o neuronas en cultivo fueron fijadas con 4% paraformaldehído/sacarosa en PBS por 30 min a 37 °C y permeabilizadas con PBS-Triton X-100 0,1% por 5 min. Los *covers* se bloquearon con PBS BSA 5% previo a la incubación con los anticuerpos primarios, que se visualizan mediante anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos descritos previamente. Los *covers* fueron montados en FluorSave (Calbiochem) y las

imágenes fueron adquiridas usando un microscopio confocal Zeiss LSM 510 Meta, con objetivos/N.A. 40x/1.3 y 63x/1.4. La longitud axonal se midió usando el programa LSM Image Browser.

Experimentos de *live cell imaging*

Células N1E-115 fueron transfectadas para inducir la expresión de EGFP-Lifeact, un péptido fluorescente que se une a F-actina y permite su visualización *in vivo* (Riedl y col., 2008). Adicionalmente se cotransfectó mKate2-PRPK WT, mKate2-PRPK D174N, o mStrawberry-Rab35 WT, y tras un día de expresión se llevaron a cabo experimentos de *Time-lapse* para analizar número de filopodios por célula, según los criterios de Lim y colaboradores (Lim y col., 2008). Se realizaron 20 *time-lapse* por condición, compuestos de 20 cuadros adquiridos cada 30 segundos, en el canal de excitación de 488 nm (EGFP-Lifeact), y en cada uno de ellos se contó el número de filopodios exhibidos por la célula en cada cuadro. Se promedió el número de filopodios/cuadro/célula, como un valor representativo del *time-lapse*, y finalmente se promediaron estos valores para las 20 células de cada condición.

Expresión del biosensor FRET de Cdc42

Neuronas en cultivo de 1 DIV fueron transfectadas con el biosensor FRET Raichu de Cdc42, o cotransfectadas con el vector pCMV-Tag2-PRPK WT, luego de 18 hrs de expresión, las neuronas fueron fijadas y se montaron para su análisis. La adquisición de imágenes se realizó siguiendo el protocolo de Pertz y colaboradores (Pertz y col., 2006). Brevemente, la excitación de la muestra se realizó con el canal de 458 nm para CFP e YFP (canal de FRET) y de 633 nm para FLAG-PRPK WT. Para detectar la emisión de la sonda, se usaron los filtros: CFP 500/25 y canal FRET 565/35. El procesamiento de imágenes se llevó a cabo usando el programa Fiji-ImageJ: se sustrajo el *background*, se aplicó un filtro de mediana de radio 1,2 y se alinearon los

canales con el plugin StackReg, luego se generó una máscara binaria usando la señal de YFP. El mapa de FRET se obtuvo dividiendo el canal FRET por el canal CFP, realizando un segundo filtro de mediana de radio 0,6 y realizando el cociente entre FRET/CFP y la máscara binaria. Las imágenes se muestran usando una LUT semejante a la de 16 colores con escala térmica del programa Metamorph, pero adaptada a ImageJ.

Purificación de proteínas de fusión y ensayos de *Pull down*

Los vectores pGEX-PAK, que codifica para el dominio de unión de Rac1 y Cdc42 a *p21-activated Kinase 1 protein* (PAK1), fusionado a GST (glutación S-transferasa) y pGEX-RBD35, que codifica para el dominio mínimo de unión de Rab35 a Rusc2, fusionado a GST (Fukuda y col., 2011), fueron transformados en bacterias *E.coli* de la cepa BL21, y la expresión de las proteínas fue inducida con 2 mM y 1 mM de IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido) respectivamente, en agitación durante 2 hrs a 37 °C. Las células fueron lisadas en buffer de solubilización (50 mM de Tris-pH 8, 150 mM NaCl, 25mM NaF, 1 mM EDTA y 1% Triton X-100), y las proteínas purificadas por afinidad, usando glutación sefarosa 4B (GE Healthcare). Los ensayos de *Pull down* se realizaron dos días después de transfectar pCMV-Tag2-PRPK WT o pCMV6-Entry-PRPK D174N, lisando las células con buffer *fishing* (10% glicerol, 1% Tritón X-100, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 25 mM NaF y un cóctel de inhibidores de proteasas) e incubando los extractos (1200-1500 μ g) con las proteínas de fusión purificadas, durante 1:10 hrs a 4°C, en buffer *fishing*, lavados 3 veces con buffer de lavado (25 mM Tris-HCl pH 7,5, 30 mM MgCl₂ y 40 mM NaCl) y denaturados para su análisis por Inmunoblot

Análisis estadístico

Los valores representados en los gráficos corresponden a promedios \pm error estándar. La comparación de los promedios se llevó a cabo mediante t-test (distribución de dos colas, no pareado), o ANOVA de una vía con el post-test de Dunnett para comparar contra el control, y el de Bonferroni o el post-test de Newman-Keuls para comparar entre condiciones, usando el programa GraphPad Prism 5. * denota $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$. El test estadístico utilizado en cada caso se menciona en la descripción de la figura.

RESULTADOS

Expresión de los constructos de PRPK y p53 en líneas celulares.

Para evaluar el efecto de la sobreexpresión de PRPK sobre la elongación axonal, utilizamos los constructos que codifican para PRPK WT, para la mutante *kinase dead* (KD) PRPK D174N, que posee una mutación en el aminoácido que posiciona el fosfato- γ del ATP en el loop de activación (Facchin y col., 2002) y que fue empleada en el trabajo en que originalmente se describió PRPK (Abe y col., 2001), y la construcción que codifica para la forma fosfo-mimética de la activación de PRPK por Akt, PRPK S241D, mutación que aumenta los niveles de p-p53 fosforilado por PRPK (Facchin y col., 2007), una relación funcional que también está presente en los homólogos de ambas quinasas en levadura, donde la fosforilación de Bud32 por Sch9p modifica la preferencia de Bud32 por su sustrato Grx4p sin aumentar su actividad quinasa (Peggion y col., 2008). Estos constructos fueron transfectados en células de la línea COS-7, para verificar su expresión. En la figura anexa 2 se muestra la expresión de las tres construcciones detectadas por el anticuerpo anti-PRPK, y también por anti-FLAG para el caso de PRPK WT y PRPK S241D, pues estas últimas presentan ese epítipo en el extremo N-terminal. Se puede apreciar que las proteínas expresadas desde el plasmidio pCMV-Tag2 presentan una movilidad electroforética reducida con respecto a la de PRPK D174N y a la marca de PRPK endógena. Este efecto ya había sido observado por otros autores al expresar Bud32-His₆ desde *E.coli*, lo que produce la aparición de la proteína en torno a los 31 kDa (Stocchetto y col., 1997). Sin embargo, este cambio en la movilidad electroforética es compartido por los constructos de p53 expresados desde el mismo vector, por lo que parece ser una característica inherente al plasmidio. La cuantificación de los niveles de p-p53/p53 presentada en el anexo 2, muestra que PRPK WT aumenta los niveles de p53 fosforilado casi al doble, mientras que PRPK D174N no

produce un aumento, pero tampoco una disminución. Esto se puede explicar por el número elevado de quinasas que presentan una actividad redundante sobre la serina 15 de p53, entre las que se encuentran ATM (Banin y col., 1998; Canman y col., 1998), ATR (Tibbetts y col., 1999), Chk1 y Chk2 (Shieh y col., 2000), DNA-PK (Lees-Miller y col., 1992), DYRK1A (Park y col., 2010), LKB1/NUAK1 (Zeng y Berger, 2006; Hou y col., 2011), AMPK (Jones y col., 2005), ERK1/2 (Persons y col., 2000), p38 (Kim y col., 2002) y CDK5 (Lee y col., 2007), las que estabilizan a p53 mediante esta fosforilación (Brooks y Gu, 2003). También puede explicarse por el hecho que PRPK D174N presenta una actividad quinasa reducida o nula, pero no se comporta como una quinasa dominante negativa, con respecto a la fosforilación sobre p53. Problemas para detectar disminuciones en los niveles de fosforilación de la serina 15 de p53 derivados de interferir con la actividad de PRPK ya habían sido reportados, por ejemplo la proteína CGI-121, que integra el complejo KEOPS/EKC, reduce significativamente la interacción entre PRPK y p53 (Miyoshi y col., 2003), sin embargo, la sobreexpresión de CGI-121 en células U2-OS, no induce una reducción de la fosforilación de p53 en la serina 15. En nuestros experimentos, PRPK S241D no se comporta como una quinasa con mayor actividad sobre su sustrato, y si bien aumenta los niveles de fosforilación en la serina 15 de p53, no muestra una actividad superior a PRPK WT, por lo que en los experimentos de transfección en neuronas sólo se compararon los efectos de PRPK WT y PRPK D174N.

La expresión de los constructos de p53 generados también fue corroborada y se presenta en el anexo 2.

Expresión de PRPK WT y PRPK DN en neuronas en cultivo

Para evaluar el efecto de PRPK sobre la elongación axonal, los constructos pCMV-Tag2-PRPK WT y pCMV6-Entry-PRPK D174N fueron cotransfectados con pCAG-GFP en neuronas hipocámpales embrionarias de rata en cultivo. Experimentos anteriores realizados en

nuestro laboratorio demostraron que la sobreexpresión de dPRPK en este modelo induce una reducción en la longitud axonal de aproximadamente un 50% con respecto a neuronas controles, lo que se muestra en la figura Anexa 4. En la figura 1 se presentan imágenes representativas de las diferentes condiciones experimentales, donde se puede observar que las neuronas que sobreexpresan PRPK WT a los 3 DIV, completan el proceso de determinación del axón, es decir, no permanecen arrestadas en estadio 2, pero exhiben una disminución en la longitud axonal de aproximadamente un 50%, con respecto a las neuronas controles, lo que recapitula el fenotipo generado por dPRPK. Esta reducción del largo axonal inducida por PRPK es dependiente de su actividad quinasa, ya que las neuronas que sobreexpresan PRPK D174N no presentan axones más cortos, e incluso existe un leve incremento en su longitud, sugiriendo que la actividad quinasa de PRPK sería importante en la inhibición del crecimiento axonal. Sin embargo la sobreexpresión de las mutantes p53 S15D y p53 S15A no modifican la longitud axonal de neuronas en cultivo, como se muestra en el anexo 3, lo que sugiere que el efecto inhibitorio de PRPK sobre la elongación axonal decursa a través de un mecanismo independiente de p53.

PRPK WT fenocopia la pérdida de función de Rab35 sobre la citoquinesis.

Luego de determinar que la actividad quinasa de PRPK es necesaria para la reducción del crecimiento axonal asociado a su sobreexpresión, pero que el efecto no depende de su sustrato p53, quisimos averiguar si existe una relación funcional entre PRPK y su interactor Rab35, que pudiera explicar los cambios fenotípicos descritos sobre la elongación axonal.

Como primera aproximación, células de la línea N1E-115 no diferenciadas fueron transfectadas con el vector pCMV-Tag2-PRPK WT y analizadas por inmunocitoquímica, para describir la aparición de alteraciones morfológicas. Los reportes presentes en la literatura indican

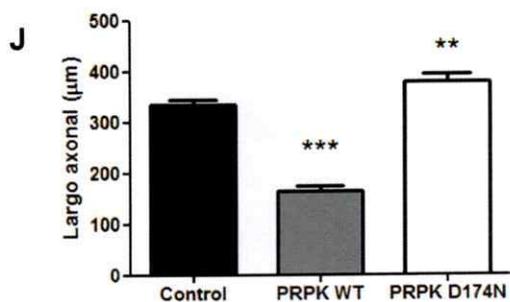
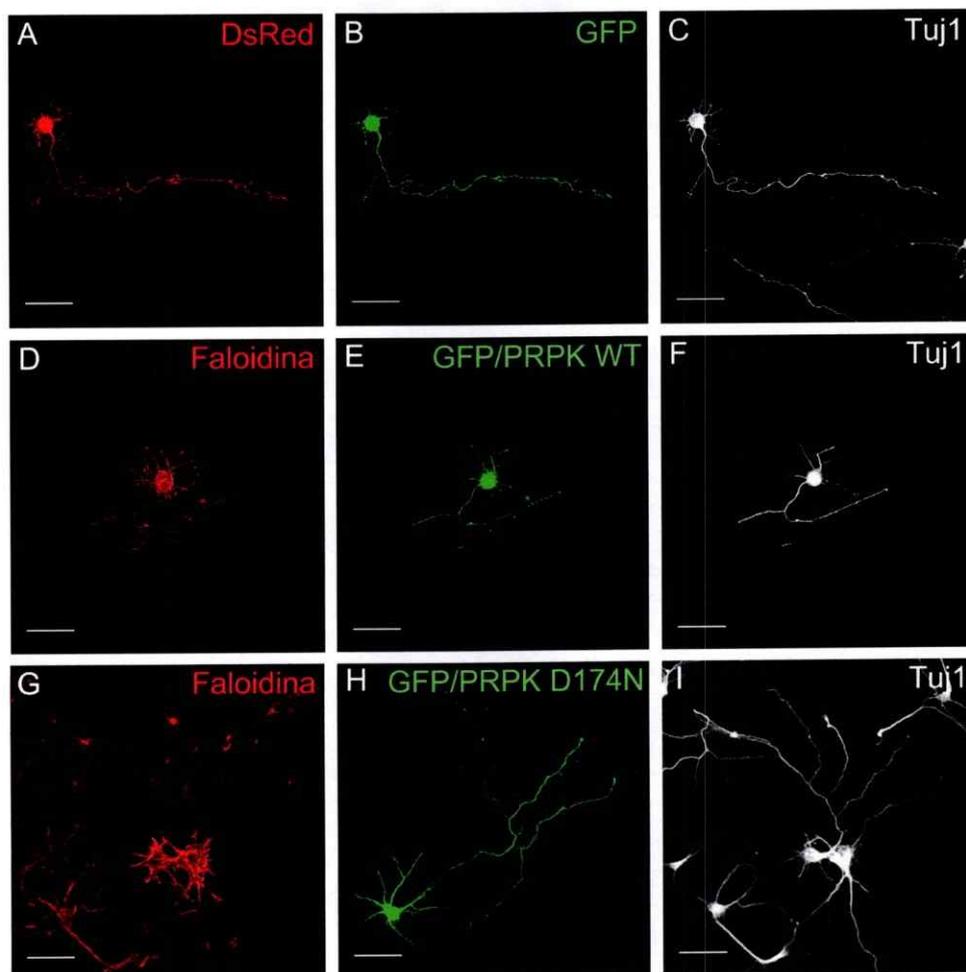


Figura 1. La reducción de la longitud axonal inducida por PRPK depende de su actividad quinasa. (A–C) Neurona cotransfectada con DsRed y GFP como control, (D–F) neurona transfectada con PRPK WT, (G–I) neurona transfectada con PRPK D174N. En A se presenta la señal de DsRed, en D y G la marca de faloidina (para visualizar F-actina), en B, E y H la señal de GFP como marcador de volumen y en C, F e I la marca de Tuj1, como marcador de linaje neuronal. En J se muestra la cuantificación de la longitud axonal para cada caso, $n = 50$ neuronas por condición, de 3 cultivos independientes. Barra de tamaño = $50 \mu\text{m}$. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Anova de una vía, post-test de Dunnett.

que la distribución subcelular de PRPK endógena es citoplasmática, pero que la sobreexpresión de la proteína induce su acumulación nuclear, ya que posee una señal de localización bipartita núcleo/citoplasma (Abe y col., 2001; Abe y col., 2006). En nuestro modelo experimental, vemos que la localización subcelular de PRPK en células que sobreexpresan esta quinasa, no es únicamente nuclear, sino que existe una diversidad de posibles localizaciones. Como se muestra en la figura 2, algunas células presentan la marca de FLAG en el citoplasma, sin una clara acumulación nuclear (2 A-B), otras exclusivamente en el núcleo (2 C-D) y un tercer grupo exhibe la marca de PRPK tanto en el citoplasma como en el núcleo (2 E-F), siendo esta distribución mixta, la encontrada con mayor frecuencia en nuestros cultivos. Como una parte de las moléculas de PRPK se acumulan en el núcleo, se realizó una tinción con Topro como marcaje nuclear, verificando que la sobreexpresión de PRPK WT induce un aumento del porcentaje de células binucleadas, lo que puede ser indicativo de un defecto durante la progresión de la citoquinesis. Para indagar más en este fenotipo, se comparó la frecuencia de aparición de células binucleadas en células expresando GFP como control, PRPK WT y Rab35 S22N, la forma dominante negativa de Rab35, cuya sobreexpresión induce alteraciones en el último paso de la citoquinesis, aumentando el tiempo necesario para que las células completen este proceso, y provocando que un subconjunto de ellas sea incapaz de dividirse, lo que genera células binucleadas (Kouranti y col., 2006). En la figura 2G se muestra una célula sobreexpresando PRPK WT y en la figura 2H, una célula sobreexpresando Rab35 S22N, ambas con dos núcleos. Respecto a la frecuencia de aparición de células binucleadas, para las que expresan GFP fue 1/56 (1,8%), para las que expresan PRPK WT fue 22/65 (33,9%) y entre las que expresan Rab35 S22N se hallaron 27/71 (38%). Este resultado sugiere que la sobreexpresión de PRPK WT fenocopia la pérdida de función de Rab35 sobre la citoquinesis.

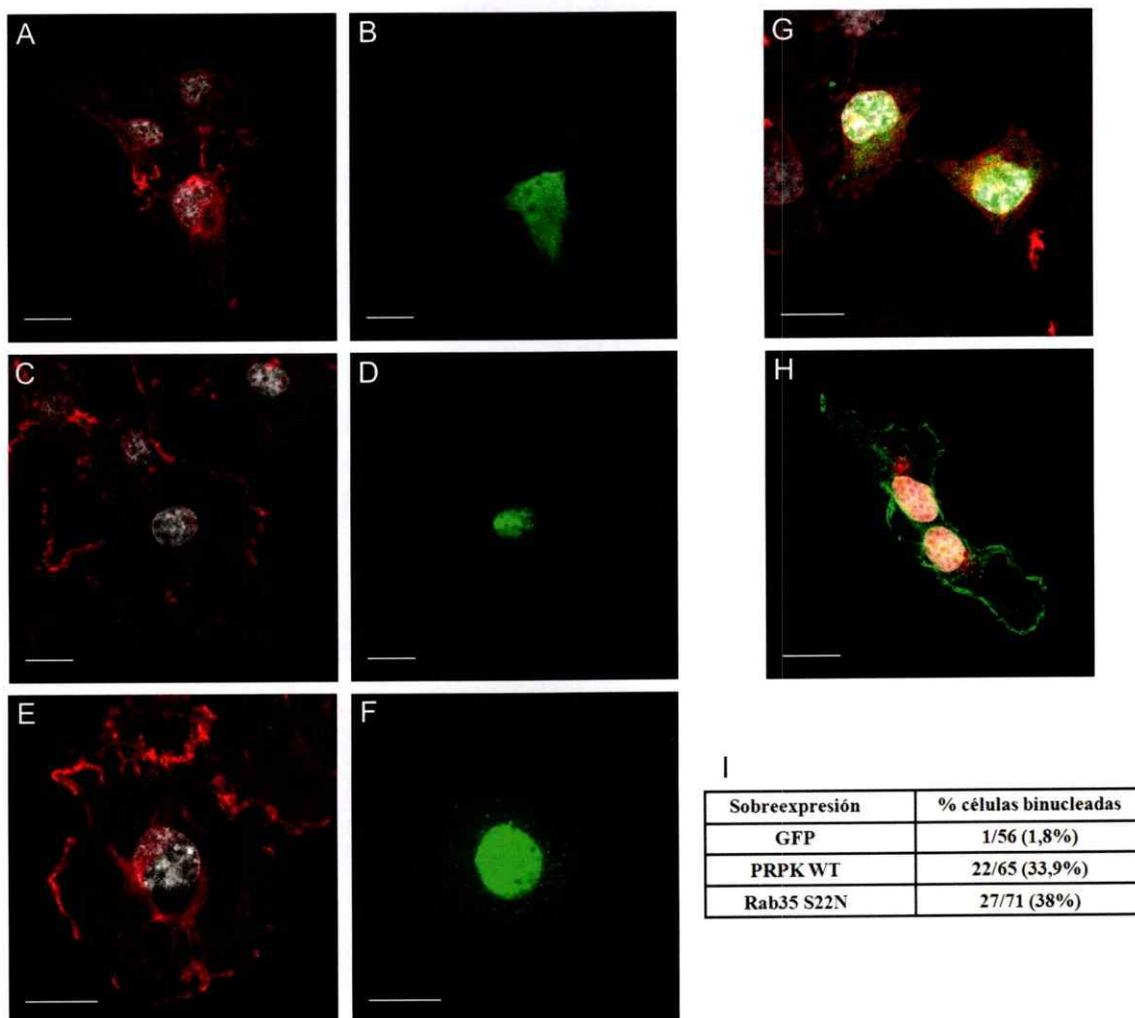


Figura 2. PRPK WT fenocopia la aparición de células binucleadas generadas por Rab35 S22N. (A–F) Células de la línea N1E-115 no diferenciadas expresando PRPK WT, en A, C y E se muestran las marcas de faloidina en rojo y Topro (marcador nuclear) en blanco. En B, D y F se muestra la marca de FLAG-PRPK WT. (G) Célula binucleada que expresa PRPK WT (verde), en que se pseudocoloreó faloidina en rojo Topro en blanco. (H) Célula binucleada que expresa Strawberry-Rab35 S22N (rojo), en que se marcó faloidina en verde y Topro en blanco. En I se presenta una tabla resumen de la frecuencia de aparición de células binucleadas para cada tratamiento, desde tres preparaciones independientes de células no diferenciadas. Barra de tamaño = 20 μ m.

PRPK WT regula la aparición de filopodios en células N1E-115.

La alteración en la progresión de la citoquinesis descrita para Rab35 S22N y reproducida por PRPK WT nos da un indicio sobre la relación funcional de ambas proteínas, sugiriendo que al menos en ese modelo, la sobreexpresión de la quinasa induciría un efecto similar a la pérdida de función de Rab35. Nuestro análisis de la relación funcional entre PRPK y Rab35 continuó con estudios dirigidos a averiguar si la sobreexpresión de PRPK es capaz de reproducir otros efectos vinculados o dependientes de Rab35. Dado que existen reportes indicando que Rab35 induce formación de filopodios y neuritogénesis (Chevallier y col., 2009), quisimos comprobar si PRPK también es capaz de regular la aparición filopodios. Para ello transfectamos células N1E-115 con un plasmidio que induce la expresión de EGFP-Lifeact, un péptido fluorescente que permite la visualización *in vivo* de la dinámica del citoesqueleto de actina sin interferir con su polimerización (Riedl y col., 2008), y además hace posible distinguir entre filopodios y otras estructuras basadas en actina, como fibras retráctiles o protrusiones similares a neuritas (Lim y col., 2008; Mattila y Lappalainen, 2008). Junto a la sobreexpresión de EGFP-Lifeact, también se sobreexpresó mKate2-PRPK WT, mKate2-PRPK D174N, Strawberry (St)-Rab35 WT y una triple cotransfección de EGFP-Lifeact, mKate2-PRPK WT y St-Rab35 WT. La figura 3A muestra una célula control que expresa EGFP-Lifeact, en 3 diferentes momentos del *time-lapse*, que también se puede ver en el video suplementario 1. La estructura más gruesa, con un flujo retrógrado de actina y que se marca con un asterisco en 3A, no se considera un filopodio sino que una estructura similar a fibras retráctiles. Protrusiones estáticas tampoco se consideraron filopodios, porque se asemejan más a neuritas (Lim y col., 2008). En promedio, las células controles mostraron cerca de 15 filopodios por célula, mientras que las que sobreexpresan PRPK WT (3B, video suplementario 2) presentaron significativamente menos, con un promedio cercano a 3, siendo frecuente encontrar células carentes de filopodios, como la de la figura 3B. PRPK D174N (figura 3C y video suplementario 3) por el contrario, induce un aumento en el

número de filopodios por célula, a cerca del doble de los encontrados en las controles, un incremento que también se observa al sobreexpresar Rab35 WT (figura 3D y video suplementario 4). Por último, en células triple transfectadas Rab35 WT es capaz de rescatar el fenotipo de disminución del número de filopodios por célula, inducido por PRPK WT (figura 3E y video suplementario 5), lo que sugiere una relación epistática entre Rab35 y PRPK WT. De todos los grupos experimentales, el mayor incremento lo generó Rab35WT, sin embargo, éste no difiere significativamente del número de filopodios por célula generados por PRPK D174N o encontrados en las células triple transfectadas. Con respecto al tiempo de vida medio promedio de los filopodios en cada condición, éste no fue medido porque la sobreexpresión por tiempos prolongados, de elementos que inducen la formación de filopodios o que regulan la dinámica de formación de manojos de actina, alteran este parámetro.

PRPK regula la actividad de Cdc42

Nuestros análisis en células N1E-115 muestran que la sobreexpresión de PRPK WT fenocopia la pérdida de función de Rab35 sobre la citoquinésis y también que PRPK D174N genera un efecto similar a la expresión de Rab35 sobre la aparición de filopodios. Como la regulación de la dinámica de los filopodios es dependiente de la activación de la GTPasa monomérica pequeña Cdc42, quisimos investigar si PRPK es capaz de modular la actividad de dicha GTPasa. Para ello transfectamos los constructos pCMV-Tag2-PRPK WT y pCMV6-Entry-PRPK D174N en células de la línea COS-7, y con los extractos de proteínas de las células transfectadas se llevaron a cabo ensayos de *pull down* de actividad para Cdc42, como se ilustra en la figura 4A. PRPK WT reduce la cantidad de Cdc42-GTP/Cdc42 total en cerca de un 30%, es decir, disminuye significativamente la actividad de esta GTPasa mientras que PRPK D174N aumenta la actividad de Cdc42 en aproximadamente un 50% (figura 4A-B).

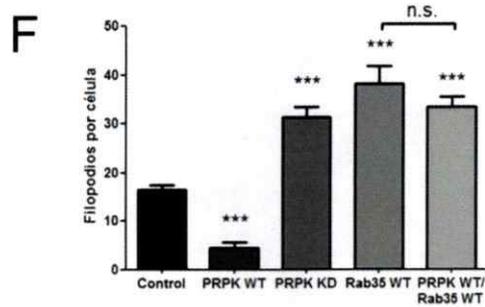
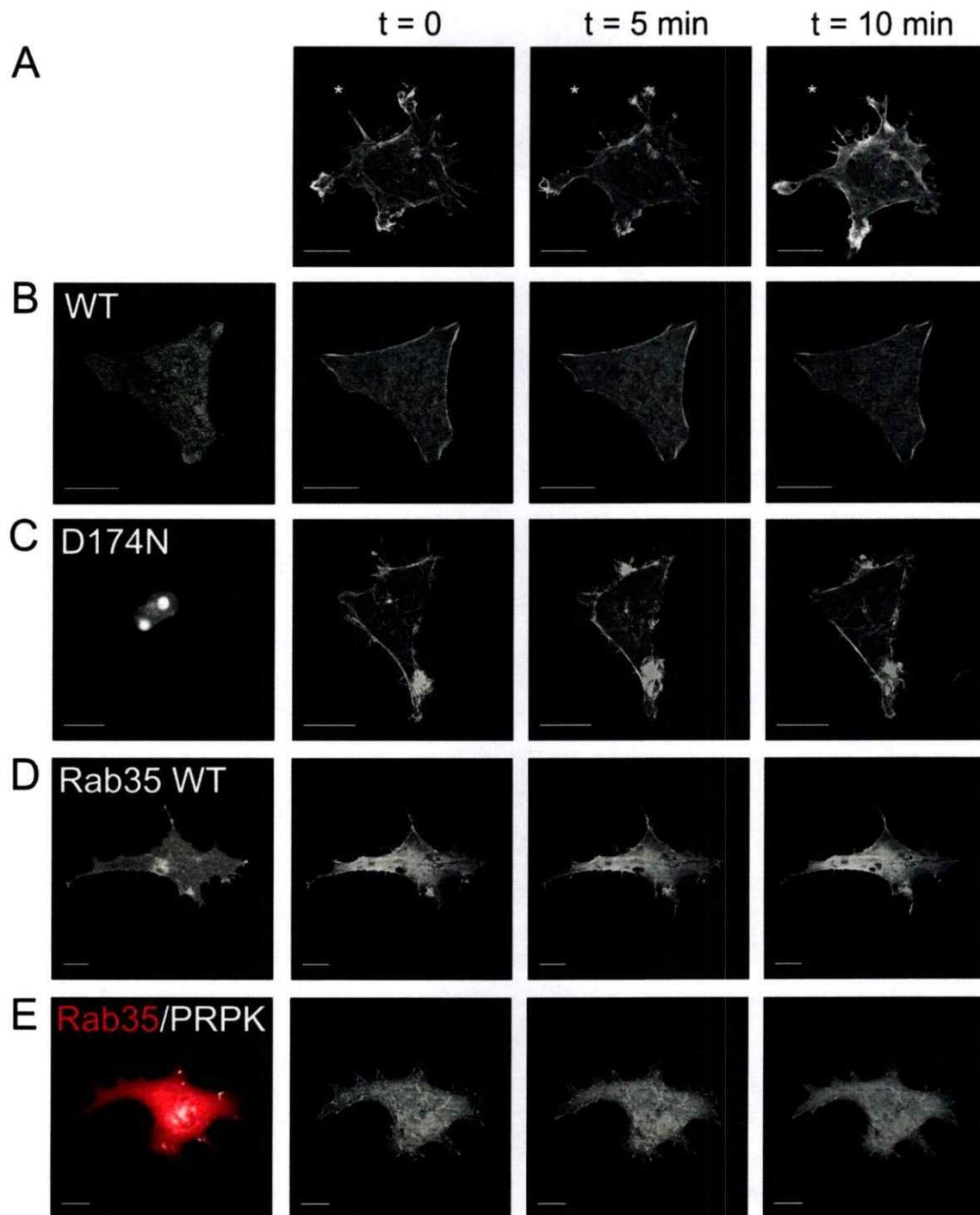


Figura 3. Rab35 WT rescata el fenotipo de reducción en el número de filopodios promedio por célula, inducido por PRPK WT. En A se presentan tres cuadros de un *time-lapse* en que se analiza una célula de la línea N1E-115 expresando EGFP-Lifeact, el tiempo del que se extrajeron los cuadros se indica en la parte superior de las imágenes. * indica una protrusión de actina que no se considera filopodio. En B, C y D se presentan células expresando PRPK WT, D174N y Rab35 WT respectivamente, el primer cuadro muestra la señal de mKate2 o Strawberry (los tag de proteínas fluorescentes de los constructos) y 3 cuadros de cada *time-lapse*. En E se observa una célula cotransfectada con Rab35 WT (en rojo) y PRPK WT (en blanco), así como 3 cuadros del *time-lapse* correspondiente. Por último, en F se muestra la cuantificación del número de filopodios promedio por célula para cada condición. Barra de tamaño = 15 μm , n = 20 células para cada condición, excepto Rab35 WT, en que n = 18 células, ***p<0.001. Anova de una vía, post-test de Dunnett.

Para verificar si este resultado es reproducible en neuronas, cotransfectamos el biosensor FRET Raichu para Cdc42 junto a pCMV-Tag2-PRPK WT en neuronas de 1 DIV, las que fueron fijadas tras 18 hrs de expresión. La intensidad de fluorescencia del mapa de FRET se midió en el último tercio del axón (axón distal), donde debería haber un mayor actividad de Cdc42 que en el soma o que en el axón proximal en neuronas de 2 DIV, y también se midió en el tercio proximal del axón, tanto de neuronas controles que expresan sólo el biosensor, como de neuronas que coexpresan PRPK WT y el biosensor. Se presenta un mapa de FRET en la figura 4C, donde se observa que existe una disminución general de la actividad de Cdc42 en neuronas que expresan PRPK WT, con respecto a las controles, tanto en el compartimento axonal como en el somatodendrítico. Ambos grupos experimentales exhiben mayor eficiencia de FRET en la parte distal del axón con respecto a la parte proximal o al compartimento somatodendrítico, dentro de una misma neurona, descartando problemas en el transporte de Cdc42 o sus activadores hacia el cono de crecimiento, sin embargo, las células que expresan PRPK WT presentan alrededor de un 22% menos de intensidad de señal en el extremo axonal (cuantificación en figura 6E). En conjunto estos resultados indican que la sobreexpresión de PRPK reduce la actividad de Cdc42, lo que se evidencia por ensayos de *pull down* de actividad, expresión de la sonda FRET y por el correlato funcional sobre la formación de filopodios.

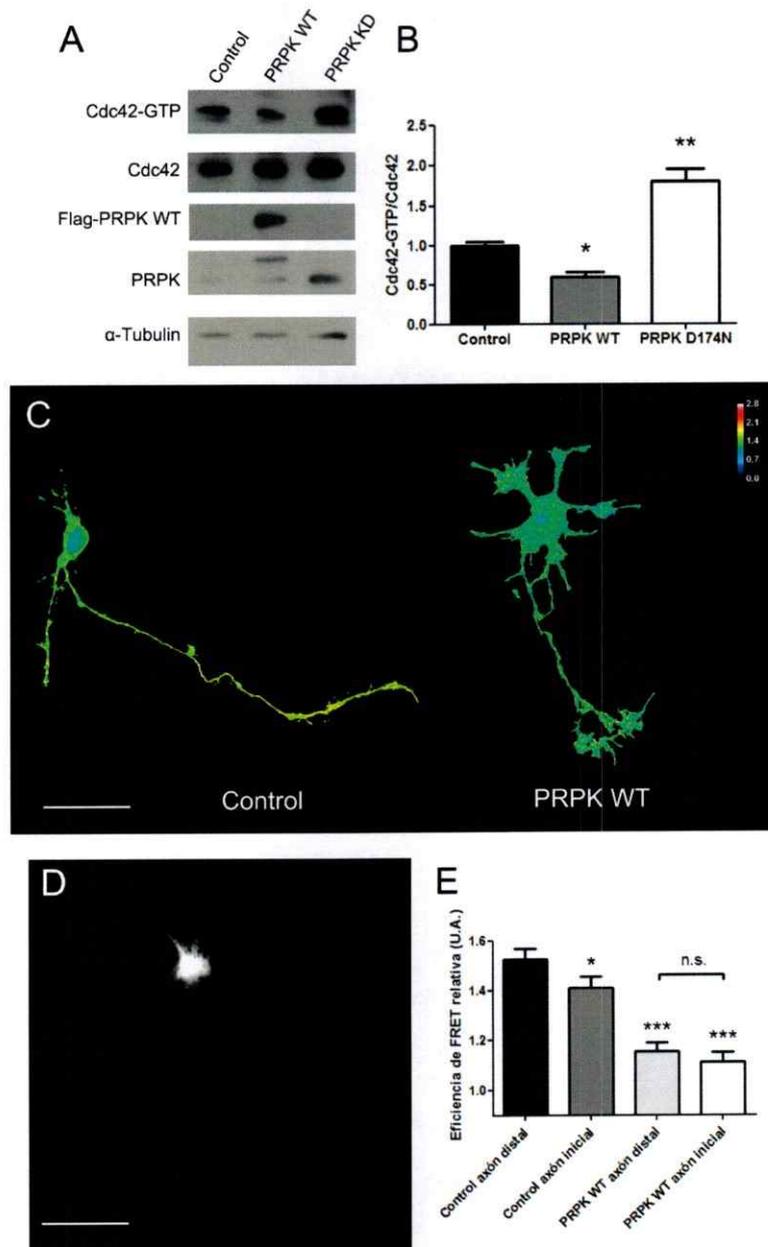


Figura 4. PRPK reduce la actividad de Cdc42 en líneas celulares y neuronas en cultivo. En A se presenta una imagen del *pull down* de Cdc42 desde células COS-7 transfectadas con PRPK WT y D174N, indicando a la izquierda de cada panel, a que corresponde cada inmunoblot. La cuantificación de los *pull downs* se presenta en B, $n=3$ * $p<0.05$, ** $p<0.01$. Anova de una vía, post-test de Dunnett. En C se muestra una composición de los mapas de FRET de 2 neuronas, una control expresando sólo el biosensor de Cdc42, y otra que coexpresa el biosensor y PRPK WT. En D se muestra la marca anti-FLAG de la neurona expresando PRPK WT del panel C. Finalmente en E se presenta la cuantificación de las intensidades de fluorescencia desde los mapas de FRET, $n=15$ neuronas por condición, cuyas imágenes fueron adquiridas desde 3 cultivos independientes, *** $p<0.001$, * $p<0.05$. Anova de una vía, post-test Newman-Keuls. Barra de tamaño en C y D = 40 μ m.

Rab35 promueve la elongación del axón de neuronas en cultivo, y rescata el fenotipo inducido por PRPK sobre la elongación axonal.

En el siguiente set de experimentos decidimos estudiar el efecto de la relación funcional entre PRPK y Rab35 sobre la elongación del axón. Como antecedente, en la literatura se ha descrito que Rab35 induce la aparición de neuritas en líneas celulares de origen neuronal (Chevallier y col., 2009; Kobayashi y Fukuda, 2012). Para esclarecer este punto, expresamos Rab35 WT, Rab35 Q67L (constitutivamente activo) y Rab35 S22N (dominante negativo), así como cotransfecciones de las diferentes variantes de Rab35, con PRPK WT, en neuronas hipocampales embrionarias de rata en cultivo, y medimos la elongación axonal de cada grupo experimental, a los 3 DIV. La figura 5 muestra imágenes representativas de neuronas expresando GFP como control, y las sobreexpresiones ya mencionadas. Acorde a lo esperado, las neuronas que expresan Rab35 WT exhiben un aumento de su longitud axonal en cerca de un 70%, al igual que las neuronas expresando Rab35 Q67L. Rab35 S22N induce una reducción de la longitud axonal en cerca de un 50%, lo que es similar al fenotipo generado por PRPK WT.

Para evaluar si Rab35 es capaz de rescatar el fenotipo de reducción de la longitud axonal que se genera al sobreexpresar PRPK WT, se realizaron los experimentos de cotransfección que se muestran en la figura 5. Rab35 WT y Q67L logran rescatar el fenotipo, generando axones que son significativamente más largos que aquellos de las neuronas controles, similar al efecto obtenido al sobreexpresar las versiones de las GTPasas individualmente. La cotransfección de PRPK WT con Rab35 S22N induce una reducción de la longitud axonal equivalente a la expresión de ambas por separado, es decir, la pérdida de función de Rab35 no rescata el fenotipo, pero tampoco lo vuelve más severo.



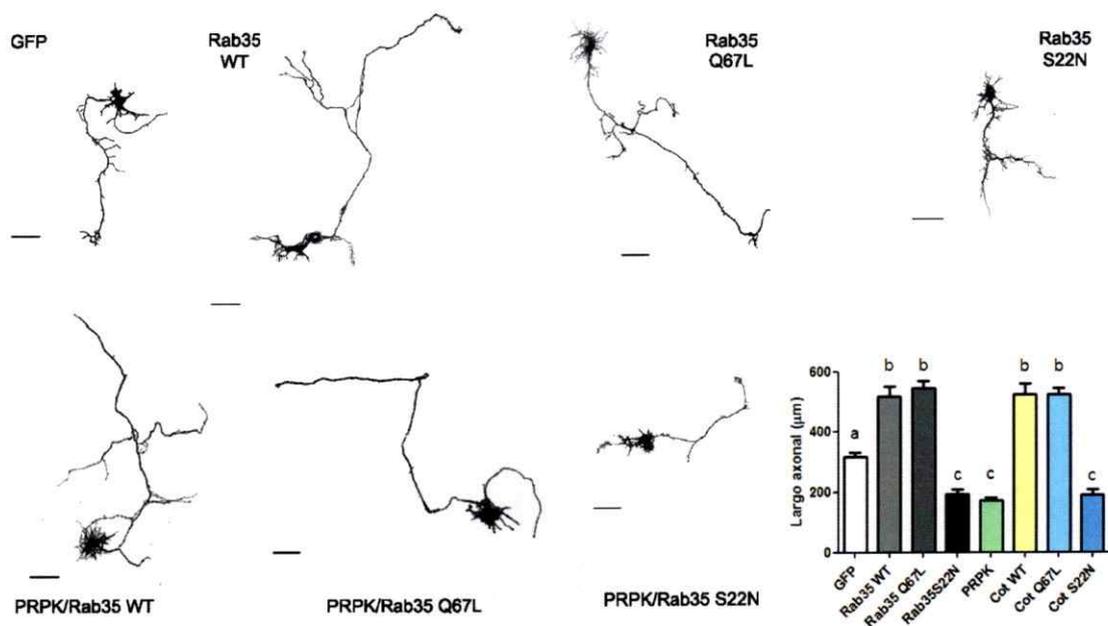


Figura 5. Rab35 promueve la elongación axonal, y rescata el fenotipo de axones más cortos inducido por PRPK, en neuronas en cultivo. En el panel se presentan 7 neuronas representativas de cada grupo experimental: sobreexpresión de GFP (control), Rab35 WT, Rab35 Q67L (constitutivamente activo), Rab35 S22N (dominante negativo), además de las cotransfecciones de PRPK WT con los diferentes constructos de Rab35. Barras de tamaño = 50 µm, n = 50 neuronas por condición para las transfecciones de constructos únicos, excepto PRPK WT, y n = 30 neuronas para las cotransfecciones y la expresión de PRPK WT, de 8 cultivos independientes, Anova de una vía, post-test de Dunnett. Cada letra indica una diferencia estadística de $***p < 0.001$ con letras diferentes y ausencia de diferencia con respecto a columnas con la misma letra.

Efecto de la sobreexpresión de PRPK y Rab35 sobre la elongación axonal de neuronas hipomorfas (hip) para MAP1B.

Como PRPK interacciona con la cadena liviana (LC1) de MAP1B, una proteína implicada en la elongación axonal (Gonzalez-Billault y col., 2001), quisimos evaluar la posible relación funcional de ambas proteínas. Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que la pérdida de función de MAP1B va acompañada de una disminución de la actividad de Cdc42, lo que coincide con los resultados reportados hasta ahora en este trabajo para los efectos de la sobreexpresión de PRPK.

Neuronas hipocampales de embriones de ratones hipomorfos y WT para MAP1B fueron transfectadas al momento de ser sembradas, y su longitud axonal fue medida a los 2 DIV, ya que

en ese momento de la progresión del cultivo se observa una mayor diferencia entre la elongación axonal de ambos genotipos (Gonzalez-Billault y col., 2001). En la figura 6A se presenta una neurona WT para MAP1B expresando GFP, y en 6B una neurona hipomorfa para MAP1B expresando GFP. Tal como se describe en la literatura, la pérdida de función de MAP1B provoca un retardo en el crecimiento axonal, lo que se manifiesta en una reducción del largo axonal de aproximadamente un 50% (cuantificación en 6F). A diferencia de lo que sucede en neuronas WT, la expresión de PRPK WT en neuronas hipomorfas para MAP1B no modifica el largo axonal con respecto al grupo hipomorfo control, las neuronas logran ingresar al estadio 3, pero sus axones son en promedio un 50% más cortos que los controles WT (figura 6C). Un resultado que difiere de lo observado en la figura 1, es la magnitud del aumento de la longitud axonal inducida por PRPK D174N. En neuronas hipocampales de rata a 3 DIV el aumento, aunque significativo, es modesto (cerca de un 10%), pero en neuronas hipomorfas para MAP1B, PRPK D174N incrementa el largo axonal en más del doble de la longitud de neuronas hipomorfas controles (figura 6D), al igual que Rab35 WT (figura 6E). Esto sugiere que la ausencia de MAP1B permite que PRPK D174N sea más eficiente en promover el crecimiento axonal. Además se demostró que PRPK D174N y Rab35 WT rescatan el fenotipo de reducción del crecimiento axonal de las neuronas hipomorfas para MAP1B, mientras que PRPK WT no modifica ni vuelve más severo el fenotipo.

Estos resultados sugieren que MAP1B podría tener un papel regulatorio sobre la actividad de PRPK, y que en ausencia de MAP1B la pérdida de dicha regulación impacta negativamente sobre la elongación axonal.

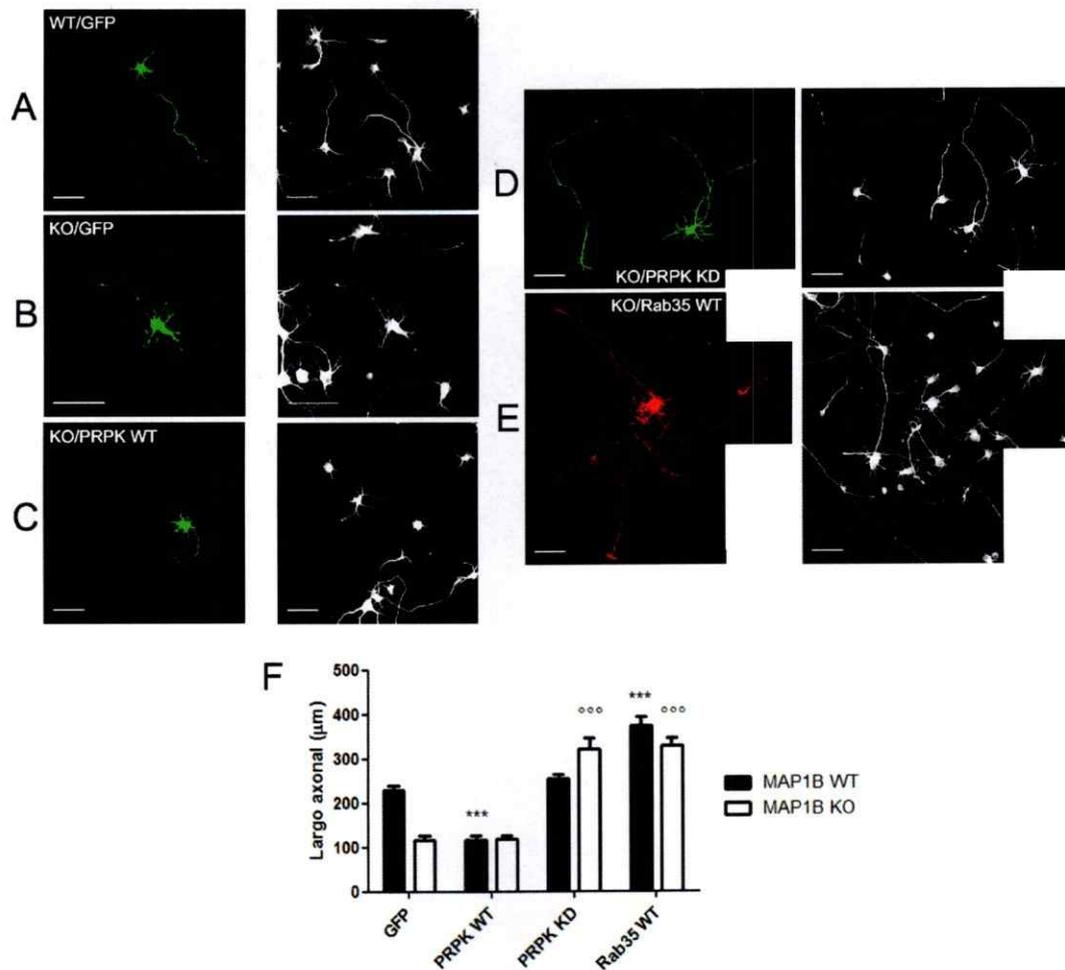


Figura 6. PRPK DN y Rab35 WT revierten el fenotipo asociado a la pérdida de función de MAP1B. En A se muestra una neurona WT expresando sólo GFP, en el resto de los paneles se muestran neuronas hipomorfas para MAP1B expresando GFP (B), PRPK WT y GFP (C), PRPK D174N y GFP (D) y Rab35 WT (E), en cada panel se presenta además la marca de Tuj1 en blanco. La cuantificación del largo axonal para cada condición se muestra en F, $n = 30$ neuronas, de 7 cultivos independientes, $***p < 0.001$. Anova de una vía, post-test de Dunnett barra de tamaño = $40 \mu\text{m}$.

Efecto de la sobreexpresión de PRPK sobre la función de Rab35

Las evidencias presentadas indican que la sobreexpresión de PRPK fenocopia la pérdida de función de Rab35, y dado que esta última rescata los fenotipos inducidos por PRPK, podría localizarse río abajo a la quinasa, posiblemente siendo regulada por ella. Por lo tanto cabe la pregunta: ¿Cuál sería la naturaleza de la regulación de PRPK sobre Rab35? Para contestarla se

expresó PRPK en células COS-7 y se analizaron los cambios en la masa de Rab35. Como se aprecia en la figura 7A, la sobreexpresión de PRPK WT induce una reducción de la masa de Rab35 en aproximadamente un 70%, mientras que PRPK D174N aumenta la expresión de Rab35 en casi un 50%, sugiriendo que existe una regulación de la cantidad de Rab35 mediada por PRPK de forma dependiente de su actividad quínasa. Esta disminución en la masa de Rab35 se reproduce en cerebros de ratones hipomorfos para MAP1B, presentando una reducción de cerca de un 40%, con respecto a cerebros de animales WT, como se aprecia en la figura 7C.

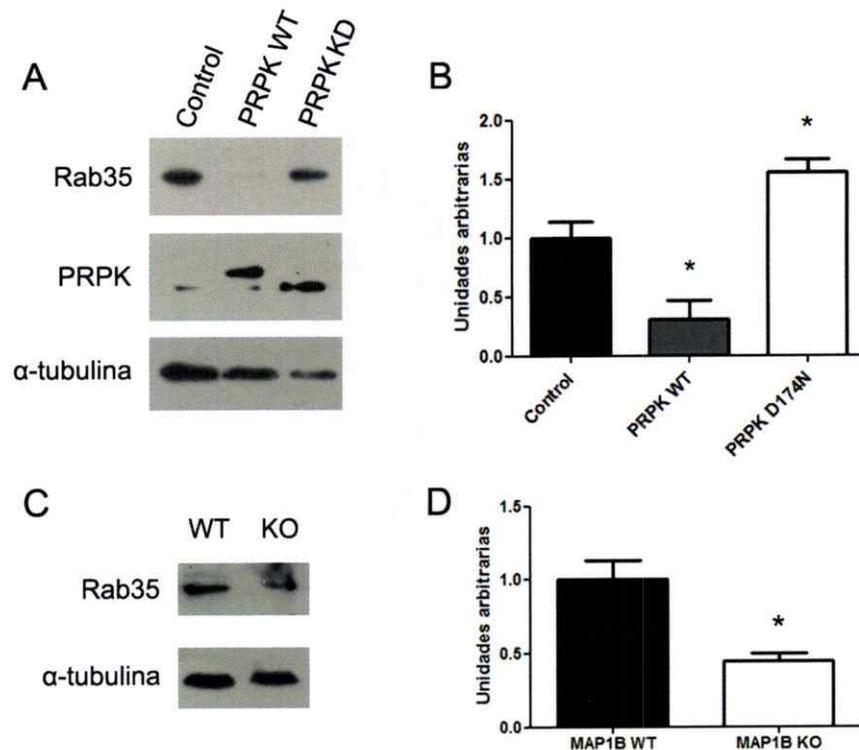


Figura 7. Disminución de la masa de Rab35 inducida por PRPK WT y por la pérdida de función de MAP1B. En A se muestra un inmunoblot de extractos de células COS-7 transfectadas con PRPK WT y D174N, revelado contra Rab35, PRPK y α -tubulina como control de carga. La cuantificación de los *western blots* se muestra en el panel B, n = 3. La determinación de la masa de Rab35 en cerebros de animales WT e hipomorfos para MAP1B se presenta en C, y la cuantificación del *western blot* se muestra en el panel D, n = 3 cerebros por condición, de animales de cultivos independientes, *p<0,05. Anova de una vía, post-test de Dunnett.

En su conjunto los resultados expuestos en este trabajo muestran que la quinasa PRPK actúa como un factor negativo de la regulación de la elongación axonal, cuya sobreexpresión reduce la masa de Rab35 y acorde a ese mecanismo, afecta procesos inducidos por la GTPasa, como la formación de filopodios y la activación de Cdc42. Adicionalmente, tanto PRPK D174N como Rab35 WT son capaces de recuperar el fenotipo de retardo en la elongación axonal, exhibido por las neuronas hipomorfas para MAP1B.

DISCUSIÓN

PRPK es una quinasa de proteínas atípica, filogenéticamente conservada, que en mamíferos fosforila al factor de transcripción p53 en la serina 15, estabilizándolo (Abe y col., 2001). Además forma parte de un complejo multiprotéico conocido como KEOPS/EKC, del que se han descrito roles en la mantención de los telómeros (Downey y col., 2006), regulación de la transcripción (Kisseleva-Romanova y col., 2006) y funciones relacionadas con una modificación de los tRNAs (t^6A) importante para el reconocimiento de los codones que empiezan con adenina (Srinivasan y col., 2011). Nuestro laboratorio describió una nueva función para PRPK en la elongación axonal, sindicando a dPRPK como un factor que inhibe el crecimiento del axón (anexo 4, resultados no publicados). Sin embargo, se desconocía si este nuevo rol era compartido por PRPK de ratón, y tampoco existía información sobre la vía de señalización involucrada en el fenotipo inducido por esta quinasa. En este trabajo reportamos que el rol de PRPK sobre la elongación axonal está filogenéticamente conservado, depende de su actividad quinasa, pero no de la fosforilación de p53 en la serina 15, e induce una disminución de los niveles de expresión de Rab35.

A diferencia de lo observado por Abe y colaboradores (Abe y col., 2001), en nuestros experimentos la expresión de PRPK D174N no redujo los niveles de p-p53/p53, pero si se comportó como una forma dominante negativa con respecto al efecto sobre la elongación axonal, sobre la regulación de la dinámica de los filopodios, de los niveles de Cdc42 activa y del control de los niveles de expresión de Rab35 indicando que aparte de ser una mutante *kinase dead*, se comporta como una dominante negativa sobre ciertos procesos. Este resultado sugiere que p53 no es un buen sustrato para medir la actividad de PRPK *in vivo*, posiblemente por la redundancia

funcional de otras quinasas que fosforilan el mismo sitio, y que enmascaran el aporte de PRPK al fosfo-estado del residuo. Sería interesante probar el efecto de otras mutantes de PRPK que presentan una actividad quinasa reducida o nula, sobre los niveles de p53 fosforilado en la serina 15, y sobre los cambios en la masa de Rab35, efectos que parecen depender de distintos sustratos de PRPK, para esclarecer definitivamente estas discrepancias experimentales. Por ejemplo, se podría expresar la mutante G25V de Bud32 (G33V en la secuencia de ratón de PRPK), cuya modificación reemplaza el aminoácido que provee espacio para el fosfato- β del ATP y reduce la actividad de la quinasa, medida por ensayos de fosforilación *in vitro*, casi en un 100% (Facchin y col., 2002).

No obstante, nuestros resultados muestran que la actividad de PRPK sobre la elongación axonal está filogenéticamente conservada, lo que sugiere que esta quinasa participa de procesos centrales para el desarrollo y la mantención de los seres vivos, ya que su actividad se ha mantenido pese a las diferencias entre los modelos, como sucede con la ausencia de un homólogo de p53 en levadura (Facchin y col., 2003) o la inexistencia del homólogo de CGI-121 en *D. melanogaster* (Ibar y col., 2013). La conservación filogenética de su actividad valida además los resultados previos del laboratorio sobre dPRPK expresada en neuronas de rata, indicando que la reducción en la elongación axonal no se debe a un efecto dominante negativo de la quinasa, derivado de las diferencias evolutivas entre artrópodos y mamíferos, sino que es ese, efectivamente el fenotipo que se induce por su sobreexpresión. Sería interesante estudiar si el rol de PRPK sobre el crecimiento axonal requiere que forme parte del complejo KEOPS/EKC o si es una función independiente de esta quinasa, y de entre todos los componentes del complejo, investigar si Kae1 (OSGEP en mamíferos) modifica la dinámica del citoesqueleto de actina y la elongación axonal, ya que esta ATPasa es el elemento más conservado filogenéticamente en el complejo KEOPS/EKC, estando presente incluso en bacterias

(Bergmiller y col., 2011; Hashimoto y col., 2011) y es uno de los dos interactores de PRPK en el complejo. La estrecha relación de PRPK y Kae1 queda bien ejemplificada por el hecho de que en algunos organismos los genes de ambas proteínas están fusionados, como en *Methanocaldococcus jannaschii*, donde la unión de Kae1 mantiene a PRPK en un estado inactivo (Hecker y col., 2008). Hasta la fecha sólo se han reportado roles para OSGEP en la regulación de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR por *unfolded protein response*) (Ng y col., 2006) y en la mantención del genoma mitocondrial (Oberto y col., 2009), a la luz de los antecedentes, proponemos que la sobreexpresión de Kae1/OSGEP debería inactivar a PRPK, promoviendo el crecimiento del axón.

La relación funcional que no coincide del todo con el modelo es la del complejo KEOPS/EKC completo y PRPK, sobre la elongación axonal, ya que se ha descrito que este complejo permite la transducción de la vía mTOR (Ibar y col., 2013), un factor positivo para la elongación axonal, que actúa a través de la GTPasa Rap1b (Li y col., 2008), que a su vez regula y activa a Cdc42 y al complejo Par de polaridad (Schwamborn y Puschel, 2004). Como en nuestro modelo, el efecto de PRPK es contrario al de la vía mTOR y Rap1b, existe la posibilidad que la función transductora de la vía mTOR de PRPK no esté conservada en neuronas, o que si esté presente, pero que la vía sea inhibida río abajo por el efecto de PRPK sobre Cdc42. Se requieren experimentos adicionales para distinguir entre estas dos posibilidades.

PRPK requiere de su actividad quinasa para ejercer su rol inhibitor del crecimiento axonal. Existen varios reportes en la literatura en que se pone en evidencia que PRPK requiere de su actividad quinasa para llevar a cabo sus funciones, pero los fenotipos derivados de la pérdida de función de PRPK pueden ser rescatados parcialmente con mutantes *kinase dead*, como las mutantes de Bud32 D161A y K52A (Lopreiato y col., 2004; Peggion y col., 2008; Srinivasan y col., 2011; Ibar y col., 2013). Esto difiere de lo descrito en este trabajo en el modelo

neuronal, sin embargo hay otras funciones de PRPK/Bud32 que no pueden ser rescatadas por sus mutantes kinase dead, como el rol del complejo KEOPS/EKC sobre la correcta localización de la proteína Bud9p, que junto a Bud8p determinan la formación de un eje de polarización durante la yemación de levaduras diploides (Kato y col., 2011). Por lo tanto el rol de PRPK/Bud32 en el surgimiento de polaridad celular en *S. cerevisiae* y su función en la elongación axonal comparten la característica de no ser rescatadas por mutantes sin actividad o de actividad quinasa reducida.

Existe la posibilidad de que la mutación puntual D174N en PRPK genere una alteración estructural adicional a la pérdida de su actividad quinasa, y se hace necesario distinguir los efectos fenotípicos que sean producto de la pérdida de función quinasa de PRPK, de los efectos asociados a estas otras alteraciones. Para indagar en funciones estructurales de PRPK, proponemos el uso de interferentes dirigidos contra la quinasa, y de esta forma aclarar si la presencia o ausencia de PRPK genera cambios sobre la regulación de la masa o la actividad Rab35. El uso de interferentes también entregará información sobre la relevancia fisiológica de la actividad de PRPK durante el desarrollo neuronal más allá de efectos derivados de su sobreexpresión. Para los análisis derivados del *knock down* de PRPK, hay que tener en cuenta que la disminución de la expresión de PRPK puede inducir un stress derivado de la reducción en la traducción de proteínas que termina desencadenando una respuesta de proteínas mal plegadas (Rojas-Benitez y col., 2013). Esta posibilidad debe analizarse en células de origen neuronal y no neuronal para esclarecer que los mecanismos relevantes a las posibles funciones de PRPK no sean contexto-dependientes.

El rol de PRPK sobre la elongación axonal depende de su actividad quinasa, pero no del único sustrato descrito hasta el momento en mamíferos, p53. Esto sugiere que existiría otro sustrato desconocido (sustrato que denominaremos X) que es fosforilado por PRPK y que media los efectos descritos en el retardo de la elongación del axón. Desde una perspectiva histórica, el

papel de p53 en el desarrollo neuronal fue inicialmente desestimado, ya que los animales KOs para p53 no presentan problemas en el desarrollo del sistema nervioso, excepto por alteraciones en el cierre del tubo neural, derivados de irregularidades en el ciclo celular de los progenitores neuronales (Armstrong y col., 1995). Además existen otros miembros de la familia de p53 que si tienen un rol caracterizado sobre el desarrollo del sistema nervioso, como p73 (Yang y col., 2000; Holembowski y col., 2011). Sin embargo, nuevas evidencias sugieren que el rol transcripcional de p53 es necesario para la elongación del axón luego de un daño en el sistema nervioso (Di Giovanni y col., 2005), a través de la activación de la expresión de factores promotores del crecimiento axonal, como coronin 1b y GAP43 (Di Giovanni y col., 2006). La razón de que la sobreexpresión de nuestros constructos no indujera un aumento de la elongación axonal a través de este mecanismo, puede explicarse por que el rol promotor de la elongación axonal de p53 requiere su acetilación en la lisina 320 por la acetiltransferasa CBP/p300 (Tedeschi y col., 2009), ya que tratamientos que inducen esta modificación postraducciona, o la sobreexpresión de p53K320Q (mutante que imita la acetilación en ese residuo) aumentan la expresión de coronin 1b y GAP43. Interesantemente, la expresión de p53K372Q como control, no aumenta los niveles de coronin 1b ni GAP43, demostrando la importancia de la acetilación en la lisina 320 y sugiriendo que nuestros constructos tampoco activarían la expresión de esas proteínas. Si además la actividad de la acetiltransferasa es limitante, un aumento en los niveles de p53 totales no afectará la elongación axonal, como si lo haría su *knock down*, aunque en sentido opuesto a la ganancia de función. Nuestro trabajo no es el primer reporte de una función de PRPK independiente de p53, ya que su rol descrito en el crecimiento de larvas y adultos de *D. melanogaster*, al permitir la transducción de la vía TOR, también es independiente de p53 (Ibar y col., 2013), además todas las funciones de PRPK en levaduras también son independientes de p53, sugiriendo que, pese a que PRPK fue originalmente caracterizada en mamíferos como una

quinasa de p53 (Abe y col., 2001), este no parece ser su rol principal, sino uno accesorio a funciones más relevantes.

En este trabajo hemos mostrado que PRPK modifica vías de señalización río abajo de Rab35, entre las cuales, la de Cdc42 es especialmente interesante en el contexto del desarrollo neuronal, porque esta GTPasa forma parte del complejo de polaridad que regula el crecimiento polarizado y la aparición de asimetría en otros modelos (Joberty y col., 2000; Lin y col., 2000) y que en neuronas promueve la elongación axonal a través de la activación de la GTPasa Rac1 (Nishimura y col., 2005). Además Cdc42 es la principal GTPasa regulando la formación de filopodios (Tapon y Hall, 1997; Krugmann y col., 2001; Jaffe y Hall, 2005), los que sirven de precursores para diversas estructuras neuronales, como neuritas, axones, dendritas y espinas dendríticas (Gallo, 2013). En este contexto, es posible que la sobreexpresión de PRPK regule la actividad de Rac1, tanto por la vía de Cdc42, como directamente por Rab35, pues se ha sugerido que en un modelo de fagocitosis, el transporte de Cdc42 y Rac1 hacia la membrana se lleva a cabo de forma Rab35 dependiente (Shim y col., 2010). A lo anterior se agrega que Rac1 es capaz de inducir la activación de Cdc42 a través de la vía de PI3K y Rap1b (Tolias y col., 1995; Keely y col., 1997), formando un *feedback* positivo PI3K-Rap1b-Cdc42-Rac1-PI3K (Andersen y Bi, 2000; Arimura y Kaibuchi, 2007), lo que sustenta la idea de que si PRPK reduce la actividad de Cdc42 también puede afectar la actividad de Rac1. Para estudiar la posible regulación de PRPK sobre Rac1 se podrían usar herramientas muy similares a las que se emplearon para Cdc42, como la sonda Raichu FRET para Rac1 y ensayos de *pull down* de actividad.

Por último, la actividad de Cdc42, la dinámica del citoesqueleto de actina y la formación de filopodios no son sólo importantes para la elongación axonal, otras estructuras también se originan desde filopodios, el modelo más evidente es la formación de espinas dendríticas (Yoshihara y col., 2009). Sería interesante estudiar si PRPK tienen un rol en el establecimiento o

consolidación de las espinas dendríticas, dado su rol inhibitorio de la formación de filopodios, para eso primero es necesario investigar cómo es el patrón de expresión espacio-temporal de PRPK en cerebro. Los primeros reportes indican que PRPK no es detectable mediante *western blot* en extractos de cerebro completo adulto (Abe y col., 2001), pero nosotros hemos demostrado que si existen niveles de expresión de la proteína endógena en cerebro embrionario (datos del laboratorio no publicados). La no detección de PRPK en extractos de cerebro completo adulto, podrían reflejar la necesidad de estudiar la expresión de la quinasa en subpoblaciones celulares (glías versus neuronas) y en regiones específicas del cerebro. Alternativamente, otras aproximaciones experimentales como la utilización de microarreglos de mRNA, que fueron previamente utilizados para detectar todos los componentes del complejo KEOPS/EKC, en prácticamente todos los tejidos analizados, podrían dar mayores luces sobre la expresión de PRPK en cerebro adulto (Costessi y col., 2012). Un ejemplo de proteína importante durante el desarrollo, que conserva una expresión reducida, pero fisiológicamente relevante en adulto, es el caso de MAP1B, cuya expresión en el sistema nervioso durante el desarrollo embrionario ha sido extensamente reportado (Riederer y col., 1986; Tucker y Matus, 1988; Sato-Yoshitake y col., 1989), y que reduce sus niveles de expresión dramáticamente en el cerebro adulto, sin embargo, éstos se mantienen en áreas que exhiben plasticidad estructural (Nothias y col., 1996). En la actualidad se acepta que MAP1B tiene funciones en el cerebro adulto, participando del control de la dinámica de las espinas dendríticas (Tortosa y col., 2011). Algo similar podría ocurrir con PRPK y su regulación sobre Cdc42.

El hecho de que la forma constitutivamente activa de Rab35 no incremente el largo axonal más que la forma WT, puede explicarse por la cantidad de GEFs y GAPs de Rab35 activas durante la elongación axonal. Si el número de GEFs activas es elevado, gran parte de la población de Rab35 WT sobreexpresado estará en su forma activa, equiparándose a los niveles

de actividad de Rab35 Q67L, sin embargo, no se puede descartar que esta última si tenga más actividad que la forma WT, pero que se manifieste en un aumento del crecimiento de todas las neuritas por igual y no sólo del axón, por lo que sería necesario ampliar el análisis morfométrico, incluyendo comparaciones de la longitud neurítica total, la longitud neurítica media y también número de procesos con identidad axonal

Existen otras vías de señalización reguladas por Rab35 que no fueron estudiadas en este trabajo, y que podrían ser reguladas por PRPK, como por ejemplo la actividad de la GTPasa ARF6. Esta GTPasa activa a su efector EPI64B, una GAP de Rab35, y por este mecanismo, ARF6 reduce la actividad de Rab35 durante la progresión de la citoquinesis (Chesneau y col., 2012). Pero la regulación es más compleja, ya que Rab35 recluta uno de sus efectores, conocido como centaurina $\beta 2$, (una GAP de ARF6) durante la neuritogénesis (Kobayashi y Fukuda, 2012). Rab35 y ARF6 forman un *loop* de inhibición cruzada, cuyo equilibrio podría ser alterado por PRPK.

La regulación sobre ARF6 durante la elongación axonal es relevante porque se ha descrito que la pérdida de función de esta GTPasa, inducida a través de la expresión de una forma dominante negativa de ARF6 o una mutante inactiva de su GEF ARNO aumentan la elongación axonal de neuronas hipocampales de rata en cultivo (Hernandez-Deviez y col., 2004), por ende, si la reducción de la masa de Rab35 inducida por la sobreexpresión de PRPK es capaz de aumentar los niveles de ARF6 activa, eso establecería otro mecanismo para explicar el fenotipo encontrado durante este trabajo.

Existen otras vías de señalización paralelas a la de Rab35, que regulan la elongación axonal y que podrían verse afectadas por la sobreexpresión de PRPK, como la vía de Rab11 (Chua y col., 2010). Rab11, al igual que Rab35 está presente en endosomas de reciclaje

(Kouranti y col., 2006) y tiene un rol promotor de la elongación axonal (Takano y col., 2012). Sin embargo Rab11 WT favorece el crecimiento del axón, al igual que la forma constitutivamente activa, pero Rab11 DN no altera la longitud de los axones (Takano y col., 2012). Los autores que describieron este rol de Rab11 proponen que esto se debe al elevado número de GEFs de Rab11 presentes durante el desarrollo neuronal, que mantendrían a un gran porcentaje de la población endógena de Rab11 en su estado unido a GTP, pero nosotros proponemos que Rab11 DN no modifica la longitud axonal porque su efecto se ve enmascarado por la actividad de Rab35. A diferencia de lo que sucede con Rab11, la forma dominante negativa de Rab35 si reduce la longitud axonal, por lo tanto, la pérdida de función de Rab11 se enmascara por la actividad de Rab35, pero la pérdida de función de Rab35 no puede ser rescatada por Rab11, indicando que en el equilibrio funcional de Rabs que controlan el tráfico de endosomas y la elongación axonal, la función de Rab35 es más relevante que la de Rab11. Para esclarecer aun más este punto, proponemos coexpresar en neuronas en cultivo las distintas mutantes de Rab11 y Rab35, y comprobar si se observan relaciones epistáticas entre estas dos GTPasas, además de sobreexpresar PRPK para inducir la disminución de la masa de Rab35 y en ese *background* sobreexpresar Rab11 DN, el resultado esperado es que al sobreexpresar PRPK, Rab11 DN si debería generar axones más cortos que los controles, dada la ausencia de Rab35.

El rescate del fenotipo de las neuronas hipomorfas para MAP1B puede ser explicado en parte, por el aumento sobre la actividad de Cdc42 inducido por Rab35, ya que los animales hipomorfos para MAP1B presentan niveles disminuidos de Rac1 y Cdc42 activos (Montenegro-Venegas y col., 2010). El efecto sobre Rac1 se rescata expresando la GEF de Rac1, TIAM1 (Montenegro-Venegas y col., 2010; Henriquez y col., 2012), y en este trabajo describimos que el efecto sobre Cdc42 podría recuperarse mediante la expresión de Rab35. En ese sentido, se podría cotransfectar la sonda FRET de Cdc42 en neuronas hipomorfas para MAP1B, junto a Rab35 y

analizar cómo cambia la actividad de Cdc42 en ese contexto. Lo que queda menos claro es por qué PRPK DN es más eficiente en la promoción de la elongación axonal en ausencia de MAP1B que en neuronas WT. Proponemos que MAP1B ejerce un efecto que interfiere con la regulación de PRPK sobre Rab35 sin importar los niveles de actividad de la quinasa, por ejemplo al secuestrarla en algún compartimento subcelular en que se impida su interacción con Rab35. Si MAP1B secuestra a PRPK WT, impediría que ésta reduzca los niveles de expresión de Rab35, estabilizando a la GTPasa y promoviendo la elongación axonal. Si MAP1B secuestra a PRPK D174N, impediría el aumento en los niveles de expresión de Rab35, por eso el fenotipo inducido por PRPK DN se ve potenciado en ausencia de MAP1B. Para confirmar este mecanismo será importante estudiar la variación en la masa de Rab35 al sobreexpresar MAP1B completa o sólo la cadena liviana LC1, además de medir si la interacción proteína-proteína entre PRPK y Rab35 se modifica en el cerebro del ratón hipomorfo para MAP1B.

Existen reportes de mecanismos en que MAP1B actúa secuestrando elementos o modificando su localización subcelular, por ejemplo las subunidades $\rho 1$ y $\rho 2$ del canal GABA_AR interaccionan con MAP1B, lo que las ancla a los microtúbulos y reduce la sensibilidad del canal (Hanley y col., 1999; Billups y col., 2000). Otro cambio en la localización subcelular es el experimentado por el receptor AMPAR, cuya endocitosis durante la LTD inducida por DHPG, es mediada por MAP1B y GRIP1, (Davidkova y Carroll, 2007). No sólo receptores de neurotransmisores y canales de iones ven modificada su actividad y localización al interaccionar con MAP1B, las proteínas EB1 y EB3 (+TIPs) que se unen al extremo (+) de los microtúbulos, son secuestradas en el citoplasma por MAP1B, por lo que en ausencia de MAP1B, interaccionan más con los microtúbulos, generando un aumento en la población de microtúbulos estables en el cono de crecimiento y una disminución en la elongación axonal (Tortosa y col., 2013). Por lo

tanto, parece plausible que la interacción de MAP1B con PRPK secuestre a la quinasa e impida que regule negativamente los niveles de Rab35.

Respecto al mecanismo por el cual PRPK reduce los niveles de expresión de Rab35, este puede comprender una regulación sobre la transcripción del gen o un mecanismo degradativo. El complejo KEOPS/EKC del que PRPK forma parte, tiene un rol en el control de la transcripción de varios genes involucrados en la regulación del ciclo celular y el crecimiento polarizado de *S. cerevisiae* (Kisseleva-Romanova y col., 2006). No se puede descartar que Rab35 sea uno más de los genes regulados por el complejo. En este contexto, los experimentos que continuarán este trabajo deben comprender un análisis de los niveles del mRNA de Rab35 en presencia y ausencia de la sobreexpresión de PRPK WT. El mecanismo alternativo consiste en la degradación proteolítica de Rab35, esto implicaría que PRPK regula alguna E3-ubiquitin ligasa, que tenga como blanco Rab35 (aun cuando a la fecha no se han descrito E3-ubiquitin liagasas para esta Rab). Esa función también podría ser llevada a cabo por el complejo KEOPS/EKC, pues se ha reportado que este complejo, a través de sus integrantes Kae1/OSGEP y LAGE3, es reclutado a una E3-ubiquitin ligasa basada en Cullin2, por una subunidad de esa ligasa, llamada PRAME (Costessi y col., 2012). Es posible que exista otra E3-ubiquitin ligasa que interacciona con el complejo KEOPS/EKC que promueve la degradación de Rab35. El trabajo de continuación de los resultados expuestos debería incluir experimentos con inhibidores de la degradación proteolítica por el sistema ubiquitin-proteosoma, como MG-132 y lactacystina, en células sobreexpresando PRPK WT, para verificar si se revierte la disminución de los niveles de expresión de Rab35. El mecanismo degradativo propuesto exige que PRPK y Rab35 colocalicen en algún escenario espacio-temporal, o que PRPK y la E3-ubiquitin ligasa putativa colocalicen, lo cual no revierte problema si se considera que la expresión de PRPK endógena es citoplasmática y que en nuestro modelo la sobreexpresión de PRPK la ubica preferentemente en

el núcleo y en la zona perinuclear. Cabe señalar que en células PC12 diferenciadas con NGF, Rab35 y ARF6 se acumulan en la zona perinuclear, promoviendo la neuritogénesis (Kobayashi y Fukuda, 2012), por lo que no es necesario que PRPK se localice en el axón para inducir la degradación de Rab35.

Tanto el control a nivel transcripcional como la degradación selectiva han sido descritos para otros elementos que participan de la determinación y el crecimiento axonal. Por ejemplo, la expresión de Pak1, una quinasa que regula la dinámica del citoesqueleto río abajo de Rac1 (Jacobs y col., 2007), es activada por el factor de transcripción FOXO durante el desarrollo de polaridad neuronal (de la Torre-Ubieta y col., 2010). Con respecto a la degradación proteolítica, algunos de estos mecanismos han sido reportados como una forma de enriquecer un elemento en una neurita por sobre las demás y generar compartimentos asimétricos (Borquez y Gonzalez-Billault, 2011). Es el caso de Akt, cuya forma fosforilada se enriquece en el axón mientras la forma no fosforilada se distribuye homogéneamente por el resto de las neuritas, siendo esta última preferentemente degradada (Yan y col., 2006). Otro mecanismo proteolítico que participa de la determinación del axón es el ejercido por la E3-ubiquitin ligasa Smurf1, cuya fosforilación por PKA cambia la preferencia de degradación sobre sus sustratos, de PAR6 (que se degrada en las neuritas menores) a RhoA (que se degrada en el axón), induciendo la acumulación de ambas en compartimentos diferentes, contribuyendo a la formación de la asimetría a nivel molecular (Cheng y col., 2011).

De los datos presentados, no es posible inferir si la actividad de PRPK presenta una localización preferencial en la neurona, aparte de su concentración somática, por lo que quizás la degradación putativa de Rab35 no es controlada espacialmente sino que temporalmente. Este es otro punto que se debe esclarecer para hacer más preciso el modelo del mecanismo de PRPK sobre el crecimiento axonal.

La estrategia para encontrar el sustrato X va a depender de la naturaleza de la regulación de PRPK sobre Rab35. Por ejemplo, si parece ser un factor de transcripción, se tendrán que realizar análisis bioinformáticos de la secuencia del promotor de Rab35 y/o experimentos en que se mida la expresión de un gen reportero bajo el control del promotor endógeno de Rab35 en presencia o ausencia de PRPK. Si el mecanismo parece ser degradativo, se tendrán que buscar interactores de PRPK o del complejo KEOPS/EKC con actividad E3-ubiquitin ligasa, que preferentemente interacciones con la quinasa WT y no con PRPK D174N. También hay que analizar si una fosforilación sobre Rab35, o alguno de los GEFs y GAPs que controlan su actividad, es capaz de inducir su degradación, y si PRPK puede ser responsable de esta fosforilación. No se puede descartar que PRPK ejerza una regulación dual sobre Rab35, reduciendo sus niveles de expresión y su actividad, ya que los experimentos pilotos, que se muestran en el Anexo 5, parecen indicar que PRPK también es capaz de reducir la actividad de Rab35.

Un resumen del modelo propuesto para la vía PRPK/Rab35 se presenta en la figura 8, en este mecanismo, PRPK a través del sustrato X, inhibe la función de Rab35 mediante la reducción de sus niveles de expresión, lo que repercute en una menor actividad de Cdc42, alteraciones de la dinámica del citoesqueleto de actina, y reducción de la elongación axonal. Es posible que la sobreexpresión de PRPK también altere el tráfico de endosomas de reciclaje y la vía de señalización de ARF6. Esta inhibición de PRPK sobre Rab35 es a su vez inhibida por MAP1B, lo que postulamos, sucede a través del secuestro de la quinasa.

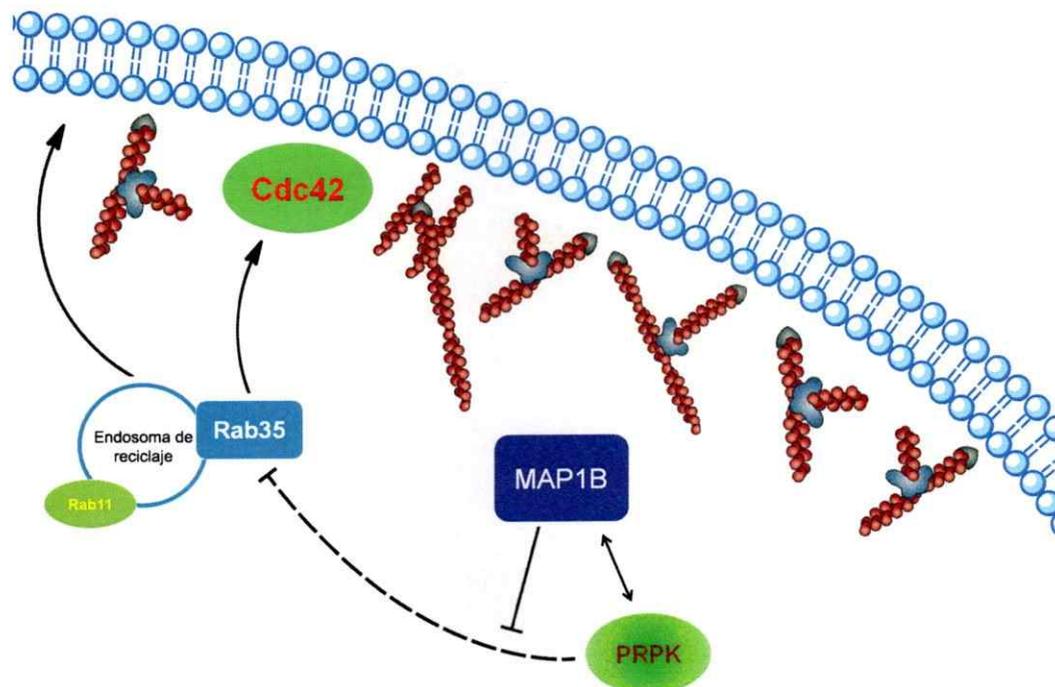


Figura 8. Modelo representativo del mecanismo molecular por el cual PRPK reduce la elongación axonal. PRPK, a través de la fosforilación de un sustrato X o de una fosforilación sobre Rab35 (lo que se representa como una línea intermitente), induce una disminución en los niveles de expresión de Rab35, lo que reduce la actividad de Cdc42, y probablemente el tráfico de membrana desde los endosomas de reciclaje. El rol de PRPK sobre el crecimiento axonal puede ser inhibido por MAP1B, posiblemente mediante el secuestro de la quinasa.

CONCLUSIONES

1- PRPK de ratón induce una disminución de la elongación axonal al igual que dPRPK, por lo que su actividad filogenéticamente conservada se hace extensiva al rol en el crecimiento del axón.

2- El papel de PRPK en la elongación axonal depende de su actividad quinasa, pero no del estado de fosforilación de la serina 15 de p53, indicando que existe otro sustrato de PRPK no identificado, que participa en esta función.

3- La sobreexpresión de PRPK fenocopia la pérdida de función de Rab35, y la sobreexpresión de esta última rescata el fenotipo inducido por la quinasa sobre la elongación axonal, sugiriendo que Rab35 actúa río abajo a PRPK.

4- La sobreexpresión de PRPK reduce indirectamente los niveles de expresión de Rab35, relación funcional que podría ser regulada negativamente por MAP1B, manteniendo estable la expresión de Rab35.

BIBLIOGRAFÍA

- Abe, Y., Matsumoto, S., Wei, S., Nezu, K., Miyoshi, A., Kito, K., Ueda, N., Shigemoto, K., Hitsumoto, Y., Nikawa, J. y Enomoto, Y. (2001) Cloning and characterization of a p53-related protein kinase expressed in interleukin-2-activated cytotoxic T-cells, epithelial tumor cell lines, and the testes. *J Biol Chem* 276:44003-44011.
- Abe, Y., Takeuchi, T., Imai, Y., Murase, R., Kamei, Y., Fujibuchi, T., Matsumoto, S., Ueda, N., Ogasawara, M., Shigemoto, K. y Kito, K. (2006) A Small Ras-like protein Ray/Rab1c modulates the p53-regulating activity of PRPK. *Biochem Biophys Res Commun* 344:377-385.
- Akhmanova, A. y Steinmetz, M. O. (2008) Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:309-322.
- Andersen, S. S. y Bi, G. Q. (2000) Axon formation: a molecular model for the generation of neuronal polarity. *Bioessays* 22:172-179.
- Arimura, N. y Kaibuchi, K. (2007) Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8:194-205.
- Armstrong, J. F., Kaufman, M. H., Harrison, D. J. y Clarke, A. R. (1995) High-frequency developmental abnormalities in p53-deficient mice. *Curr Biol* 5:931-936.
- Ascano, M., Richmond, A., Borden, P. y Kuruvilla, R. (2009) Axonal targeting of Trk receptors via transcytosis regulates sensitivity to neurotrophin responses. *J Neurosci* 29:11674-11685.
- Banin, S., Moyal, L., Shieh, S., Taya, Y., Anderson, C. W., Chessa, L., Smorodinsky, N. I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y. y Ziv, Y. (1998) Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* 281:1674-1677.
- Banker, G. A. y Cowan, W. M. (1977) Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res* 126:397-342.
- Barbero, P., Bittova, L. y Pfeffer, S. R. (2002) Visualization of Rab9-mediated vesicle transport from endosomes to the trans-Golgi in living cells. *J Cell Biol* 156:511-518.
- Barnes, A. P. y Polleux, F. (2009) Establishment of axon-dendrite polarity in developing neurons. *Annu Rev Neurosci* 32:347-381.
- Bergmiller, T., Pena-Miller, R., Boehm, A. y Ackermann, M. (2011) Single-cell time-lapse analysis of depletion of the universally conserved essential protein YgjD. *BMC Microbiol* 11:118.
- Billups, D., Hanley, J. G., Orme, M., Attwell, D. y Moss, S. J. (2000) GABAC receptor sensitivity is modulated by interaction with MAP1B. *J Neurosci* 20:8643-8650.
- Bloom, O. E. y Morgan, J. R. (2011) Membrane trafficking events underlying axon repair, growth, and regeneration. *Mol Cell Neurosci* 48:339-348.
- Borland, G., Gupta, M., Magiera, M. M., Rundell, C. J., Fuld, S. y Yarwood, S. J. (2006) Microtubule-associated protein 1B-light chain 1 enhances activation of Rap1 by exchange protein activated by cyclic AMP but not intracellular targeting. *Mol Pharmacol* 69:374-384.
- Borquez, D. A. y Gonzalez-Billault, C. (2011) Regulation of cell polarity by controlled proteolytic systems. *Biol Res* 44:35-41.
- Bouquet, C., Soares, S., von Boxberg, Y., Ravaille-Veron, M., Propst, F. y Nothias, F. (2004) Microtubule-associated protein 1B controls directionality of growth cone migration and axonal branching in regeneration of adult dorsal root ganglia neurons. *J Neurosci* 24:7204-7213.
- Bradke, F. y Dotti, C. G. (1999) The role of local actin instability in axon formation. *Science* 283:1931-1934.
- Brooks, C. L. y Gu, W. (2003) Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Curr Opin Cell Biol* 15:164-171.
- Brown, A., Li, Y., Slaughter, T. y Black, M. M. (1993) Composite microtubules of the axon: quantitative analysis of tyrosinated and acetylated tubulin along individual axonal microtubules. *J Cell Sci* 104 (Pt 2):339-352.

- Brugg, B., Reddy, D. y Matus, A. (1993) Attenuation of microtubule-associated protein 1B expression by antisense oligodeoxynucleotides inhibits initiation of neurite outgrowth. *Neuroscience* 52:489-496.
- Caceres, A., Ye, B. y Dotti, C. G. (2012) Neuronal polarity: demarcation, growth and commitment. *Curr Opin Cell Biol* 24:547-553.
- Canman, C. E., Lim, D. S., Cimprich, K. A., Taya, Y., Tamai, K., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M. B. y Siliciano, J. D. (1998) Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* 281:1677-1679.
- Conde, C. y Caceres, A. (2009) Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci* 10:319-332.
- Costessi, A., Mahrouf, N., Sharma, V., Stunnenberg, R., Stoel, M. A., Tijchon, E., Conaway, J. W., Conaway, R. C. y Stunnenberg, H. G. (2012) The human EKC/KEOPS complex is recruited to Cullin2 ubiquitin ligases by the human tumour antigen PRAME. *PLoS One* 7:e42822.
- Craig, A. M. y Banker, G. (1994) Neuronal polarity. *Annu Rev Neurosci* 17:267-310.
- Cueille, N., Blanc, C. T., Popa-Nita, S., Kasas, S., Catsicas, S., Dietler, G. y Riederer, B. M. (2007) Characterization of MAP1B heavy chain interaction with actin. *Brain Res Bull* 71:610-618.
- Chavrier, P., Parton, R. G., Hauri, H. P., Simons, K. y Zerial, M. (1990) Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell* 62:317-329.
- Cheng, A., Krueger, B. K. y Bambrick, L. L. (1999) MAP5 expression in proliferating neuroblasts. *Brain Res Dev Brain Res* 113:107-113.
- Cheng, P. L. y Poo, M. M. (2012) Early events in axon/dendrite polarization. *Annu Rev Neurosci* 35:181-201.
- Cheng, P. L., Lu, H., Shelly, M., Gao, H. y Poo, M. M. (2011) Phosphorylation of E3 ligase Smurf1 switches its substrate preference in support of axon development. *Neuron* 69:231-243.
- Chesneau, L., Dambournet, D., Machicoane, M., Kouranti, I., Fukuda, M., Goud, B. y Echard, A. (2012) An ARF6/Rab35 GTPase cascade for endocytic recycling and successful cytokinesis. *Curr Biol* 22:147-153.
- Chevallier, J., Koop, C., Srivastava, A., Petrie, R. J., Lamarche-Vane, N. y Presley, J. F. (2009) Rab35 regulates neurite outgrowth and cell shape. *FEBS Lett* 583:1096-1101.
- Chua, C. E., Lim, Y. S. y Tang, B. L. (2010) Rab35--a vesicular traffic-regulating small GTPase with actin modulating roles. *FEBS Lett* 584:1-6.
- Dambournet, D., Machicoane, M., Chesneau, L., Sachse, M., Rocancourt, M., El Marjou, A., Formstecher, E., Salomon, R., Goud, B. y Echard, A. (2011) Rab35 GTPase and OCRL phosphatase remodel lipids and F-actin for successful cytokinesis. *Nat Cell Biol* 13:981-988.
- Davidkova, G. y Carroll, R. C. (2007) Characterization of the role of microtubule-associated protein 1B in metabotropic glutamate receptor-mediated endocytosis of AMPA receptors in hippocampus. *J Neurosci* 27:13273-13278.
- de la Torre-Ubieta, L., Gaudilliere, B., Yang, Y., Ikeuchi, Y., Yamada, T., DiBacco, S., Stegmuller, J., Schuller, U., Salih, D. A., Rowitch, D., Brunet, A. y Bonni, A. (2010) A FOXO-Pak1 transcriptional pathway controls neuronal polarity. *Genes Dev* 24:799-813.
- Dehmelt, L. y Halpain, S. (2005) The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol* 6:204.
- Dent, E. W. y Gertler, F. B. (2003) Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron* 40:209-227.
- Dent, E. W., Gupton, S. L. y Gertler, F. B. (2011) The growth cone cytoskeleton in axon outgrowth and guidance. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.
- Di Giovanni, S., Knights, C. D., Rao, M., Yakovlev, A., Beers, J., Catania, J., Avantaggiati, M. L. y Faden, A. I. (2006) The tumor suppressor protein p53 is required for neurite outgrowth and axon regeneration. *EMBO J* 25:4084-4096.
- Di Giovanni, S., Faden, A. I., Yakovlev, A., Duke-Cohan, J. S., Finn, T., Thouin, M., Knoblach, S., De Biase, A., Bregman, B. S. y Hoffman, E. P. (2005) Neuronal plasticity after spinal cord injury: identification of a gene cluster driving neurite outgrowth. *FASEB J* 19:153-154.

- DiTella, M. C., Feiguin, F., Carri, N., Kosik, K. S. y Caceres, A. (1996) MAP-1B/TAU functional redundancy during laminin-enhanced axonal growth. *J Cell Sci* 109 (Pt 2):467-477.
- Dotti, C. G., Sullivan, C. A. y Banker, G. A. (1988) The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 8:1454-1468.
- Downey, M., Houlsworth, R., Maringele, L., Rollie, A., Brehme, M., Galicia, S., Guillard, S., Partington, M., Zubko, M. K., Krogan, N. J., Emili, A., Greenblatt, J. F., Harrington, L., Lydall, D. y Durocher, D. (2006) A genome-wide screen identifies the evolutionarily conserved KEOPS complex as a telomere regulator. *Cell* 124:1155-1168.
- Facchin, S., Lopreiato, R., Stocchetto, S., Arrigoni, G., Cesaro, L., Marin, O., Carignani, G. y Pinna, L. A. (2002) Structure-function analysis of yeast piD261/Bud32, an atypical protein kinase essential for normal cell life. *Biochem J* 364:457-463.
- Facchin, S., Lopreiato, R., Ruzzene, M., Marin, O., Sartori, G., Gotz, C., Montenarh, M., Carignani, G. y Pinna, L. A. (2003) Functional homology between yeast piD261/Bud32 and human PRPK: both phosphorylate p53 and PRPK partially complements piD261/Bud32 deficiency. *FEBS Lett* 549:63-66.
- Facchin, S., Ruzzene, M., Peggion, C., Sartori, G., Carignani, G., Marin, O., Brustolon, F., Lopreiato, R. y Pinna, L. A. (2007) Phosphorylation and activation of the atypical kinase p53-related protein kinase (PRPK) by Akt/PKB. *Cell Mol Life Sci* 64:2680-2689.
- Fuhrmann-Stroissnigg, H., Noiges, R., Descovich, L., Fischer, I., Albrecht, D. E., Nothias, F., Froehner, S. C. y Probst, F. (2012) The light chains of microtubule-associated proteins MAP1A and MAP1B interact with alpha1-syntrophin in the central and peripheral nervous system. *PLoS One* 7:e49722.
- Fukata, Y., Itoh, T. J., Kimura, T., Menager, C., Nishimura, T., Shiromizu, T., Watanabe, H., Inagaki, N., Iwamatsu, A., Hotani, H. y Kaibuchi, K. (2002) CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nat Cell Biol* 4:583-591.
- Fukuda, M., Kobayashi, H., Ishibashi, K. y Ohbayashi, N. (2011) Genome-wide investigation of the Rab binding activity of RUN domains: development of a novel tool that specifically traps GTP-Rab35. *Cell Struct Funct* 36:155-170.
- Futerman, A. H. y Banker, G. A. (1996) The economics of neurite outgrowth--the addition of new membrane to growing axons. *Trends Neurosci* 19:144-149.
- Gallo, G. (2013) Mechanisms underlying the initiation and dynamics of neuronal filopodia: from neurite formation to synaptogenesis. *Int Rev Cell Mol Biol* 301:95-156.
- Geraldo, S., Khanzada, U. K., Parsons, M., Chilton, J. K. y Gordon-Weeks, P. R. (2008) Targeting of the F-actin-binding protein drebrin by the microtubule plus-tip protein EB3 is required for neuritogenesis. *Nat Cell Biol* 10:1181-1189.
- Gonzalez-Billault, C., Avila, J. y Caceres, A. (2001) Evidence for the role of MAP1B in axon formation. *Mol Biol Cell* 12:2087-2098.
- Gonzalez-Billault, C., Munoz-Llanca, P., Henriquez, D. R., Wojnacki, J., Conde, C. y Caceres, A. (2012) The role of small GTPases in neuronal morphogenesis and polarity. *Cytoskeleton (Hoboken)* 69:464-485.
- Goold, R. G., Owen, R. y Gordon-Weeks, P. R. (1999) Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation of microtubule-associated protein 1B regulates the stability of microtubules in growth cones. *J Cell Sci* 112 (Pt 19):3373-3384.
- Gordon-Weeks, P. R. (2004) Microtubules and growth cone function. *J Neurobiol* 58:70-83.
- Govek, E. E., Newey, S. E. y Van Aelst, L. (2005) The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev* 19:1-49.
- Halpain, S. y Delmelt, L. (2006) The MAP1 family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol* 7:224.
- Hammarback, J. A., Obar, R. A., Hughes, S. M. y Vallee, R. B. (1991) MAP1B is encoded as a polyprotein that is processed to form a complex N-terminal microtubule-binding domain. *Neuron* 7:129-139.
- Hanley, J. G., Koulen, P., Bedford, F., Gordon-Weeks, P. R. y Moss, S. J. (1999) The protein MAP-1B links GABA(C) receptors to the cytoskeleton at retinal synapses. *Nature* 397:66-69.

- Hashimoto, C., Sakaguchi, K., Taniguchi, Y., Honda, H., Oshima, T., Ogasawara, N. y Kato, J. (2011) Effects on transcription of mutations in *ygjD*, *yeaZ*, and *yjeE* genes, which are involved in a universal tRNA modification in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 193:6075-6079.
- Hecker, A., Lopreiato, R., Graille, M., Collinet, B., Forterre, P., Libri, D. y van Tilbeurgh, H. (2008) Structure of the archaeal Kae1/Bud32 fusion protein MJ1130: a model for the eukaryotic EKC/KEOPS subcomplex. *EMBO J* 27:2340-2351.
- Henriquez, D. R., Bodaleo, F. J., Montenegro-Venegas, C. y Gonzalez-Billault, C. (2012) The light chain 1 subunit of the microtubule-associated protein 1B (MAP1B) is responsible for Tiam1 binding and Rac1 activation in neuronal cells. *PLoS One* 7:e53123.
- Hernandez-Deviez, D. J., Roth, M. G., Casanova, J. E. y Wilson, J. M. (2004) ARNO and ARF6 regulate axonal elongation and branching through downstream activation of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha. *Mol Biol Cell* 15:111-120.
- Holembowski, L., Schulz, R., Talos, F., Scheel, A., Wolff, S., Dobbelstein, M. y Moll, U. (2011) While p73 is essential, p63 is completely dispensable for the development of the central nervous system. *Cell Cycle* 10:680-689.
- Hou, X., Liu, J. E., Liu, W., Liu, C. Y., Liu, Z. Y. y Sun, Z. Y. (2011) A new role of NUAK1: directly phosphorylating p53 and regulating cell proliferation. *Oncogene* 30:2933-2942.
- Hutagalung, A. H. y Novick, P. J. (2011) Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol Rev* 91:119-149.
- Ibar, C., Cataldo, V. F., Vasquez-Doorman, C., Olguin, P. y Glavic, A. (2013) *Drosophila* p53-related protein kinase is required for PI3K/TOR pathway-dependent growth. *Development* 140:1282-1291.
- Inagaki, N., Chihara, K., Arimura, N., Menager, C., Kawano, Y., Matsuo, N., Nishimura, T., Amano, M. y Kaibuchi, K. (2001) CRMP-2 induces axons in cultured hippocampal neurons. *Nat Neurosci* 4:781-782.
- Jacobs, T., Causeret, F., Nishimura, Y. V., Terao, M., Norman, A., Hoshino, M. y Nikolic, M. (2007) Localized activation of p21-activated kinase controls neuronal polarity and morphology. *J Neurosci* 27:8604-8615.
- Jacobson, C., Schnapp, B. y Banker, G. A. (2006) A change in the selective translocation of the Kinesin-1 motor domain marks the initial specification of the axon. *Neuron* 49:797-804.
- Jaffe, A. B. y Hall, A. (2005) Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:247-269.
- Janke, C. y Bulinski, J. C. (2011) Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12:773-786.
- Joberty, G., Petersen, C., Gao, L. y Macara, I. G. (2000) The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nat Cell Biol* 2:531-539.
- Jones, R. G., Plas, D. R., Kubek, S., Buzzai, M., Mu, J., Xu, Y., Birnbaum, M. J. y Thompson, C. B. (2005) AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell* 18:283-293.
- Kaech, S. y Banker, G. (2006) Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc* 1:2406-2415.
- Kanno, E., Ishibashi, K., Kobayashi, H., Matsui, T., Ohbayashi, N. y Fukuda, M. (2010) Comprehensive screening for novel rab-binding proteins by GST pull-down assay using 60 different mammalian Rabs. *Traffic* 11:491-507.
- Kato, Y., Kawasaki, H., Ohyama, Y., Morishita, T., Iwasaki, H., Kokubo, T. y Hirano, H. (2011) Cell polarity in *Saccharomyces cerevisiae* depends on proper localization of the Bud9 landmark protein by the EKC/KEOPS complex. *Genetics* 188:871-882.
- Keely, P. J., Westwick, J. K., Whitehead, I. P., Der, C. J. y Parise, L. V. (1997) Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K. *Nature* 390:632-636.
- Kim, S. J., Hwang, S. G., Shin, D. Y., Kang, S. S. y Chun, J. S. (2002) p38 kinase regulates nitric oxide-induced apoptosis of articular chondrocytes by accumulating p53 via NFkappa B-dependent transcription and stabilization by serine 15 phosphorylation. *J Biol Chem* 277:33501-33508.
- Kimura, T., Watanabe, H., Iwamatsu, A. y Kaibuchi, K. (2005) Tubulin and CRMP-2 complex is transported via Kinesin-1. *J Neurochem* 93:1371-1382.

- Kirschner, M. y Mitchison, T. (1986) Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis. *Cell* 45:329-342.
- Kisseleva-Romanova, E., Lopreiato, R., Baudin-Baillieu, A., Rousselle, J. C., Ilan, L., Hofmann, K., Namane, A., Mann, C. y Libri, D. (2006) Yeast homolog of a cancer-testis antigen defines a new transcription complex. *EMBO J* 25:3576-3585.
- Kobayashi, H. y Fukuda, M. (2012) Rab35 regulates Arf6 activity through centaurin-beta2 (ACAP2) during neurite outgrowth. *J Cell Sci* 125:2235-2243.
- Kouranti, I., Sachse, M., Arouche, N., Goud, B. y Echard, A. (2006) Rab35 regulates an endocytic recycling pathway essential for the terminal steps of cytokinesis. *Curr Biol* 16:1719-1725.
- Krugmann, S., Jordens, I., Gevaert, K., Driessens, M., Vandekerckhove, J. y Hall, A. (2001) Cdc42 induces filopodia by promoting the formation of an IRSp53:Mena complex. *Curr Biol* 11:1645-1655.
- Lalli, G. (2012) Crucial polarity regulators in axon specification. *Essays Biochem* 53:55-68.
- Lee, J. H., Kim, H. S., Lee, S. J. y Kim, K. T. (2007) Stabilization and activation of p53 induced by Cdk5 contributes to neuronal cell death. *J Cell Sci* 120:2259-2271.
- Lee, S. Y., Kim, J. W., Jeong, M. H., An, J. H., Jang, S. M., Song, K. H. y Choi, K. H. (2008) Microtubule-associated protein 1B light chain (MAP1B-LC1) negatively regulates the activity of tumor suppressor p53 in neuroblastoma cells. *FEBS Lett* 582:2826-2832.
- Lees-Miller, S. P., Sakaguchi, K., Ullrich, S. J., Appella, E. y Anderson, C. W. (1992) Human DNA-activated protein kinase phosphorylates serines 15 and 37 in the amino-terminal transactivation domain of human p53. *Mol Cell Biol* 12:5041-5049.
- Li, Y. H., Werner, H. y Puschel, A. W. (2008) Rheb and mTOR regulate neuronal polarity through Rap1B. *J Biol Chem* 283:33784-33792.
- Lim, K. B., Bu, W., Goh, W. I., Koh, E., Ong, S. H., Pawson, T., Sudhaharan, T. y Ahmed, S. (2008) The Cdc42 effector IRSp53 generates filopodia by coupling membrane protrusion with actin dynamics. *J Biol Chem* 283:20454-20472.
- Lin, C. H. y Forscher, P. (1995) Growth cone advance is inversely proportional to retrograde F-actin flow. *Neuron* 14:763-771.
- Lin, D., Edwards, A. S., Fawcett, J. P., Mbamalu, G., Scott, J. D. y Pawson, T. (2000) A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. *Nat Cell Biol* 2:540-547.
- Longhurst, D. M., Watanabe, M., Rothstein, J. D. y Jackson, M. (2006) Interaction of PDZRhoGEF with microtubule-associated protein 1 light chains: link between microtubules, actin cytoskeleton, and neuronal polarity. *J Biol Chem* 281:12030-12040.
- Lopreiato, R., Facchin, S., Sartori, G., Arrigoni, G., Casonato, S., Ruzzene, M., Pinna, L. A. y Carignani, G. (2004) Analysis of the interaction between p1261/Bud32, an evolutionarily conserved protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, and the Grx4 glutaredoxin. *Biochem J* 377:395-405.
- Lowery, L. A. y Van Vactor, D. (2009) The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:332-343.
- Mack, T. G., Koester, M. P. y Pollerberg, G. E. (2000) The microtubule-associated protein MAP1B is involved in local stabilization of turning growth cones. *Mol Cell Neurosci* 15:51-65.
- Mattila, P. K. y Lappalainen, P. (2008) Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:446-454.
- Meixner, A., Haverkamp, S., Wassle, H., Fuhrer, S., Thalhammer, J., Kropf, N., Bittner, R. E., Lassmann, H., Wiche, G. y Probst, F. (2000) MAP1B is required for axon guidance and is involved in the development of the central and peripheral nervous system. *J Cell Biol* 151:1169-1178.
- Miyoshi, A., Kito, K., Aramoto, T., Abe, Y., Kobayashi, N. y Ueda, N. (2003) Identification of CGI-121, a novel PRPK (p53-related protein kinase)-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 303:399-405.
- Montenegro-Venegas, C., Tortosa, E., Rosso, S., Peretti, D., Bollati, F., Bisbal, M., Jausoro, I., Avila, J., Caceres, A. y Gonzalez-Billault, C. (2010) MAP1B regulates axonal development by modulating Rho-GTPase Rac1 activity. *Mol Biol Cell* 21:3518-3528.
- Mukherjee, S., Ghosh, R. N. y Maxfield, F. R. (1997) Endocytosis. *Physiol Rev* 77:759-803.

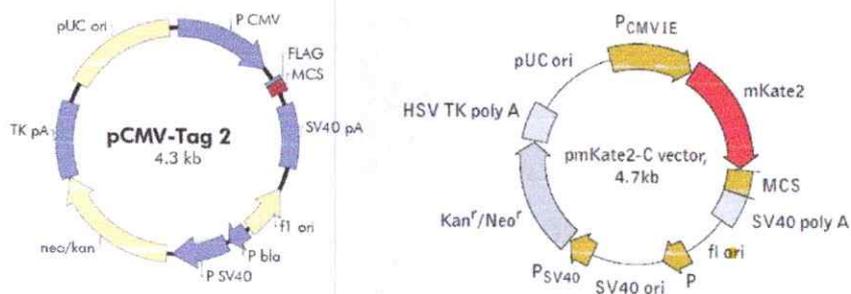
- Ng, A. P., Howe Fong, J., Sijin Nin, D., Hirpara, J. L., Asou, N., Chen, C. S., Pervaiz, S. y Khan, M. (2006) Cleavage of misfolded nuclear receptor corepressor confers resistance to unfolded protein response-induced apoptosis. *Cancer Res* 66:9903-9912.
- Nishimura, T., Kato, K., Yamaguchi, T., Fukata, Y., Ohno, S. y Kaibuchi, K. (2004) Role of the PAR-3-KIF3 complex in the establishment of neuronal polarity. *Nat Cell Biol* 6:328-334.
- Nishimura, T., Yamaguchi, T., Kato, K., Yoshizawa, M., Nabeshima, Y., Ohno, S., Hoshino, M. y Kaibuchi, K. (2005) PAR-6-PAR-3 mediates Cdc42-induced Rac activation through the Rac GEFs STEF/Tiam1. *Nat Cell Biol* 7:270-277.
- Nobes, C. D. y Hall, A. (1995) Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81:53-62.
- Noble, M., Lewis, S. A. y Cowan, N. J. (1989) The microtubule binding domain of microtubule-associated protein MAP1B contains a repeated sequence motif unrelated to that of MAP2 and tau. *J Cell Biol* 109:3367-3376.
- Nothias, F., Fischer, I., Murray, M., Mirman, S. y Vincent, J. D. (1996) Expression of a phosphorylated isoform of MAP1B is maintained in adult central nervous system areas that retain capacity for structural plasticity. *J Comp Neurol* 368:317-334.
- Oberto, J., Breuil, N., Hecker, A., Farina, F., Brochier-Armanet, C., Culetto, E. y Forterre, P. (2009) Qri7/OSGEPL, the mitochondrial version of the universal Kae1/YgjD protein, is essential for mitochondrial genome maintenance. *Nucleic Acids Res* 37:5343-5352.
- Park, J., Oh, Y., Yoo, L., Jung, M. S., Song, W. J., Lee, S. H., Seo, H. y Chung, K. C. (2010) Dyrk1A phosphorylates p53 and inhibits proliferation of embryonic neuronal cells. *J Biol Chem* 285:31895-31906.
- Pedrotti, B. y Islam, K. (1996) Dephosphorylated but not phosphorylated microtubule associated protein MAP1B binds to microfilaments. *FEBS Lett* 388:131-133.
- Peggion, C., Lopreiato, R., Casanova, E., Ruzzene, M., Facchin, S., Pinna, L. A., Carignani, G. y Sartori, G. (2008) Phosphorylation of the *Saccharomyces cerevisiae* Grx4p glutaredoxin by the Bud32p kinase unveils a novel signaling pathway involving Sch9p, a yeast member of the Akt / PKB subfamily. *FEBS J* 275:5919-5933.
- Persons, D. L., Yazlovitskaya, E. M. y Pelling, J. C. (2000) Effect of extracellular signal-regulated kinase on p53 accumulation in response to cisplatin. *J Biol Chem* 275:35778-35785.
- Pertz, O., Hodgson, L., Klemke, R. L. y Hahn, K. M. (2006) Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature* 440:1069-1072.
- Polleux, F. y Snider, W. (2010) Initiating and growing an axon. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a001925.
- Qin, Q., Baudry, M., Liao, G., Noniyev, A., Galeano, J. y Bi, X. (2009) A novel function for p53: regulation of growth cone motility through interaction with Rho kinase. *J Neurosci* 29:5183-5192.
- Riederer, B., Cohen, R. y Matus, A. (1986) MAP5: a novel brain microtubule-associated protein under strong developmental regulation. *J Neurocytol* 15:763-775.
- Riederer, B. M. (2007) Microtubule-associated protein 1B, a growth-associated and phosphorylated scaffold protein. *Brain Res Bull* 71:541-558.
- Riedl, J., Crevenna, A. H., Kessenbrock, K., Yu, J. H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T. A., Werb, Z., Sixt, M. y Wedlich-Soldner, R. (2008) Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Methods* 5:605-607.
- Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y. y Zerial, M. (2005) Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* 122:735-749.
- Rojas-Benitez, D., Ibar, C. y Glavic, A. (2013) The *Drosophila* EKC/KEOPS complex: Roles in protein synthesis homeostasis and animal growth. *Fly (Austin)* 7.
- Sann, S., Wang, Z., Brown, H. y Jin, Y. (2009) Roles of endosomal trafficking in neurite outgrowth and guidance. *Trends Cell Biol* 19:317-324.
- Sato-Yoshitake, R., Shiomura, Y., Miyasaka, H. y Hirokawa, N. (1989) Microtubule-associated protein 1B: molecular structure, localization, and phosphorylation-dependent expression in developing neurons. *Neuron* 3:229-238.

- Schaefer, A. W., Kabir, N. y Forscher, P. (2002) Filopodia and actin arcs guide the assembly and transport of two populations of microtubules with unique dynamic parameters in neuronal growth cones. *J Cell Biol* 158:139-152.
- Schwamborn, J. C. y Puschel, A. W. (2004) The sequential activity of the GTPases Rap1B and Cdc42 determines neuronal polarity. *Nat Neurosci* 7:923-929.
- Shcherbo, D., Murphy, C. S., Ermakova, G. V., Solovieva, E. A., Chepurnykh, T. V., Shcheglov, A. S., Verkhusha, V. V., Pletnev, V. Z., Hazelwood, K. L., Roche, P. M., Lukyanov, S., Zaraisky, A. G., Davidson, M. W. y Chudakov, D. M. (2009) Far-red fluorescent tags for protein imaging in living tissues. *Biochem J* 418:567-574.
- Shieh, S. Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y. y Prives, C. (2000) The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev* 14:289-300.
- Shim, J., Lee, S. M., Lee, M. S., Yoon, J., Kweon, H. S. y Kim, Y. J. (2010) Rab35 mediates transport of Cdc42 and Rac1 to the plasma membrane during phagocytosis. *Mol Cell Biol* 30:1421-1433.
- Shirane, M. y Nakayama, K. I. (2006) Protrudin induces neurite formation by directional membrane trafficking. *Science* 314:818-821.
- Sonnichsen, B., De Renzi, S., Nielsen, E., Rietdorf, J. y Zerial, M. (2000) Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J Cell Biol* 149:901-914.
- Srinivasan, M., Mehta, P., Yu, Y., Prugar, E., Koonin, E. V., Karzai, A. W. y Sternglanz, R. (2011) The highly conserved KEOPS/EKC complex is essential for a universal tRNA modification, t6A. *EMBO J* 30:873-881.
- Stenmark, H. (2009) Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:513-525.
- Stuessi, M. y Bradke, F. (2011) Neuronal polarization: the cytoskeleton leads the way. *Dev Neurobiol* 71:430-444.
- Stocchetto, S., Marin, O., Carignani, G. y Pinna, L. A. (1997) Biochemical evidence that *Saccharomyces cerevisiae* YGR262c gene, required for normal growth, encodes a novel Ser/Thr-specific protein kinase. *FEBS Lett* 414:171-175.
- Tahirovic, S. y Bradke, F. (2009) Neuronal polarity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1:a001644.
- Takano, T., Tomomura, M., Yoshioka, N., Tsutsumi, K., Terasawa, Y., Saito, T., Kawano, H., Kamiguchi, H., Fukuda, M. y Hisanaga, S. (2012) LMTK1/AATYK1 is a novel regulator of axonal outgrowth that acts via Rab11 in a Cdk5-dependent manner. *J Neurosci* 32:6587-6599.
- Takemura, R., Okabe, S., Umeyama, T., Kanai, Y., Cowan, N. J. y Hirokawa, N. (1992) Increased microtubule stability and alpha tubulin acetylation in cells transfected with microtubule-associated proteins MAP1B, MAP2 or tau. *J Cell Sci* 103 (Pt 4):953-964.
- Tanaka, E., Ho, T. y Kirschner, M. W. (1995) The role of microtubule dynamics in growth cone motility and axonal growth. *J Cell Biol* 128:139-155.
- Tapon, N. y Hall, A. (1997) Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 9:86-92.
- Tedeschi, A. y Di Giovanni, S. (2009) The non-apoptotic role of p53 in neuronal biology: enlightening the dark side of the moon. *EMBO Rep* 10:576-583.
- Tedeschi, A., Nguyen, T., Puttagunta, R., Gaub, P. y Di Giovanni, S. (2009) A p53-CBP/p300 transcription module is required for GAP-43 expression, axon outgrowth, and regeneration. *Cell Death Differ* 16:543-554.
- Tibbetts, R. S., Brumbaugh, K. M., Williams, J. M., Sarkaria, J. N., Cliby, W. A., Shieh, S. Y., Taya, Y., Prives, C. y Abraham, R. T. (1999) A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev* 13:152-157.
- Togel, M., Wiche, G. y Propst, F. (1998) Novel features of the light chain of microtubule-associated protein MAP1B: microtubule stabilization, self interaction, actin filament binding, and regulation by the heavy chain. *J Cell Biol* 143:695-707.
- Tolias, K. F., Cantley, L. C. y Carpenter, C. L. (1995) Rho family GTPases bind to phosphoinositide kinases. *J Biol Chem* 270:17656-17659.

- Tortosa, E., Galjart, N., Avila, J. y Sayas, C. L. (2013) MAP1B regulates microtubule dynamics by sequestering EB1/3 in the cytosol of developing neuronal cells. *EMBO J* 32:1293-1306.
- Tortosa, E., Montenegro-Venegas, C., Benoist, M., Hartel, S., Gonzalez-Billault, C., Esteban, J. A. y Avila, J. (2011) Microtubule-associated protein 1B (MAP1B) is required for dendritic spine development and synaptic maturation. *J Biol Chem* 286:40638-40648.
- Tucker, R. P. y Matus, A. I. (1988) Microtubule-associated proteins characteristic of embryonic brain are found in the adult mammalian retina. *Dev Biol* 130:423-434.
- Ullrich, O., Reinsch, S., Urbe, S., Zerial, M. y Parton, R. G. (1996) Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J Cell Biol* 135:913-924.
- Vandecandelaere, A., Pedrotti, B., Utton, M. A., Calvert, R. A. y Bayley, P. M. (1996) Differences in the regulation of microtubule dynamics by microtubule-associated proteins MAP1B and MAP2. *Cell Motil Cytoskeleton* 35:134-146.
- Witte, H., Neukirchen, D. y Bradke, F. (2008) Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. *J Cell Biol* 180:619-632.
- Yan, D., Guo, L. y Wang, Y. (2006) Requirement of dendritic Akt degradation by the ubiquitin-proteasome system for neuronal polarity. *J Cell Biol* 174:415-424.
- Yang, A., Walker, N., Bronson, R., Kaghad, M., Oosterwegel, M., Bonnin, J., Vagner, C., Bonnet, H., Dikkes, P., Sharpe, A., McKeon, F. y Caput, D. (2000) p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature* 404:99-103.
- Yap, C. C. y Winckler, B. (2012) Harnessing the power of the endosome to regulate neural development. *Neuron* 74:440-451.
- Yoshihara, Y., De Roo, M. y Muller, D. (2009) Dendritic spine formation and stabilization. *Curr Opin Neurobiol* 19:146-153.
- Zauner, W., Kratz, J., Staunton, J., Feick, P. y Wiche, G. (1992) Identification of two distinct microtubule binding domains on recombinant rat MAP 1B. *Eur J Cell Biol* 57:66-74.
- Zeng, P. Y. y Berger, S. L. (2006) LKB1 is recruited to the p21/WAF1 promoter by p53 to mediate transcriptional activation. *Cancer Res* 66:10701-10708.
- Zerial, M. y McBride, H. (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:107-117.
- Zhang, J., Fonovic, M., Suyama, K., Bogoy, M. y Scott, M. P. (2009) Rab35 controls actin bundling by recruiting fascin as an effector protein. *Science* 325:1250-1254.

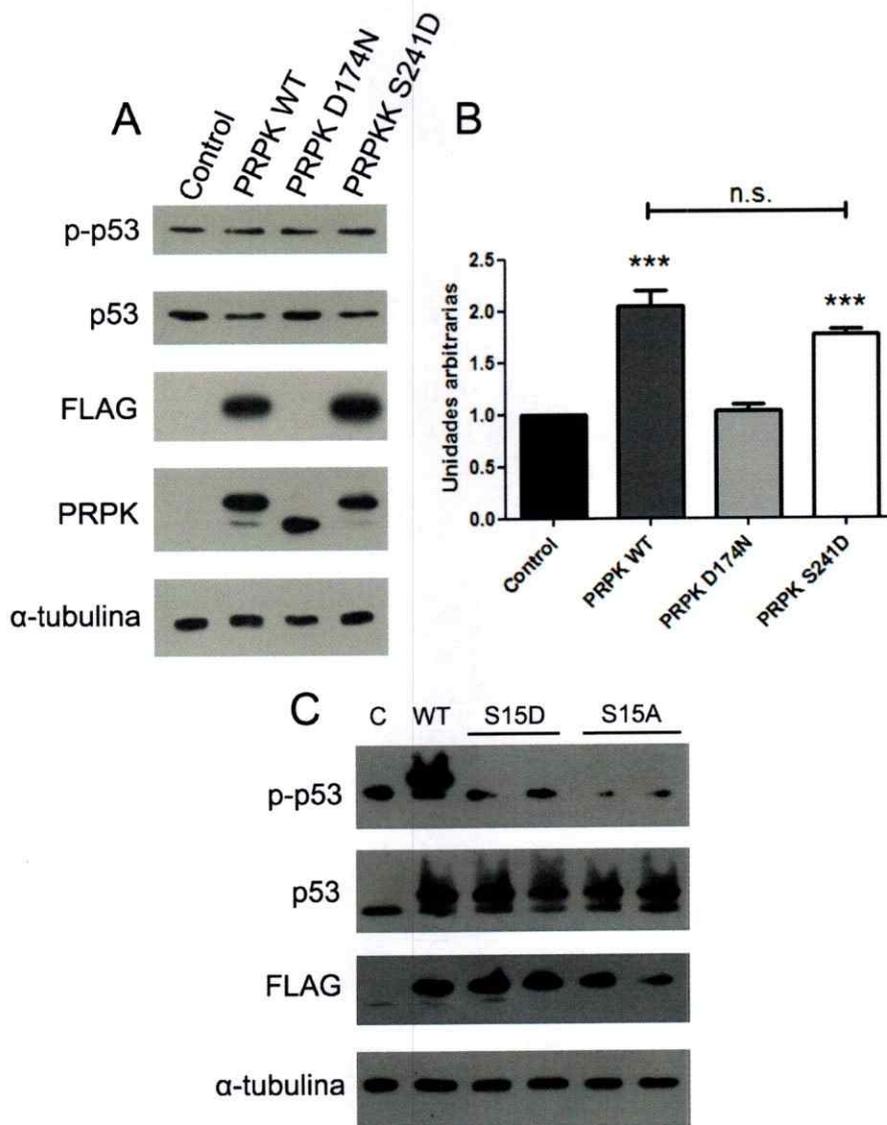
ANEXOS

Anexo 1. Mapa de los plasmidios utilizados durante el *cloning* de PRPK y p53



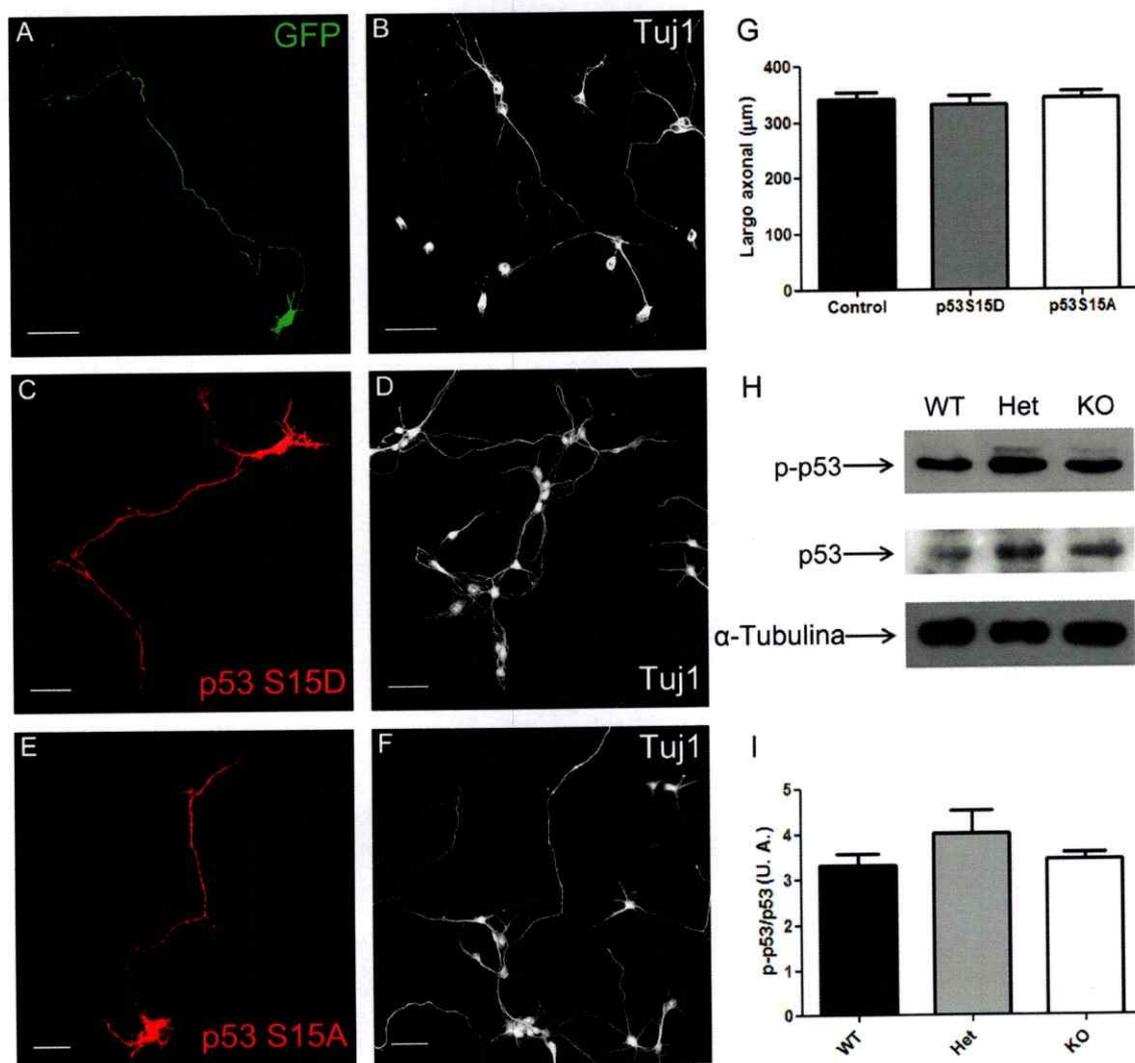
Anexo 1. Los mapas de los plasmidios fueron obtenidos desde <http://www.chem.agilent.com/library/usermanuals/Public/211172.pdf> y <http://www.evrogen.com/products/vectors/pmKate2-C/pmKate2-C.shtml>.

Anexo 2. Expresión de los constructos de PRPK y p53 generados, en COS-7



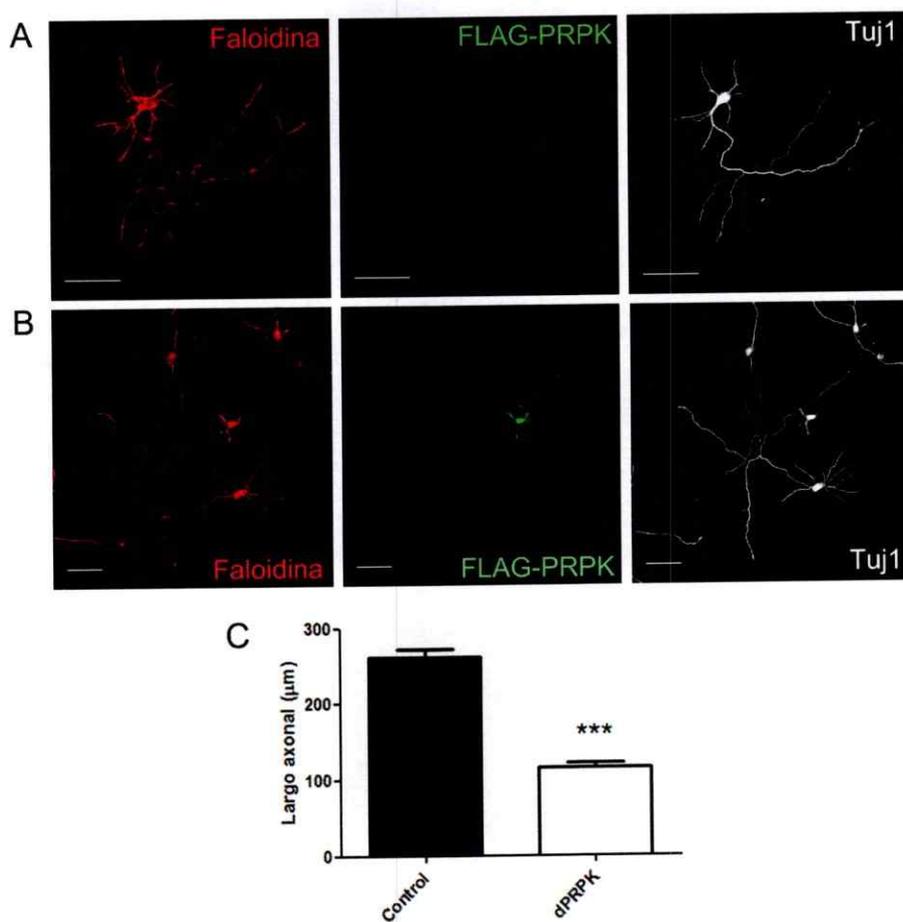
Anexo 2. En el panel A se presentan *western blots* desde extractos de COS-7 transfectadas con los 3 constructos generados para PRPK, revelados contra p-p53, p53, FLAG, PRPK y α -tubulina como control de carga. La cuantificación respectiva se presenta en el panel B, $n = 3$ Anova de una vía, post-test Newman-Keuls. En C se muestra la expresión de los constructos generados para p53.

Anexo 3. Efecto de la sobreexpresión de p53 S15D y S15A sobre la elongación axonal.



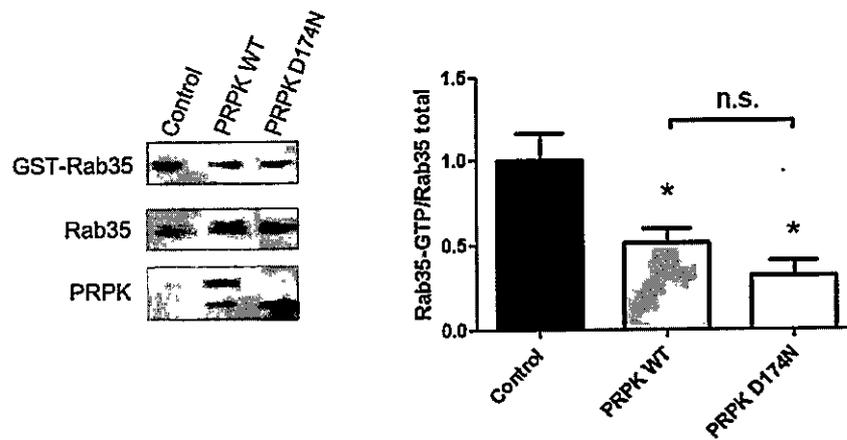
Anexo 3. El efecto de PRPK sobre la elongación axonal es independiente del estado de fosforilación de la serina 15 de p53. (A–B) neurona control expresando GFP, (C–D) neurona expresando p53 S15D, (E–F) neurona expresando p53 S15A. En A se muestra la señal de GFP, en C y E la marca anti-FLAG y en B, D y F la marca de Tuj1, como marcador de linaje neuronal. En G se muestra la cuantificación de la longitud axonal para cada condición, $n = 50$ neuronas, de 3 cultivos independientes, barra de tamaño = $50 \mu\text{m}$. En H se presenta un *western blot* representativo de p-p53, p53 y α -tubulina como control de carga, desde extractos de cerebro embrionario completo de ratones WT, Het e Hip para MAP1B. La cuantificación de las bandas en los *western blots* se muestra en la figura I, $n = 3$.

Anexo 4. La sobreexpresión de dPRPK reduce la elongación axonal



Anexo 4. En A se presenta una neurona sin transfectar y en B una neurona transfectada con dPRPK, ambas de 3 DIV. Los paneles de la izquierda muestran la marca de faloidina, los paneles centrales la marca anti-FLAG y los paneles de la derecha la marca de Tuj1. La cuantificación de la longitud axonal para cada grupo experimental se muestra en C, n = 50 neuronas por condición desde 3 cultivos independientes, barra de tamaño = 50 μm, ***p < 0,001; test t de Student no pareado.

Anexo 5. La sobreexpresión de PRPK reduciría la actividad de Rab35



Anexo 5. La sobreexpresión de PRPK en células COS-7 reduce los niveles de Rab35-GTP/Rab35, independientemente de la actividad quinasa de PRPK, como se puede ver en los *pull down* de actividad que se presentan en la figura. $n = 3$, $*p < 0,05$. Anova de una vía, post-test de Dunnett.