



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Bioquímica i
Biologia Molecular.
Unitat de Medicina



REGULACIÓN Y FUNCIÓN DE LAS *BRAIN-SPECIFIC KINASES 1 Y 2* (BRSK1 Y BRSK2, TAMBIÉN LLAMADAS SAD QUINASAS) EN LA DIFERENCIACIÓN Y SINAPSIS NEURONALES.

Arantzazu Rodríguez Asiaín

TESIS DOCTORAL

Bellaterra, 2012

RESULTADOS-CAPÍTULO 2:

R.2 Papel de BRSK1 y BRSK2 en la diferenciación neuronal.

R.2 Papel de BRSK1 y BRSK2 en la diferenciación neuronal.

Las BRSKs juegan un papel primordial en promover y mantener una correcta polaridad durante estadios tempranos de la diferenciación neuronal, como se deduce por la incapacidad de las neuronas de ratones deficientes en BRSK1 y BRSK2 de polarizar correctamente el eje axón-dendrita, lo que conlleva la muerte de estos animales en las 2 horas después del nacimiento (Kishi et al, 2005). Además, las BRSKs regulan también procesos más tardíos del desarrollo neuronal, tales como la sinaptogénesis y la función sináptica en neuronas maduras (Crump et al, 2001; Inoue et al, 2006). Sin embargo, se desconocen los mecanismos moleculares por los que las BRSKs orquestan la diferenciación neuronal, en parte debido a que faltan por describir los mecanismos implicados en la regulación de su actividad quinasa y expresión en la neurona. Uno de los objetivos de este trabajo ha sido caracterizar el patrón de expresión de las BRSKs a lo largo del proceso de diferenciación neuronal e identificar, mediante el uso de una línea celular estable, las vías de señalización implicadas en la expresión de estas quinasas. Los resultados derivados del estudio de la expresión génica de las BRSKs que se recogen en este capítulo se han realizado en estrecha colaboración con Josep Espadamala y el Dr. Néstor Gómez (Departament de Bioquímica i Biología Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona).

R.2.1 Distribución tisular y regional de BRSK1 y BRSK2.

La caracterización de los anticuerpos anti-BRSK1 y anti-BRSK2 expuesta en el capítulo 1 de Resultados, ha permitido llevar a cabo un estudio detallado sobre la distribución de estas quinasas en diferentes tejidos y, por primera vez, en diferentes regiones del cerebro de rata.

La figura R.11 muestra el patrón de expresión de BRSK1 y BRSK2 en diferentes tejidos de rata (cerebro, corazón, músculo esquelético, hígado, tejido adiposo, páncreas, testículo, riñón y bazo), tanto a nivel de expresión proteica (inmunoblot) como de actividad enzimática (histogramas). De acuerdo con observaciones previas (Kishi et al, 2005), el cerebro es el órgano que presenta la mayor expresión y actividad de BRSK1 y BRSK2, aunque también se encuentran (en mucho menor grado) en testículos. Cabe destacar la expresión significativa de BRSK2 en páncreas, que sugiere una posible función de BRSK2 en este órgano.

Con el fin de caracterizar la distribución de las BRSKs en cerebro, se disecaron hipocampo, córtex, cerebelo y bulbo olfatorio de un cerebro de rata de 4 semanas de edad. La determinación de los niveles de expresión y actividad quinasa de las BRSKs para cada región muestra que ambas isoformas presentan una distribución muy similar (figura R.12): están presentes en todas las regiones analizadas, si bien hipocampo y córtex son las áreas con mayor expresión de BRSKs (hecho que correlaciona con una actividad enzimática mayor en estas dos regiones).

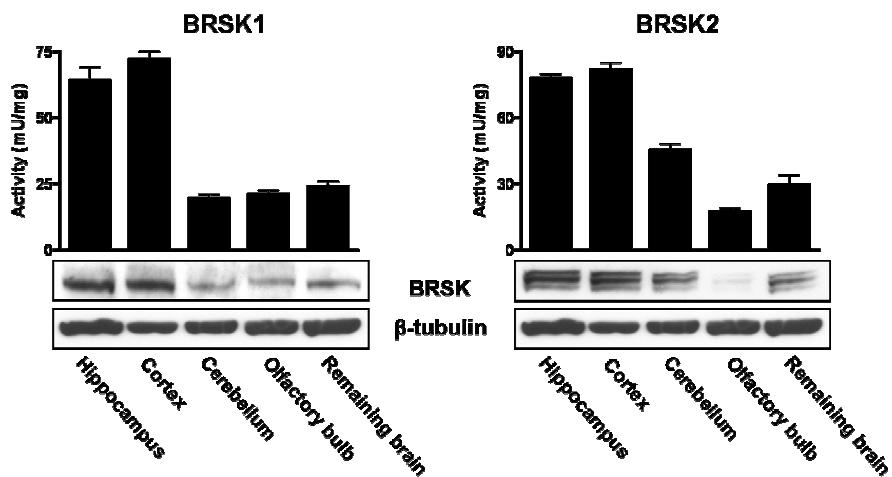


Figura R.11 Distribución tisular y actividad quinasa de BRSK1 y BRSK2 de rata. Homogenados de los tejidos de rata indicados fueron analizados mediante inmunoblot (25 μ g) utilizando los anticuerpos anti-BRSK1 y anti-BRSK2 (paneles inferiores). Los histogramas muestran la actividad específica para cada quinasa, determinada mediante inmunoprecipitación de 300 μ g de proteína de cada tejido y ensayo radiométrico utilizando 200 μ M péptido sustrato AMARA y 100 μ M 32 P-[γ -ATP]/Mg $^{2+}$. Los valores de actividad son medias \pm s.d. de ensayos realizados por triplicado y representativos de dos experimentos independientes.

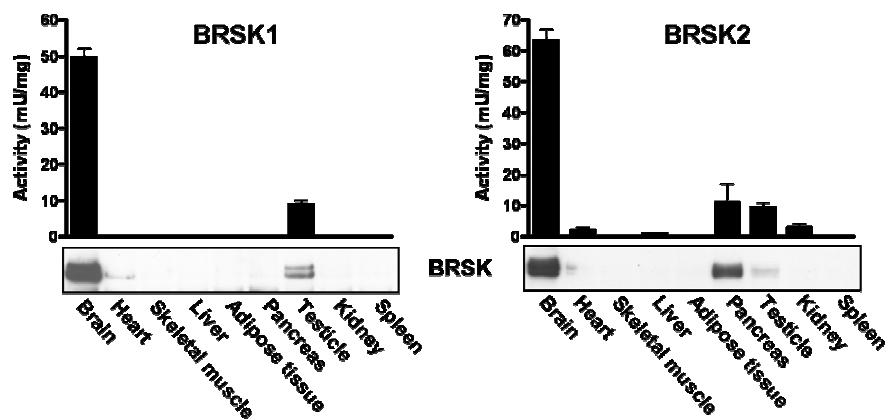


Figura R.12 Distribución regional y actividad quinasa de BRSK1 y BRSK2 de cerebro de rata. Se diseccionaron las regiones del cerebro indicadas y los homogenados fueron analizados mediante inmunoblot (25 μ g) utilizando los anticuerpos anti-BRSK1 y anti-BRSK2. Se usa β -tubulina como control de carga (paneles inferiores). Los histogramas muestran la actividad específica de BRSK1 y BRSK2 para cada región, determinada mediante inmunoprecipitación de 300 μ g de proteína y ensayo radiométrico utilizando 200 μ M péptido sustrato AMARA y 100 μ M 32 P-[γ -ATP]/Mg $^{2+}$. Los valores son medias \pm s.d. de ensayos por triplicado y representativos de dos experimentos independientes.

R.2.2 Aumento de la expresión de BRSK1 y BRSK2 durante el desarrollo ontogénico del cerebro y la diferenciación de neuronas corticales.

Tras aproximadamente tres semanas de gestación, los roedores nacen cuando apenas se está iniciando la neurogénesis de células granulares en el bulbo olfatorio, hipocampo y cerebelo, de manera que la mayoría de neuronas se acaban por formar alrededor del tiempo de destete (21 días postnatales), cuando se considera que el cerebro posee la apariencia de un cerebro adulto (Bayer et al, 1993). Los mecanismos moleculares implicados en el establecimiento de la polaridad neuronal y el inicio de procesos sinápticos se ponen en marcha a las dos semanas de gestación (E14) y van aumentando en sucesivos días hasta la tercera o cuarta semana postnatal (P21-28). Dada la implicación de las BRSKs en estos procesos se decidió estudiar si de forma paralela a ellos, el patrón de expresión de estas quinasas aumenta también durante el desarrollo ontogénico del cerebro. Con este fin se analizó la expresión de las BRSKs en dos modelos: durante el desarrollo ontogénico postnatal del cerebro y durante el proceso de diferenciación *in vitro* de neuronas corticales en cultivo.

Análisis de la expresión y actividad de BRSK1 y BRSK2 durante el desarrollo ontogénico del cerebro de rata.

Como se ha mencionado anteriormente, desde el nacimiento (P0) hasta el destete (P21) se producen procesos de neurogénesis y sinaptogénesis en el cerebro de la rata. Para estudiar el patrón de expresión de BRSKs en esta etapa se obtuvieron cerebros a diferentes días postnatales (comprendidos entre 0 y 5 semanas) en los que se analizó los niveles de expresión y actividad de las BRSKs mediante análisis de inmunoblot y ensayos radiométricos de las quinasas inmunoprecipitadas. La **figura R.13** muestra como los niveles de BRSK1 y BRSK2 aumentan a lo largo del desarrollo postnatal hasta alcanzar un máximo alrededor de la cuarta semana (P25), coincidiendo con el tiempo de destete. Estas BRSKs que se expresan *de novo* son funcionales, ya que el incremento en la expresión proteica se corresponde con el aumento de actividad de estas quinasas.

Análisis de la expresión de BRSK1 y BRSK2 durante la diferenciación *in vitro* de neuronas corticales de rata.

A continuación se estudió el patrón de expresión de las BRSKs durante la diferenciación neuronal de células corticales embrionarias (E17) mantenidas en cultivo *in vitro* durante varios días. Así, siguiendo el protocolo detallado en la sección Material y Métodos, se obtuvieron cultivos primarios de células corticales de embriones de rata que fueron analizados mediante

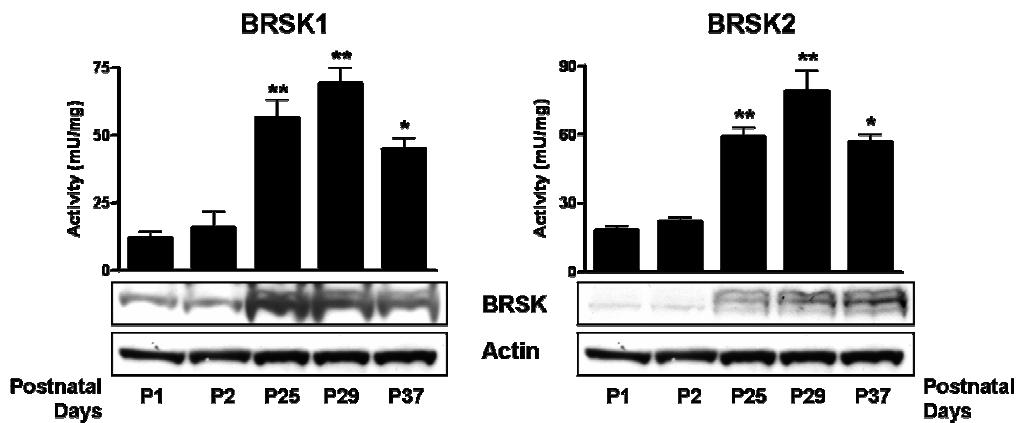


Figura R.13 Aumento de la expresión y actividad de BRSK1 y BRSK2 durante el desarrollo postnatal del cerebro de rata. Homogenados de cerebros de rata obtenidos a los días postnatales indicados fueron analizados mediante inmunoblot (25 µg) utilizando los anticuerpos anti-BRSK1 y anti-BRSK2 (paneles inferiores); se utilizó actina como control de carga. Los histogramas muestran la actividad específica para BRSK1 y BRSK2, determinada mediante inmunoprecipitación de 300 µg de proteína de cerebro y ensayo radiométrico utilizando 200 µM péptido sustrato AMARA y 100 µM ^{32}P -[γ -ATP]/Mg²⁺. Los valores son medias \pm s.d. de ensayos por triplicado y representativos de dos experimentos independientes (* P<0.05, ** P <0.01 respecto a P1).

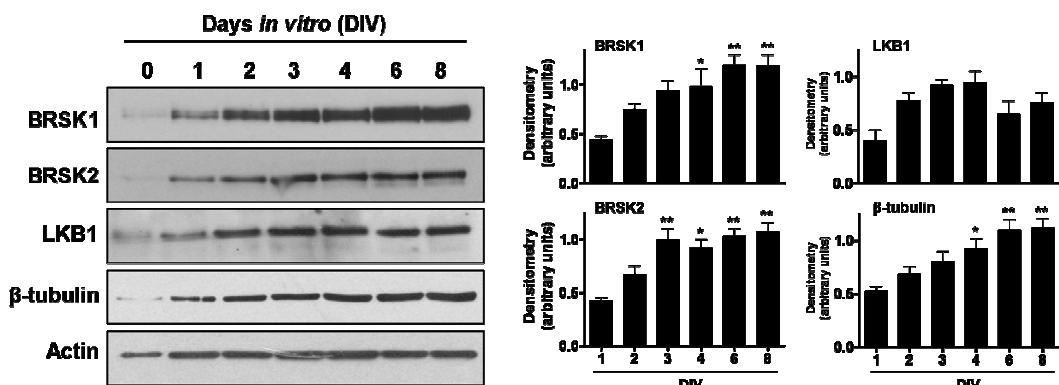


Figura R.14 Aumento de la expresión de BRSK1 y BRSK2 durante la diferenciación *in vitro* de neuronas corticales de rata. Los cultivos primarios de neuronas corticales de rata fueron lisados a los días de diferenciación *in vitro* (DIV) indicados, y la expresión de BRSK1, BRSK2 y LKB1 se analizó mediante inmunoblot. β -tubulina, marcador de diferenciación neuronal; actina, control de carga. Los histogramas representan la densitometría de los correspondientes inmunoblot, normalizada con los valores control (actina). Resultados representativos de tres cultivos independientes (* P<0.05, ** P <0.01 respecto a 1 DIV).

inmunoblot desde el día de siembra (0 DIV) hasta 8 días de diferenciación *in vitro* (8 DIV). La **figura R.14** muestra que durante el proceso de diferenciación de neuronas corticales se produce un aumento de la expresión de BRSK1 y BRSK2 del mismo orden que el observado para el marcador de diferenciación neuronal β -III-tubulina. Por el contrario, los niveles de expresión de LKB1 (quinasa activadora de las BRSKs) se mantienen constantes a partir del segundo día de cultivo *in vitro* (2 DIV), de manera análoga al patrón de expresión detectado para la actina (control).

En paralelo se llevaron a cabo estudios inmunocitoquímicos de cultivos primarios de neuronas corticales que corroboran los resultados obtenidos mediante inmunoblot. La **figura R.15** muestra las fotografías de inmunofluorescencia para BRSK1 y BRSK2 de cultivos de neuronas corticales a 2, 4, 7 y 10 días de diferenciación *in vitro* (DIV). Como se menciona en la Introducción, a los 2 días de cultivo la mayoría de neuronas se encuentran en el estadio 3 de diferenciación, donde se observa una polaridad neuronal aparente cuando alguna de las neuritas exhibe un crecimiento acelerado y adquiere características axonales. En los siguientes días de cultivo (4 DIV) se alcanza el estadio 4 de diferenciación en el que ocurre la maduración de las dendritas y el axón, seguido del estadio 5 (7 y 10 DIV) en el que finalmente se forma una entidad sináptica funcional. A medida que las neuronas se diferencian durante estos días de cultivo *in vitro*, se observa un aumento en la expresión de las BRSKs del mismo orden que el observado mediante inmunoblot, siendo máxima a 10 DIV (**figura R.15C**). En este estadio, ambas quinasas presentan una localización mayoritariamente citosólica, encontrándose tanto en el soma como en las prolongaciones neuronales. A pesar de que ambas isoformas se distribuyen de manera discontinua a lo largo de estas prolongaciones, su patrón de localización es algo dispar: BRSK1 presenta una localización más puntuada, mientras que BRSK2 rinde una distribución más homogénea a lo largo de las dendritas y el axón. En el siguiente capítulo de resultados (Capítulo 3) se muestran los estudios ampliados de co-localización de las BRSKs con marcadores neuronales y gliales, donde se caracteriza en detalle el patrón de distribución de estas quinasas en neuronas corticales.

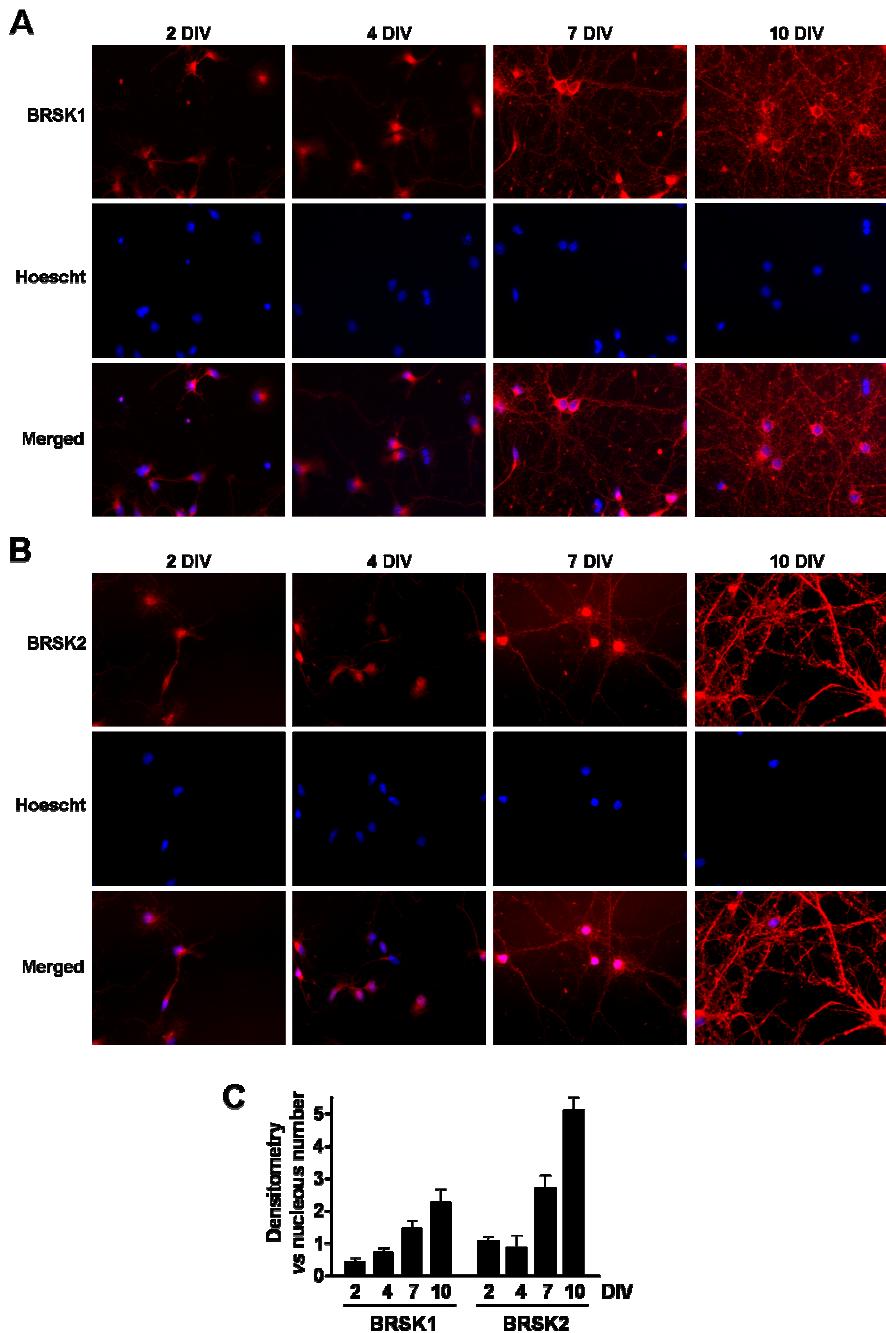


Figura R.15 Expresión y localización de BRSK1 y BRSK2 durante la diferenciación *in vitro* de neuronas corticales de rata. Neuronas corticales de rata cultivadas durante los días de diferenciación *in vitro* (DIV) indicados, fueron analizadas mediante inmunocitoquímica (rojo) para BRSK1 (**A**) y BRSK2 (**B**). Los paneles intermedios muestran la tinción de núcleos (Hoescht, azul), y los inferiores la superposición de las dos tinciones anteriores (Merged). (**C**) Análisis densitométrico de la señal inmunofluorescente de BRSK1 y BRSK2 con respecto al número de núcleos teñidos. Los valores son medias \pm s.d. del análisis de cinco campos. Se obtuvieron resultados similares en tres cultivos independientes.

R.2.3 Caracterización del aumento de expresión de BRSK1 y BRSK2 durante la diferenciación neuronal de la línea celular PC12.

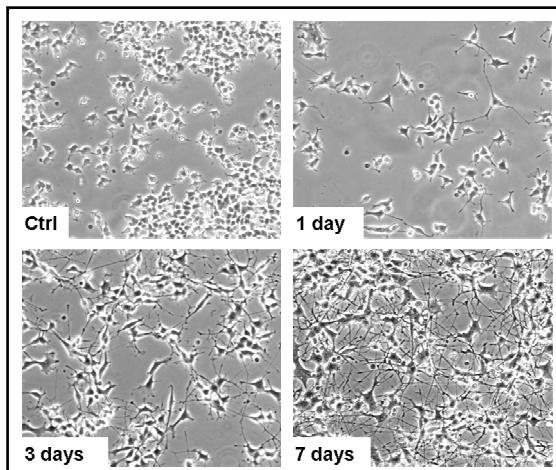
Con la finalidad de caracterizar los mecanismos moleculares implicados en el aumento de expresión de las BRSKs durante la diferenciación neuronal se utilizó como modelo la línea celular PC12 derivada de feocromocitoma de rata (tumor de células cromafinas de la médula adrenal). Desde la descripción de esta línea tumoral a mediados de los años 70 (Greene & Tischler, 1976) se conoce que la exposición prolongada de células PC12 a la acción de neurotrofinas conduce a la adquisición de un fenotipo neuronal, por lo que resulta un modelo muy útil para el estudio de los mecanismos de señalización implicados en la diferenciación. Con el objetivo de determinar si se reproduce en PC12 el aumento de expresión de las BRSKs observado durante el proceso de diferenciación neuronal en homogenados de cerebro y cultivos de neuronas corticales, se trataron células PC12 con el factor de crecimiento neuronal NGF (*Nerve Growth Factor*) y se analizó la expresión de las BRSKs mediante inmunoblot a varios días de diferenciación. La **figura R.16A** muestra como en respuesta a la acción de NGF, las células dejan de dividirse y pasan de ser redondeadas a presentar una morfología típica neuronal, obteniendo un cultivo diferenciado a los 5-7 días de exposición a NGF. El análisis mediante inmunoblot de lisados de células PC12 a diferentes días de tratamiento con NGF muestra un incremento en los niveles de BRSK1 y BRSK2, análogo al observado para el marcador de diferenciación neuronal tubulina- β -III (**figura R.16B**). Por el contrario, otros componentes de la vía de señalización LKB1-BRSK (como la propia LKB1 y su subunidad activadora STRAD α) presentan una elevada expresión en células no diferenciadas, que no se ve alterada a lo largo del proceso de diferenciación estimulado por NGF. Este trabajo constituye la primera descripción de la inducción de la expresión de las quinasas BRSKs en respuesta a factores de crecimiento neuronales, como el NGF.

Estos resultados validan las células PC12 como modelo de diferenciación neuronal para el estudio de las vías de señalización implicadas en el aumento de expresión de las BRSKs. En los siguientes apartados se recogen los resultados derivados de estos estudios, que señalan la vía de la MAP quinasa ERK1/2 y el factor de transcripción SP1 como responsables de la activación del promotor de BRSK y del consecuente aumento de expresión de la proteína.

R.2.4 Activación del promotor de BRSK1 durante la diferenciación neuronal en respuesta a las neurotrofinas NGF y BDNF.

Un aspecto relevante del incremento de expresión de las BRSKs observado durante la diferenciación neuronal es discernir si es consecuencia o no de la activación del promotor y, por tanto, de síntesis *de novo* de mRNA. Con este fin, Josep Espadamala (del laboratorio del Dr.

A



B

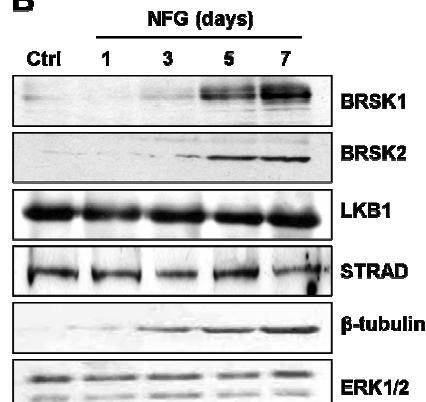


Figura R.16 Expresión de la vía LKB1-BRSKs durante la diferenciación neuronal de células PC12 inducida por NGF. (A) Microfotografías de contraste de fase de células PC12 a 1, 3 y 7 días de diferenciación inducida con 150 ng/ml de NGF. Control (Ctrl), células sin tratar mantenidas 7 días en cultivo. (B) Análisis de la expresión mediante inmunoblot de BR SK1, BR SK2, LKB1 y STRAD α a los días indicados de diferenciación. β -tubulina, marcador de diferenciación neuronal; ERK1/2, control de carga. Resultados representativos de al menos tres experimentos independientes.

Néstor Gómez, Departament de Bioquímica i Biología Molecular, UAB) clonó 1 kb de la región *upstream* del inicio de transcripción del gen de BR SK1 de rata en un vector luciferasa *reporter* pGL2, lo que ha supuesto clonar por primera vez el promotor de una BR SK (Josep Espadamala, Tesis Doctoral en preparación). Se trata de un promotor que carece de TATA *box* y que presenta gran cantidad de regiones ricas en CG (islas CG).

Para estudiar si el aumento de expresión de las BR SKs observado durante la diferenciación neuronal de células PC12 es consecuencia de la activación del promotor, estas células fueron transfectadas con el vector pGL2-luciferasa que contiene la región de 1 kb del promotor de BR SK1 (pGL2-BR SK1-promoter), y tratadas posteriormente con NGF o EGF (*Epidermal Growth Factor*). A diferencia del NGF, el EGF no induce la diferenciación de células PC12 al tratarse de un activador agudo, y no sostenido, de ERK1/2. Como se muestra en las fotografías de microscopía de contraste de fase (figura R.17A), tras dos días de tratamiento con NGF las células PC12 empiezan a emitir prolongaciones (neuritas), mientras que las tratadas con EGF mantienen su morfología redondeada inicial.

Las medidas de actividad luciferasa muestran que el NGF, pero no el EGF, provoca la activación del promotor de BR SK1 a las 24 horas de tratamiento, activación que se mantiene a las 36 y 48 horas (figura R.17B). El correspondiente inmunoblot muestra que la activación del promotor en respuesta a NGF se traduce en un incremento en los niveles proteicos de BR SK1.

Idéntico resultado se obtuvo para los niveles de BRSK2, mientras que no se detectó expresión de las BRSKs cuando las células fueron expuestas a EGF (figura R.17C). Como control, la diferenciación de células PC12 inducida por NGF, pero no por EGF, provoca un aumento de expresión del marcador β -tubulina, así como el incremento de los niveles de fosforilación de ERK1/2. Por último, los niveles de LKB1 se mantienen inalterables independientemente del factor de crecimiento utilizado.

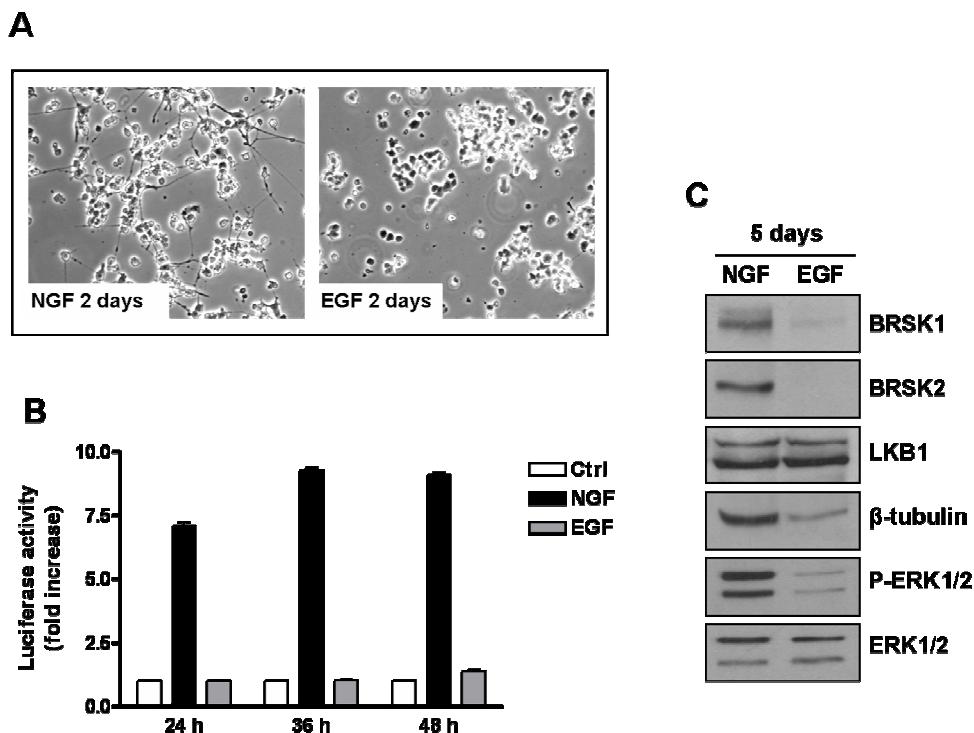


Figura R.17 Activación del promotor de BRSK1 en respuesta a NGF en células PC12. (A) Fotografías de contraste de fase de células PC12 tratadas durante 2 días con 150 ng/ml de NGF o 50 ng/ml de EGF. **(B)** Actividad luciferasa de células PC12 transfectadas con el vector reporter pGL2-BRSK1-promoter y tratadas 24 horas después con NGF (150 ng/ml) o EGF (50 ng/ml) durante los tiempos indicados. Control (Ctrl), células transfectadas no tratadas. Actividad luciferasa en valores respecto al control. Los resultados son medias \pm s.d. de experimentos realizados por triplicado y representativos de tres experimentos independientes. **(C)** Análisis de la expresión mediante inmunoblot de BRSK1, BRSK2 y LKB1 de células PC12 tratadas durante 5 días con NGF (150 ng/ml) o EGF (50 ng/ml). β -tubulina, marcador de diferenciación neuronal. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes.

A continuación se analizó si el aumento de expresión de las BRSKs en neuronas corticales respondía, al igual que en el modelo PC12, a una activación previa del promotor en respuesta a neurotrofinas. Para ello, neuronas corticales embrionarias de rata cultivadas 2 días *in vitro* (2 DIV) se transfectaron con el vector pGL2-BRSK1-promoter y se trataron con la neurotrofina

BDNF (*Brain-derived Neurotrophic Factor*). La **figura R.18A** muestra que el BDNF induce una activación significativa del promotor de BRSK1 de 2.5 y 3.5 veces a las 24 y 48 horas de tratamiento, respectivamente. Los correspondientes inmunoblotting muestran que, de acuerdo con la observación anterior, el tratamiento de neuronas corticales con BDNF resulta en un aumento significativo en la expresión de BRSK1 y BRSK2, mientras que (análogamente a lo observado en células PC12) no se detectan cambios en la expresión de LKB1 (**figura R.18B**). Como control positivo, y de acuerdo con resultados publicados (Feng et al, 1999), el tratamiento con BDNF provoca un aumento contundente de la expresión de SNAP25 (*Synaptosomal-associated Protein 25*) en este modelo.

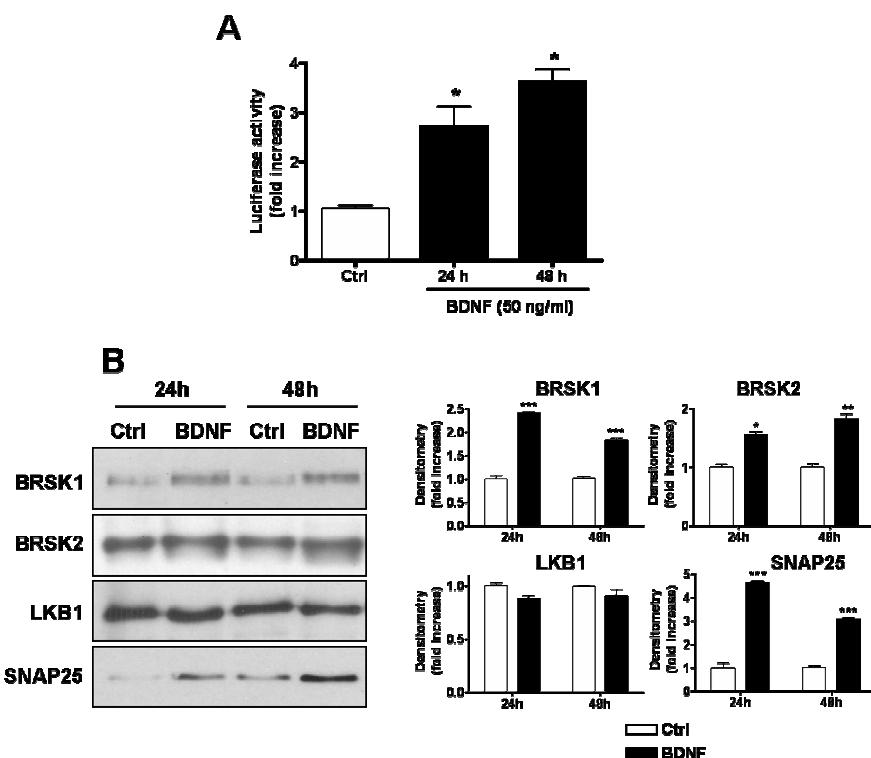


Figura R.18 Activación del promotor de BRSK1 en respuesta a BDNF en neuronas corticales de rata. (A) Neuronas corticales de rata (2 DIV) fueron transfectadas con el vector reporter pGL2-BRSK1-promoter y tratadas 24 horas después con 50 ng/ml de BDNF durante los tiempos indicados. Control (Ctrl), células transfectadas no tratadas. Actividad luciferasa en niveles de activación respecto al control. Los valores son medias \pm s.d. de experimentos realizados por triplicado de dos cultivos diferentes (* P<0.05 respecto control). (B) Expresión de BRSK1, BRSK2 y LKB1 en neuronas corticales de rata (1 DIV) tratadas con BDNF (50 ng/ml) durante los tiempos indicados. Control (Ctrl), células no tratadas. SNAP25, marcador de diferenciación neuronal. Los histogramas muestran el análisis densitométrico de los inmunoblotting en niveles relativos respecto al control (* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001). Resultados representativos de dos cultivos primarios independientes.

R.2.5 La vía de señalización Ras–Raf–MEK1–ERK1/2 regula la expresión de BRSK1 y BRSK2 durante el proceso de diferenciación neuronal.

Como se detalla en la Introducción, la diferenciación en células PC12 en respuesta a neurotrofinas es un proceso complejo en el que se ven involucradas varias de vías de señalización, entre las que la activación sostenida de la vía Ras-Raf-MEK1-ERK1/2 juega un papel primordial (revisado en Vaudry et al, 2002; Skaper, 2008). Así, la sobre-expresión de formas constitutivamente activas de las proteínas *upstream* de ERK1/2 (como Ras, Raf o MEK1) mimetizan el efecto de diferenciación del NGF en células PC12, mientras que, tanto la introducción de los correspondientes dominantes negativos como el uso de inhibidores de Raf o MEK1, resulta en el bloqueo del crecimiento neurítico inducido por la neurotrofina.

La sobre-expresión del mutante constitutivamente activo de MEK1 (MEK1-EE) induce la expresión de BRSK1 y BRSK2 en células PC12.

La activación sostenida de la MAP quinasa quinasa (MEK1) es necesaria y suficiente para inducir la diferenciación de células PC12, al provocar la consecuente activación sostenida de ERK1/2 (Cowley et al, 1994). Para comprobar si este evento es suficiente para promover la expresión de las BRSKs se transfecaron células PC12 con un vector que codifica para una forma de MEK1 constitutivamente activa (MEK1-EE, en el que se mimetiza su fosforilación por Raf mediante la mutación a glutámico de las serinas en posición 218 y 222). La **figura R.19A** muestra como la sobre-expresión de MEK1-EE provoca la diferenciación de las células PC12 a lo largo del tiempo, alcanzando a los 7 días un patrón de extensión neurítica similar al inducido por el NGF. Los correspondientes análisis mediante inmunoblot muestran que la diferenciación de células PC12 inducida por MEK1-EE resulta en un aumento significativo de la expresión de BRSK1 y BRSK2, similar al obtenido para el marcador de diferenciación β -tubulina, pero no resulta en un cambio de expresión de la quinasa activadora LKB1 (**figura R.19B**). Los elevados niveles de fosforilación de ERK1/2 detectados muestran que la diferenciación inducida por MEK1-EE cursa con una activación sostenida de estas quinasas.

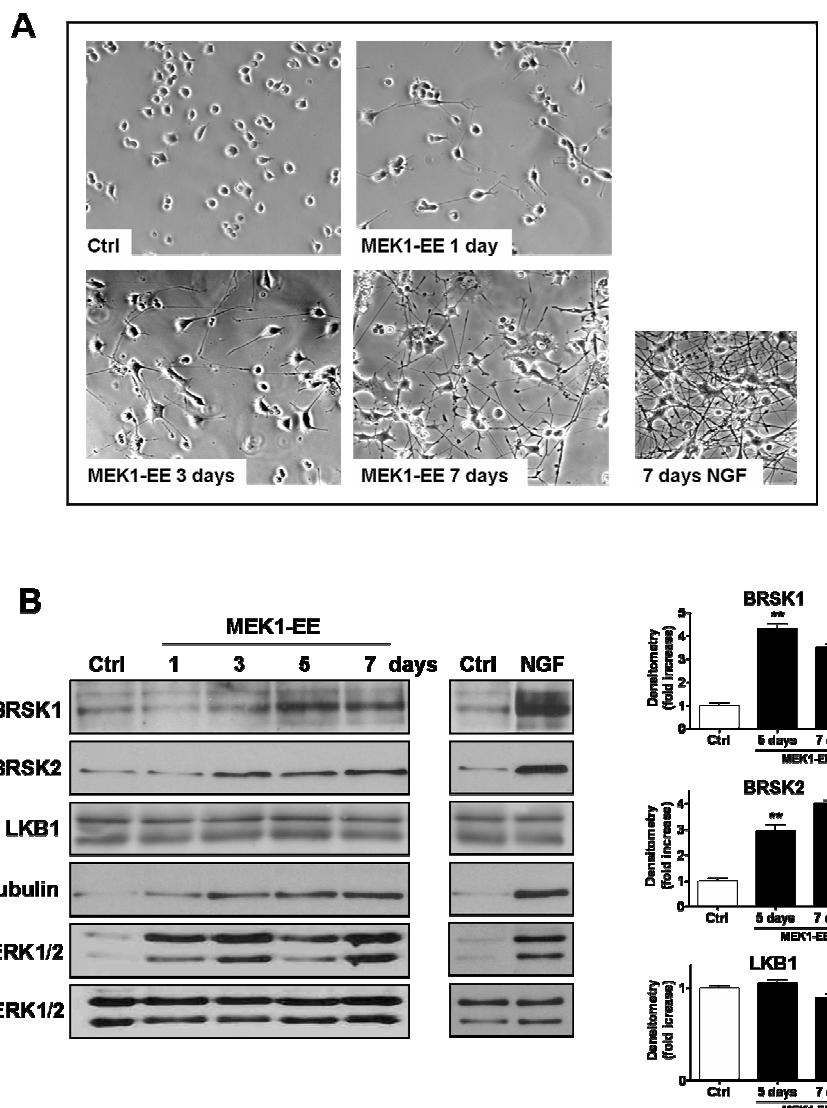


Figura R.19 Aumento de la expresión de BRSK1 y BRSK2 durante la diferenciación de células PC12 inducida por la sobre-expresión de MEK1 constitutivamente activo (MEK1-EE). (A) Fotografías de contraste de fase de células PC12 que sobre-expresan MEK1-EE durante 1, 3 y 7 días. Ctrl, control de transfección (vector pCDNA3). En tamaño reducido se muestran células PC12 diferenciadas tras 7 días de tratamiento con NGF (150 ng/ml). (B) Expresión de BRSK1, BRSK2 y LKB1 a los días indicados de sobre-expresión de MEK1-EE, comparado con la diferenciación inducida por exposición al NGF (150 ng/ml) durante 7 días. β -tubulina y p-ERK1/2, marcadores de diferenciación neuronal. Los histogramas muestran el análisis densitométrico de los inmunoblot para BRSK1, BRSK2 y LKB1 a los días indicados de sobre-expresión de MEK1-EE, en niveles relativos respecto al control de transfección (** $P < 0.01$). Resultados representativos de tres experimentos independientes.

La sobre-expresión del mutante oncogénico de H-Ras (H-RasV12) induce la expresión de BRSK1 y BRSK2 en células PC12.

Dados los resultados anteriores, la activación de la vía de ERK1/2 por encima de MEK1 debería también inducir el aumento de expresión de las BRSKs. Para comprobarlo se transfecaron células PC12 con vectores que codifican para formas constitutivamente activas e inactivas de H-Ras. Numerosos autores han mostrado que la sobre-expresión de mutantes oncogénicos de Ras induce la diferenciación neuronal de células PC12 (Bar-Sagi et al, 1985), mientras que la sobre-expresión de dominantes negativos de Ras inhibe robustamente la diferenciación de estas células en respuesta a NGF (Szeberényi et al, 1990).

Ras es una proteína G monomérica cuyo estado de activación e inactivación depende de su unión al nucleótido GTP o GDP, respectivamente. La estrategia de desplazar uno u otro nucleótido ha sido frecuentemente usada para obtener formas siempre activas o inactivas de Ras. En este trabajo se utilizaron 2 formas de H-Ras: H-RasV12 y H-RasN17. En la primera, la substitución de la Gly12 por una Val resulta en un mutante de Ras que carece de su actividad GTPasa intrínseca, de manera que retiene GTP indefinidamente y por tanto se mantiene constitutivamente activo. En el segundo mutante, la substitución de la Ser17 por una Asn resulta en una forma de Ras que presenta mayor afinidad por GDP que por GTP, lo que permite que esté más tiempo inactivo y actúa por tanto de dominante negativo. Como se observa en la **figura R.20A**, la sobre-expresión de la forma activa de Ras (H-RasV12) induce la aparición de extensiones neuronales detectables a 7 días, aunque morfológicamente no se alcanza el entramado neurítico que provoca la acción del NGF a 7 días de tratamiento. La sobre-expresión de la forma inactiva (H-RasN17) no produjo efecto morfológico alguno. De acuerdo con estas observaciones, el análisis mediante inmunoblot muestra que la sobre-expresión de H-RasV12 provoca un ligero aumento (pero significativo) de la expresión de BRSK1 y BRSK2 a los 7 días, así como de la expresión del marcador de diferenciación β -tubulina. Asimismo, no se detectan cambios en los niveles proteicos de la quinasa *upstream* LKB1 (**figura R.20B**).

En general, la sobre-expresión de H-RasV12 en células PC12 no alcanza los efectos provocados por la sobre-expresión de MEK1-EE, ni a nivel morfológico ni a nivel de expresión de las BRSKs.

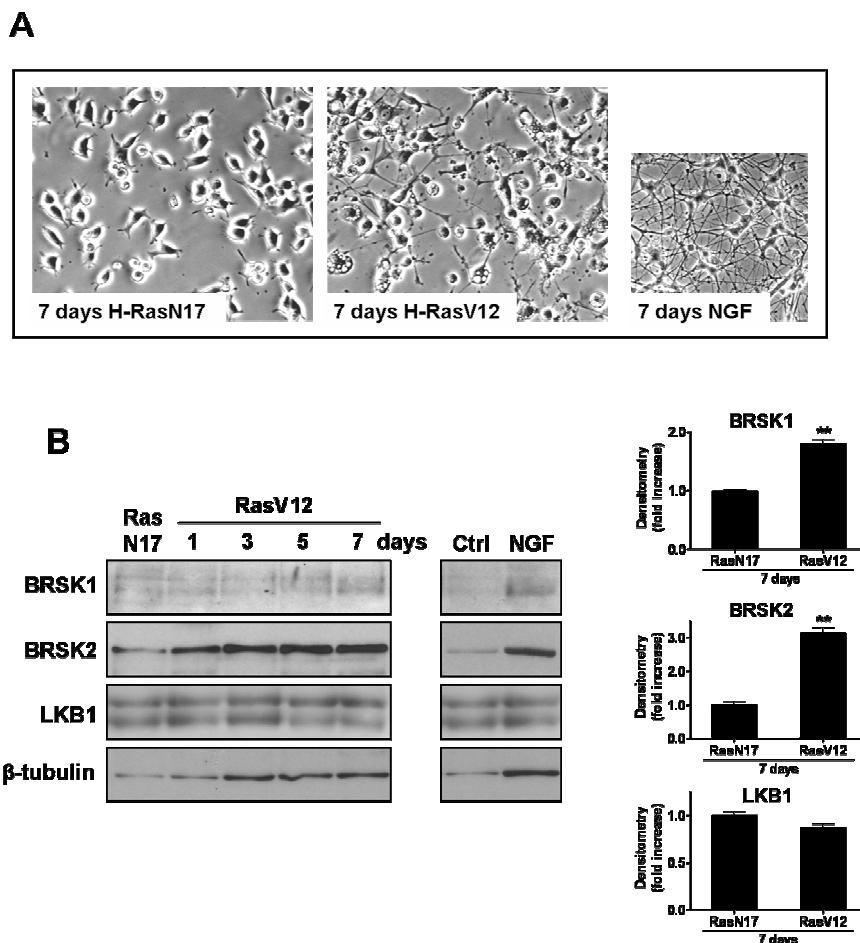


Figura R.20 Aumento de la expresión de BRSK1 y BRSK2 durante la diferenciación de células PC12 inducida por la sobre-expresión de H-Ras constitutivamente activo (H-RasV12). (A) Fotografías de contraste de fase de células PC12 que sobre-expresan durante 7 días H-Ras inactivo (H-RasN17) o constitutivamente activo (H-RasV12). En tamaño reducido se muestran células PC12 diferenciadas tras 7 días de tratamiento con NGF (150 ng/ml). (B) Expresión de BRSK1, BRSK2 y LKB1 a los días indicados de sobre-expresión de H-RasV12, comparado con la diferenciación inducida por exposición al NGF (150 ng/ml) durante 7 días. RasN17, células que sobre-expresan Ras inactivo (H-RasN17) durante 7 días. β -tubulina, marcador de diferenciación neuronal. Los histogramas muestran el análisis densitométrico de los inmunoblot para BRSK1, BRSK2 y LKB1 a 7 días de sobre-expresión de ambas formas de H-Ras, en niveles relativos respecto H-RasN17 (** $P < 0.01$). Resultados representativos de tres experimentos independientes.

Inhibidores específicos de la vía de ERK1/2 bloquean el aumento de expresión de las BRSKs durante la diferenciación de células PC12 inducida por NGF.

A continuación se estudió el efecto de la inhibición de la vía de ERK1/2 en el aumento de expresión de las BRSKs observado en respuesta a NGF. En células PC12, la inhibición de la cascada de señalización mediada por ERK1/2 provoca un bloqueo de la diferenciación inducida por NGF (Pang et al, 1995). Así, el tratamiento de células PC12 con inhibidores selectivos de MEK1, como el PD98059 (Dudley et al, 1995) o el U0126 (Favata et al, 1998), impide la formación neurítica inducida por NGF, sin alterar la viabilidad celular. Ambos compuestos son inhibidores selectivos no-competitivos de MEK1 que ejercen su efecto al unirse a la forma inactiva de la quinasa impidiendo su activación.

La **figura R.21A** muestra como el tratamiento independiente con dos inhibidores de MEK1 estructuralmente diferentes (como son el PD98059 y el U0126) resulta en el bloqueo de la diferenciación de células PC12 en respuesta a NGF. Consecuentemente, los correspondientes inmunoblot (figura R.21B) muestran que la inhibición de MEK1 inhibe el incremento de expresión de BRSK1 y BRSK2 provocado por el NGF, así como el del marcador de diferenciación β -tubulina. Sin embargo, no se detectan cambios en los niveles de expresión de LKB1. Como control positivo se muestra que ambos inhibidores de MEK1 inhiben la fosforilación-activación de ERK1/2 inducida por NGF.

En resumen, mediante la sobre-expresión de las formas activas de MEK1 y H-Ras junto con el uso de inhibidores específicos de MEK1, se muestra que el aumento de expresión de BRSK1 y BRSK2 durante el proceso de diferenciación neuronal en células PC12 está bajo el control de la vía de señalización de las MAP quininas ERK1/2.

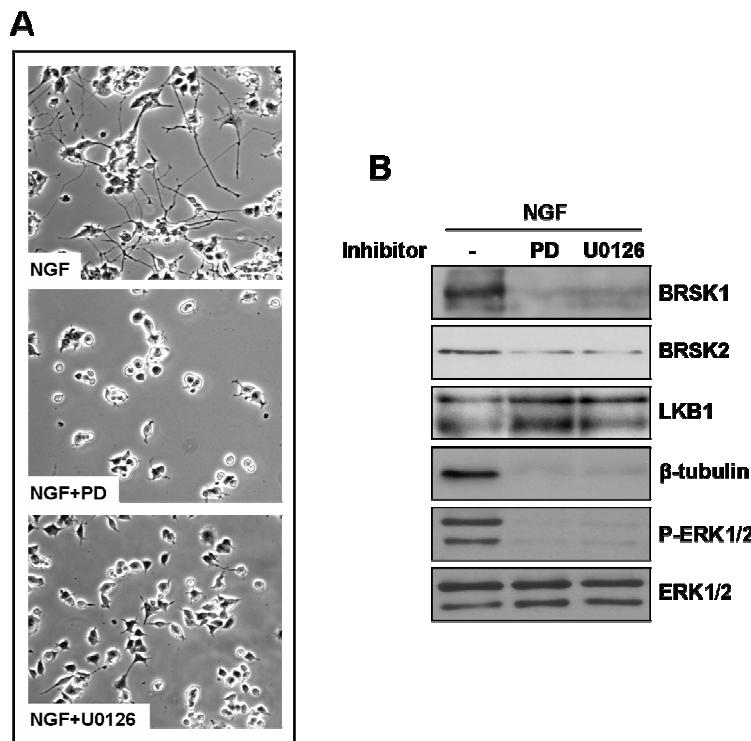


Figura R.21 Efecto de los inhibidores de MEK1 PD98059 y U0126 sobre la expresión de BRSK1 y BRSK2 durante la diferenciación de células PC12 inducida por NGF. (A) Fotografías de contraste de fase de células PC12 a 5 días de diferenciación con NGF (100 ng/ml), pre-tratadas durante 45 minutos con los inhibidores de MEK1 PD98059 (50 μ M) y U0126 (10 μ M). (B) Expresión de BRSK1, BRSK2 y LKB1 de células PC12 estimuladas con NGF (100 ng/ml) durante 5 días en presencia o ausencia de los inhibidores PD98059 (50 μ M) y U0126 (10 μ M). β -tubulina, marcador de diferenciación neuronal; P-ERK1/2, control de la inhibición de MEK1. Resultados representativos de tres experimentos independientes.

R.2.6 El factor de transcripción Sp1 (*Specificity Protein 1*) media en el aumento de la expresión de las BRSKs durante la diferenciación neuronal de células PC12 inducida por NGF.

En primer lugar, se llevó a cabo un estudio *in silico* de la región inédita de 1 kb del promotor de BRSK1 clonado mediante el software AliBaba2 (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html>), algoritmo que permite la predicción de secuencias del DNA unidas a factores de transcripción. El análisis identificó 18 potenciales secuencias, 15 de las cuales corresponden a la unión del factor de transcripción *Specificity Protein 1* (Sp1). Este factor de transcripción es una proteína de expresión ubicua perteneciente a la familia de factores que contienen dominios de unión al DNA tipo *zinc-finger*. Sp1 se une a

motivos ricos en CG activando o reprimiendo la transcripción de cientos de genes que carecen o presentan TATA-box. Sp1 responde a una gran variedad de estímulos, lo que involucra a este factor en multitud de procesos celulares, entre ellos la diferenciación neuronal: en células PC12, el NGF incrementa la unión de Sp1 al DNA tras su fosforilación y activación por ERK1/2 (Atkins et al, 2003), lo que induce la expresión de proteínas como la quinasa *Sphingosine Kinase 1* (SPHK1) o la Ciclina D1 (Sobue et al, 2005; Marampon et al, 2008).

Para estudiar si Sp1 está involucrado en el aumento de expresión de las BRSKs observado durante la diferenciación de células PC12 inducida por NGF, se realizaron en primer lugar estudios de *gene reporter*. La **figura R.22A** muestra que la sobre-expresión de Sp1 en ausencia de NGF produce una activación significativa del promotor de BRSK1 (alrededor de 20 veces), mayor incluso que la activación inducida por NGF (8 veces). Además, el tratamiento con NGF de células que sobre-expresan Sp1 resulta en una mayor activación del promotor de BRSK1 (alrededor de 30 veces). Los correspondientes inmunoblot (figura R.22B) muestran que si bien la sobre-expresión de Sp1 en ausencia de NGF provoca un aumento de expresión de BRSK1 y BRSK2, este incremento es significativamente menor que el inducido por NGF. Además, el efecto sinérgico del NGF y Sp1 observado a nivel de promotor de BRSK1 tampoco se refleja a nivel de proteína, ya que células PC12 que sobre-expresan Sp1 y tratadas con NGF presentan un aumento de expresión de las BRSKs similar al observado para células solamente expuestas al NGF.

Con la finalidad de corroborar los resultados anteriores, se utilizó del inhibidor específico de Sp1 Mitramicina A. Este compuesto es un antibiótico producido por bacterias *Streptomyces* que actúa como agente intercalante del DNA inhibiendo la unión de Sp1 a regiones ricas en CG. La **figura R.23A** muestra que la inhibición de Sp1 mediante el tratamiento con Mitramicina bloquea completamente la activación del promotor de BRSK1 en respuesta a NGF. Las fotografías de microscopía (figura R.23B) muestran que, tras 4 días de exposición a NGF, las células PC12 pre-tratadas con Mitramicina A no presentan fenotipo diferenciado, sino que mantienen una morfología redondeada sin extensión de prolongaciones neuríticas. Los correspondientes inmunoblot (figura R.23C) muestran que el tratamiento de células PC12 con Mitramicina resulta en la inhibición del aumento de expresión de las BRSKs inducido por NGF, así como de la expresión del marcador de diferenciación neuronal β -tubulina. Los niveles de expresión de la quinasa *upstream* LKB1 no se ven afectados por la sobre-expresión o inhibición de Sp1.

En conclusión, mediante ensayos de sobre-expresión de SP1 y el uso del inhibidor específico Mitramicina A, se muestra que el factor de transcripción Sp1 está involucrado en el aumento de expresión de las BRSKs observado durante la diferenciación de células PC12 inducida por NGF.

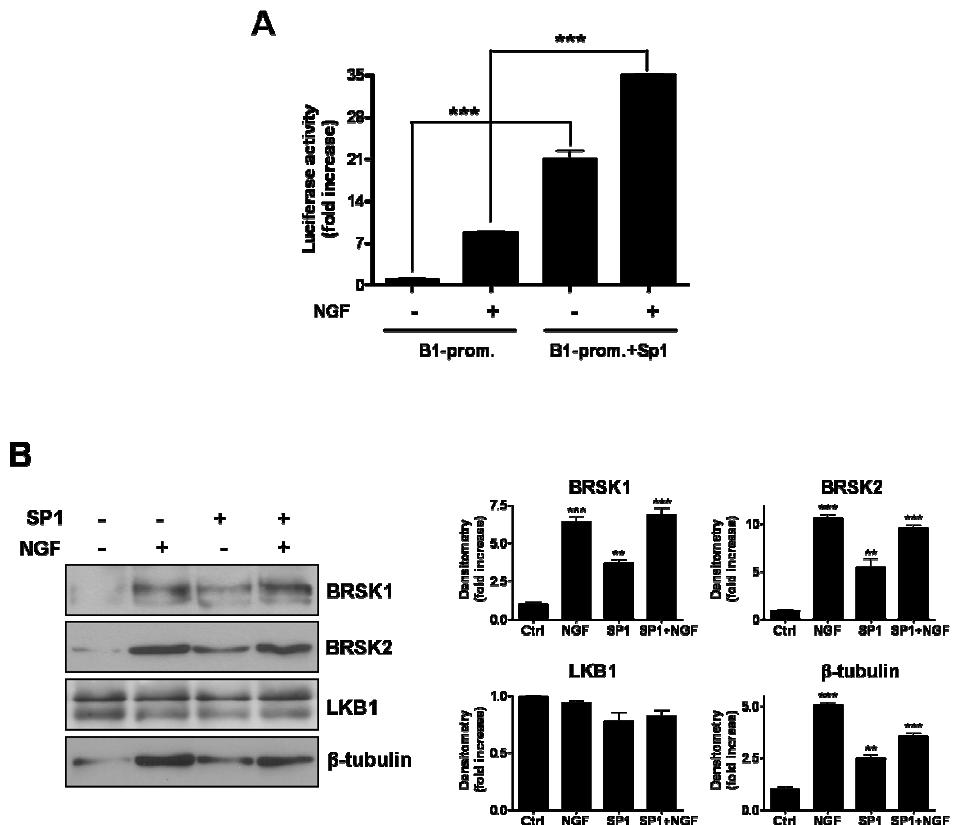


Figura R.22 El factor de transcripción Sp1 media en el aumento de expresión de las BRSKs en respuesta a NGF. (A) Actividad luciferasa de células PC12 co-transfectadas con el vector reporter pGL2-BRSK1-promoter y el vector de expresión pCMV-Sp1, o vector pCMV. En los casos indicados las células fueron tratadas después de 24 horas con 150 ng/ml de NGF durante 24 horas. Actividad luciferasa en niveles de activación respecto a las células transfectadas con los vectores pGL2-BRSK1-promoter y pCMV no tratadas. Los resultados corresponden a medias \pm s.d. de ensayos realizados por triplicado y representativos de tres experimentos independientes (** P<0.01, *** P<0.001). **(B)** Expresión de BRSK1, BRSK2 y LKB1 de células PC12 transfectadas con el vector de expresión pCMV-Sp1 (+) o vector pCMV (-) y, en los casos indicados, estimuladas después de 24 horas con NGF (150 ng/ml) durante 5 días. β -tubulina, marcador de diferenciación neuronal. Los histogramas muestran el análisis densitométrico de los correspondientes inmunoblot en niveles relativos respecto al control (Ctrl, células PC12 transfectadas con el vector pCMV no tratadas) (** P<0.01, *** P<0.001 respecto al control). Resultados representativos de tres experimentos independientes.

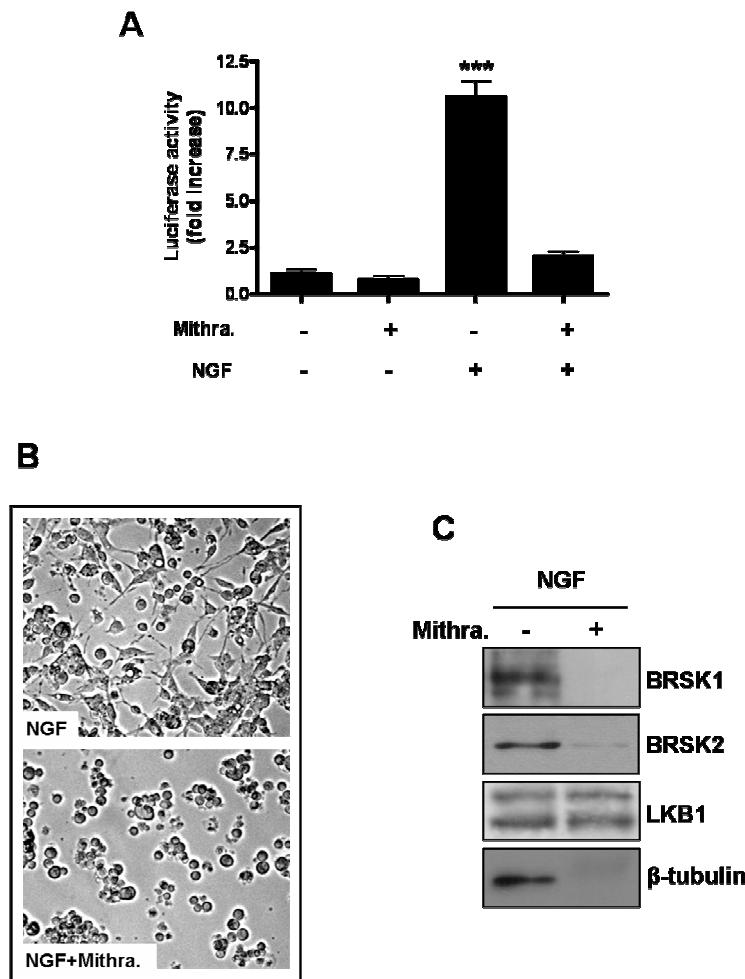


Figura R.23 Efecto del inhibidor de Sp1 Mitramicina A en la expresión de BRSK1 y BRSK2 durante la diferenciación de células PC12 inducida por NGF. (A) Actividad luciferasa de células PC12 transfectadas con el vector reporter pGL2-BRSK1-promoter. En los casos indicados las células fueron tratadas después de 24 horas con 150 ng/ml de NGF durante 24 horas, previo tratamiento con 40 nM de Mitramicina A (Mithra.) durante 45 minutos. Actividad luciferasa en niveles respecto a las células no tratadas. Los resultados son medias \pm s.d. de ensayos realizados por triplicado y representativos de tres experimentos independientes (**P<0.001 respecto células no tratadas). **(B)** Fotografías de contraste de fase de células PC12 tratadas con 150 ng/ml de NGF durante 4 días (imagen superior), y pre-tratadas con 40 nM de Mitramicina durante 45 minutos (imagen inferior). **(C)** Expresión de BRSK1, BRSK2 y LKB1 de células PC12 estimuladas con NGF (150 ng/ml) durante 4 días en presencia (+) o ausencia (-) del inhibidor Mitramicina A (40 nM, 45 minutos). β -tubulina, marcador de diferenciación neuronal. Resultados representativos de tres experimentos independientes.

RESUMEN

Mediante el uso de los anticuerpos anti-BRSK1 y anti-BRSK2 descritos en el capítulo anterior se ha descrito que la expresión de estas quinasas se restringe al cerebro. Mediante ensayo radiométrico de determinación de actividad quinasa de extractos celulares y titulares, se ha determinado que las BRSKs expresadas en cerebro son activas. BRSK1 y BRSK2 se expresan en todas las regiones del cerebro estudiadas, en mayor grado en hipocampo y córtex (áreas con mayor actividad BRSK). Mediante técnicas de inmunoblot e inmunocitoquímica, se muestra que durante el desarrollo ontogénico del cerebro de rata y la diferenciación de neuronas corticales en cultivo, se produce un aumento de expresión de BRSK1 y BRSK2 (pero no su activador LKB1), análogo al del marcador de diferenciación neuronal β -tubulina. Con el objetivo de caracterizar las vías de señalización implicadas en el aumento de expresión de las BRSKs se ha utilizado el modelo de diferenciación neuronal PC12 en respuesta a neurotrofinas. Durante la diferenciación de células PC12 inducida por NGF, se produce un aumento de la expresión de BRSK1 y BRSK2 (paralelo al del marcador de diferenciación β -tubulina), mientras que no se detectan variaciones en los niveles proteicos de la quinasa *upstream* LKB1 o STRAD α . Mediante experimentos de *gene reporter* con la secuencia inédita de 1 kb del promotor de BRSK1, se muestra que el NGF, pero no el EGF, induce la activación del promotor de BRSK1 durante la diferenciación de células PC12. Similares resultados se obtienen en neuronas corticales de rata estimuladas con el factor neurotrófico diferenciador BDNF. Mediante experimentos de sobre-expresión de formas constitutivamente activas de MEK1 y H-Ras (MEK1-EE y H-RasV12), así como el uso de inhibidores de MEK1 (PD98059 y U0126), se muestra que el incremento de la expresión de las BRSKs durante la diferenciación neuronal en células PC12 está mediado por la vía de señalización de ERK1/2. Por último, se muestra que el factor de transcripción Sp1 está implicado en el aumento de expresión de las BRSKs observado durante la diferenciación en células PC12, mediante experimentos de sobre-expresión de Sp1 y uso del inhibidor específico de Sp1 Mitramicina A.