



**BMP-6 i NMDA com a moduladors de la
supervivència de les neurones granulars de
cerebel: mecanismes implicats.**

Bruna Barneda Zahonero

TESI DOCTORAL

Bellaterra 2009



Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Unitat de Bioquímica de Medicina
Institut de Neurociències

BMP-6 i NMDA com a moduladors de la supervivència de les neurones granulars de cerebel: mecanismes implicats.

Memòria de tesi doctoral presentada per na Bruna Barneda Zahonero per optar al grau de Doctor en Bioquímica, Biologia Molecular per la Universitat Autònoma de Barcelona.

El treball ha estat realitzat sota la direcció del Doctor José Rodríguez Álvarez, professor titular del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Bellaterra, 1 d'octubre del 2009

Doctorant

Director de tesi

Bruna Barneda Zahonero

Dr. José Rodríguez Álvarez

A la meva gent

Allà d'allà de l'espai
he vist somriure una estrella
perduda en lo front del cel
com espiga en temps de sega,
com al pregon de l'afrau
una efímera lluerna.
- Estrelleta - jo li he dit-,
de la mar cerúlia gemma,
de les flors de l'alt verger
series tu la darrera?
-No só la darrera, no;
no só més que una llanterna
de la porta del jardí
que creies tu la frontera.
És sols lo començament
lo que prenies per terme.
L'univers és infinit,
pertot acaba i comença,
i ençà, enllà, amunt i avall,
la immensitat és oberta,
i a on tu veus lo desert
eixams de mons formiguegen.

Jacint Verdaguer

ABREVIATURES

AIF: Apoptosis Inducing Factor.
AG: aparell de golgi
AMPA: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
AMPAR: AMPA receptor
AMPK: AMP inducible kinases
Apaf-1: apoptotic protease-activating factor-1
Ara C: Cytosine arabinofuranosid
ASK: apoptosis activated kinase
ATF: Activating transcription factor
ATP: Adenosine triphosphate
Bcl: B-Cell Lymphoma
BDNF: Brain-derived neurotrophic factor
BH: domini d'homologia a Bcl-2
BIR: Baculovirus IAP repeat.
BME: Basal medium eagle
BMP: Bone morphogenetic protein
BMPR: BMP receptor
BSA: Bovine serum albumin
bZIP: Basic leucine zipper domain
Ca²⁺: calci.
Cam: Calmodulin.
CamK: Calmodulin Kinase.
CARD: Caspase recruitment domain
CBP: CREB binding protein
cdk: cicline dependent kinase
cDNA: DNA complementari
CGCs: Cèl·lules Granulars de Cerebel.
CGE: capa granular externa
CGI: capa granular interna
CGP: precursor de les cèl·lules granulars de cerebel
ChIP: chromatin immunoprecipitation
CNK: connector enhancer of KRS
CREB: cAMP Response Element-Binding protein.
CREM: CREB modulator
cRNA: RNA complementari
DAT: dopamione transporter
DED: Death effector domain
DEPC: dietilpirocarbonat
DIV: Dies In Vitro.
D-MEM: Dubelcco's modified eagle's medium
DMSO: Dimethyl sulfoxide
DNA: Deoxyribonucleid acid

Abreviatures

dNTP: Deoxynucleotides triphosphate
DTT: Dithiotreitol
E: dia embrionari
EDTA: Ethylenediamine Tetraacetic Acid
EGTA: Ethyl glycol-bis (beta -amino-ethyl-ether) Tetraacetic Acid
EMSA : assaig de mobilitat electroforètica
ER: endoplasmatic reticulum
ERK: Extracellular signal Regulated Kinase.
FBS: Fetal Bobin Serum
FCS: Fetal Calf Serum
FKH: Forkhead
GABA: gamma-aminobutyric acid
GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GAPs: GTPases activating proteins
GDFs: Growth and differentiation factor
GDP: guanosine diphosphate
GEFs: Guanine nucleotide exchange factors
GFP: fluorescent green protein
GSK3 β : Glycogen Synthase Kinase 3 β .
GTP: guanosine triphosphate
hsp 90: heat shock protein 90
HSV: Herpes virus simplex
IAP: Inhibitor of Apoptosis Protein.
ICAD: Inhibitor of Caspase Activated Deoxyribonuclease
IEG: Immediate early gene
IGF: Insulin Growth Factor.
IRS: substrat del receptor de IGF
JNK: c-Jun NH2-terminal kinase.
K25: 25 mM de potassi.
K5: 5 mM de potassi.
KDa: KiloDaltons
KO: Knock out
KRS1: Ras1 repressor kinase 1
LBA: LB amb ampicilina
Mad: mothers against dpp
MAP: Mitogen Activated Protein.
MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase.
MAPKK: Mitogen Activated Protein Kinase Kinase.
MAPKKK: Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase.
MCS: multiple cloning site
MEF2: myocyte enhancer factor 2
MEK: Extracellular signal regulated kinase kinase.
mg: Miligramo
MH: mad homology domain

MK-801: Dizocilpine maleate
MKPs: MAP Kinases phosphatases (MKPs)
ML: capa molecular
mL: Mililitro
mM: Milimol/litro
MNKs: mapk interacting kinases
MORG1: MAPK organizer-1
MP1: MEK partner-1
MPTP: 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridina (MPTP)
mRNA: RNA missatger
MSK1: mitogen and stress-activated kinase-1
MTT: [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]
Na⁺: Sodio
NF- κB: Nuclear factor κB
NF1: nuclear factor-1
NGF: Nerve Growth Factor.
NMDA: N-methyl-D-aspartic.
NMDAR: NMDA receptor.
NO: Òxid nítric
NP-40: Nonidet P-40
NR1: NMDAR subunitat 1
NR2A-D: NMDAR subunitats 2A-D
NR3: NMDAR subunitat 3
NR4A: Nuclear receptor subfamily 4, group A
NT: Neurotrofina.
p: dia postnatal
PACAP: Pituitary Adenilate Cyclase Activating Polypeptide.
PARP: Poly (ADP-ribose) polymerase
PBS: Phosphate Buffered Saline
PCR: Polimerase Chain Reaction
PDK: Phosphoinositide Dependent Kinase.
PI3K: Phosphoinositide 3-kinase.
PKA: Protein Kinase A.
PKB: Protein Kinase B.
PKC: Protein Kinase C.
PMSF: Phenylmethylsulfonyl fluor
PP2A/B: proteïnes fosfatasses 2A/B
Ptc: patched
PVDF: Polyvinylidene Difluoride
RKIP: Raf kinase Inhibitor
RNA: Ribonucleic acid
RNAi: RNA d'interferència
Rsk: Ribosomal S6 Kinase.
RT-PCR: Reverse transcriptase PCR

Abreviatures

SAPK: stress-activated protein kinases
SBTI: Soybean trypsin inhibitor
SDS: Sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulphate – polyacrilamide gel electrophoresis
Shh: Sonic Hedgehog
shRNA: short hairpin RNA
Smo: smoothened
SN: Sistema Nervios.
SNC: Sistema Nervios Central.
T.E: tampó Tris EDTA
TBE: tampó tris-borate-EDTA
TBS: Tris Buffered Saline
TBS-T: TBS + 0,1% tween
TGF- β : transforming growth factor- β
TH: tyrosine hidroxilase
TM: transmembrana
TNF α : Tumor necrosis factor alpha
TORC: transducers of regulated CREB
VIP: vasoactive intestinal peptide
VMAT2: monoamine vesicular transporter 2
 μ g: Microgram
 μ L: Microlitre
 μ M: Micromol/litre

Doncs au, ja hi som!! Finalment escrivint els agraïments. L'apartat que més és llegirà i que reflexa el que per mi és més important. Per que sí, està bé això de formar-se com a científic, però el millor és poder-ho fer rodejat de gent que participa i t'acompanya durant aquests camí. He de dir que 6 anys (ai, quin mal) donen per molt, així que aquest apartat promet. En aquests 6 anys he viscut moments de tots els colors i m'agradaria agrair-vos-els a tots aquells que m'heu acompanyat i heu fet que aquests hagin estat uns dels millors anys de la meua vida.

Bé, en primer lloc, no pot faltar, el principal culpable de que jo m'hagi liat a fer la tesi, el meu director. Gràcies Pepe. Durant aquests anys hem compartit molts moments, la majoria bons i t'he d'agrair que em captessis pel teu grup. Que em deixessis començar el màster i que finalment em fitxessis per fer la tesi. Gràcies per la confiança que sempre m'has demostrat, i per què no, la llibertat que m'has donat i que a vegades m'ha costat pair. És gràcies a ella que ens formes com ens formes i, mirant enrere, m'agrada i la prefereixo a altres sistemes (tot i que no hagués pensat mai que ho diria, eh). Gràcies per ser un dels meus mestres. I també gràcies per tots els sopars, congressos i de més actes pro-grup que ens han ajudat a tenir un ambient de conya.

Sí sí, de conya, perquè he tingut la sort de tenir un ambient fantàstic per fer la tesi i els responsables d'això, en gran part, han estat els meus companys de grup. Què dic companys de grup, de vida. Mil mercis, Xavi, Nahuai i Alfredo. Xavi, a tu ja t'agrairé més endavant. Nahuai, no hay palabras.... me encantas y me ha encantado compartir mi tesis contigo, hemos vivido tantas cosas que no sabría como resumir todo lo que se me remueve cuando quiero agradecerle tu amistad, cariño y constancia. Has estat com un germà a las buenas y a las malas. Espero que el teu futur estigui ple d'èxits, però sobretot, d'alegries i que me les deixis compartir amb tu. Ai, i el meu Alfredin!!! Ninyu, ets fantàstic!! El meu mestre al lab. M'has ensenyat mil coses tant fora com dins. Jo també recordo quan vaig arribar i el Pepe em va deixar a tu tutela, quina por que em feies al principi, jejeje ;D. Però res, unes llagrimetes, més 6 anys i aquí estem, un gran amic de per vida. Merci per tot, per ensenyar-me en el teu rigor i acceptar, amb el temps, les meves interpretacions,

Agraïments

jeje; per ser sempre allà, per deixar-me l'espatlla i per animar-me i ajudar-me a en tot moment. Mil gràcies nois.

No em deixaré a la resta de components del grup que també han ajudat, a la seva manera, a aconseguir aquesta fita. Merci Rut, ha estat bé compartir la tesi amb tu, tant diligent i tímida, però tant dura i tossuda (casi tant com jo) jeje, espero que tot et vagi bé en el futur. Daniel, ànims que també et queda poc! També hem tingut gent fent estades com la Simona, quina joia, arribaràs lluny segur! o la Laia, qué otra... que divertit va ser compartir lab amb tu i quin gran fitxatge que haguessis estat. I, per acabar, els nous Caterina, Guillem, Jessica i Salva espero que us ho passeu tant bé com jo. Sap greu només haver compartit el meu moment tesi, feu molt bona pinta com a companys de lab.

També en aquests anys han tingut un gran paper tots els personatges que han anat passant i passen pel departament. Gràcies als que hi eren quan jo vaig començar per iniciar-me en cafès, sopars, cases rurals... Will (merci per ensenyar-me en els meus inicis, ets un gran amic), Alex (quin home!), Mar, Sandra, Imane, Alberto, Cristina, Noe (merci per els crossants de xocolata de la bagueta i les visites dels dimarts al matí), heu estat un gran referent a seguir. I els que hi sou: Cristin, Mireia, Irene, Eli (no vas venir als dilluns al sol, però també va per tu), Montse, Murtra (quin gran fitxatge que se pierde, ens veiem pel poble!), Tània (Merici per tots els moments i ànims amb el new jefe, jeje), Roger (Ànims que ja queda menys!! Ojo amb el mate! i menció especial als teus massatges, ets un crack!), Santi (Quin joc de cames que tens, jeje), Moreno (Des de el dia 0 i donant-ho tot!! que vagi molt bé), Barneda (merci per la discografia del pla, sense ella la intro no seria el que és, jeje), Miqui, Mateu (va ser un plaer compartir lab, ets genial), Paulina, Sergi (ai pipiolillo, quin paio!), Vidi (quins inicis al lab i mira't ara, perduda per l'Orient!! Un plaer compartir la tesi amb tu, ho fas tot fàcil, ets genial), Judit, Jorge, Elsa (que grans que sou l'equip de les masmorres, mil gràcies per fer que aquesta tesi hagi esta més divertida), Arantza (ets un sol), Gerard, Tatiana, Tina (ets la reina!! m'ho vaig passar molt bé mentre compartíem poyata i despatx), Fernando, Victoria, Rana, Albert, Gema, Marta i Laura gràcies a tots per seguir amb les tradicions, jeje, i fer, que fer la tesi al departament hagi estat una sort.

I les “nenes al sol”? Merci boniques per ser les meves nenes del dept amb tot el que això comporta. M'ha encantat compartir cafès, passadissos, dinars, berenars i mil coses amb vosaltres. Gràcies per ser sempre allà per tirar un cable o el que faci falta. Simplement, GENIALS! Espero que mantinguem això per molt de temps!!!!

Aquest departament és lo más, no només pel “potencial científic” sinó per tota la gent que el forma, des d'els d'administració fins als grups. Mil gràcies als de secretaria, per ser tant servicials i fer-nos-ho tot tant fàcil. Gràcies Melchor, per ser tant *cabron* i estar sempre per tot el que se't demana, que GRANDE que ets! Merci Carlos per seguir les passes del Mel i ser tant fàcil de tracte i diligent. Merci Isabel, Santi, Oscar i David per ser tant fantàstics. També m'agradaria mencionar aquelles persones que des de fa més o menys temps ens estan ajudant a fer més fàcil el dia-dia. Eli, Susana (2 paraules, im pesionante!! jeje, vals molt en tots els sentits) i Cris (que decir, lo das todo y eres buena, animo con todo lo que llevas entre manos, estoy segura que te saldrás con la tuya! y cuenta conmigo para que ello suceda).

També agrair als jefes: l'Aguilera, el Pica, la Cesca, la Pepi, l'Isaac, la Mercè, l'Enrique, el Saura, la Elena, el Lizcano, el Victor, el Comella, el JM, el Bayascas, el Gil, l'Ortiz i la Roser amb qui he tingut bona relació. Especialment, m'agradaria agrair al Bayascas la paciència que ha tingut per explicar-me les mil i una de la biologia molecular.

I més gent de la ciència que d'alguna manera o altre he anat coneixent. Merci Guillermo, transmetes amor per la ciència i els que t'envolten i ho fas tot fàcil, ets un gran referent per mi. Espero que tu, la Raquel i els nens estigueu de conya, aviam si ens veiem aviat. Joan-Marc, que sense voler-ho i gràcies a les coneixences del meu home has esdevingut un punt clau en la meva tesi. Moltes gràcies per la teva assequibilitat i “prestància”, sense tu encara estaria barallant-me amb les dades de l'array!! Espero que aconseguis tot el que et proposis en el futur.

També hi ha els que m'acompanyen des de sempre des de fora. Roger i Marc ha estat un plaer compartir amb vosaltres barces, jocs de taula i moltes converses. gràcies nois. A la gent del “despatx”, merci per tractar-me tant bé i acollir-me en el

Agraïments

meu moment escriptura. Ioanna gràcies per estar sempre disposada a ajudar., espero que et vagi molt bé la nova aventura.

I, les meves nenes, Fornells, Janu, Melo, Llimós, ja ho sabeu, sou puntals de la meua vida, sense vosaltres no podria fer res. Ens veiem menys, sí, però es que els germans sempre hi són, oi?. Mil gràcies.

I la family. Gràcies Sarais, Amparo, Xevi, Joanito, Josep Lluís, Bernadet, Magda, tiets, Pepis i Lucre a tots, vaja, per recolzar-me sempre i mostrar-me el vostre amor incondicional. També la meua família política, GRÀCIES Fina, Francesc, Marc, Alexandre, Teresa, Valèria, Nico i Ariela, m'heu fet sentir com a casa. I mil milions de gràcies Fina, Marc i Francesc per les mil i una cobertures que ens heu donat.

Bé, i el nucli dur... Mama, Papa i enanito. Us estimo. És evident que sense vosaltres res d'això podria ser. M'heu recolzat, guiat, aconsellat, mimat i mil coses més en el meu camí cap a la Figuera (oi, Papa ;D). Papa, gràcies, perquè sempre ets allà escoltant i donant suport a totes. Mama, ets la millor, sempre seràs el reflex on em vull emmirallar. Ho has donat tot per mi. Si soc el que soc és perquè sempre t'he tingut de model i se que tot el que aconseguixi o sigui en aquesta vida serà gràcies a tu. GRÀCIES. Enanito (1,96 m) com m'agrada ser la única que et pot dir així, jeje, merci per tot, les cobertures, les vingudes a buscar a la UAB, els massatges, les abraçades i tots els moments que compartim. Ets fantàstic i tot el que vull és que siguis molt feliç!!!

Finalment, els tresors que tinc a casa. Gràcies Xavi. M'encanta compartir la vida amb tu. Gràcies per l'amor que em dones, que em dona vida. Gràcies per tots els consells científics o no. Gràcies per la paciència i el suport. Aquesta tesi també és teva. T'estimo. I les dos cosetes que em donen sentiment... Iu i Anna. Mil gràcies Iu perquè sense adonar-te'n has aguantat el que és una tesi, què puc dir, soc la mare... ets el més meravellós que hi ha! Annetta 8 mesets ja! i la cosa promet. Sou el que em fa feliç cada matí. Gràcies amors.

I - INTRODUCCIÓ

1. El cerebel. Estructura i desenvolupament.

El cerebel està englobat en l'encèfal posterior o romboencèfal. Mitjançant estudis amb lesions, se l'ha associat amb el control de l'activitat motora, la postura i l'equilibri, l'aprenentatge motor, la regulació del to muscular i la coordinació dels moviments en el temps. Per altra banda, també se l'hi ha atribuït un paper en funcions com la modulació de les emocions, l'organització del comportament i el llenguatge. Al llarg dels anys el cerebel ha estat àmpliament estudiat per l'alta correspondència que existeix entre funció i estructura en la seva escorça (Eric R.Kandel et al., 2000).

1.1. Estructura del cerebel.

El cerebel a nivell macroscòpic, es caracteritza per semblar un cervell en miniatura ja que el formen un conjunt de nuclis coberts per una escorça altament replegada. En aquesta escorça hi trobem vuit poblacions neuronals diferents: les cèl·lules de Purkinje, les cèl·lules granulars, les cèl·lules de Golgi, les cèl·lules Lugaro, les cèl·lules en cistella, les cèl·lules estelades, les cèl·lules unipolars en raspall i les cèl·lules de canelobre (Cajal, 1911;Laine and Axelrad, 1994;Mugnaini and Floris, 1994). D'aquestes poblacions, només les cèl·lules de Purkinje innerven fora del cerebel, la resta formen part de la circuiteria cerebelar (Sotelo, 2004).

L'organització anatòmica dels circuits de l'escorça cerebelar fou establerta per Cajal al 1911. Cajal va definir tres capes en l'escorça de mamífers i aus. La més superficial, on hi ha poca densitat cel·lular i alta incidència de sinapsis és la capa molecular. La més profunda, que exhibeix una altíssima densitat cel·lular, on trobem les cèl·lules granulars, s'anomena capa granular. I, finalment, entre les dos anteriors trobem una capa fina que conté els somes de les cèl·lules de Purkinje i es coneix com la capa de les cèl·lules de Purkinje (Cajal, 1911;Apps and Garwicz, 2005).

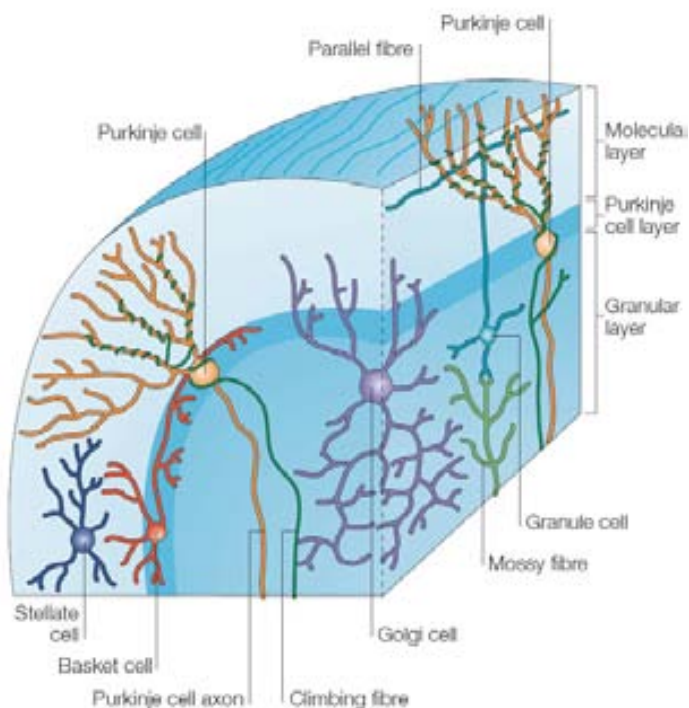


Figura 1. Estructura bàsica de l'escorça del cerebel. Esquema de l'arquitectura de l'escorça cerebelar i les principals vies aferents (*mossy* i *climbing fibres*). En l'esquema es representen les tres capes (molecular, de Purkinje i granular) que componen l'escorça i les diferents cèl·lules presents en cada una d'elles (Apps and Garwicz, 2005).

1.2. Desenvolupament del cerebel.

El cerebel deriva de l'ala dorsal de la placa del tub neural. Les seves cèl·lules provenen d'una matriu germinal que inicialment està associada a l'istme i, posteriorment, al plexe coroide. Aquesta matriu, en les primeres fases, consta d'un neuroepiteli ventricular i una zona germinal més caudal, altrament anomenada, llavi ròmbic.

Així, el desenvolupament del cerebel consta de dos fases, una embrionària i una postnatal. En l'etapa embrionària, del neuroepiteli ventricular es generen les cèl·lules

formadores dels nuclis profunds i les de Purkinje (a dies embrionaris E10-E13 en ratolí). Mentre que del llavi ròmbic sorgeixen els precursors de la que serà la segona capa germinal, la capa granular externa (CGE), i les cèl·lules de Golgi. En la fase postnatal, la CGE sembla la capa granular interna (CGI) de cèl·lules granulars i es generen les cèl·lules estelades i les de cistella que colonitzaran la capa molecular. En aquesta mateixa etapa, els neuroblast de les cèl·lules granulars migren a través de la capa molecular i la de cèl·lules de purkinje, amb l'ajuda de la glia de Bergman per establir-se a la CGI, deixant d'existir la CGE cap a finals de la tercera setmana de vida (Chizhikov and Millen, 2003; Millen and Gleeson, 2008).

2. El desenvolupament de les neurones granulars de cerebel (CGCs). Factors implicats.

Com hem vist en l'apartat anterior, els precursors de les CGCs es generen de la primera zona germinal, migren tangencialment per sobre el cerebel en desenvolupament per donar la CGE, (Ryder and Cepko, 1994; Hallonet and Alvarado-Mallart, 1997) on proliferen i, finalment migren radialment per formar la CGI (Hatten, 1990). Durant tot aquest procés aquests neuroblasts experimenten proliferació, migració, diferenciació i, en gairebé la meitat dels casos, mort (vegeu Figura 2). Tots aquests processos són controlats per un seguit d'estímuls que han estat focus d'estudi al llarg dels anys.

2.1. Control de la proliferació dels precursors de les CGCs.

En la primera etapa del desenvolupament de les CGCs s'ha vist que la proliferació dels neuroblasts provinents de la primera zona germinal dependria de l'expressió de gens implicats en el cicle cel·lular com la ciclina D2 (Huard et al., 1999) i gens reguladors de l'expressió de neurotrofines com Barhl1 entre d'altres (Li et al., 2004).

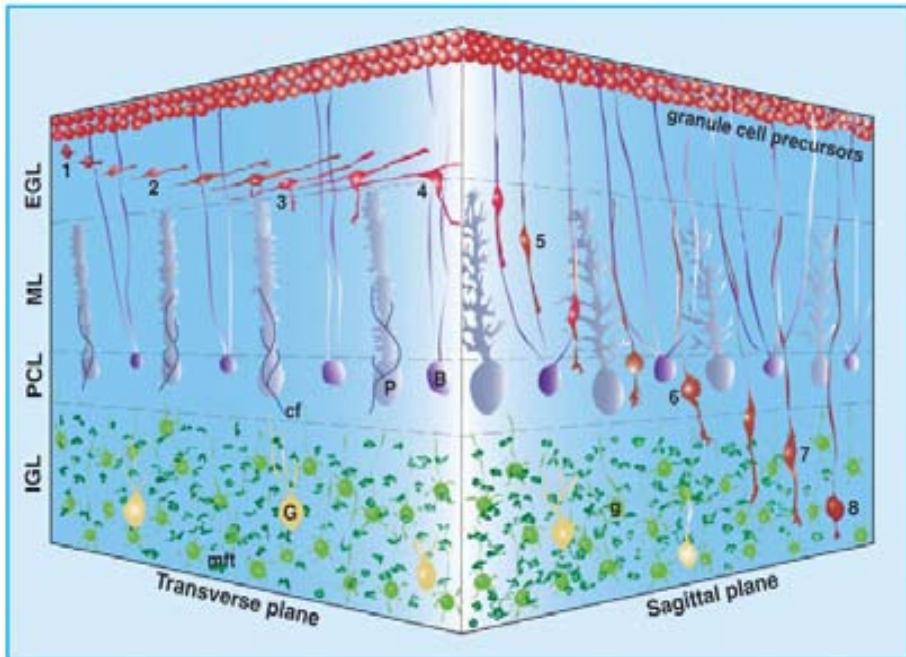


Figura 2. Desenvolupament de les neurones granulars del cerebel. Diagrama esquemàtic del procés de migració (1-8) i diferenciació de les CGCs durant el desenvolupament postnatal del cerebel. Abreviatures: EGL, Capa granular externa; ML, capa molecular; PCL, Capa de cèl·lules de Purkinje; IGL, capa granular interna; P, cèl·lula de Purkinje; B, glia de Bergmann; G, Cèl·lula de Golgi; g, postmigratory granule cell; cf, climbing fibre; mft, mossy fibre terminal. (Komuro and Yacubova, 2003).

Postnatalment, la proliferació és anterior a la migració i sembla que estaria majoritàriament controlada per Sonic Hedgehog (Shh) (Dahmane et al., 1999; Wechsler et al., 1999). Els precursors de les granulars (CGPs) de la CGE expressen notch2 (Solecki et al., 2001), patched (Ptc), smoothened (Smo), gli1 i gli2, els quatre últims implicats en la senyalització de Shh. Shh és una glicoproteïna secretada per les cèl·lules de Purkinje (Traiffort et al., 1998;Traiffort et al., 1999) i s'ha vist que seria el protoncogen N-myc el que mediarà l'efecte proliferatiu en les granulars per activació de Shh (Park et al., 2000;Kenney et al., 2004). N-myc regularia a la baixa els inhibidors de les ciclins dependents de cinasa Kip1 i Ink4c (Zindy et al., 2006). I,

més recentment, s'ha descrit que Mad3 seria la encarregada de incrementar l'expressió de N-myc en resposta a Shh (Yun et al., 2007).

Per altra banda, al laboratori de Alvarez-Buylla han descrit mitjançant l'ús de mutants condicionals que Kif3a, quinesina membre de la família 3A, regularia epistàticament a Smo en el cili primordial dels progenitors de les cèl·lules granulars i al torn la senyal de Shh (Yun et al., 2007; Spassky et al., 2008). També s'ha trobat que participen d'aquest procés els microRNAs, tant positivament, com miR-17/92 que és induït per N-myc i participa en la seva resposta, com negativament i participant del pas de proliferació a diferenciació com el sistema de miR-125b, miR-326 i miR-324-5p (Ferretti et al., 2008; Northcott et al., 2009).

Altres factors participen coordinadament amb Shh en la proliferació dels CGPs. Els *insuline growth factor 1 i 2* (IGF-1 i IGF-2) activen la fosfoinosítid-3 cinasa (PI3K) per unió al seu receptor, aquesta inhibeix la proteïna glicogen sintasa cinasa 3 β (GSK3 β) encarregada de senyalar N-myc per dirigir-lo al proteosoma, potenciant d'aquesta manera la senyal de Shh (Kenney et al., 2004; Mill et al., 2005). A més a més, s'ha descrit que Shh promou l'estabilització del mRNA del substrat del receptor d'IGF1, IRS1, interferint en la via de m-TOR i afavorint la seva traducció. La presència del shRNA de IRS1 redueix l'efecte de Shh en la proliferació del CGPs en cultiu organotípic de cerebels de rates de p5 (Parathath et al., 2008).

2.2. Senyals responsables del pas de proliferació a diferenciació.

La Shh produïda per les cèl·lules de Purkinje mediarà la proliferació però no participaria del procés de diferenciació (Lewis et al., 2004). Pons i cols., van proposar un mecanisme cel·lular que podria parar aquesta senyal basada en la participació de molècules de la matriu extracel·lular. La vitronectina, glicoproteïna de la matriu extracel·lular, per una banda interaccionaria amb Shh i n'impediria l'acció proliferativa i per l'altre a través de la unió amb el seu receptor ($\alpha 5$ integrina) induiria la fosforilació del factor de transcripció CREB (*cAMP Response Element Binding protein*), induint la diferenciació (Pons et al., 2001). Reforçant el paper de CREB com a inductor de la diferenciació hi ha el treball de Kaltschmidt i cols., que

mostra com CREB activat induiria l'expressió de TGF β 2, promouria la regulació a la baixa el factor de transcripció NF κ B altament expressat en precursors granulars en proliferació, donant pas a la diferenciació a CGCs (Kaltschmidt and Kaltschmidt, 2001).

Unes proteïnes importants en la inducció de la diferenciació a cèl·lules granulars són les Proteïnes Morfogenètiques d'Os (Bone Morphogenetic Proteins; BMPs). D'aquestes s'ha descrit una acció oposada a Shh en molts paradigmes de desenvolupament (Zhu et al., 1999a; Mekki-Dauriac et al., 2002; Patten and Placzek, 2002). Tant en cultius organotípics, com en cultius primaris s'ha observat que BMP-2 i BMP-4 són capaces d'inhibir l'efecte proliferatiu de Shh, activant Smad 5 o Smad 1 (proteïnes que participen en la senyalització de BMPs) respectivament, i induir la diferenciació a cèl·lules granulars (Anglely et al., 2003; Rios et al., 2004; Alvarez-Rodriguez et al., 2007). A més, Alder i cols., va observar la inducció del fenotip de CGC mediat per l'acció de les BMPs en cèl·lules extretes de la part ventral del tub neural, com també que cèl·lules d'aquesta mateixa regió cultivades i tractades amb BMPs esdevenien CGCs quan es trasplantaven a un cerebel immadur (Alder et al., 1999). En la mateixa direcció, buscant les possibles maneres de generar neurones granulars de cerebel madures per poder ser utilitzades en teràpia substitutiva, Salero i Hatten, tractaren amb BMP-6 i BMP-7 junt amb altres factors reconeguts per la seva participació en el desenvolupament d'aquestes neurones com Shh o fgf8, cèl·lules pluripotents embrionàries i obtingueren CGCs que implantaren amb èxit en cerebels de ratolí (Salero and Hatten, 2007). Reforçant, encara més, el paper de les BMPs com a controladores de la diferenciació, s'ha descrit l'expressió per part dels precursors de les granulars, des de les primeres etapes, de gens que s'activen en resposta a elles com math1, de la família dels factors de transcripció bHLH (Ben Arie et al., 1997; Helms et al., 2001), o els factors de transcripció de dits de Zinc zipro 1 (Yang et al., 1996; Yang et al., 1999) Zic 1, Zic 2, Zic 4 (Aruga et al., 1994; Aruga et al., 1996; Aruga et al., 1998; Aruga et al., 2002), tots ells considerats marcadors de diferenciació a CGCs.

Al polipèptid activador de l'adenilat ciclase de la pituitària (*pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*, PACAP), neuropèptid de la família del pèptid

vasoactiu intestinal (*vasoactive intestinal peptide*, VIP), també se l'hi atribueix un rol en el pas de proliferació a diferenciació de les CGCs. Ja que, a part del seu paper de supervivència (Villalba et al., 1997; Vaudry et al., 2000), també se l'hi ha atribuït capacitat antimitogènica (Suh et al., 2001). En els ratolins KO (*knocked out*) per PACAP les CGCs no aconsegueixen entrar en el programa de diferenciació (Allais et al., 2007). Com a efector de PACAP en l'efecte diferenciador s'ha proposat el gen supressor de tumors *Lot1*. *In vivo* la injecció intracranial a nivell del cerebel amb PACAP n'indueix un increment en l'expressió i, aquest, induïx l'expressió del receptor de PACAP produint una potenciació de la resposta (Fila et al., 2009)

En els últims anys, s'ha descrit que La pro-hormona convertase 1/3, gene primerament aïllat en resposta a NGF en cèl·lules PC12, regula a la baixa els nivells de ciclina D1 i així inhibeix la proliferació dels precursors de les neurones granulars senyal que se suma a la resta per induir la diferenciació (Canzoniere et al., 2004; Farioli-Vecchioli et al., 2007).

Per últim, un fenomen que participa també de la diferenciació de les CGCs és el canvi d'expressió dels receptors de GABA_A i de NMDA. Aquests canvis confereixen a les CGCs diferents estats electrofisiològics que les fan més o menys sensibles a canvis en el seu entorn. Sent menys sensibles en un inici i anar guanyant en sensibilitat a mesura que van madurant. Així doncs, s'ha descrit que en *in vivo* els CGPs expressen les subunitats $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 3$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, del receptor de GABA_A i que, a etapes més avançades a la CGI, les $\alpha 2$, $\alpha 3$, i $\gamma 1$ són regulades a la baixa i s'expressen la $\alpha 1$, $\alpha 6$, i δ (Mellor et al., 2000). Pel que fa al receptor de NMDA (NMDAR) tenim un comportament similar, ja que en un inici es dona l'expressió de les subunitats NMDAR2A (NR2A) i NMDAR2B (NR2B). A mesura que va madurant el cerebel NR2B va desapareixent progressivament mentre augmenta l'expressió de NMDAR2C (NR2C). Aquestes subunitats del receptor confereixen diferents conductàncies al Ca²⁺ al porus del canal iònic del receptor (Nakanishi and Okazawa, 2006). Tanmateix, s'ha descrit que la fosfatasa calcineurina juga un paper important en la regulació de l'expressió d'aquests marcadors de maduració de les CGCs. S'ha descrit que la inhibició de calcineurina induïx l'expressió de la subunitat NR2C del NMDAR i les subunitats $\alpha 1$ i $\alpha 6$ dels receptors GABA_A, tanmateix també

induiria l'estabilització de MEF2A (*myocyte enhancer factor 2A*) en forma de repressor participant de la diferenciació i del creixement dendrític de les CGCs (Suzuki et al., 2005; Sato et al., 2005; Shalizi et al., 2006; Okazawa et al., 2009).

2.3. La migració de les CGCs. Condicionants implicats.

Tal com hem descrit a l'inici de l'apartat 2, els precursors de les CGCs migren en dos moments en el seu desenvolupament. Dels factors que influeixen en la primera migració de cèl·lules des de la zona germinal caudal se'n coneix poc, només s'ha descrit que la Netrina i el seu receptor, UNC5H3, podrien jugar un paper molt important en la definició dels límits del cerebel (Ackerman et al., 1997).

Pel que fa a la migració des de la CGE a la CGI s'ha vist, mitjançant l'anàlisi de KOs i la utilització d'anticossos, que la supervivència i migració de les granulars és dependent d'un bon estat i ordenació de la glia radial (Rakic and Sidman, 1973; Anton et al., 1996; Cameron et al., 1997; Rio et al., 1997; Lin et al., 2009). Molècules, relacionades amb el control de la homeòstasi iònica de la cèl·lula, com el NMDAR (Komuro and Rakic, 1996), la subunitat $\beta 1$ del canal de sodi voltatge dependent (*scn1b*) (Brackenbury et al., 2008) i la proteïna acoblada a proteïna G associada a canals de potassi GIRK2 (Patil et al., 1995) també hi participarien. En la regulació de la migració per el NMDAR, es creu que seria el receptor que es troba fora de sinapsi el que seria l'implicat en el procés i que l'expressió de la subunitat NR2B participaria activament, ja que la sobreexpressió d'aquesta resulta en un increment de la migració de les CGCs (Tarnok et al., 2008).

En els últims anys hi ha hagut diversos estudis que han anat atribuint al gradient de BDNF i l'expressió del seu receptor TrkB un paper rellevant en aquest procés. En el treball de Zhou i col., van més enllà i descriuen com l'endocitosi d'aquest receptor unit a bdnf participaria també en un procés de polarització intracel·lular que seria rellevant per guiar la cèl·lula cap a la CGI (Segal et al., 1992; Borghesani et al., 2002; Zhou et al., 2007).

La interacció cèl·lula-cèl·lula té una especial rellevància en el control de la migració. Així doncs, la interacció entre les integrines RGD-depenents i NOV/CCN3 de la matriu cel·lular regula la migració dels progenitors de les CGCs (Le et al., 2009). El control de l'expressió de molècules d'adhesió per el factor de transcripció NFI es tradueix en la regulació de formació d'axons, dendritogenesi i comportament migratori de les CGCs (Wang et al., 2007c). Així també, la unió de Semaforina 6A (Sema6A) amb el seu receptor plexina-A2 indueix un increment de la fosforilació de la ciclina depenent de cinases 5 (cdk5) que s'ha implicat fortament en la migració neuronal mitjançant l'ús de KOs. Aquest efecte també s'havia atribuït a Sema3A. Les dades de Renaud i cols., suggereixen la participació de Semaforines i els seus receptors, les plexines, en la regulació de la migració a través del control de la translocació del nucli del centrosoma. A més, el mateix grup, prèviament, va descriure la necessitat de l'expressió de Sema6A en els CGPs per tal de fer el *switch* de la migració tangencial a la radial (Kerjan et al., 2005; Renaud et al., 2008).

2.4. La mort participa de l'establiment de les CGCs en el desenvolupament del cerebel.

Per inèrcia s'acostuma a associar desenvolupament amb proliferació i mort amb malaltia, però ja a principis del segle XX, es va veure que en el desenvolupament del sistema nerviós hi havia mort neuronal (Ernst and Inke, 1962; Glucksmann, 1965). Més tard, cap a la dècada dels 70, es va observar que es tractava d'un tipus de mort molt diferent de la necrosi. Kerr la caracteritzà i li donà el nom de mort cel·lular programada o apoptosi (Kerr et al., 1972).

La funció de l'apoptosi en el desenvolupament neuronal és controlar i establir el nombre de neurones finals. Inicialment hi ha una superproducció de neurones, seguida d'una mort apoptòtica de totes aquelles que no hagin tingut un desenvolupament normal o hagin establert connexions defectuoses (Changeux and Danchin, 1976). D'aquesta manera, es determinarà no només el nombre de neurones sinó també la correcta connexió entre elles, així com la correcta migració (Oppenheim, 1991). A partir d'aquí, molts investigadors es van centrar en estudiar

com el sistema era capaç de regular aquesta mort massiva i com es dictaminava quines neurones havien de sobreviure i quines no.

D'aquí es va generar la teoria neurotròfica on Levi-Montalcini (1978) va postular dues hipòtesis. La primera consistia en que la supervivència de les neurones en el desenvolupament dels vertebrats depèn de l'alliberació de factors tròfics secretats per les pròpies cèl·lules dianes, que les neurones innervaran posteriorment. I la segona era que només les neurones que rebin el suficient suport tròfic sobreviuran, les restants moriran per apoptosi. Més tard, van anar apareixent evidències de que no només són necessaris per un bon desenvolupament els factors tròfics sinó que també hi jugaria un paper clau l'alliberació de senyals pro-mort (Nagata, 1997).

L'apoptosi en el desenvolupament és generalitzada a tot el sistema nerviós i, per tant, la teoria neurotròfica també és aplicable a tot ell. En el desenvolupament del cerebel es produeix doncs una important acció tròfica i una activitat tant antiapoptòtica com proapoptòtica. Com ja hem esmentat, no tots els neuroblasts que es generen a la CGE acaben formen part de la CGI. Molts d'ells, aproximadament la meitat, moren per apoptosi o mort cel·lular programada ja sigui a la CGE o a la CGI (Raff et al., 1993; Wood et al., 1993). Per tal de que aquestes cèl·lules tinguin un correcte desenvolupament necessiten l'aportació de tot un seguit d'estímuls excitadors (Williams and Herrup, 1988; Wood et al., 1993), l'acció de diferents factors tròfics, com el factor de creixement derivat de la insulina-1 (IGF-1), el factor neurotròfic derivat del cervell (*brain derived neurotrophic factor*, BDNF), PACAP i les neurotrofines 4 i 5 durant estadis immadurs i la neurotrofina 3 en estadis madurs. Així com també de senyals proapoptòtiques com les exercides per TGF- β i Fas lligand (Vaudry et al., 2003).

Tot i que la presència de les cèl·lules de Purkinje és imprescindible per a la correcta migració i maduració de les CGCs, aquesta situació *in vivo* es pot estudiar *in vitro*, realitzant un cultiu pur de neurones granulars de cerebel. El cultiu primari de CGCs és un model àmpliament usat per a l'estudi dels efectes neurotròfics o neurotòxics de diversos factors i ha aportat informacions crucials dels mecanismes implicats en l'apoptosi neuronal. A partir de diferents concentracions de potassi extracel·lulars, es

pot aconseguir que les neurones sobrevisquin o morin per apoptosi. Si les CGCs creixen en un medi amb concentracions fisiològiques de potassi (5mM; K5) moren per un procés que s'ha descrit apoptòtic. En canvi, si el medi conté concentracions despolaritzants de potassi (per exemple 25mM; K25) sobreviuran i es desenvoluparan (Gallo et al., 1987). La influència del potassi és semblant quan les neurones són madures. Si es deixa madurar les CGCs en un medi K25 i, posteriorment, es depriven de potassi, moren per apoptosi (D'Mello et al., 1993). Es postula que l'alta concentració de potassi substituiria d'alguna manera els estímuls excitadors que, *in vivo*, permeten la supervivència i el desenvolupament de les neurones granulars.

Una altre manera d'estimular les neurones perquè sobrevisquin contra la mort induïda per K5 es afegint factors tròfics al medi. Un dels més ben establerts és l'efecte protector de IGF-1 (D'Mello et al., 1993), però també cal destacar-ne d'altres: el BDNF (Kubo et al., 1995), el PACAP (Gonzalez et al., 1997; Villalba et al., 1997), o l'agonista glutamatèrgic N-metil-D-aspartic (NMDA) (Balazs et al., 1988; Xifro et al., 2005).

3. L' Apoptosi.

Com veníem dient en l'apartat anterior, l'apoptosi participa de molts processos, ja sigui de desenvolupament o de malaltia. Per aquesta raó aquest procés ha estat el focus d'estudi de molts grups d'investigació en els darrers 30 anys, ja sigui el mateix mecanisme d'execució com els possibles factors que el regulen.

Així doncs, l'apoptosi és un tipus de mort cel·lular programada i es caracteritza per ser un procés altament controlat per la cèl·lula que resulta en una mort "continguda" en un intent de no danyar l'entorn de dita cèl·lula ni d'induir la resposta del sistema immunitari. El control d'aquest programa arriba fins el punt que és necessària la síntesi proteica *de novo* per tal de ser executat (Umansky, 1982). Tanmateix, s'han descrit uns trets claus de les cèl·lules durant aquest procés, com són la pèrdua de volum cel·lular, la condensació de cromatina, la fragmentació del nucli cel·lular, la desestructuració d'òrgànuls cel·lulars: reticle endoplasmàtic (ER), l'aparell de Golgi i

la mitocondria, i, en últim terme, la formació dels cossos apoptòtics. (Fraser et al., 1996; Taylor et al., 2008).

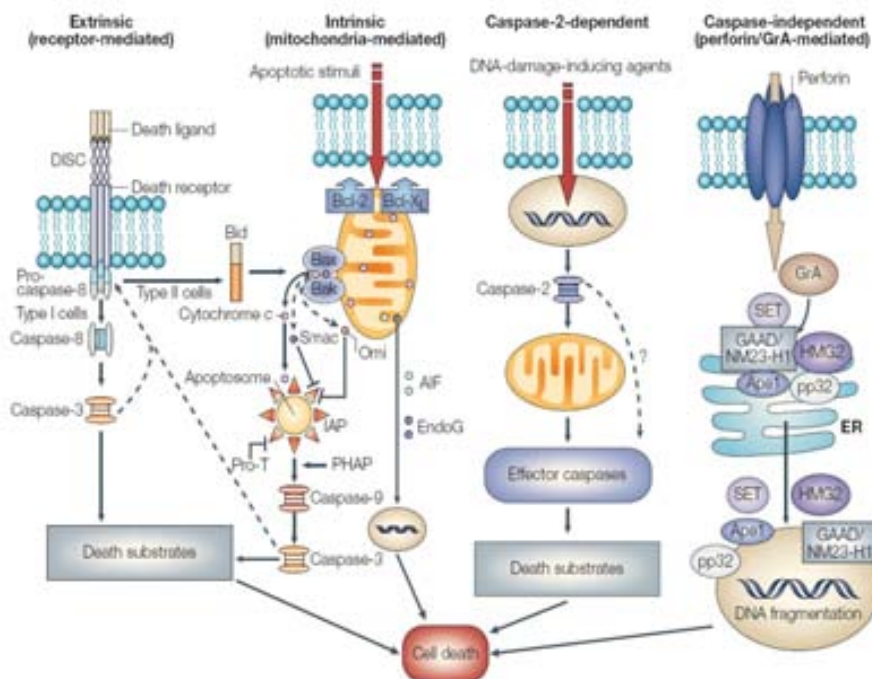


Figura 3. Vies de senyalització que poden desencadenar apoptosi. Esquema general dels diferents tipus de cascades de senyalització que promouen l'apoptosi i la interacció entre elles. (Orrenius et al., 2003)

La mort apoptòtica pot ser causada per l'activació de varies cascades de senyalització. Com es veu a la figura 3, l'apoptosi es pot desencadenar per activació de receptors de mort que, al torn, poden activar la caspasa 8 resultant en l'activació de manera directe o indirecte, depenent del tipus de cèl·lula, de la caspasa 3 que proteolititzaria els seus substrats induint la mort de la cèl·lula. Aquesta és la via que es coneix com a extrínseca. Per altre banda, existeix la via intrínseca, que es principalment regulada per els membres de la família Bcl-2 i que es caracteritza per la formació de porus a la membrana mitocondrial resultat del desplaçament de Bcl-2 i Bcl-xL i la inserció d'oligòmers Bax i/o Bak. Aquesta formació de porus promou

l'alliberament de citocrom *c* al citoplasma, que junt amb *apoptotic protease-activating factor-1* (Apaf-1) i la caspasa-9 formen l'apoptosoma que tallarà la caspasa-3 activant-la i desencadenant la mort. Altrament, el dany al DNA pot activar la caspasa-2 que indueix l'alliberament de citocrom *c* i la mort per activació de les caspases 9 i 3 com en la via intrínseca. Existeixen vies independents de l'activació de caspases com la del factor proapoptòtic alliberat de la mitocondria, AIF (*apoptosis inducing factor*). Aquest transloca a nucli induint la condensació de cromatina i s'ha descrit com a citoplasma actuatoria sobre la maquinària de traducció promovent l'apoptosi (Joza et al., 2009). També cal esmentar la via de l'estrés reticular provocat per l'acumulació de proteïnes mal plegades que convergeix amb la via intrínseca a la mitocondria i en que també hi participa la caspasa-12 .

Donat la seva complexitat, l'apoptosi és un procés que té un punt de no retorn, moment en el que per molt que la cèl·lula rebi estímuls pro-supervivència la mort es desencadena inexorablement. Aquest moment, dependrà molt del tipus cel·lular i de l'entorn en que es trobi la cèl·lula en qüestió. En el cas del cultiu *in vitro* de les CGCs depèn de si ens trobem davant de CGCs madures o immadures. Sent el cas de les últimes, les CGCs poden estar fins a 3 DIV en condicions proapoptòtiques (K5) abans de que el procés de mort programada no es pugui aturar (Gallo et al., 1987). En el cas de sotmetre a K5 les CGCs madures, en consonància amb que la mort també es desencadena més ràpidament, la finestra de possible rescat és només de 4 hores.

3.1. Les efectores de la mort apoptòtica, les caspases.

Existeix una família de proteïnes que participen molt activament en tot el procés apoptòtic, les caspases (*cystein aspartic acid-specific proteases*) (Alnemri et al., 1996). Aquestes són proteases que han estat altament conservades durant l'evolució, les trobem des de nematodes a humans. Contenen tres dominis: un prodomini N-terminal, d'interacció amb altres proteïnes, una subunitat llarga que conté el centre actiu format per una cisteïna dins un motiu altament conservat QACXG (p20) i una subunitat petita al C-terminal (p10) (Stennicke and Salvesen, 1998). Fins al moment se n'ha descrit 14 diferents, i es divideixen en dos subfamílies

depenen de si participen en el procés apoptòtic o participen en el processament de citoquines inflamatòries, com són les caspases -1,-4, -5, -11 i -14. Dins les caspases apoptòtiques tenim dos grups, les que s'anomenen iniciadores, com són les caspases -2, -8, -9,-10 i -12 i les executores o efectores, les caspases -3,-7 i -6 (vegeu la Figura 4). Les caspases iniciadores com bé es desprèn del seu nom són les que estan en l'inici de la cascada apoptòtica i són les encarregades de produir el tall en les executores per tal d'activar-les. Les efectores són les encarregades de tallar tot un conjunt de substrats que desencadenen el fenotip apoptòtic.

Les caspases es sintetitzen en forma de zimògens contenint els tres dominis que hem esmentat anteriorment. L'activació d'aquestes passa per la proteolisi amb el següent alliberament dels fragments p20 i p10, donant l'enzim madur que en la majoria dels casos serà un heterotetràmer d'aquestes subunitats 2 a 2 (Hengartner, 2000).

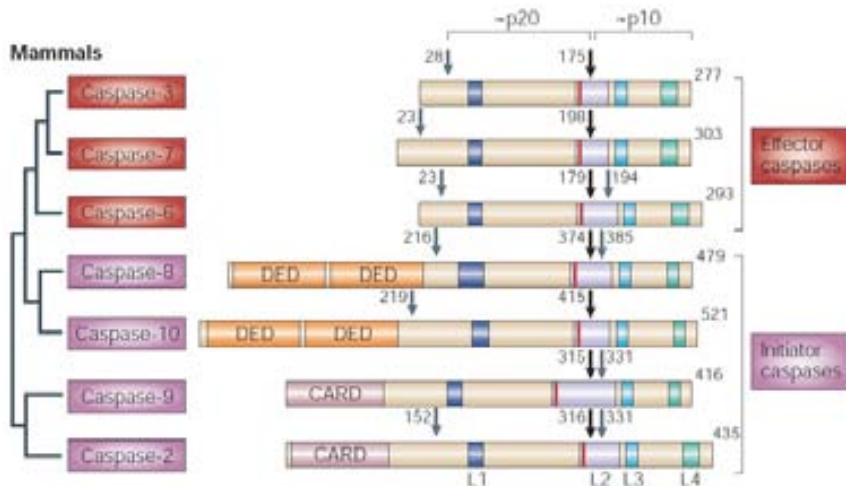


Figura 4. Caspases apoptòtiques de mamífers. Representació en arbre filogenètic de les caspases apoptòtiques de mamífers, es destaquen en vermell les caspases efectores i en lila les iniciadores. Amb fletxes negres s'il·lustra llocs de tall pertinents a l'activació de cada una de les caspases. (Riedl and Shi, 2004)

Existeixen diferents mecanismes d'activació de caspases. En primer lloc, tenim l'activació per tall per altres caspases que és l'activació característica de les caspases executores -3, -6 i -7. Les encarregades de fer el tall són les caspases iniciadores (vegeu figura 4). El tall per caspases iniciadores induiria l'alliberament de p20 i p10 i posterior formació de l'enzim madur. Els altres mecanismes descrits, consisteixen en l'activació per proximitat, atribuïda a la caspases -8 i -2 i l'activació per unió a subunitats reguladores, atribuïda a la caspasa-9. Les caspases -2 i -8, s'activen per una concentració de les molècules de zimogen en un lloc concret que indueix l'oligomerització d'aquests i la seva activació per l'activitat proteasa intrínseca de la molècula (Muzio et al., 1998; Baliga et al., 2004). La caspasa-9, no és activada per tall sinó que aquesta s'activa per un canvi de conformació per interacció amb subunitat reguladora. Quan s'allibera citocrom *c* de la mitocòndria en resposta a un estímul apoptòtic, s'associa a Apaf-1 en un procés ATP dependent. Al torn, Apaf-1 recluta la procaspasa-9 formant l'apoptosoma. I, dins el complex de l'apoptosoma la caspasa-9 s'activa per canvi de conformació (Zou et al., 1999). Tanmateix, les caspases també són activables per altres proteases com les calpaines que activarien caspasa-3 i caspasa-12 (Nakagawa and Yuan, 2000)

Les caspases tallen una quantitat ingent de substrats durant tot el procés (Luthi and Martin, 2007; vegeu Figura 4). En el tall d'alguns d'aquests rau l'explicació de les característiques atribuïdes a la mort apoptòtica. L'aparició de la cromatina condensada i la fragmentació internucleosomal del DNA que dona el patró en escala en són exemples (Wyllie, 1980). La proteòlisi per caspasa-3 de l'inhibidor de la *caspase-activated DNase* (CAD), ICAD, promou l'activació d'aquesta i conseqüent tall del DNA. La caspasa 3 també actua sobre la Poli ADP-ribosa polimerasa (PARP) involucrada en processos de metabolisme i reparació de DNA, així com sobre MST1 que proteolitzada transloca al nucli on fosforila la histona H2B i indueix condensació de cromatina (Enari et al., 1998; Woo et al., 1998; Ura et al., 2001; D'Amours et al., 2001).

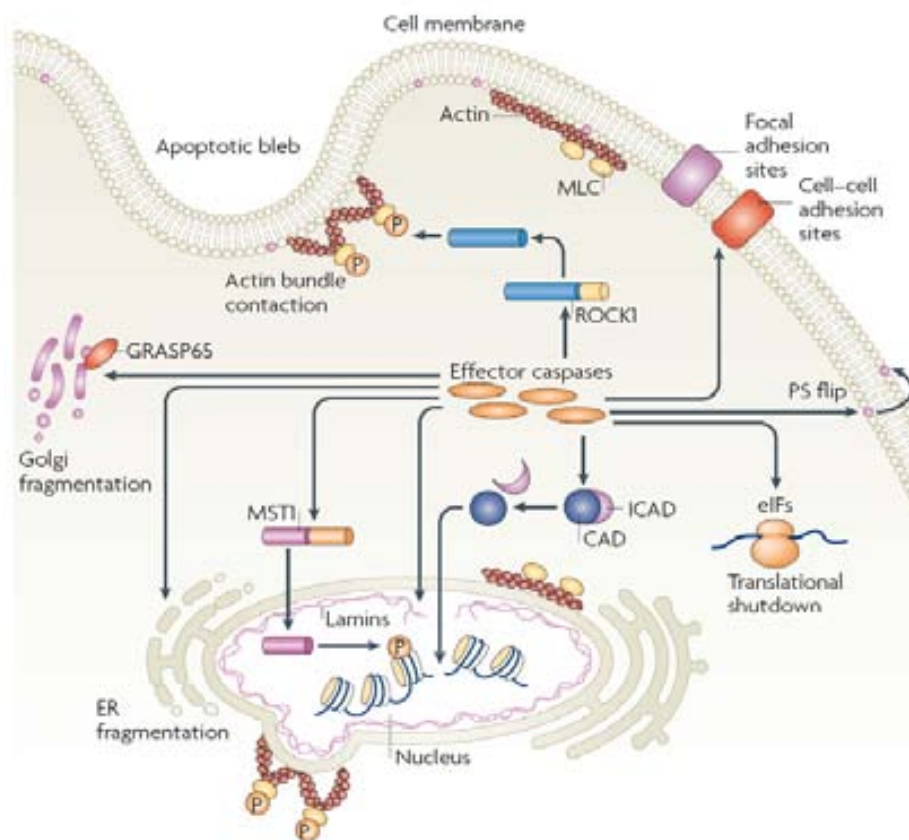


Figura 5. El fenotip apoptòtic resulta del processament per caspases. Esquema d'algunes de les accions de les caspases executores 3, 6 i 7 durant el procés apoptòtic (Taylor et al., 2008).

La desestructuració i reorganització de membranes també és clau en l'apoptosi. Caspasa-3 actua sobre les laminines A, B i C promovent la desintegració de l'embolcall nuclear (Rao et al., 1996). Altrament, l'activació de ROCK1 per tall de caspasa-3 regularia el citoesquelet d'actina en la desestructuració del nucli i, també, a la membrana plasmàtica, en la posterior formació dels cossos apoptòtics (Coleman et al., 2001; Croft et al., 2005). D'igual manera, les caspases també tenen substrats com la fodrina i la gesolina que originarien el recolliment citoplasmàtic (Kothakota et al., 1997). La proteòlisi de microtúbuls participa de la formació de les

pústules apoptòtiques que generen els cossos apoptòtics i de la repartició de la cromatina en aquests compartiments (Moss et al., 2006). Per altra banda, dins encara de la reestructuració de membranes, el tall per caspases està implicat en la presentació a la cara extracel·lular del fosfolípid fosfatidilserina (Martin et al., 1996)

A més a més, les caspases efectores modulen funcions fonamentals de la cèl·lula com la transcripció i la traducció de proteïnes actuant tant directament sobre factors de transcripció, elements d'elongació i RNA ribosòmic, com participant de la desestructuració del ER, del AG i la mitocòndria (Frank et al., 2001; Lane et al., 2002; Luthi and Martin, 2007).

Les caspases es regulen tant a nivell transcripcional com post-traduccional (Earnshaw et al., 1999). Tot i així, cal fer esment a la família de les *inhibitor apoptosis proteins* (IAPs) com a reguladores de la seva acció (Shi, 2002; Riedl and Shi, 2004). Aquesta família fou identificada en el genoma de baculovirus per la seva habilitat de prevenir l'apoptosi (Miller, 1999). En mamífers fins al moment se n'ha descrit 8: NAIP, cIAP1, cIAP2, XIAP, *survivin*, *livin*, Apollon i ILP2 (Riedl and Shi, 2004).

Els membres d'aquesta família es caracteritzen per contenir com a mínim un domini *baculovirus IAP repeat* (BIR). Algunes d'elles en contenen només un i altres en contenen fins a tres com són NAIP, cIAP1, cIAP2 i XIAP. Les tres últimes, a més, comparteixen un domini RING. Només XIAP, cIAP1, cIAP2 i NAIP són capaces d'inhibir de manera directa o indirecta les caspases. XIAP inhibeix tant les caspases efectores -3 i -7 com la caspasa iniciadora -9 per interacció directe (Shiozaki et al., 2003; Scott et al., 2005). NAIP també actua per interacció directe sobre les caspases -3 i -7 (Maier et al., 2002). En canvi, cIAP1 i cIAP2 tot i que són capaces d'unir les caspases -3, -7 i -9 no les inhibirien directament per interacció sinó que es postula que les inhibirien per ubiquitinització i subseqüent direccionament cap a la via proteosomal donat la seva activitat E3 ubiquitin lligasa (Eckelman and Salvesen, 2006; O'Riordan et al., 2008; Bertrand et al., 2008).

Tant la mort apoptòtica que experimenten les CGCs *in vivo* com *in vitro* s'ha vist associada a una activació de les caspases (Armstrong et al., 1997; Miller et al., 1997; Lossi et al., 1998; Monti and Contestabile, 2000; Chrysis et al., 2001; Vaudry et al., 2003; Zhong et al., 2004; Lossi et al., 2004; Xifro et al., 2005; Canu et al., 2005). En consonància, estímuls neuroprotectors en front la mort per privació de potassi promouen un augment en els nivells de XIAP, així com una major interacció d'aquesta amb caspasa-3 (Xifro et al., 2006).

3.2. La mitocòndria, el punt de partida de la via intrínseca. La família Bcl-2.

La mitocòndria és una peça fonamental per la cèl·lula, i aquest paper té especial rellevància en la neurona ja que participa de la producció d'energia en processos fonamentals per ella com, la regulació del Ca^{2+} , el manteniment del potencial de la membrana plasmàtica, el plegament de proteïnes per xaperones, el transport axonal i dendrític i l'alliberament i la recaptació de neurotransmissors (Knott et al., 2008). Així doncs, el manteniment de l'homeòstasi d'aquest orgànu és clau. La participació d'aquest en la via intrínseca ve donada per la pèrdua del potencial de membrana mitocondrial degut a la formació de porus, que, al torn, induïx l'alliberament de factors proapoptòtics, com el citocrom c o *smac*/DIABLO (inhibidor de les IAPs) entre d'altres, de l'espai intermembrana al citoplasma. Qui regula la formació de porus a la membrana d'aquesta són les proteïnes de la família Bcl-2.

La família de proteïnes B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) engloba 3 subfamílies que contenen des de 1 fins a 4 dominis d'homologia Bcl-2 (BH) (vegeu Figura 6). Els membres considerats proapoptòtics, Bax, Bak i Bok, contenen 3 dominis BH i 1 domini transmembrana (TM). Aquest domini els permet l'ancoratge a membranes d'orgànuls com el ER i la mitocòndria així com la membrana nuclear (Orrenius et al., 2003). La formació tant de homodímers com heterodímers d'aquests induïx la inserció a la membrana mitocondrial i alliberament de factors proapoptòtics. La subfamília antiapoptòtica està composta per Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, MCL1, Bcl-2a1 i Bcl-B, totes elles contenen 4 dominis BH i un TM, a excepció de Bcl-2a1. La seva funció com a membres antiapoptòtics de la família és de competir per la unió amb Bax i/o Bak o membres de la subfamília *BH3-only* per impedir que els oligòmers

d'aquests indueixen l'alliberament de citocrom *c* de la mitocòndria per formació de porus. Per últim, tenim la subfamília dels *BH3-only*, la componen 8 membres: Bik, Hrk, Bim, Bad, Bid, Puma, Noxa i Bmf. Entre ells existeix poca homologia tret del domini BH3, alguns d'ells com Bik i Bim contenen domini TM. Donat la heterogeneïtat en el grup, s'ha vist que es regulen de manera diferent, però la sobreexpressió de tots ells promou apoptosi deguda a una translocació a mitocòndria on reforcen la oligomerització amb Bak i/o Bax i l'alliberament de citocrom *c* (Taylor et al., 2008).

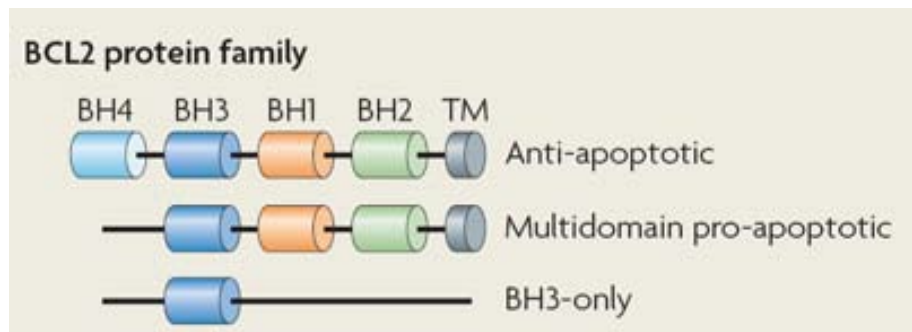


Figura 6. Característiques estructurals dels membres de la família Bcl-2. Representació esquemàtica de la disposició dels dominis BH (domini d'homologia a Bcl-2) i de la regió TM (transmembrana) en els membres de la família Bcl-2 (Degterev and Yuan, 2008).

En cultius de CGCs de ratolins KO per Bax les neurones eren insensibles a la inducció de mort per privació de potassi (Miller et al., 1997), i els KO per el membre antiapoptòtic Bcl-2, n'eren més sensibles (Tanabe et al., 1997). A més, la sobreexpressió de Bcl-2 redueix el nombre de cèl·lules apoptòtiques enfront K5 (Miller et al., 1997; Canu et al., 2005) i factors tròfics en aquest model de mort, com són NMDA, K25 o PACAP, n'indueixen un augment en els nivells (Alavez et al., 2003; Xifro et al., 2006; Aubert et al., 2006).

Els membres de la família Bcl-2 són regulables de diverses maneres. Hi ha estímuls que n'indueixen una regulació directa de l'expressió però n'hi ha d'altres que a més d'aquesta també regulen la seva activitat per fosforilació en determinats residus o

per modificació de la conformació. Així, trobem que els membres de la família Bcl-2 són regulables per cinases antiapoptòtiques com Akt o per proapoptòtiques com JNK (vegeu apartats 3.3 i 4.2.1).

3.3. Jun-N-terminal Kinase, JNK.

La proteïna cinasa JNK, forma part de la família de les proteïnes cinases activades per mitogens (*mitogen activated protein kinases*, MAPK) i s'activa en resposta a l'estrès cel·lular, d'aquí que també se l'anomeni proteïna cinasa activada per estrès (*stress activated protein kinase*, SAPK). Així, aquesta serin-treonin cinasa participa en multitud de respostes a diferents estímuls. JNK pot ser activada per les cinases MKK4 o 7 que són activades per les MLKs. Aquesta seqüència d'activacions es dona gràcies a la interacció de les tres cinases amb una proteïna aglutinadora, proteïna d'interacció amb JNK, JIP 1,2 o 3 (Yasuda et al., 1999). Un cop activada JNK, fosforila tot una sèrie de substrats induint les diferents respostes d'estrès.

El seu substrat més famós i pel que va ser identificada és el factor de transcripció c-jun, tot i així, en el moment ja se'n compten més de 9, la majoria d'ells factors de transcripció com Elk-1, NFAT4, SMAD4, p53, ATF-2, HSF1, STAT3 i Jun, però també altres proteïnes de la família Bcl-2 com Bcl-2 o Bim. La fosforilació de Bcl-2 en la serina 70 n'indueix la degradació i la fosforilació de Bim a la serina 65 en promou la translocació a la mitocondria, sent ambdós processos punt de partida en l'activació de la via intrínseca en alguns estímuls apoptòtics (Srivastava et al., 1999; Okuno et al., 2004; Zhang et al., 2009; Chen and Chang, 2009; Becker and Bonni, 2007). En CGCs s'ha descrit que l'activació de JNK i de p38, un altre membre de la família de les MAPK, participen en la mort apoptòtica per K5 en estadis tant madurs com immadurs del cultiu (Enguita et al., 2005; Xifro et al., 2006). També s'ha atribuït a JNK i p38 un paper en malalties que cursen amb neurodegeneració com són les malalties d'Alzheimer o Parkinson, així com Huntington i l'esclerosi lateral amiotròfica (Miloso et al., 2008).

3.4. Processos implicats en la mort per privació de potassi en les neurones gràulars de cerebel.

Com hem anat comentant fins al moment, la mort apoptòtica que promou l'exposició a baixes concentracions de potassi (5mM, K5) a les CGCs cursaria per la via intrínseca. Així, s'ha descrit l'aparició de tots els trets típics d'aquesta via com són la pèrdua de potencial de la membrana mitocondrial, l'alliberament de factors proapoptòtics i l'activació de les caspases -3, -7 i -9 (Armstrong et al., 1997; Alavez et al., 2003; Xifro et al., 2006). Tot i que l'alliberament de factors per part de la mitocondria al citosol sembla clar en K5, la participació de cada un d'ells ja és més controvertida. Existeixen estudis que descriuen com citocrom c augmenta al citosol en K5 (Alavez et al., 2003; Xifro et al., 2006). Tot i així, sembla que l'activació o no de la caspasa-9 és dependent de la maduresa del cultiu, essent aquesta activada només en estadis madurs (Alavez et al., 2003). Per altre banda, també s'ha observat l'activació de mecanismes apoptòtics caspasa independents resultants de l'alliberament de factors proapoptòtics com AIF en K5 (Slagsvold et al., 2003).

Els membres de la família de Bcl-2 estan fortament involucrats en la mort per K5 pel seu rellevant paper en la regulació de la via mitocondrial. Així, el membre proapoptòtic de la família Bax es clau per la mort en K5 ja que els cultius de CGCs dels ratolins KO no moren enfront aquest estímul. Així mateix, també s'ha descrit com vies pro-mort activades en condicions de K5 com JNK i GSK3- β , actuarien sobre Bax promovent-ne la translocació a mitocòndria (Miller et al., 1997; Cross et al., 2001; Harris et al., 2002). Per altre banda, alguns factors neuroprotectors en front la mort per K5 indueixen un augment en els nivells de Bcl-2 per tal de mediar el seu efecte de supervivència (Alavez et al., 2003; Xifro et al., 2006). O, d'altre manera, promouen la inhibició dels membres apoptòtics de la família com Bad o Bax per fosforilació per Akt (vereu apartat 4.2.1; Gleichmann et al., 2000; Alavez et al., 2003).

De manera esperable, les vies proapoptòtiques que poden modificar el grau d'activitat de membres apoptòtics de la família Bcl-2 tenen un paper rellevant en la mort per K5. Així, JNK, p38 i GSK3- β s'ha descrit que s'activen en K5 i la seva inhibició farmacològica ha mostrat que participen activament del procés (Cross et al.,

2001; Harris et al., 2002; Enguita et al., 2005). A més, factors que protegeixen les CGCs d'aquesta mort com NMDA o K25 cursen amb la inhibició d'aquestes (Xifro et al., 2006). Amb tot, no només aquestes participen en la mort per K5, s'ha vist com l'altre via de les MAPK, la MEK/ERK, podria estar mediant la mort per K5 per una inducció del compromís de la membrana cel·lular (Subramaniam et al., 2004).

Així doncs, tenim que quan les CGCs són sotmeses a K5 s'activen tot un seguit de vies que conflueixen en la via mitocondrial que indueix l'activació de mecanismes caspasa dependents o independents que resultaran en la mort de la neurona per apoptosi. A més, factors que protegeixen les CGCs de K5 com NMDA, promouen l'activació d'altres vies amb el fi d'aturar el procés desencadenat per K5.

4. Implicació del Receptor del NMDA en el desenvolupament de les CGCs

4.1. El Receptor del NMDA i les neurones granulars de cerebel.

El glutamat és un aminoàcid àmpliament distribuït al SNC i és el principal neurotransmissor excitador en el SN dels mamífers, amb un paper importantíssim en el desenvolupament del SN en general i en el del cerebel en particular (Young et al., 1974; de et al., 1980; Pearce et al., 1987). El glutamat actua via receptors metabotòpics (mGluR, on hi ha tres subgrups, I, II, III) que estan acoblats a proteïnes G i via receptors ionotòpics (el receptor NMDA (NMDAR), i els no-NMDA: el receptor AMPA (AMPA) i el receptor Kainat) que estan acoblats a canals iònics. El NMDAR participa de molts processos claus en el correcte funcionament i desenvolupament del SN com són plasticitat, sinàptogènesi, migració neuronal i supervivència.

Donat la seva participació en processos tant complexes aquest receptor necessita d'una regulació fina. Així, NMDAR necessita de la unió simultània del co-agonista glicina per tal de poder-se obrir (Nakanishi et al., 1994), i el canal iònic està bloquejat per la presència d'un ió de magnesi, bloqueig que és dependent de voltatge. A més, el receptor també presenta diversos llocs d'unió a moduladors de la

seva acció tant endògens com exògens. Per aquesta raó, el NMDAR presenta una cinètica d'activació complexa, essent de més lenta activació però més sostinguda que les dels altres membres de la família dels receptors de glutamat ionotròpics.

El canal iònic del NMDAR és permeable a ions de sodi, calci i potassi, sent més permeable als monovalents que al divalent. Tot i així, la seva participació en els diferents tipus de processos biològics està lligada a l'entrada de calci a la cèl·lula que promou l'obertura del canal. La conductància al calci, així com la interacció amb la màquinaria cel·lular depen de la composició de subunitats del receptor.

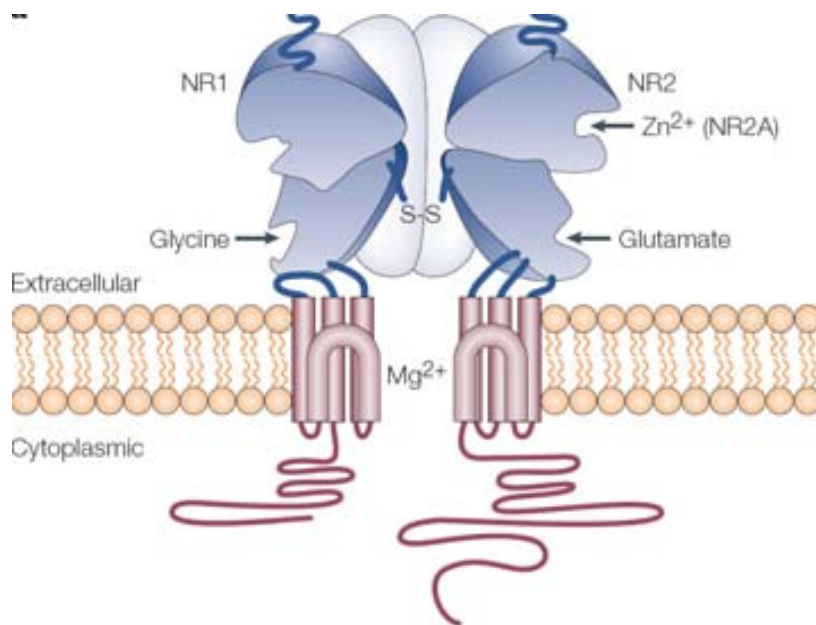


Figura 7. El receptor del NMDA. El receptor funcional de NMDA és un tetràmer, contenint una subunitat NMDAR1 i altres subunitats de les NMDAR2A-C o NMDAR3. Presenta llocs d'interacció amb glicina, glutamat i Zinc. El canal de bescanvi iònic està regulat en primer terme per la presència d'un ió de Magnesi i la conductància a Calci ve regulat per la subunitat NMDAR2 que el formi. *Nature Reviews Drug Discovery* , S38-S40 (July 2004) doi:10.1038.nrd1411

El NMDAR és tracta d'un complex tetramèric de subunitats NMDAR1-1-4(a o b) (NR1), NMDAR2A-D (NR2A-D) i/o NMDAR3A/B (NR3). Les subunitats NR1 estan codificades pel mateix gen però existeixen fins a 8 variants de processament que determinen la modulació per poliamines i la interacció amb la proteïna cinasa C (PKC) . En canvi, les 4 subunitats NR2 estan codificades en 4 gens diferents igual que les 2 subunitats NR3. Els receptors funcionals de NMDA es componen com a mínim per una NR1 i altres NR2 i/o NR3. La conductància al calci ve determinada per les subunitats NR2 tenint una menor conductància la NR2C que les NR2A i B, tot i que la presència de una subunitat NR3 en el complex inhabilita la conductància a aquest ió (Villmann and Becker, 2007).

Pel seu paper indispensable en la composició del NMDAR, la subunitat NR1 s'expressa de forma ubíqua a les neurones del SNC durant el desenvolupament. En canvi, hi ha un patró d'expressió diferencial dels mRNA de les diferents subunitats NR2 durant el desenvolupament (McBain and Mayer, 1994). En el cerebel de ratolí i rata, els nivells de RNA de la subunitat NR2A augmenten progressivament; no passa el mateix amb la NR2B que, a partir de la segona setmana postnatal, els nivells de missatger disminueixen de forma dràstica (Akazawa et al., 1994). La disminució de la subunitat NR2B sembla que seria substituïda per un augment de l'expressió de NR2C, subunitat que acaba predominant de forma clara en el cerebel adult (Watanabe et al., 1994;Monyer et al., 1994) . S'ha descrit l'existència de correlació entre la situació *in vivo* i la *in vitro* en la variació de la composició del NMDAR (Resink et al., 1995a;Vallano, 1998). A més, s'ha descrit que aquesta variació podria venir induïda tant per l'activació del propi receptor (Resink et al., 1995b) com per l'acció de factors tròfics (Chen and Roche, 2009). En el treball de Chen i cols. veuen com l'activació de Akt per factors tròfics fosforila la subunitat NR2C a la serina 1096, fet que l'allibera de la seva unió amb la proteïna 14.3.3 i n'indueix la presentació a membrana.

Està ben establerta l'acció protectora de l'activació del NMDAR sobre les CGCs. Experiments amb antagonistes del NMDAR mostraren el bloqueig de l'acció tròfica del NMDA (Balazs et al., 1988;Moran and Patel, 1989). L'activació del receptor induïx una entrada de calci amb el conseqüent augment de la concentració

intracel·lular d'aquest, que segons els nivells, promou l'activació de diferents i nombroses vies de transducció que són claus per a les propietats del NMDAR

4.2. Vies de senyalització de supervivència associades a l'activació del receptor del NMDA.

L'estimulació d'entrada de calci pel NMDAR promou la supervivència tant en cultiu com en el desenvolupament de les CGCs (Balazs et al., 1988; Ikonomidou et al., 1999). L'activació d'aquest receptor s'ha associat a un increment en l'activitat de les vies PI3K (*phosphoinositide-3-Kinase*)-Akt i MEK/ERK (*Extracellular signal regulated Kinase*; Soriano et al., 2006; Xifró and Rodríguez-Alvarez, dades no publicades). Tanmateix, l'efecte neuroprotector en resposta a l'activació d'aquest receptor s'ha descrit que seria mediat principalment per la senyalització a través de la via PI3K-Akt, tot i que, l'activació de vies que impliquen la fosforilació en tirosines també hi estaria involucrada (Lafon-Cazal et al., 2002; Xifro et al., 2005; Papadia et al., 2005; Soriano et al., 2006).

4.2.1 La via de PI3K-Akt.

L'activació de la via de PI3K-Akt és clau en l'efecte de molts agents neurotròfics per les neurones granulars, com IGF-I, NMDA o K25 tant en cultiu com *in vivo* (D'Mello et al., 1997; Xifro et al., 2005; Wiedmann et al., 2005). La regulació de l'activació de la PI3K està en mans dels receptors tirosina cinasa i de la proteïna G monomèrica Ras (Rodríguez-Viciano et al., 1994; Schlessinger, 2000). L'activació d'aquesta passa pel seu reclutament a la membrana on actua sobre substrats lipídics generant fosfatidoinositol 3,4,5-trifosfat (PIP₃) entre d'altres. L'acumulació de PIP₃ recluta a la cinasa dependent de fosfoinositids 1 (*phosphoinositide dependent kinase*, PDK1) i a la serina/treonina cinasa Akt o altrament coneguda com proteïna cinasa B (PKB) que contenen dominis d'homologia a plekstrina (PH) d'interacció amb aquests lípids. PDK1 fosforila a Akt i l'activa. Akt és la principal efectora d'aquesta via en supervivència. Aquesta cinasa actua sobre molts substrats directament lligats amb l'apoptosi com proteïnes de la família Bcl-2, la cinasa activada en apoptosi (*apoptosis activated kinase*, ASK1), la GSK3 β , la XIAP, els factors de transcripció de

la família *Forkhead* (FKH) o el factor de transcripció CREB. Així, Akt modula la senyalització en pro de la supervivència inhibint substrats proapoptòtics i potenciant l'acció dels antiapoptòtics.

Existeixen diversos exemples de la inhibició de substrats apoptòtics per part d'Akt, aquest és el cas de la *BH3 only* Bad. Akt la fosforila i n'indueix la interacció amb la proteïna 14.3.3 deixant lliures a Bcl-2 i Bcl-XL per fer la seva funció protectora (Brunet et al., 2001). De la mateixa manera, quan Akt fosforila FKH, la proteïna 14.3.3 hi interacciona i l'exporta del nucli, inhibint la transcripció de gens implicats en la mort apoptòtica com Bim (Brunet et al., 1999; Linseman et al., 2002; Soriano et al., 2006). Altrament, la fosforilació inhibidora de ASK1 fa que no es pugui activar JNK, que com hem esmentat, participa de la mort per apoptosi (Kim et al., 2001). En la mateixa direcció, Cross i cols. varen descriure la fosforilació de GSK3 β per Akt en resposta a insulina (Cross et al., 1995) i, més tard, el mateix autor va relacionar la inhibició d'aquesta cinasa amb la supervivència de les CGCs (Cross et al., 2001).

Per altre banda, Akt promou l'estabilització i/o activació d'algunes proteïnes per exercir el seu efecte de supervivència. Akt i XIAP mantenen una interessant relació en pro d'aquest efecte. Al 2004, Dan i cols., varen descriure que la fosforilació per Akt de XIAP induïa l'estabilització d'aquesta potenciant-ne l'efecte antiapoptòtic (Dan et al., 2004). I recentment, s'ha vist que XIAP actuaria com a E3 ubiquitina lligasa sobre PTEN, fosfatasa que actua sobre la població de PIP₃ regulant negativament l'activació d'Akt (Van et al., 2009). D'aquesta manera entre ambdues sembla que existeix un mecanisme de retroalimentació per tal d'evitar que la cèl·lula mori. En el mateix sentit, Akt indueix l'expressió de gens de vida com Bcl-XL o Bcl-2 mitjançant l'activació de factors de transcripció com NF- κ B i CREB (Kandel and Hay, 1999). Aquest factor de transcripció també és activat per la via MEK/ERK que, com hem comentat, també s'activa després de l'estimulació del NMDAR.

4.2.2. La via de les MAPKs MEK/ERK.

Aquesta via també és activada en resposta a múltiples factors neurotròfics com el PACAP, BDNF, IGF-1 o K25 en les CGCs (Villalba et al., 1997; Han and Holtzman,

2000;Zhong et al., 2004;Xifro et al., 2005), tot i que, la seva activació no sempre s'ha trobat que participi de l'efecte protector. A més, existeix controvèrsia sobre el seu paper en la supervivència de les CGCs ja que no només s'ha vist que la seva activació promogui supervivència sinò que s'ha descrit que la mort per K5 també cursaria amb l'ativació d'aquesta via (Subramaniam et al., 2003;Zhong et al., 2004;Subramaniam et al., 2004;Subramaniam et al., 2005). Per altre banda, l'activació d'ERK també participa del manteniment neurític en CGCs (Miñano et al., 2008).

Totes aquestes evidències porten a pensar que aquesta és una via molt versàtil i que segons com i on s'activi pot mediar respostes a estímuls absolutament oposats que desencadenin tant vida com mort. La via MEK/ERK s'inclou dins la família de les MAPK. Així doncs, es compona per la cascada d'activació de 3 cinases en cadena. La cinasa iniciadora de la via és Raf que és capaç d'activar MEK1/2, que activarà ERK1/2. Aquesta última pot o fosforilar altres cinases com RSK1-4, MSK1-2 i MNK1/2 que s'encarreguen d'actuar sobre la transcripció i traducció o actuar-hi directament ella per fosforilació d'altres dels seus substrats (Rubinfeld and Seger, 2005).

ERK1 i 2 comparteixen un 84% d'homologia i s'expressen de manera ubiqua tot i que l'expressió relativa de ERK2 és major (Boulton et al., 1990;Boulton et al., 1991). Els gens *p44mapk* i *p42mapk* codifiquen per unes proteïnes de 44 i 42 KDa que corresponen a les variants ERK1 i ERK2 respectivament. Aquestes cinases foren primerament descrites al 1983 per Cooper i cols., com a MAPK i, més tard, se'ls canvià el nom per ERK quan es veié que eren activades per molts estímuls extracel·lulars (Rossomando et al., 1989). L'activació d'ERK per MEK rau en la fosforilació d'una tirosina i una treonina i MEK necessita de dos interaccions per tal de dur a terme la fosforilació dual (Ray and Sturgill, 1988). D'aquesta manera, existeix a la cèl·lula no estimulada un romanent de ERK fosforilades en el residu tirosina que en resposta a un estimul proporcionen una activació ràpida de la via. En el cas que la via es mantingui activada més temps, tindriem un segon pic corresponent a la fosforilació de *novoo* en els dos residus donant un patró de resposta bifàsica (Ferrell, Jr. and Bhatt, 1997;Ferrell, Jr., 1999). Generalment,

l'activació d'ERK s'associa amb la seva translocació al nucli on actua sobre altres cinases o sobre factors de transcripció. Tot i així, amb el temps s'ha anat veient que la regulació d'aquesta via és més fina que això, ja que la interacció amb altres proteïnes resulta en la compartimentalització de la senyalització d'aquesta via dins la cèl·lula (Kolch, 2005).

MEK 1 i 2 codifiquen en dos gens diferents i presenten un 80% d'homologia entre elles (Crews et al., 1992; Crews and Erikson, 1992). MEK1 és més abundant que MEK2 en el cervell de ratolí (Ortiz et al., 1995). Es considera que l'únic substrat de MEK1/2 és ERK1/2, així que sigui comú l'estudi d'aquesta via mitjançant els inhibidors d'aquesta cinasa PD98059 (Alessi et al., 1995; Dudley et al., 1995) i U0126 (Favata et al., 1998). Tot i que d'un temps cap aquí s'ha vist que aquests també actuarien sobre la via de MAPK que inclou ERK5 (Kamakura et al., 1999; Mody et al., 2001). Les encarregades d'activar MEK1/2 són les MAPKKK Raf, de les que existeixen 3 vairants, A-Raf, B-Raf i Raf1 (Dent et al., 1992; Daum et al., 1994), que representen el primer graó de regulació de la cascada.

L'activitat de Raf és regulable per diversos mecanismes, ja sigui per interacció amb proteïnes com *Ras1 repressor kinase 1* (KRS1), *connector enhancer of KRS* (CNK), *heat shock protein 90* (hsp90), 14.3.3 o *Raf kinase Inhibitor* (RKIP) (Kolch, 2005) o per fosforilació per cinases com PKC, Src o PKA que alhora regularan la interacció amb les proteïnes esmentades (Dumaz and Marais, 2003; Dumaz and Marais, 2005). Tot i així, les que en serien les principals reguladores són les proteïnes G monomèriques Ras i Rap1 que s'encarreguen de transmetre a la cascada de Raf/MEK/ERK entre d'altres, gran part de les senyals extracel·lulars (Dickson et al., 1992; York et al., 1998).

L'activitat del complex format per les 3 cinases també es regula per altres interaccions amb proteïnes que actuen com a aglutinadores com MORG1 (*MAPK organizer-1*) o MP1 (*MEK partner-1*). La desfosforilació inactiva aquesta cascada així és d'esperar que les fosfatases també participin de manera important en la regulació de la senyalització a través de la via MEK/ERK. Les principals implicades en aquesta modulació són les fosfatases de la família de les *MAP Kinases*

phosphatases (MKPs) i les proteïnes fosfatases PP2A i PP2B (Boutros et al., 2008; Junttila et al., 2008).

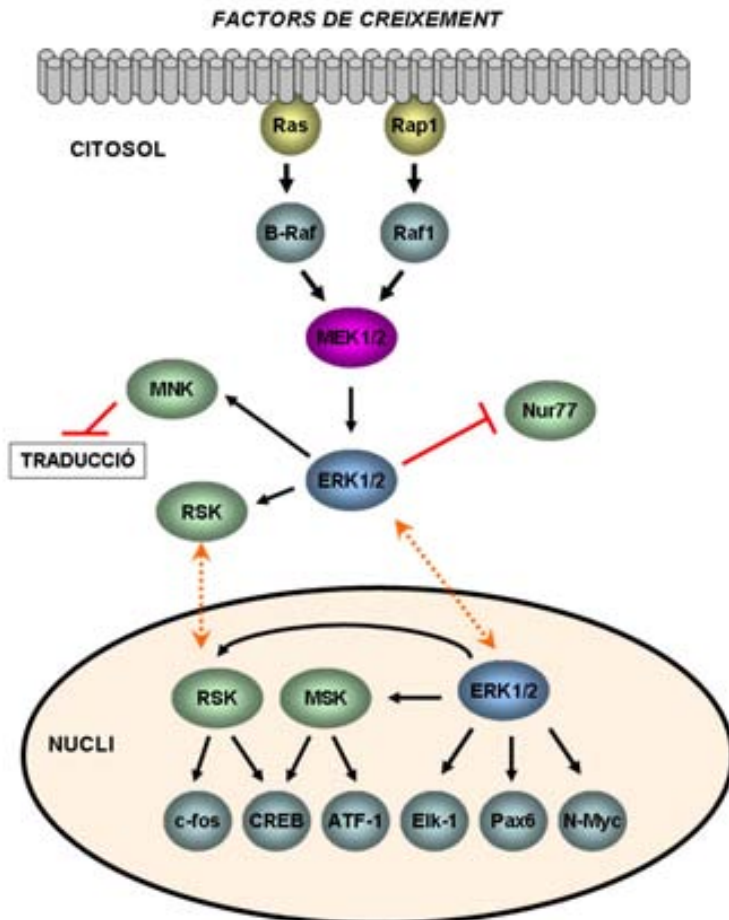


Figura 8. La via de les MAPK, Raf/MEK/ERK. Diagrama esquemàtic de la cascada de senyalització de la via Raf/MEK/ERK. Cada nivell de la cascada s'ha representat amb un color diferent. A tall d'exemple, s'han afegit alguns dels substrats d'aquesta via així com també les proteïnes G monomèriques que se situen per sobre de la seva activació Ras i Rap1.

S'ha descrit fins a 70 substrats d'ERK. Molts d'ells dins el nucli on trobem que ERK es capaç de fosforilar directament fins a 7 factors de transcripció entre ells Elk-

1(Gille et al., 1995), Pax6 (Mikkola et al., 1999) o N-myc ambdós factors de transcripció implicats en el desenvolupament de les CGCs. A més, també al nucli, ERK fosforila altres cinases com la *ribosomal s6 kinase* (RSK;Frodin and Gammeltoft, 1999) i la *mitogen and stress-activated kinase-1* (MSK1; Deak et al., 1998) que actuen sobre altres factors de transcripció com CREB, ATF-1 o c-fos (Chen et al., 1993; Arthur and Cohen, 2000). L'activació d'aquests factors de transcripció incrementa l'expressió de gens de vida com Bcl-2 en resposta a neurotrofines (Riccio et al., 1999;Kaplan and Miller, 2000). Fora del nucli, ERK actua sobre múltiples dianes com les cinases d'interacció amb le MAPK (*mapk interacting kinases*, MNKs; Waskiewicz et al., 1997) que actuen sobre la traducció de proteïnes (Knauf et al., 2001;Ueda et al., 2004). Entre els substrats citosòlics hi figura el receptor nuclear orfe nurr77. La fosforilació d'aquest per ERK2 inactiva el seu rol apoptòtic en CGCs (Jacobs et al., 2004). (vegeu figura 8)

4.2.3. Proteïnes G monomèriques Ras i Rap1.

Totes elles s'integren en una família que porta el nom de Ras, composta per quinze membres, altament conservats. Les proteïnes de la família Ras cicle entre una conformació activa (lligada a GTP) i una conformació inactiva (lligada a GDP). Només la conformació sota la forma GTP és capaç de lligar-se i activar els efectors. Aquest cicle actiu/inactiu està estretament regulat per dos tipus de proteïnes. Per una banda, les GEFs (*Guanine nucleotide exchange factors*) que indueixen la dissociació de GDP per afavorir l'associació a GTP i, per l'altra banda, les GAPs (*GTPases activating proteins*) que, gràcies a la seva activitat GTPasa intrínseca, afavoreixen el pas a l'estat inactiu. Pel seu important paper en la regulació de la via d'ERK1/2 nosaltres ens centrarem en Ras i Rap1. Tot i ser importants en processos de supervivència, també tenen un paper clau en processos de proliferació i diferenciació.

Dintre de la subfamília de Ras, cinc gens diferents s'han codificat: H-Ras, N-Ras, Ras, R-Ras i R-Ras3. A nivell de localització, les proteïnes H, N i K-Ras són força ubiqües, expressant-se en nombrosos teixits, i particularment abundants en el cervell adult, en especial en el còrtex cerebral i cerebel·lós. Per contra, R-Ras3

sembla que la seva expressió es veuria restringida al SNC (Kimmelman et al., 1997). Ras-GTP s'associa a diferents proteïnes, promovent-ne l'activació. Així, Ras-GTP pot associar-se a Ral-GEF (Hofer et al., 1994), a la subunitat catalítica p110 de la PI3K (Rodríguez-Viciano et al., 1994; Rodríguez-Viciano et al., 1996), a c-Raf (Vojtek et al., 1993) i a B-Raf (Vaillancourt et al., 1995). Més recentment, s'han identificat com a efectors directes de Ras-GTP, la PLC ϵ i Tiam1, un factor d'intercanvi per Rac (Kelley et al., 2001; Song et al., 2001; Lambert et al., 2002).

Rap1 s'expressa de forma ubiqua, és particularment abundant en les plaquetes, els neutròfils i el cervell (Bos et al., 1997). Va ser descoberta pel grup de M. Noda, investigant proteïnes capaces de revertir l'acció d'una forma oncogènica de K-Ras en fibroblasts (Kitayama et al., 1989). Un mutant constitutivament actiu de Rap1, Rap1- V12, podia inhibir l'activació de les ERKs per Ras (Cook and McCormick, 1993). Així, des d'un bon principi, es va atorgar a Rap1 una acció antagonista a Ras. A més, Ras i Rap1 presenten un 50% d'homologia (Kitayama et al., 1989) dada que feia plausible que Ras i Rap1 regulessin de manera antagonista els mateixos efectors. De fet, Rap1-GTP interacciona amb Ral-GDS, una GEF per la GTPasa Ral, amb B-Raf estimulant-la (Ohtsuka et al., 1996) i amb c-Raf, que la segresta formant un complex que li impedeix activar-se (Schmitt and Stork, 2002). Una altra funció de Rap1 seria ser el nexe d'unió entre la PKA i les ERKs, funció que s'ha observat en CGCs (Villalba et al., 1997), ja que PKA és capaç de fosforilar Rap1 *in vitro* (Altschuler and Lapetina, 1993). A més, Rap1 també pot interaccionar amb la PLC ϵ (Kelley et al., 2001; Song et al., 2001). Alguns autors han suggerit la possibilitat d'una interacció amb la PI3K (Rubio et al., 1997) si bé aquest punt encara resta lluny d'aclarir-se. Tot i aquestes coincidències, el paper de Rap1 va molt més enllà d'un simple antagonisme amb l'acció de Ras. Tots dos poden actuar independentment un de l'altre (Zwartkruis et al., 1998) o de forma sinèrgica, segons la situació. A més, Rap1 participa en processos que li són considerats com a propis, com seria la regulació de processos d'adhesió (Bos et al., 2001; Knox and Brown, 2002).

Ras i Rap1 són regulades per l'entrada de calci a la cèl·lula, ja que aquest ió regula tant GEFs com GAPs. Rosen i cols., el 1994, utilitzant cèl·lules PC12 i cultius primaris de neurones corticals, van observar que Ras era estimulada a partir d'un

flux de calci a través dels canals voltatge dependents o a través dels reservoris interns (Rosen et al., 1994). Per altre banda el tractament amb fàrmacs inductors de l'entrada de calci produïen una forta activació de Rap1 a temps curts (Franke et al., 1997). Més endavant, es va veure que en neurones hipocampals, la sobreexpressió del dominant negatiu de Ras bloquejava l'activació de les MAPK induïda per tractament amb BDNF, despolarització o per estimulació del NMDAR (Iida et al., 2001).

En les CGCs Obara i cols. feren un estudi exhaustiu de la participació de Ras i Rap1 en l'activació de ERK pels estímuls de supervivència de PACAP, K25 i BDNF. Així doncs, trobaren que Ras és la responsable majoritària de l'estimulació d'aquesta via en els tractaments amb K25, PACAP i bdnf, mentre que Rap1 tot i que és activada per PACAP i K25 d'una manera PKA dependent, s'encarregaria exclusivament de l'activació d'un romanent de ERK associat a membrana (Obara et al., 2007). En el nostre grup també es va voler investigar l'activació d'aquestes en CGCs immadures tractades amb K25 i NMDA. Veiérem que ambdós estímuls activen a Ras, però que només en el cas de l'estimulació del NMDAR es veia una activació clara de Rap1

Recapitulant, tenim que el NMDAR ens activa varies vies per tal de dur a terme la seva funció, algunes són claus per el seu efecte pro vida com PI3K-Akt i d'altres participen en altres efectes de l'activació d'aquest receptor sobre les neurones com seria la via de les MAPK. Així, Soriano i cols., han descrit com l'estimulació de NMDAR en neurones hipocampals indueix activació de PI3K-Akt, que resulta en la fosforilació de GSK3 β , Foxo i CREB, inhibint l'acció dels primers i potenciant la funció de l'últim i, en el mateix estudi, veuen com també s'activa la via de ERK però no van més enllà en el seu efecte (Soriano et al., 2006). En el nostre grup hem observat l'activació de les dos vies en resposta a NMDA en CGCs i hem caracteritzat que només l'activació de la primera participa de l'efecte neuroprotector (Xifro et al., 2005). A més, també hem observat l'activació de Ras i Rap1 en una cinètica temporal coherent a l'activació de les vies d'Akt i ERK, faltant els experiments amb dominants negatius per certificar la seva possible participació (Xifró and Alvarez-Rodríguez, dades no publicades)

(Xifró and Alvarez-Rodríguez, dades no publicades). Així, NMDA du a terme els seus efectes per l'activació d'aquestes vies en les CGCs *in vitro* i fa pensar que *in vivo* aquestes també participen dels efectes de l'estimulació d'aquest receptor.

4.3. Participació del NMDAR en el desenvolupament de les CGCs.

El NMDAR està present en tot el SN. Concretament en el cerebel, està present durant tot el seu desenvolupament i a estadis adults. Com hem comentat a l'apartat 4.1, el que varia és l'expressió de les diferents subunitats NR2. L'estimulació d'aquest receptor és clau per la supervivència d'aquestes neurones durant el desenvolupament del cerebel com van mostra Monti i col·laboradors (Monti and Contestabile, 2000) . A més, l'expressió de diferents subunitats del receptor participa de la migració de les CGCs cap a la CGI, concretament, NR2B juga un paper clau en aquest procés (Komuro and Rakic, 1996; Mancini and Atchison, 2007; Tarnok et al., 2008).

L'estimulació de NMDAR induïx l'expressió de bdnf. Tant és així, que es creu que l'efecte protector d'aquest receptor és mediat per bdnf ja que l'addició al medi d'anticossos contra aquest i el bloqueig del seu receptor, TrkB, resultaren en la reversió de l'efecte protector de NMDA (Xifro et al., 2005; Bazan-Peregrino et al., 2007). En consonància, s'ha descrit com bdnf és imprescindible pel correcte desenvolupament del cerebel (Schwartz et al., 1997; Schwartz et al., 1998), tant en processos de supervivència (Kubo et al., 1995) com de migració (Borghesani et al., 2002; Zhou et al., 2007). Funcions sobre el desenvolupament de les CGCs que també s'han relacionat amb NMDAR.

Uns altres factors que participen del desenvolupament del cerebel, són les BMPs. Tot i que aquestes desenvolupen el seu paper en la diferenciació de les CGCs, s'ha de dir que també participen com a factors de supervivència en altres sistemes neuronals. Aquest fet ens va fer interessar-nos en elles pel seu possible paper dual, com el que s'atribueix al NMDAR en el desenvolupament de les CGCs, sent en aquest cas un paper en pro de la diferenciació i la supervivència d'aquestes neurones.

5. Les Proteïnes Morfogenètiques d'Os (BMPs) com a factors neuroprotectors.

5.1. Característiques generals.

Les BMPs formen part de la superfamília del factor de transformació i creixement β (TGF- β) junt amb altres factors de diferenciació i creixement (GDFs). Massagué organitzà dita família segons la correspondència de la seqüència d'aminoàcids amb un dels membres més característics, BMP-2 (Massague, 1998). I, des de llavors fins ara ha anat augmentant la complexitat i el nombre de subfamílies de BMPs. Així, si en el treball del Dr. Massagué en va descriure 3 ara ja se'n compten fins a 5 (vegeu Taula 1). D'aquesta manera, existeixen les subfamílies de BMP-2, BMP-3, BMP-5, BMP-9 i BMP-12.

Subfamily	BMP	Functions
BMP-2/-4	<u>BMP-2</u> (BMP-2a)	Cartilage and bone morphogenesis/heart formation
	<u>BMP-4</u> (BMP-2b)	Cartilage and bone morphogenesis/kidney formation
BMP-3	BMP-3 (osteogenin)	Negative regulator of bone morphogenesis
	BMP-3b	Negative regulator of bone morphogenesis
BMP-5/-6/-7/-8/-8b	BMP-5	Limb development/bone morphogenesis
	<u>BMP-6</u> (Vrg1, Dvr6)	Cartilage hypertrophy/bone morphogenesis/oestrogen mediation
	<u>BMP-7</u> (OP-1)	Cartilage and bone morphogenesis/kidney formation
	BMP-8 (OP-2)	Bone morphogenesis/spermatogenesis
	BMP-8b (OP-3)	Spermatogenesis
BMP-9/-10	<u>BMP-9</u> (GDF-2)	Bone morphogenesis/development of cholinergic neurons/glucose metabolism/anti-angiogenesis
	BMP-10	Heart morphogenesis
CDMP-1/-2/-3	BMP-12 (GDF-7/CDMP-3)	Ligament and tendon development/sensory neurons development
	BMP-13 (GDF-6/CDMP-2)	Cartilage development and hypertrophy
	BMP-14 (GDF-5/CDMP-1)	Chondrogenesis/angiogenesis

Taula 1. Taula resum de les subfamílies de BMPs existents i les funcionalitats atribuïdes a elles (Senta et al., 2009)

Les BMPs són unes citocines que es sintetitzen a partir de proteïnes precursors d'alt pes molecular. Després de ser metabolitzades dimeritzen pel seu extrem C-terminal i es mantenen unides per ponts disulfur i unions hidrofòbiques (Sun and

Davies, 1995). Aquesta conformació dimèrica és necessària per a que les BMPs induïxin la seva acció biològica (Eimon and Harland, 1999). Tot i així, ens podem trobar tan amb homodímers com amb heterodímers i, s'ha descrit que els heterodímers BMP4/7 generarien una resposta més potent que els respectius homodímers (Aono et al., 1995).

Les BMPs van ser descrites per primer cop com a inductores de la formació de cartílag i d'os *in vivo* (Urist et al., 1965). Però més endavant, se les ha associat a multitud de processos relacionats amb el desenvolupament: proliferació, diferenciació, determinació de l'herència de les cèl·lules progenitores, adhesió i posicionament cel·lular i apoptosi o mort cel·lular programada (Massague, 1998; Nohe et al., 2004). Totes aquestes accions les duen a terme via la interacció amb receptors de la família TGF- β .

5.2. Mecanismes implicats en la resposta a BMPs.

5.2.1. Activació dels receptors per les BMPs.

Les BMPs actuen mitjançant receptors de la família TGF- β del tipus I i del tipus II. Trobem que del tipus I les BMPs són capaces d'interaccionar amb els receptors de les BMPs tipus IA i tipus IB (BMPRIa i BMPRIb) i amb el receptor amb activitat cinasa d'activina 2 (ALK-2). Pel que fa als receptors tipus II, s'ha descrit que es poden unir a tres variants: al receptor de BMPs tipus II (BMPRII), a receptor d'activina tipus II (ActRII) i al receptor d'activina tipus IIB (ActRIIB) (Miyazono et al., 2005).

Els receptors de les BMPs tipus I i II són glicoproteïnes d'aproximadament 55KDa i 70KDa, respectivament, i tenen un sol domini transmembrana. Presenten N-glicosilació a la regió extracel·lular (Cheifetz et al., 1988; Wells et al., 1997) i ambdós tipus tenen activitat serina/treonina cinasa (Mathews and Vale, 1991). Els receptors de tipus I tenen un domini denominat L45 loop dins el domini cinasa que els confereix especificitat d'unió al lligand, d'aquí que es digui que qui determina la resposta intracel·lular són els receptors tipus I (Heldin et al., 1997).

L'estructura dimèrica de les BMPs activa la resposta per la inducció de la formació de tetràmers de parelles de receptors tipus I i tipus II. Els dos tipus de receptors s'uneixen de manera cooperativa, és a dir, que la presència d'aquest últim fa que augmenti l'afinitat entre els dos tipus de receptors. A més, s'ha descrit que les BMPs tenen poca afinitat pels receptors tipus I i II individualment, i alta afinitat quan aquests estan en forma d'heterotetràmer (ten Dijke et al., 1994; Rosenzweig et al., 1995).

Un cop s'uneix el lligand, el receptor de tipus II s'autofosforila i fosforila el receptor de tipus I. El receptor de tipus I, un cop activat, fosforilarà els seus substrats, les proteïnes Smad, en residus serina (Macias-Silva et al., 1996; Kretschmar et al., 1997b) que seran els encarregats de transmetre la senyal a nivell intracel·lular (vegeu Figura 9).

5.2.2. Senyalització intracel·lular. Les proteïnes Smad.

El primer membre que es va caracteritzar de la família de les Smads va ser el producte del gen *Mad* (mothers against dpp) de *Drosophila* (Sekelsky et al., 1995). Més endavant, es van caracteritzar tres homòlegs de *Mad* en *C.elegans* *sma-2*, *sma-3* i *sma-4* (Savage et al., 1996) i, poc després es van caracteritzar homòlegs en vertebrats que van rebre el nom de Smads (per la relació amb SMA i MAD).

S'ha aïllat 8 Smads en mamífers (des de Smad 1 fins Smad 8). Les Smads es classifiquen en tres subtipus segons estructura i funció: les Smads regulades pel receptor o R-Smads, la mediadora comuna o Co-Smad i les Smad inhibidores o anti-Smads (Miyazono, 1999).

Les R-Smads que s'activen en resposta als receptors de BMPs són la Smad 1, la 5 i la 8. La Co-Smad és la Smad4 que és comuna per tota la família de TGF β . Totes elles consten de dos dominis altament conservats: MH1 i MH2 (*Mad homology 1* i *2*) al N i al C-terminal respectivament, units per una regió més variable en nombre

d'aminoàcids i seqüència. Les R-Smads tenen al domini MH2 el lloc de fosforilació pel receptor de tipus I.

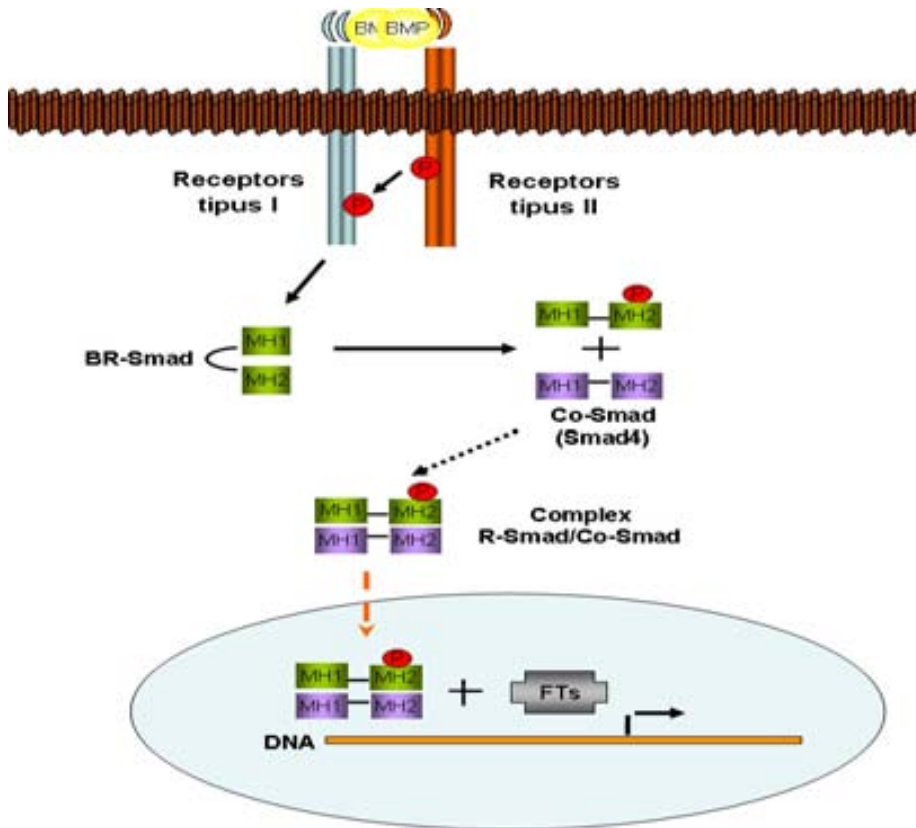


Figura 9. Esquema de la senyalització de les BMPs a través dels seus receptors i activació de les Smads.

En estat basal les Smads formen homo-oligòmers que queden inactius degut a la interacció entre MH1 i MH2. Quan el receptor de tipus I fosforila les R-Smads, aquestes es despleguen, permetent l'associació amb Smad 4. Amb aquest desplegament també es deixen lliures llocs d'unió amb proteïnes d'unió al DNA a MH2, i MH1 pot unir-se directament al DNA (Heldin et al., 1997). Quan té lloc la unió entre les R-Smads i la Co-Smad el complex es transloca al nucli per induir la

transcripció de determinats gens, ja sigui com a coactivadors o com a factors de transcripció pròpiament dits (Miyazono, 2000).

Un cop el complex R/R-Smad/Co-Smad és al nucli, pot influir de diverses maneres en la inducció o repressió de gens. Per una banda, s'ha descrit que les R-Smads de resposta a BMP (BR-Smads) es poden unir directament a DNA en diverses seqüències consens i funcionar com a factors de transcripció directament (Kusanagi et al., 2000; Henningfeld et al., 2000; Lopez-Rovira et al., 2002; Karaulanov et al., 2004). Per altre banda, s'ha vist que les BMPs induïren la transcripció mitjançant la interacció de les BR-Smads amb altres factors de transcripció com CREB i Msx1, factors molt relacionats amb processos de supervivència i desenvolupament (Yamamoto et al., 2000; Ionescu et al., 2004) o d'altres relacionats més amb la seva funció en osteogenia com Runx2, OAZ i Vent2 (Zhang et al., 2000; Henningfeld et al., 2002; Miyazono et al., 2004).

La interacció de les BR-Smads amb altres proteïnes com el coactivador GCN5 (Kahata et al., 2004) i els corepressors com c-Ski i SnoN (Miyazono et al., 2005) també estaria present en la senyalització de les BMPs.

Així doncs, amb l'ajuda d'aquests factors les BMPs indueixen la transcripció de gens, ja siguin relacionats amb la formació de l'os com *Id3*, *OASIS*, *Prx2*, *TIEG*, *Hey1* i *Tcf7* (de Jong et al., 2002), com relacionats amb la seva acció en el desenvolupament com *zic1*, *math1*, *Gli3*, *Pax6*, *Dbx2* i *Msx1* (Timmer et al., 2002; Ebert et al., 2003; Meyer and Roelink, 2003), o amb el control del cicle cel·lular i/o l'apoptosi com *Msx2*, *p21* i *Bcl-x(L)* (Izumi et al., 2001; Israsena and Kessler, 2002; Pardali et al., 2005). També indueix de manera ràpida gens de proteïnes implicades en la seva senyalització i/o en la seva regulació com BMPRIb, Smad 6 i Smad 7 entre d'altres (Panchision et al., 2001; Karaulanov et al., 2004; Ionescu et al., 2004).

5.2.3. Control de la senyalització via Smads.

La senyalització via Smads pot ser regulada en diferents nivells (vegeu Figura 10). Per començar, tenim l'acció de les anti-Smads (Smads 6 i 7) que poden inhibir la transducció del senyal per unió als receptors de tipus I no deixant que les R-Smad s'hi uneixin (Hanyu et al., 2001), per interacció directa amb les R-Smads activades impedit la formació del complex amb Smad 4 (Hata et al., 1998; Murakami et al., 2003), o per interacció amb el complex activat al nucli impedit-li la unió a DNA (Zhang et al., 2007a).

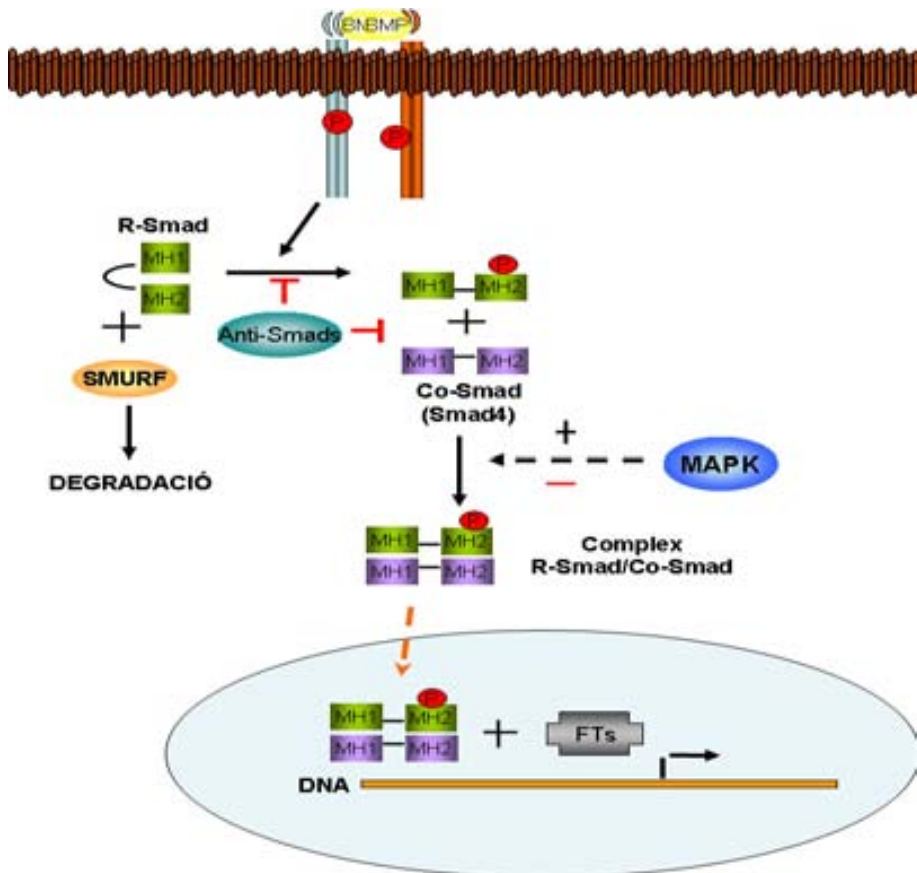


Figura 10. Esquema dels diferents punts de regulació la senyalització via SMADs.

Unes altres proteïnes que regulen la senyalització de les BMPs són les de la família HECT tipus E3 ubiquitin lligases Smurf 1 i Smurf2. Aquestes s'associarien directament amb les R-Smads i n'induirien la degradació (Zhu et al., 1999b; Zhang et al., 2001; Ying et al., 2003). A més, les smurfs també podrien interaccionar amb les anti-Smads al nucli fent-les translocar al citoplasma, on s'unirien al receptor tipus I i el marcarien per ser degradat (Kavsak et al., 2000; Ebisawa et al., 2001).

Les MAPK també participen d'aquesta regulació. S'ha descrit que la fosforilació via MAP Kinasa de la regió d'unió dels dominis MH 1 i 2 inhibiria la translocació al nucli del complex R-Smads/Co-Smad (Kretzschmar et al., 1997a), així com també que TAK1, una MAPKKK, tindria un paper de regulador fi dels efectes de les BMPs en el desenvolupament osteogènic mitjançant la seva interacció amb les BR-Smads (Hoffmann et al., 2005). Per altre banda, s'ha observat que les vies FAK-Ras-Erk i Ras-MEK podrien potenciar la senyalització de les BMP actuant sobre Smad 1 (Yue et al., 1999; Suzawa et al., 2002).

5.3. Les BMPs podrien tenir un efecte dual en el desenvolupament de les CGCs.

Les BMPs participen tant del desenvolupament primerenc com tardà de les CGCs, ja sigui en la generació dels CGPs com en la determinació d'aquests cap a CGCs (Liu and Niswander, 2005). En consonància, aquestes i els seus receptors són expressades en les CGCs tant *in vivo* com *in vitro* (Ming et al., 2002; Yabe et al., 2002). El tractament dels CGPs amb BMP-6 i BMP-7 és capaç d'induir la generació de granulars madures (Alder et al., 1999; Salero and Hatten, 2007). En cultiu de CGCs, el paper pro-diferenciació de les BMPs ha estat confirmat i s'ha vist que tant BMP-2 com BMP-4 tenen la capacitat d'induir diferenciació (Angley et al., 2003; Rios et al., 2004).

Així, el paper de BMPs en pro de la diferenciació d'aquestes neurones està clarament assentat. Pel que fa a actuar com a factor tròfic, hi ha alguns articles que atribueixen un paper proapoptòtic a BMP-2 (Kimura et al., 2000; Hallahan et al., 2003) així com també a BMP-4 en les cèl·lules progenitores de la zona ventricular

(Israsena and Kessler, 2002). Tot i així, també n'hi ha d'altres com el de lantosca i cols., que descriuen com BMP-2 i BMP-4 reduïrien l'apoptosi en cèl·lules DAOY de llinatge cerebelar (lantosca et al., 1999). En el treball de Cox i cols., BMP-7 protegeix les neurones corticals en cultiu enfront una mort induïda per H₂O₂ (Cox et al., 2004), i BMP-6 i BMP-7 incrementen l'efecte de neurotrofines en cèl·lules cultivades del septum enfront hipoglucèmia (Nonner et al., 2001). Més recentment, s'ha observat que BMP-6 actua també com a factor tròfic de les motoneurones sent secretat per les cèl·lules de Schwann (Wang et al., 2007b). En CGCs en cultiu, només existeix l'article de Yabe i cols., on veuen com BMP-6 i BMP-7 protegeixen enfront K5 en estadis immadurs del cultiu i com a estadis madurs poden protegir enfront la mort per addició de H₂O₂ (Yabe et al., 2002). Tot i així, en aquest estudi no entren a definir el mecanisme a través del qual les BMPs exercirien la seva acció.

6. Importància dels canvis d'expressió gènica en resposta a estímuls protectors.

Com venim veient al llarg de la introducció tant l'apoptosi com la supervivència necessiten de la síntesi de *novo* de proteïnes i, en la majoria dels casos això implica que necessiten de l'activació de la maquinària de transcripció. Així doncs, tenim que tots els estímuls dels que hem estat parlant, necessiten de la regulació de l'expressió gènica per tal de generar la seva resposta.

Per l'estudi dels canvis en l'expressió gènica, una eina molt utilitzada és l'array de DNA. En molts casos ens permet tenir una idea de quins gens s'estan induint en resposta a l'estímul estudiat. En el cas de les CGCs, s'ha dut a terme alguns estudis de l'expressió gènica tant al llarg del seu desenvolupament *in vivo*, com en el cultiu. Així, Kaltschmidt i cols., compararen l'expressió de gens entre els dies 4 i 12 postnats, agafant mostra de CGPs (p4) i diferents estadis de diferenciació de les CGCs (p12). Ells trobaren que els nivells de CREB de ERK 1 i 2 i JNK3 entre d'altres estaven augmentats a mesura que avançava el desenvolupament del cerebel. A més, veieren com l'expressió dels receptors de TrkB com la subunitat de NR2C del NMDAR també augmentaven (Kaltschmidt and Kaltschmidt, 2001).

Pel que fa a les CGCs en cultiu, s'estudià si les condicions d'addició de K25 i NMDA mimetitzaven el desenvolupament *in vivo* i, per aquesta raó, es parà especial atenció a aquells gens que es creu com a característics de la diferenciació d'aquestes cèl·lules com les diferents subunitats del receptor GABA_A i el canvi en el patró d'expressió de les subunitats del NMDAR (vegeu apartat 2.4 i 4.1). Els autors de dit estudi, observaren una inducció de TrkB, NR2C i GABA α6 més important en CGCs en K5 que en K25 (Bui et al., 2006).

El grup del Dr. Bading usà aquesta tècnica per tal d'aïllar aquells gens que, en resposta al tractament amb glutamat a concentracions subtòxiques en que promou la supervivència de les neurones hipocampals, eren estrictament induïts per l'estimulació del NMDAR. Així identificaren dos nous gens *bcl6* i *bgt2* que eren induïts per l'estimulació de NMDAR i que mitjançant la regulació de la transcripció aquests actuaven com a mediadors de l'efecte antiapoptòtic de NMDAR (Zhang et al., 2007b).

Així doncs, l'utilització d'arrays de DNA ens ajuda a tenir una idea del que pot estar passant per sota l'activació de totes les vies de senyalització en resposta a un estímul. Donant especial rellevància als efectes a llarg termini que s'observen en resposta a l'estímul i que necessiten de l'activació d'aquells que regulen l'expressió gènica, els factors de transcripció.

6.1. Els factors de transcripció i la supervivència de les CGCs.

Els factors de transcripció (FTs) són proteïnes que s'uneixen específicament a determinats promotors de gens, sent el senyal per reclutar la maquinària necessària per a la transcripció d'aquests. Existeixen també altres reguladors de l'expressió dels gens com són els activadors o repressors que moltes vegades també s'uneixen a elements dins al DNA específics per ells però que no han d'estar específicament en el promotor d'aquell gen al que regulen. Tot i així no tots els moduladors de la transcripció actuen per interacció amb DNA, també n'hi ha que actuen per interacció amb els FTs formant complexos que promouen o reprimeixen la seva acció.

La regulació de l'expressió gènica és un procés clau en el funcionament de la cèl·lula. A partir d'aquest la cèl·lula s'adapta a l'entorn que l'envolta integrant les senyals extracel·lulars i donant si s'escau una resposta. Com hem vist en diversos apartats de la introducció la resposta d'aquesta cèl·lula ja pot ser induir l'expressió de determinats gens que l'ajudaran a adquirir un determinat fenotip, com induir l'expressió de gens que promouran l'apoptosi de la cèl·lula o, per contra, en promouran la supervivència sota un estímul tròfic. Així doncs, aquells que controlen tot aquest procés, acabaran sent de vital importància per la cèl·lula i el seu bon funcionament.

Ja hem esmentat com alguns factors de transcripció juguen papers clau en el desenvolupament de les CGCs, com *nuclear factor-1* (NF-1) que mitjançant la regulació de l'expressió d'integrines regula la migració d'aquestes neurones (Wang et al., 2007c) o *lot1* que induint l'expressió del receptor de PACAP promou el bloqueig de la proliferació dels CGPs (Fila et al., 2009), o les mateixes smads que promourien la diferenciació (Angley et al., 2003; Rios et al., 2004).

En relació a la mort per K5 en CGCs, c-jun té un paper important en la inducció de l'apoptosi. *Egr1* n'indueix l'expressió en resposta a K5 (Levkovitz and Baraban, 2001) i la seva activació, formant complex amb ATF-2, al torn, indueix la proteïna *BH3 only* *Dp5*, altrament coneguda com *harakiri*, que interaccionarà amb *Bcl-2* alliberant *Bax* i promovent l'activació de la via intrínseca de l'apoptosi (Guan et al., 2006). El bloqueig de l'expressió de *dp5* insensibilitza les CGCs a l'apoptosi induïda per K5 (Ma et al., 2007).

Per altre banda, *E2F1* també s'ha postulat com a mediador de la mort per K5. La seva expressió es veu incrementada en K5 i el bloqueig d'aquest increment amb tractament amb flavopiridol, inhibidor de ciclina cinases que en regulen l'expressió, protegeix les CGCs de la mort induïda per deprivació de potassi (O'Hare et al., 2000). Tot i així, en el model animal *E2F1*^{-/-} no es tràa una major resistència a la mort sinó que les neurones madures entren en la fase de síntesi i posterior atrofia, així que se l'hi ha atribuït més el paper de repressor del cicle cel·lular en neurones madures (Wang et al., 2007a).

Els factors de transcripció de la família FKH també tenen una implicació en la mort per K5, com hem citat anteriorment quan els factors tròfics activen Akt, promouen una fosforilació d'aquest que el fa interaccionar amb la proteïna 14.3.3, fet que el fa sortir del nucli (Brunet et al., 1999). Aquesta interacció es veu truncada en condicions apoptòtiques com K5 quan la proteïna cinasa MST1 el fosforila a la serina 207 o 212 segons si FOXO3 o FOXO1, fet que fa que pugui anar a nucli i induir l'expressió de gens de mort com bim (Yuan et al., 2009).

Altres factors de transcripció participen de la supervivència d'aquestes neurones i la seva acció i integritat es veuen truncades en condicions de K5, com NFAT3. El bloqueig de la seva activitat transcripcional indueix la mort de les CGCs i en condicions pro vida com K25 es veu reforçada la seva localització nuclear (Benedito et al., 2005).

La família de MEF2 també és important per a que aquestes neurones sobrevisquin. Ja al 1999, Mao i cols., demostraren mitjançant l'ús del dominant negatiu d'aquests, que eren responsables en part de la protecció per K25 (Mao et al., 1999). Més endavant, un altre estudi va descriure com en condicions proapoptòtiques MEF2A i MEF2D són fosforilats, senyal que els fa ser tallats per caspasa-3, esdevenint inactius (Li et al., 2001). Així també, MEF2A és regulat per la calcineurina i resulta essencial en la maduració dendrítica de les CGCs (Shalizi et al., 2006).

Dins aquest grup de factors prosupervivència en CGCs està CREB. Que, com hem vist en altres apartats no només el tenim en pro de la supervivència d'aquestes neurones sinó que també actua en la diferenciació d'aquestes.

6.2. cAMP response element binding protein CREB.

CREB forma part de la superfamília dels factors de transcripció *basic leucine zipper* (b-ZIP), i junt amb CREM i ATF-1 forma la família que porta per nom CREB. Aquest FT participa en múltiples processos que impliquen modulació de la plasticitat del cervell. Així, en el cervell adult se li atribueixen funcions en la regulació de

processos com la consolidació de la memòria, l'addicció o el control del ritme circadià (Carlezon, Jr. et al., 2005). En el desenvolupament del SNC CREB també participa de manera significativa i, concretament en el cas del cerebel, com hem comentat, participa de la diferenciació de les CGCs i també del control de la supervivència d'aquestes en resposta a l'activitat sinàptica per activació dels NMDAR (Monti et al., 2002).

CREB, com la resta de la superfamília bZIP, conté al domini C-terminal el domini d'unió a DNA i el domini *leucine zipper* responsable de la dimerització. Donat l'alta similitud d'aquest últim domini entre els membres de la família CREB s'ha observat la formació tant d'homo com d'heterodímers (De and Sassone-Corsi, 2000) que són capaços d'interaccionar amb el *CAMP response element* (CRE) que consisteix de TGACGTCA. Tot i així, s'ha vist que CREB és capaç d'unir-se a altres motius que són variacions d'aquesta seqüència sent CGTCA el nucli fonamental (Bokar et al., 1988).

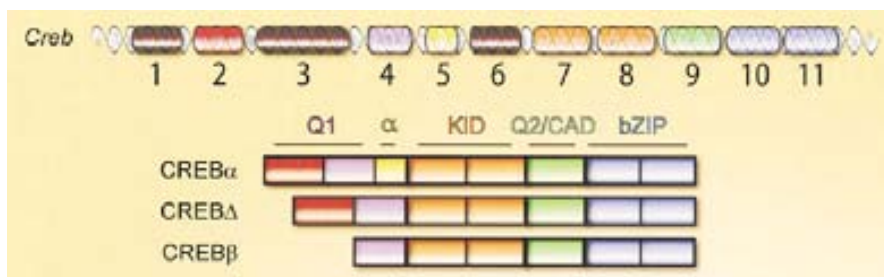


Figura 11. Esquema de l'estructura del gen de *creb* i les diferents isoformes que en deriven per esplicing alternatiu (Lonze and Ginty, 2002).

El gen de CREB, *creb1*, codifica per 3 isoformes de CREB: CREB α , CREB Δ i CREB β resultants del processament alternatiu d'aquest gen (vegeu Figura 11). CREB α i CREB Δ són les més abundants i contenen els dominis Q1 i Q2/CAD (domini constitutivament actiu) separats per el *kinase inducible domain* (KID) on trobem la serina 133 responsable de l'activació d'aquest FT per interacció amb la *CREB binding protein* (CBP). L'expressió d'una o altre variants porta a la interacció amb

diferents coactivadors i/o corepressors que es tradueix en la inducció o repressió de diferents gens.

Per a l'estudi de la funció d'aquest FT s'ha utilitzat varies eines com són la generació de mutants. Així ens trobem en que existeixen dos mutants dominants negatius, MCREB i KCREB i un dominant positiu V16CREB. MCREB que conté una mutació puntual de la serina 133 per alanina, pel que també se'l coneix com a ACREB, forma dímers i s'uneix a DNA però no es pot activar la transcripció per la incapacitat d'interacció amb CBP (Gonzalez and Montminy, 1989). L'altre és KCREB que conté la mutació al *DNA binding site*, aquest segresta per dimerització al CREB endògen ja que no es pot unir a DNA (Pittenger et al., 2002). V16CREB, conté un domini d'activació de transcripció viral que és capaç d'activar la transcripció en absència de fosforilació de la serina 133 (Yan et al., 1994). Per altre banda, també s'ha estudiat la seva funció mitjançant la inhibició de les vies que són responsables de la fosforilació a la Ser 133.

Com hem esmentat, l'activació de CREB s'associa a la seva fosforilació en la serina 133 (Bito et al., 1996). Aquesta fosforilació permet la unió amb CBP i posterior activació de la transcripció. L'estat d'activació d'aquest FT és modulable per molts llocs i per molts efectors diferents. D'aquesta manera tenim que s'ha descrit que la serina 133 és fosforilable per CaMKIV, PKA, RSK o MSK1 (Arthur and Cohen, 2000; Deisseroth and Tsien, 2002). També existeixen altres residus fosforilables de CREB, les serines 142 i 143 que modulen l'activació de CREB. La fosforilació de la Ser142 per CaMKIV, s'ha associat a l'activació de CREB com a dímer independent de la interacció amb CBP (Kornhauser et al., 2002). En canvi, la fosforilació del mateix residu per CaMKII indueix un bloqueig en l'activació del factor de transcripció promogut per la incapacitat per forar dímers (Wu and McMurray, 2001) o per la no capacitat d'interacció amb CBP quan es dona la doble fosforilació junt amb la de la Ser143 (Kornhauser et al., 2002). Per altre banda, la modificació de CBP també regula l'activitat del complex. La interacció entre CBP i CREB és modificable de diferents maneres, com acabem de detallar, la doble fosforilació de les Ser 142 i 143 bloqueja l'activació. A més, CBP pot ser metilat al domini d'interacció amb CREB tenint igual resultat que la fosforilació de les dos serines (Xu et al., 2001). Altres

cofactors participen en el complex com p300 i la modificació d'aquests també pot tenir el seu efecte en l'activitat de CREB o en la desicció dels gens que es regulen o no (vegeu Figura 12).

Recentement, s'ha descrit una família de coactivadors de CREB, els *transducers of regulated CREB* (TORCs) (Conkright et al., 2003). Aquests interaccionen amb CREB per el domini bZIP i són capaços d'induir un augment en l'expressió de gens regulables per CREB independentment de la fosforilació de la Ser133 (Takemori et al., 2007). En condicions basals, els membres de la família TORC es troben fosforilats per les cinases de la família de *AMP inducible kinases* (AMPKs), SIK. Aquesta fosforilació els manté al citoplasma. Quan es dona un increment de cAMP, TORC2 és defosforilat i entra al nucli on s'associa amb CREB i incrementa la transcripció dels gens diana d'aquest FT (Conkright et al., 2003). A més, Ravnsjaker i cols., demostraren que no era una inducció a l'engros sinó que la interacció amb TORC, no només modula l'activació de CREB sinó que el direcciona cap a uns promotors i no d'altres (Ravnskjaer et al., 2007).

Com hem esmentat, la regulació de CREB per fosforilació en Ser133 pot ser duta a terme per l'acció de varies cinases que seran activades per estímuls diferents. L'entrada de calci a través de receptors de membrana, com els canals de calci tipus L o el AMPAR o el mateix NMDAR, indueix l'activació de calmodulina que activa a la CaMKII i la CaMKIV que regularan la fosforilació de CREB. Per altre banda, l'augment de cAMP, per un increment en l'activitat de l'adenilat ciclasa induït per l'activació de receptors acoblats a proteïnes Gs o per l'acció de la pròpia calmodulina, comporta l'activació de la PKA que també és capaç de fosforilar CREB a la Ser133. Tant l'activació de receptors tirosina cinasa com l'entrada de calci, per l'acció de neurotrofines com el BDNF entre d'altres, activen la via de MEK/ERK que via RSK i/o MSK1 són capaços d'actuar sobre CREB (Arthur et al., 2004). Per últim, l'activació de RSK dependent de PDK1 també és essencial per a que aquesta cinasa pugui fosforilar CREB (Lonze and Ginty, 2002; Carlezon, Jr. et al., 2005).

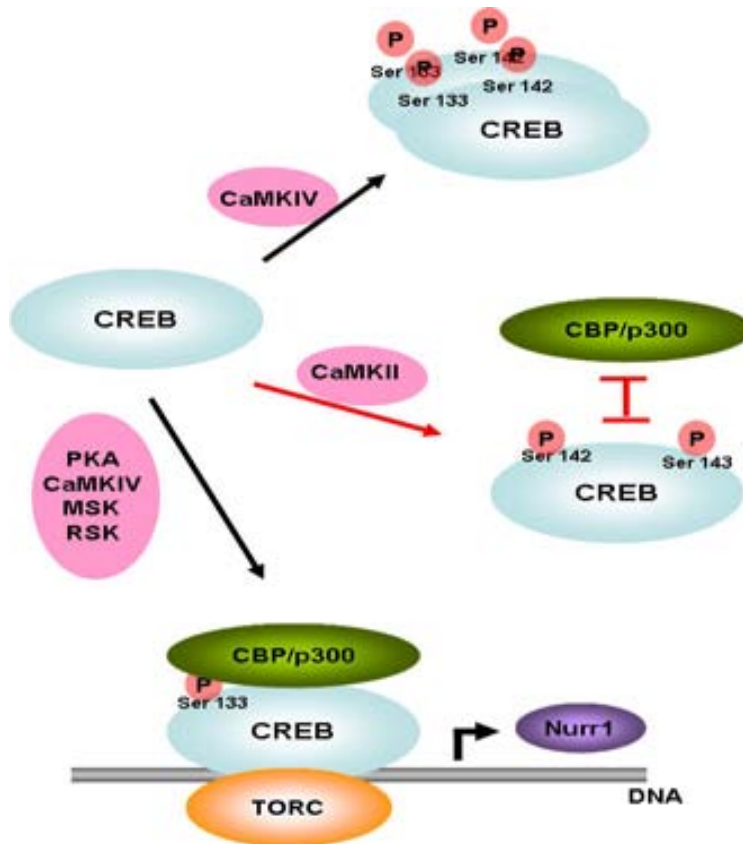


Figura 12. Senyalització de CREB. Diagrama esquemàtic on es representen les diferents modificacions que pot presentar CREB per fosforilació de cinases. La fosforilació de la serina 142 per CamKIV n'indueix una activació així com la de la serina 133 on s'ha il·lustrat a tall d'exemple la regulació de Nurr1 que es du a terme amb coordinació amb TORC. Per contra, la fosforilació en la serina 143 per CaMKII inhibeix l'activació de CREB per incapacitat d'associació amb CBP.

En el cas del NMDAR, Lee i cols., veieren que ,en neurones corticals, l'addició de U0126, inhibidor de MEK, i KN62, inhibidor de la CaMKIV bloquejaren la fosforilació de CREB no tenint cap efecte sobre ella els inhibidors de PKA ni PKC (Lee et al., 2005a). Per contra, en l'estudi de Iida del 2001, veien com la inhibició de l'activació

de la via de les MAPK induïda per NMDAR, en neurones hipocampals, no era rellevant en la modulació dels nivells de fosforilació de CREB (Iida et al., 2001). En CGCs s'ha vist l'activació tant de ERK com de la PI3K. Tot i així, s'ha atribuït a la via de PI3K-Akt el paper regulador de la fosforilació de CREB (Soriano et al., 2006). A més, la regulació de la fosforilació de CREB per aquest receptor en determina la resposta. La sobreestimulació de NMDAR, que s'ha lligat més a l'activació del receptor extrasinàptic, provoca una baixada en els nivells de fosforilació de CREB (Hardingham et al., 2002; Hardingham and Bading, 2002). Aquesta baixada s'ha atribuït a l'activació de calcineurina per l'entrada massiva de calci (Lee et al., 2005a).

La sobreexpressió o l'impediment de la fosforilació d'aquests participen de la supervivència de les CGCs (Bonni et al., 1999). En estudis fets en cultiu s'ha descrit un augment en l'activació i/o participació directe de CREB en resposta a l'estimulació NMDAR (Monti et al., 2002; Hardingham et al., 2002; Papadia et al., 2005; Soriano et al., 2006) o, com Zhang i cols, que identificaren dos gens, *bcl6* i *bgt2*, regulables per CREB com a mediadors de l'efecte de l'activació del NMDAR en neurones hipocampals (Zhang et al., 2007b).

CREB té molts substrats, Impey i cols., els han caracteritzat dins el genoma (Impey et al., 2004). Entre els més característics tenim cFos (Sheng et al., 1990), Bdnf (Tao et al., 1998), CREM (Foulkes et al., 1991) o Bcl-2 (Riccio et al., 1999) tots ells amb possibles implicacions en la supervivència de les neurones. Tot i així, s'ha vist com CREB no només regula l'expressió de gens al nucli sinó que també és capaç de regular l'expressió del genoma mitocondrial, fet que també s'ha demostrat rellevant per el manteniment de la viabilitat neuronal (Lee et al., 2005b).

D'uns anys cap aquí també s'ha vist com CREB és capaç de modular la transcripció del receptor orfe de la família NR4A, Nurr1 (McEvoy et al., 2002; Ravnskjaer et al., 2007; Lemberger et al., 2008). Tot i així no s'ha aprofundit en veure si l'expressió d'aquest substrat podria tenir algun paper en efectes de CREB en la supervivència neuronal.

6.3. El receptor nuclear orfe 4a2 (Nr4a2) o altrament conegut, Nurr1.

Nurr1(Nr4a2) pertany al supgrup de receptors nuclears orfes Nr4a junt amb Nur77 (Nr4a1) i NOR-1 (Nr4a3). Els membres d'aquest subgrup són expressats en teixits d'alta demanda metabòlica i energètica com el múscul llis, teixit adipos, cor, ronyó, cèl·lules T, fetge i cervell.

Els Nr4a pertanyen a la superfamília dels receptors nuclears (NRs). L'estructura bàsica dels NRs consisteix en: un domini al N-terminal, AF-1, responsable de la interacció amb altres factors de transcripció, coactivadors i corepressors que varia segons els NRs; un domini d'unió a DNA que conté dos motius de dits de Zinc; una regió linker i el domini d'unió al lligand que conté AF-2, butxaca d'interacció amb el lligand (vegeu Figura 13). Tot i així, l'estructura dels NR4A divergeix d'una manera clara tant en el motiu AF-1 com en el motiu d'unió al lligand. El domini AF-1 d'aquests NRs els confereix activitat constitutiva (Paulsen et al., 1995). Per altre banda, mitjançant estudis de cristalografia i mutació dirigida, Wang i cols., han descrit el domini d'unió a lligand (LBD) de Nurr1 com un domini l'activitat del qual és modulable però no dependent de la unió a lligand, és a dir, que la modulació d'aquest per fosforilació o altres canvis postraduccionals fa variar l'activitat de Nurr1 però que aquesta no és dependent de la unió a lligand ja que el domini típic dels NRs contingut en el LBD, AF-2, té una conformació que s'assembla a la d'altres NR acoblats a lligand. A més, les butxaques on s'uneixen els lligands als NRs en el cas de Nurr1 estan ocupades per residus hidrofòbics voluminosos (Wang et al., 2003).

Els NR4As desenvolupen la seva activitat transcripcional per unió al DNA tant en forma monomèrica com dimèrica i, Nur77 i Nurr1 formen heterodímers amb altres NRs com RXR. La seva seqüència consens és octaoligonucleòtid 5'-AAAGGTCA-3' (Wilson et al., 1991). I regulen l'expressió de molts gens de manera diferencial segons la seva expressió en diferents teixits i/o tipus cel·lulars. Per estudis amb ratolins KO pels diferents membres de la família, es va veure que entre ells existien algunes redundàncies funcionals però que també altres de les seves funcions són específiques de cada membre (Maxwell and Muscat, 2006).

Els ratolins *Nurr1*^{-/-} moren al néixer per defectes en el seu desenvolupament. Concretament, presenten defectes en la funció respiratòria. A més, el KO per aquest gen presenta una agènesi de les neurones dopaminèrgiques consistent, amb la reducció de l'expressió de la tirosina hidroxilasa i altres marcadors de neurona dopaminèrgica gens que s'han descrit regulables per Nurr1 (Castillo et al., 1998). Així, s'ha descrit que Nurr1 té un paper important en la regulació de la supervivència d'aquestes neurones ja que la reducció en els seus nivells en el ratolí *Nurr1*^{+/-} incrementa la sensibilitat d'aquestes neurones a estímuls tòxics com el 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridina (MPTP) (Le et al., 1999). En aquesta mateixa direcció, una mutació de Nurr1 que en baixa l'activitat transcripcional s'ha observat en malalts de Parkinson (Jacobsen et al., 2008).

El missatger de Nurr1 s'expressa de forma ubíqua en rata adulta tenint majors nivells a la hipòfisis. Al cervell, l'expressió és majoritària en l'escorça presentant nivells més baixos en el cerebel (Ohkura et al., 1999). Durant el desenvolupament Nurr1 es troba expressat de manera important a tot el SNC (Zetterstrom et al., 1996).

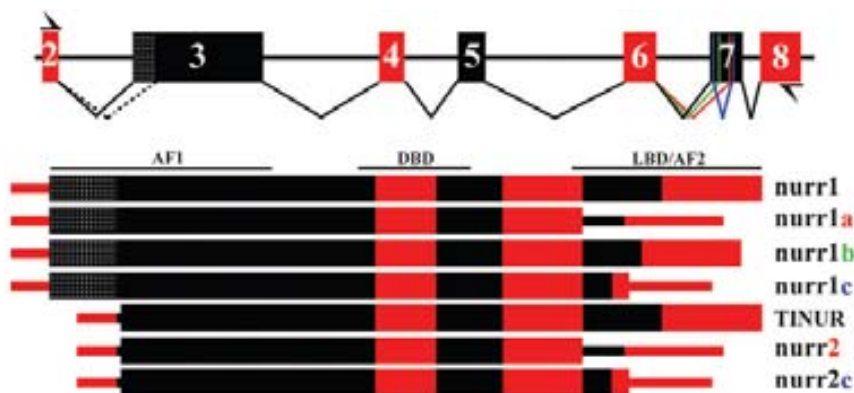


Figura 13. Diagrama esquemàtic del gen de *nurr1*. Variants resultant del processament alternatiu on s'indica les regions estructurals típiques dels NRs. La correspondència entre exons i dominis de la proteïna es poden seguir pel codi de colors. (Michelhaugh et al., 2005)

El gen de Nurr1 codifica per a 7 isoformes diferents. Tenint plena activitat transcripcional només la forma completa. Nurr1a, b, c i TINUR tenen menor activitat transcripcional mentre que nurr2 i nurr2c actuen com a dominants negatius sobre l'acció com a factors de transcripció de la família NR4A (Ohkura et al., 1999) (Michelhaugh et al., 2005; Filippi et al., 2007). En el promotor de Nurr1 hi trobem els elements de resposta als factors de transcripció Sp1, NfκB i CREB (Torii et al., 1999) i McEvoy i cols., i altres laboratoris han demostrat la regulació per NFκB i CREB (McEvoy et al., 2002; Darragh et al., 2005). Altrament, la regulació de l'expressió de Nurr1 també és dependent de TORC que actuaria junt amb CREB per induir-ne l'expressió en resposta al tractament amb forskolina. Mentre que en concomitància amb altres FT diferents de CREB, TORC, ajudaria a induir la transcripció de Nurr1 en cèl·lules tractades amb el fàrmac inductor d'apoptosi stauporina (Ravnskjaer et al., 2007).

L'activitat de Nurr1 com a factor de transcripció pot ser regulada per algunes de les vies de senyalització de les que hem parlat anteriorment. Així, Nurr1 pot ser fosforilat a la serina 125 per la via de ERK/MSK1 (Darragh et al., 2005; Jacobsen et al., 2008), aquest residu es troba al domini AF-1 i la seva fosforilació incrementa l'activitat transcripcional de Nurr1. En l'estudi de Fan i cols., atribueixen a aquesta fosforilació la responsabilitat de la translocació de Nurr1 al nucli (Fan et al., 2009). Una altra via de les MAPK, la de p38 també regula l'activitat de Nurr1, la prevalència de l'activació per ERK o p38 és dependent d'estímul (Darragh et al., 2005). Per altre banda, Nurr1 pot ser regulat per sumoilització ja que mutacions en els dos residus lisina sensibles a sumoilització la 9 i la 577, produeixen un increment i una reducció de l'activitat de Nurr1 respectivament. PIASγ indueix la sumoilització de Nurr1 en la lisina 9 promovent la inactivació d'aquest (Galleguillos et al., 2004).

Nurr1 regula tot una sèrie de gens relacionat amb el desenvolupament de les neurones dopaminèrgiques, com la tirosina hidroxilasa (TH), el transportador de monoamina vesicular 2 (VMAT2) i el transportador de dopamina (DAT) (Smits et al., 2003). A més, també s'ha vist que és capaç de regular un membre de la família del PACAP, VIP (*vasoactive intestinal polypeptide*) (Luo et al., 2007), factor que s'indueix en el model de neuroprotecció per K25 en CGCs i que en participa

parcialment de l'efecte protector (Fukuchi et al., 2004). α -sinucleïna també és regulada per Nurr1 (Yang and Latchman, 2008) i la baixada en els seus nivells induïx una baixada en la viabilitat de les neurones granulars en cultiu (Monti et al., 2007). Emperò, el gen regulat per Nurr1 que ens atany més directament en aquest treball és bdnf (Volpicelli et al., 2007). Mitjançant l'ús de cotransfeccions i bloqueig de l'expressió per siRNA, Volpicelli i cols., van descriure com Nurr1 regula la transcripció de bdnf mitjançant la interacció amb els promotors I, IV, VI i VII d'aquest (Volpicelli et al., 2007).

II - OBJECTIUS

II- OBJECTIUS

En la present tesi doctoral ens varem plantejar dos objectius principals.

En primer lloc, l'estudi del paper de les proteïnes morfogenètiques d'os (*Bone Morphogenetic Proteins*, BMPs) en la supervivència de les neurones granulars de cerebel (CGCs). Aquest objectiu es va desglossar en els següents subapartats:

- Determinació de l'efecte de l'addició de les BMPs en la supervivència de les CGCs enfront de la mort induïda per privació de potassi (K5).

- Determinació dels mecanismes implicats en l'efecte de les BMPs.

En segon lloc, ens varem plantejar aprofundir en els mecanismes implicats en l'efecte protector del NMDA enfront de K5 (Xifro et al. 2005). Aquest apartat es va afrontar amb els següents subobjectius:

- Realització d'un estudi dels canvis en l'expressió gènica en les CGCs en presència de NMDA. Tant gen per gen com per anàlisi ontogènic.

- Anàlisi comparatiu amb bases de dades bibliogràfiques dels gens que tenen canvis en la seva expressió de manera significativa en resposta a NMDA .

- Dels candidats obtinguts de l'apartat anterior, comprovació de la possible participació en l'efecte protector del NMDA. I, en cas afirmatiu, estudi dels mecanismes implicats en la participació de l'efecte.

III - MATERIALS I MÈTODES

1. El cultiu de neurones granulars de cerebel, com a model d'estudi de la mort neuronal.

1.1. Les neurones granulars de cerebel (CGCs) moren per un procés apoptòtic en presència de concentracions fisiològiques de potassi *in vitro*.

El model de les CGCs en cultiu fou descrit per Gallo i cols. (Gallo et al., 1987) i és àmpliament utilitzat en molts treballs, tant per a l'estudi de l'apoptosi com per a l'estudi d'efectes i mecanismes moleculars antiapoptòtics. Les neurones granulars de cerebel necessiten concentracions despolaritzants de potassi per a sobreviure *in vitro* (per exemple 25mM;K25). Per contra, concentracions fisiològiques de potassi en el medi de cultiu (5mM; K5) produeixen la mort apoptòtica (Gallo et al., 1987;D'Mello et al., 1993)

Només durant els dos primers dies *in vitro* (DIV), sembla que la supervivència de les neurones és independent de les concentracions extracel·lulars de potassi (Gallo et al., 1987). En presència de factors tròfics, com per exemple IGF-1 (factor de creixement derivat de la insulina-1), BDNF (factor neurotròfic derivat del cervell), NMDA (N-metil-D-aspartic) o PACAP (polipèptid activador de l'adenilat ciclase de la pituitària) entre d'altres, les neurones sobreviuen (Balazs et al., 1988;D'Mello et al., 1993;Kubo et al., 1995;Villalba et al., 1997)

1.2. Material biològic i obtenció de la suspensió cel·lular.

Per la realització dels cultius primaris de neurones granulars de cerebel de rata es van utilitzar rates de la soca OFA de 7 o 8 dies d'edat, sent el seu sexe indiferent.

Breument, es van extreure els cerebels i se'n va eliminar les meninges per tal de minimitzar la contaminació per fibroblasts. Seguidament, es van tallar els cerebels i es van dipositar en un tampó Krebs-Ringer (NaCl 120mM, KCl 4.8mM, KH₂PO₄ 1.2mM, NaHCO₃ 25mM, Glucosa 14.3mM; 3g/L d'albumina de sèrum boví) amb 0,03% de MgSO₄. Es va centrifugar a 1500 rpm uns segons i es va eliminar el sobrenedant. Per disgregar enzimàticament el teixit, el sediment es va incubar amb

una solució Krebs-Ringer que contenia 0.25g/L de tripsina durant 10 minuts a 37°C. Per tal d'eliminar l'acció de la tripsina i degradar el DNA en suspensió es va afegir una solució Krebs-Ringer amb inhibidor de tripsina (SBTI; Sigma-Aldrich; 0.312g/L), desoxiribonucleasa (SIGMA; 0.048g/L) i 0,006% de MgSO₄ i es va repetir el pas de la centrifugació a 1500 rpm uns segons tornant a eliminar el sobrenedant. Seguidament, s'homogeneïtzà amb solució Krebs-Ringer amb SBTI (0,52 g/L), desoxiribonucleasa (0,08g/L), i 0,038% MgSO₄ i es va passar per una malla de niló (amb un diàmetre del por de 40 µm) amb l'ajuda d'una pipeta Pasteur per tal de dissociar mecànicament el teixit i aconseguir una suspensió unicel·lular. Aquest últim pas es va repetir 2 vegades.

La suspensió cel·lular es va centrifuga 5 minuts a 1000 rpm i el sediment resultant es va diluir amb medi de cultiu. Un cop realitzat el comptatge cel·lular (amb blau tripà 1:1) , es van diluir les cèl·lules en D-MEM (Dubelcco's Modified Eagle Medium) amb GlutaMAX™ (GIBCO) o BME (Basal Medium Eagle; Sigma-Aldrich) complementat amb 2mM de glutamina, amb 10% de sèrum fetal boví (FBS; Sigma-Aldrich), 25.000 u de penicil·lina (PAN Biotech) i 25 mg d'estreptomicina (PAN Biotech) i 5mM o 25mM de KCl. Les cèl·lules es van sembrar a una densitat de $3 \cdot 10^3$ cèl·lules/mm².

Les plaques on es van sembrar les neurones van ser pretractades amb poli-L-Lisina (5µg/mL; Sigma-Aldrich) un mínim de 2 hores a l'incubador. En el cas de la sembra en cubres de 10mm de diàmetre de vidre per realitzar les immunocitoquímiques per microscopia confocal el pretractament té la mateixa durada però la concentració de poli-L-lisina usada fou 10 cops major (50µg/mL). Els cultius de cèl·lules granulars de cerebel (CGCs) es van mantenir dins l'incubador en una atmosfera humida, amb un 5% de CO₂ i a 37°C fins el dia d'utilització.

Al cap de 20-24 hores, es va afegir als cultius citosina-β-D-Arabinofuranoside (Ara-C) 10 µM per tal d'evitar la proliferació de cèl·lules gials. El cultiu presenta més d'un 90% de neurones (Rodriguez et al., 1991)

1.3. Tractaments del cultiu.

1.3.1. Tractaments de les CGCs en cultiu amb Proteïnes Morfogenètiques d'Òs (Bone Morphogenetic Proteins; BMPs).

Tenint en compte el paper de les BMPs durant el desenvolupament del cerebel es va voler estudiar si aquestes eren capaces de mimetitzar aquest efecte protector durant el desenvolupament o, si al contrari, eren capaces d'inhibir el desenvolupament correcte del cultiu tot i estar aquest en concentracions despolaritzants. Així que es van sembrar les cèl·lules en plaques de 96 pous en medi D-MEM 5mM KCl amb sèrum i a 1 o 2 DIV el varem substituir per D-MEM 5 o 25mM de KCl amb sèrum amb o sense BMP-2 (100ng/mL) o BMP-6 (100ng/mL) o BMP-7 (30ng/mL). La viabilitat cel·lular per MTT es va determinar cada 2 DIV fins a 12 DIV.

També es va voler estudiar l'efecte de les BMPs sobre la mort apoptòtica induïda per privació de potassi i factors tròfics de les CGCs immadures. Es van sembrar les neurones en plaques de 24 pous en un medi D-MEM amb 25mM de KCl i sèrum i a 2 DIV se'ls va canviar el medi per medi D-MEM 5 o 25mM de KCl sense sèrum amb o sense BMP-2 (100ng/mL) o BMP-6 (100ng/mL) o BMP-7 (30ng/mL) i es va estudiar la viabilitat a 24 hores després del canvi de medi.

El possible efecte de les BMPs davant la mort de les CGCs per privació de potassi i factors tròfics també es va estudiar en estadis madurs del cultiu (6 DIV). Es van sembrar les CGCs en plaques de 24 en un medi D-MEM amb 25mM de KCl i sèrum. A 6 DIV se'ls va canviar el medi per medi D-MEM 5 o 25mM de KCl sense sèrum amb o sense BMP-2 (100ng/mL) o BMP-6 (100ng/mL) o BMP-7 (30ng/mL) i es va estudiar la viabilitat a 24 hores i 48 hores després del canvi de medi. Un cop establert aquest com a model d'estudi, la resta de tractaments amb BMP-6 i BMP-7 foren com ha estat descrit i es recolliren les cèl·lules en els temps indicats per tal de fer l'estudi dels mecanismes implicats en l'efecte neuroprotector de BMP-6.

1.3.2. Tractament amb NMDA (N-methyl-D-aspartic) del cultiu immadur de CGCs

En l'estudi dels mecanismes implicats en l'efecte neuroprotector del NMDA es va utilitzar el model prèviament descrit en el nostre grup que consistia en sembrar les CGCs en medi BME amb FBS amb 5mM de KCl i a 2 DIV tractar amb NMDA (100µM) o K25 (Xifro et al., 2005).

1.3.3. La inhibició de proteïnes per determinar-ne el seu rol.

La inhibició de determinades proteïnes per estudiar-ne la funció és una tàctica molt utilitzada en la recerca científica. En el conjunt de la tesi s'ha utilitzat aquesta estratègia diverses vegades i de diferents maneres: ja sigui per inhibició farmacològica, sobreexpressió del dominant negatiu o silenciament de l'expressió per shRNA.

En el cas de la inhibició farmacològica, les CGCs es van tractar amb PD98059 (50µM) o U0126 (1µM) 45 minuts abans del tractament amb o sense BMP-6 i es varen mantenir en el medi a la mateixa concentració en els casos indicats.

En el cas de la sobreexpressió del dominant negatiu, donat que les CGCs són difícils de transfectar es va utilitzar virus. Més concretament, *herpes virus simplex* (HSV) que contenen el gen de la proteïna verda fluorescent (HSV-GFP) o el dominant negatiu de CREB, MCREB, fusionat amb GFP (HVS-MCREBGFP) que foren cedits pel laboratori del Dr Eric Nestler del UT SOUTHWESTERN Medical Center (Carlezon, Jr. et al., 2005). Així doncs, a 4 DIV es varen infectar les cèl·lules amb els virus HSV-GFP i HSV-MCREBGFP i a 6 DIV es va fer el tractament com s'ha detallat en l'apartat anterior, 24 hores després es va determinar la viabilitat cel·lular per recompte de nuclis apoptòtics d'aquelles cèl·lules que expressaven GFP.

En darrer lloc queda la utilització dels shRNA el funcionament dels quals es detallarà més endavant en l'apartat 14 d'aquesta secció, però que, com en el cas anterior, la

introducció d'aquests en les neurones fou a través de vectors lentivirals. En aquest cas el tractament de les CGCs fou diferent, el dia de cultiu les CGCs es van sembrar en la meitat de volum i en presència dels diferents lentivirus (1×10^6 partícules infectives/mL) amb els shRNA pels gens de *Nr4a2/Nurr1*, *vgf*, *pcsk1/3*, *creb1* i *bcl-2*, o els shRNA *scramble* i *scNurr1*, que foren utilitzats com a controls en tots els estudis posteriors. El medi amb els virus es va mantenir durant 5 hores i, seguidament, es va canviar per medi BME amb FBS i 5 o 25mM de KCl segons convingués en el cas de les cèl·lules a tractar amb NMDA, i per D-MEM amb FBS i 25 mM de KCl en el cas de les cèl·lules a tractar amb BMP-6.

2. Determinació de la viabilitat neuronal.

2.1. Per avaluació de l'activitat mitocondrial amb l'assaig de reducció del MTT.

El MTT o Bromur de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazoli, és una sal de tetrazoli hidrosoluble i és reduït a formazà, un compost lila insoluble en medi aquós, per les deshidrogenases mitocondrials de les cèl·lules viables. El formazan solubilitzat es pot mesurar espectrofotomètricament, correlacionant l'absorbància obtinguda amb la viabilitat cel·lular. Tot i que aquesta tècnica permet detectar el percentatge de cèl·lules viables, no permet discriminar si les cèl·lules mortes moren per necrosi o apoptosi (Mosmann, 1983).

Per mesurar la viabilitat cel·lular, es va afegir MTT a 0,25 mg/mL als temps convinguts i es va incubar a 37°C durant 45 minuts. Posteriorment, es va aspirar el medi i es va afegir el mateix volum del pou de DMSO (Dimetil sulfòxid) per dissoldre el formazà format i procedir a la mesura dual espectrofotomètrica a 560 nm i 620 nm en un lector de plaques (Labsystem Multiskan). Si l'assaig no es realitzava en plaques de 96 pous, es transferien ràpidament 100 µL del contingut de cada pou amb DMSO a una placa de 96 pous per tal de realitzar la lectura espectrofotomètrica.

2.2. Per observació de l'estat de la cromatina mitjançant tinció amb HOECHST.

El Hoechst 33258 o Bisbenzimidazol (2-[4-hidroxifenil]-5-[4-metil-1-piperazinil]2,5-bisbenzimidazol) (Molecular Probes) és un compost fluorescent que s'uneix al DNA. Si la cromatina es troba condensada o fragmentada, tal com esdevé en processos de mort cel·lular per apoptosi, aquest compost es concentra en major proporció a causa de la condensació de les estructures i el senyal que s'obté amb el microscopi de fluorescència és molt més intens. Per tant, l'observació de la condensació de la cromatina, una de les característiques morfològiques de l'apoptosi, es un bon indicador del grau de mort apoptòtica present en els nostres cultius.

Els dies que es volia observar l'estat de la cromatina, les cèl·lules que s'havien sembrat en plaques de 24 sobre cubres de vidre van ser rentades amb tampó tris salí (TBS, 20mM Tris; 137mM NaCl; pH 7,6) pretemperat a 37°C. Posteriorment, es van fixar amb paraformaldèhid al 4% en tampó fosfat salí (PBS, 137mM de NaCl; 2,6mM KCl; 10mM Na₂HPO₄; 1,8mM de KH₂PO₄; pH 7,4) durant 10 minuts. Es van rentar amb TBS a 4°C dues vegades i es va afegir una dissolució de Hoechst 33258 1µg/mL. Després d'incubar 5 minuts, es van realitzar dos rentats més amb TBS a 4°C. Amb unes gotes de medi de muntatge FluorSave (Calbiochem), es va procedir al muntatge dels cubres sobre un portaobjectes per a la seva observació al microscopi de fluorescència (LEICA) a una longitud d'ona d'emissió de 460 nm.

Els nuclis laxos es van considerar neurones viables, en canvi, els nuclis condensats o fragmentats es van comptar com a neurones apoptòtiques. Es van comptar totes les cèl·lules d'un mínim de 3 camps per cada pou (unes 1.000 cèl·lules per cada condició de cada experiment). Els resultats es van expressar en forma de percentatge de cèl·lules apoptòtiques vers el total de cèl·lules comptades

3. Immunocitoquímica.

Les CGCs van ser sembrades en el medi convenient en plaques de 24 amb cubres de vidre o de 48 pous. Als temps detallats post-tractament, es va rentar amb PBS complementat amb 30mM de glucosa, 100.000 u de penicil·lina i 100 mg

d'estreptomina (PBS-AB) i es va fixar les cèl·lules amb paraformaldehid (Electron Microscopy Sciences) al 4% en PBS durant 1 hora a 4°C. Posteriorment, es va fer 3 rentats de 5 minuts amb TBS-Tween 0,1% (TBS-T) a temperatura ambient. Per tal de bloquejar els grups aldehid del fixador, es va rentar 2 cops amb glicina 0.1M durant 10 minuts. Tot seguit, es va prosseguir a incubar les cèl·lules amb TBS-T amb Tritó X-100 al 0.1% durant 10 minuts a temperatura ambient per permeabilitzar les membranes cel·lulars. Per evitar les unions inespecífiques dels anticossos primaris es va incubar les cèl·lules amb la solució de bloqueig (TBS-T amb 5% de sèrum fetal de cabra (FCS) i 3% de BSA) durant 1 hora a 4°C. Seguidament, es van fer 3 rentats de 5 minuts amb TBS-T i es va incubar amb els següents anticossos primaris: Smad 1 i Smad 4 (Upstate), Smad 5 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) i caspasa-3 activa (Cell signaling) diluïts en TBS-T amb 5% de BSA a raó de 1:100 durant 20h a 4°C. Es va rentar amb TBS-T 3 cops i es va incubar amb anticossos secundaris amb Fluoresceïna (FITC) conjugada, anti-conill pels primaris Smad 1, Smad 4 i caspasa-3 activa i anti-cabra per Smad 5 (Molecular Probes) diluïts en TBS-T amb 5% de BSA a raó de 1:500 durant 1 hora a temperatura ambient. Després de realitzar 3 rentats amb TBS-T es va incubar amb Hoechst 33258 durant 5 minuts a temperatura ambient. Tot seguit, es va realitzar 2 rentats més amb TBS-T i es va procedir a muntar els cubres en els portaobjectes aplicant una gota de medi de muntatge FluorSave (Calbiochem) per aquelles immunocitoquímiques que havien de ser visualitzades en microscopia confocal (LEICA TCS 4D), o directament, es va obtenir les imatges de la placa amb microscopi invertit (Nikon ECLIPSE TE-2000-E). La tinció de nuclis amb Hoechst es va utilitzar com a control de localització nuclear, així com també, pel recompte de cèl·lules totals.

4. Fraccionament Subcel·lular.

Un cop tractades, les CGCs es van rentar amb PBS-AB a 4°C, es van resuspendre en PBS-AB, i centrifugar durant 5 minuts a 1.000g a 4°C. El sediment resultant es va resuspendre amb cura en tampó A (0,01M Hepes pH 7,9; 1,5mM MgCl₂; 0,01M KCl; 0,5mM DL-Dithiothreitol (DTT; Sigma); 0,1% NP-40; 1mM PMSF; 10µg/ml Aprotinina; 20µg/ml Leupeptina; 1mM Na₂VO₄) i es va incubar 5 minuts en gel per tal de llisar les membranes plasmàtiques. Seguidament, es va centrifugar a 400g i el

sobrenedant es va recuperar com a fracció citosòlica. Els nuclis precipitats es van incubar durant 30 minuts a 300 rpm i en fred amb un tampó amb alta concentració de sals (0,02M Hepes pH 7,9; 25% glicerol; 0,42M NaCl, 0,2mM EDTA; 0,5mM DTT; 1mM PMSF; 10µg/ml Aprotinina; 20µg/ml Leupeptina; 1mM Na₂VO₄) per aïllar les proteïnes nuclears. Finalment, es va centrifugar a 16.000g a 4°C i el sobrenedant es va considerar com a la fracció nuclear. Les mostres es van quantificar amb BCATM protein assay (BCA; Pierce) i es van guardar a -80°C. Ambdós fraccions subcel·lulars es van analitzar per Western blot. La fracció nuclear també fou utilitzada per fer l'EMSA.

5. Western Blot.

Les CGCs es van sembrar en plaques de 35mm, als temps detallats post-tractament es van rentar amb PBS-AB, i seguidament es van recollir en tampó de llisi (20mM Tris pH 7.5, 1% NP-40, 150mM NaCl i 5mM EDTA suplementat amb inhibidors de proteases (1mM PMSF, 10µg/ml Aprotinina, 20µg/ml Leupeptina, 1mM Na₂VO₄)) i centrifugar durant 10 minuts a 16.000g a 4°C. Es va descartar el sediment, es va determinar la concentració de proteïna del sobrenedant amb el mètode de Bradford (Bradford, 1976) i es va ajustar cada mostra a una concentració de 1 µg/µL amb tampó laemmli-SDS (250mM Tris-HCl pH 6.8, 5%(p/v) SDS, 2.5% glicerol, 1.4M β-mercaptoetanol y 0,01% (p/v) de blau de bromofenol).

Entre 5-30µg de proteïna, segons el cas, es van separar per electroforesi en gels de poliacrilamida en condicions despolaritzants (Poly Acrilamide Gel Electroforesi-Sosium Dodecyl Sulfate; PAGE-SDS). La densitat dels gels fou variable 10-15% segons la proteïna que s'estudiava. L'electroforesi es va realitzar a una intensitat constant de 30mA per gel durant 1 hora en tampó d'electroforèsi (25mM de Tris/192mM glicina; 0,1% SDS). Posteriorment, es va transferir les proteïnes a membranes de nitrocel·lulosa (Amersham Biosciences) per incubació en tampó de transferència (25mM de Tris/192mM glicina; 20% de metanol) durant 1 hora a 90V. Per tal d'evitar unions inespecífiques dels anticossos primaris, es van incubar les membranes amb tampó de bloqueig (TBS-T o PBS-T amb 5% (1) o 10% (2) de llet suplementat amb 5% FBS (3) o blotto: TBS-T amb 2% de llet i 0,5% d'albúmina de

sèrum boví (4)) 1 hora a temperatura ambient. Seguidament, es van rentar les membranes 4 cops amb TBS-T o PBS-T (segons l'anticòs utilitzat) i es van incubar tota la nit a 4°C amb l'anticòs primari diluït en tampó de bloqueig: anti-fosfo akt (ser. 473)¹, anti-fosfo p44/42 MAPK¹, anti-MAPK¹, anti-fosfo CREB (ser. 133)¹, anti-CREB¹, anti-caspasa-3¹, anti-Nur77¹ de Cell Signaling; anti-BMPRIa¹, anti-BMPRIb¹, anti-Smad5¹, anti-JNK2¹, anti-Histona H1¹, anti-VGF³ i anti-BDNF³ de Santa Cruz Biotechnology; anti-Smad1¹, anti-Smad4¹ de Upstate Biotechnology; anti-BMPRII¹, anti-tubulina¹, anti-panAkt¹, anti-Bcl2¹, anti-Ras⁴ i anti-Rap1⁴ de BD Biosciences; anti-JNK actiu¹ de Promega; anti-actina¹ de Sigma Aldrich i anti-Nurr1², anti-NOR1¹ i anti-pcsk1/3¹ d'Abcam.

El dia següent, es van rentar les membranes amb TBS-T o PBS-T 4 cops i es van incubar amb l'anticòs secundari corresponent (anti-conill i anti-ratolí IgG de BD Biosciences; anti-cabra IgG de Santa Cruz Biotechnology) diluït en tampó de bloqueig durant 1 hora a temperatura ambient. Les proteïnes es van visualitzar per detecció quimioluminescent amb ECLTM Western Blotting Detection Reagent (Amersham Biosciences) i revelat en HyperfilmTM ECLTM (Amersham Biosciences). Per quantificar els nivells de proteïna detectats es van densitometrar les bandes amb l'ajuda del programa Image J i es va utilitzar els nivells de Tubulina, Actina o GAPDH com a control de càrrega de proteïna.

6. RT-PCR.

6.1. Extracció de RNA.

Per fer l'extracció de RNA es van sembrar les CGCs en plaques de 60 mm de diàmetre. Un cop realitzat el tractament pertinent, es va aspirar el medi, rentar amb PBS-AB i recollir en 1mL de TRIZOL[®] Reagent (Invitrogen). Es va transferir a un microtub RNAsa free de 2mL on es va afegir 0,2mL de cloroform i, després d'agitar vigorosament, es va deixar en repòs 2-3 minuts a temperatura ambient. La separació en dues fases (aquosa i orgànica) es va obtenir per centrifugació a 12.000 g a 4°C durant 15 minuts. Per tal de precipitar el RNA contingut a la fase aquosa, es va transvasar dita fase a un altre microtub de 2mL, s'hi va afegir 0,5mL

d'isopropanol, es va agitar i deixar en repòs 10 minuts a temperatura ambient. Seguidament, es va centrifugar durant 10 minuts a 12.000g a 4°C. El sediment resultant es va rentar afegint 0,5mL d'etanol al 75% RNAsa free i centrifugant durant 5 minuts a 7.500g a 4°C. Es va eliminar el sobrenedant i deixar assecar entre 10 i 15 minuts. Després per eluir la mostra es van afegir 50µL d'aigua tractada amb Dietilpirocarbonat (DEPC; Invitrogen) i ho varem tenir duran 5-10 minuts entre 50-60°C. Es va utilitzar 1µL per quantificar la concentració de RNA obtinguda.

6.2. Transcripció inversa.

En la obtenció del cDNA a partir del RNA es va utilitzar l'enzim SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen) i el termociclador PTC-100 Peltier Thermal Cycler (MJ Research).

Per cada mostra es va agafar 500ng de RNA, 1µL de dNTPs 10mM, 1µL d'hèxamers aleatoris i aigua tractada amb DEPC fins a 12µL i es va tenir 5 minuts a 65°C. Seguidament, es va incubar en gel uns segons i es va centrifugar. Es varen afegir 4µL de 5x First-Strand Buffer, 1µL de DTT 0,1M i 1µL de RNaseOUT™ i, durant 2 minuts, es va incubar a 42°C. Finalment, s'hi va afegir 2µL de transcriptasa inversa i es va incubar 50 minuts a 42°C i 15 minuts a 70°C. El cDNA obtingut es va mantenir a -20°C fins a la seva utilització.

6.3. Amplificació per PCR.

Es van agafar 2µL del resultat de la RT i es van afegir a la barreja amb les següents condicions: *Taq* PCR Buffer 1x, 0,1mM dNTPs, 1,5mM de MgCl₂, 1 unitat (u) *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen), 0,5µM d'encebadors i aigua tractada amb DEPC fins a 25µL. A continuació, es van sotmetre al programa d'amplificació corresponent (1) 2' 94°C + X [30'' 94°C + 30'' 60°C + 60'' 72°C] + 5' 72°C; 2) 5' 95°C + X [30'' 94°C + 30'' 60°C + 45'' 72°C] + 5' 72°C o 3) 2' 94°C + X [30'' 94°C + 30'' 60°C + 30'' 72°C] + 2' 72°C) i, finalment, es va visualitzar els resultats en gels d'agarosa al 1% en tampó TAE amb SYBR safe™ (Invitrogen).

Els encebadors utilitzats en l'amplificació de DNA, prèviament dissenyats amb el programa PRIMER3 (Rozen and Skaletsky, 2000), van ser:

Gen	encebador Fw (5'-3')	encebador RW (5'-3')	Programa	Cicles
<i>bmprla</i>	CAGCTACGCAGGACAATAGA	AGCTGAGTCCAGGAACCAGT	1	35
<i>bmprlb</i>	AAGTGTCTCTCACCACGGAG	AGGCCGTAACCTTCTTCATGC	1	37
<i>bmprll</i>	GCTTCGCAGAATCAAGAACG	GTGGACTGAGTGGTGTGTG	1	40
<i>smad 1</i>	GAACTAGACCAGCCGCTATG	GTGGTGGTAGTTGCAGTTCC	2	35
<i>smad 5</i>	GCCAAGCAAGTGTGCTACTA	TAGGCAACAGGCTGAACATC	2	34
<i>smad 4</i>	GTTTCAGGTAGGAGAGACCTT	TAAAGGCTGTGGGTCCGCAT	2	37
<i>nr4a1/nur77</i>	CACCTTCCTATACCAGCTGC	GAAGGAGAAGAAGGTTGGAG	3	35
<i>nr4a2/nurr1</i>	CCTTCACAACCTCCACCAGA	AACACCGTAATGCTGACAGG	3	35
<i>nr4a3/nor1</i>	CCTGATTCTGGAGAGCAGTG	GGCGGAGACTGCTTGAAGTA	3	35
<i>vgf</i>	CTCAGACTCAGGACAACGAT	CTGCCTCTACCTGAGCTAAC	3	35
<i>pcsk1/3</i>	CCTTGCTGTATGAGACCTGG	AGTCTTGCTGCTTCTCTGCT	3	35
<i>pcsk2</i>	GAGGAAGAGGCTCGCCAAGT	GCTTCGGCCACATTCAAGTC	3	35
<i>18s</i>	TCAAGAACGAAAGTCGGAGG	GGACATCTAAGGGCATCACA	3	30

Taula 2. Encebadors utilitzats en l'amplificació de DNA. Seqüència del parell d'encebadors, programa i nombre de cicles utilitzats en les PCRs pels gens que es detalla.

7. Assaig d'activitat caspasa-3.

L'activitat caspasa-3 es va estudiar utilitzant el ENZCHEK CASPASE-3 ASSAY KIT (Molecular Probes, Invitrogen). Un cop tractades les CGCs es van recollir en medi de cultiu i es va centrifugar durant 3 minuts a 400g. Es va descartar el sobrenedant, es va afegir PBS-AB i centrifugar 3 minuts a 16.000g. Es va aspirar el sobrenedant i es va afegir 70µL de tampó de lisi del Kit (composició desconeguda), es va lliar per congelació-descongelació: es va submergir el microtub en etanol al 70% amb neu carbònica 5 minuts i, seguidament, es va deixar descongelar a temperatura ambient. A continuació es va centrifugar a 2.300g a 4°C per fer baixar les membranes i es van transferir 50µL a una microplaca opaca negra. La resta es varen guardar per determinar la concentració de proteïna. Seguidament, es van afegir 50µL de working solution 2x que contenia el pseudo-substrat de caspases Z-DEVD-AMC, es va

deixar 30 minuts a temperatura ambient i es va procedir a la lectura de la intensitat de fluorescència al lector de microplaques fluorescent Synergy HT (Bio-Tek). Els resultats es van relativitzar amb la quantitat de proteïna mesurada per Bradford.

8. Determinació de l'activitat de proteïnes G monomèriques.

Les proteïnes G monomèriques de la família de ras són proteïnes G l'estat d'activació de les quals es determina per la seva unió a GTP o GDP. Així doncs, quan estan unides a GTP estan en la seva forma activa i, quan tenen unit GDP presenten la forma inactiva. Els anticossos existents contra aquestes proteïnes no distingeixen entre ambdues formes. Per aquesta raó, per l'estudi de les activacions de les proteïnes G monomèriques, abans de fer el Western blot, els llisats cel·lulars es van passar per una reïna que tenia unida una proteïna de fusió específica per cada proteïna G, que s'uneix amb molta afinitat a la forma activa (GTP), i amb poca afinitat a la forma GDP, la inactiva. Varem analitzar les activacions de les proteïnes G petites, ras i rap-1, i per cada una es van purificar les proteïnes de fusió GST-Raf1-RBD (per aïllar ras) i GST-RalGDS-RBD (per aïllar rap-1; Zwartkruis et al., 1998).

8.1. Purificació de les proteïnes de fusió GST-Raf-1-RBD i GST-Ral-GDS-RBD.

Bacteris transformats amb els plàsmids pGEX-KG; GST-Raf1-RBD i pGEX-4T:GST-RalGDS-RBD van ser amablement cedits pels doctors Néstor Gómez, Universitat Autònoma de Barcelona i Michel Fournier, Université d'Orléans. Tots dos plàsmids contenen l'operó *lac* i, per tant, la seva expressió podrà ser induïda utilitzant IPTG (isopropyl-b-d-galactopyranoside). Per ambdós bacteris, el procediment de purificació de les proteïnes fou el mateix.

Primerament, es va procedir a créixer un precultiu dels bacteris. Es van sembrar 100µL de bacteris que estaven en estoc en plaques d'agar amb medi LB (medi Luria-Bertani, que per litre conté: 10g de Triptona, 5g d'extracte de llevat i 10g de NaCl, pH 7) amb ampicil·lina 50 µg/mL (LBA) i es van deixar tota la nit a 37°C.

L'endemà, es va repicar una colònia de les que havien crescut i es va transferir a 10mL de cultiu amb LBA i es va deixar créixer tota la nit en agitació a 37°C.

L'endemà, els 10mL de precultiu es van passar a 500mL de LBA. Després de 2 hores en agitació a 37°C, es va afegir IPTG a una concentració final de 0,2mM. Es va incubar de nou a 37°C en agitació fins a arribar a una densitat òptica (DO) de 1,2. Seguidament, es va centrifugar a 2600g durant 20 minuts a 4°C. Els sediments resultants es van rentar amb una solució STE (10mM Tris pH 8; 150mM NaCl i 1mM EDTA). Es va centrifugar a 2600g durant 10 minuts a 4°C i es va homogeneïtzar el sediment amb solució STE. Seguidament, es va realitzar una centrifugació a 1750g durant 7 minuts. El sediment resultant es va llisar amb 20mL de STE amb els inhibidors de proteases (1mg/mL de lisosima; 10µg/mL d'inhibidor de tripsina; 1mM de PMSF; 10 µg/mL d'aprotinina i 10µg/mL de leupeptina), deixant-ho 20 minuts a 4°C. Posteriorment, es va afegir DTT (fins a una concentració final de 1mM) i N-lauryl-sarcosyl (fins a un percentatge final de 1,5%). Es va deixar 10 minuts a 4°C i es va sonicar fins que el llisat es va tornar translúcid. Es va afegir de nou PMSF i Tritó X-100 a un percentatge final de 2%. Posteriorment, es va centrifugar a 5000 g durant 1 hora a 4°C. Al sobrenedant bacterià resultant de la centrifugació, se li va afegir la reïna de glutatió-sefarosa.

8.2. Preparació de la reïna de glutatió-sefarosa i incubació de la reïna amb les proteïnes de fusió.

La reïna de glutatió-sefarosa (Glutathione SepharoseTM 4B; Amersham) es va rentar dues vegades amb PBS-AB a 4°C i es va centrifugar a un màxim de 250g durant 1 minut, i es va afegir a la reïna el sobrenedant bacterià resultant de l'última centrifugació de l'apartat 8.1. Es va deixar tota la nit a 4°C amb agitació orbital per tal de facilitar la unió entre la cua GST de la proteïna de fusió amb la reïna de glutatió-sefarosa i es va rentar 3 vegades amb PBS a 4°C la reïna amb la proteïna de fusió unida.

Finalment, es va realitzar una quantificació per tal d'estimar la concentració de proteïna de fusió que s'havia obtingut (vegeu figura 14). Per això es va realitzar un

patró de BSA de 2,5µg a 30µg i es va migrar en un gel de poliacrilamida de 10% de densitat. A més, es va realitzar la migració d'una mostra de reïna amb proteïna de fusió de 2µL; 5µL i 10µL. En tots els casos es van diluir les mostres de BSA i reïna amb tampó d'electroforesi (vegeu apartat 5.1). El gel es va tenyir amb blau de Coomassie. Primerament, es va deixar el gel en la solució de blau de Coomassie durant 30 minuts a temperatura ambient. Posteriorment es van realitzar diferents rentats amb una solució 20% metanol i 10% àcid acètic fins que el gel quedés transparent.

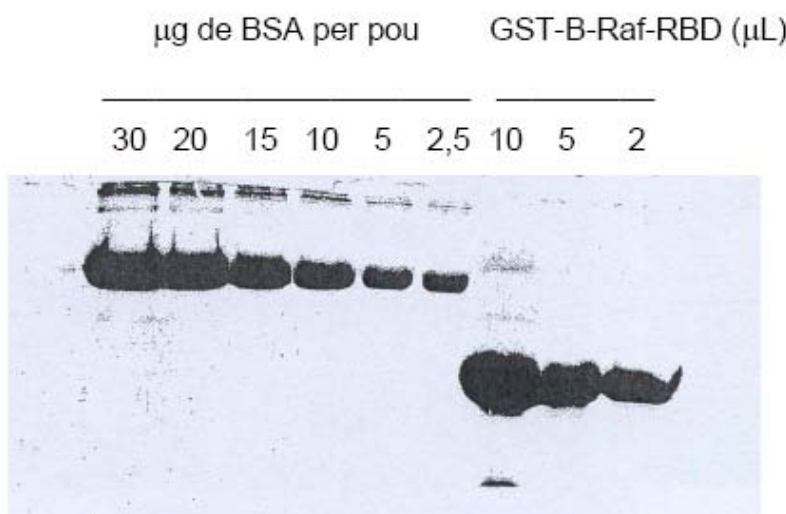


Figura 14. Exemple de quantificació de la proteïna de fusió GST-B-Raf-RBD. Els 6 primers carrils corresponen a una patró de concentracions de BSA que va de 2,5 µg a 30 µg. Els 3 últims carrils corresponen a la proteïna GST-B-Raf-RBD després de tot el procés de purificació. S'ha afegit de 2 µL a 10 µL. Es va realitzar un gel de poliacrilamida de 10% de densitat i després de la migració es va tenyir amb blau de Coomassie. Per extrapolació amb el patró de BSA, en aquesta quantificació es va considerar que la concentració de proteïna GST-B-Raf-RBD era de 5 µg/µL.

8.3. Aïllament de les proteïnes monomèriques G del llisat cel·lular.

La proteïna G ras-GTP (forma activa) té una forta afinitat pel domini RBD de la proteïna Raf-1, no així la forma ras-GDP. Passa el mateix amb la proteïna G rap-1 amb el domini RBD de la proteïna Ral-GDS. D'aquesta manera, la reïna que té unida la proteïna de fusió GST-Raf-1-RBD es va utilitzar per a aïllar la proteïna ras; i la reïna que té unida la proteïna de fusió GST-Ral-GDS-RBD es va utilitzar per a aïllar la forma activa de la proteïna rap-1.

Després de realitzar els diferents tractaments en els cultius de neurones granulars de cerebel que hauran crescut en plaques de 100 mm, es van rentar les plaques una vegada amb PBS-AB pretemperat a 37°C. Seguidament, es van llisar les cèl·lules amb 500µL de tampó EMBO (10% glicerol; 1% NP-40; 50mM Tris-HCl pH 7,4; 200mM NaCl; 2,5mM MgCl₂; 10mM NaF; 1mM d'ortovanadat; 0,1µM d'aprotinina; 250µM de PMSF i 1µM de leupeptina). Es va quantificar la concentració de proteïnes pel mètode de Bradford.

Abans d'afegir el llisat cel·lular a la reïna amb la proteïna de fusió, es van realitzar 3 rentats amb PBS fred de la reïna (centrifugació de 250g durant 1 minut a 4°C). Posteriorment, es van incubar durant una hora amb agitació orbital a 4°C, 700 µg de proteïna del llisat cel·lular de cada mostra en 150µg de proteïna de fusió present en la reïna de glutatió-sefarosa (en l'exemple de la Figura 14, es van afegir 25µL de proteïna de fusió per 700µg de llisat cel·lular). La proteïna restant es guarda per a realitzar un Western blot per a la forma total de cada proteïna G. Seguidament es va rentar 3 vegades amb PBS i el sediment resultant es va diluir en 30µL de tampó d'electroforesi. Posteriorment, es van separar les proteïnes per electroforesi amb un gel de poliacrilamida al 12% per a després realitzar un western blot (vegeu apartat 5.). Només el tampó de bloqueig, així com el tampó de dilució per als anticossos anti-ras o anti-*rap-1*, es va modificar. Es va utilitzar el tampó blotto (2% de llet i 0,5% de BSA diluït en TBS-T). Les dilucions que es van realitzar van ser de 1/1000 per a ambdós anticossos primaris i de 1/2000 per als seus anticossos secundaris corresponents.

9. Assaig de mobilitat electroforètica (EMSA).

L'assaig de mobilitat electroforètica (EMSA) és una tècnica que ens serveix per tenir una idea de l'estat d'activació d'un factor de transcripció ja que ens dóna una idea de la capacitat d'aquest d'unir-se a la seva seqüència consens.

9.1. Marcatge i purificació de la sonda.

Les seqüència consens mutades o no de CREB i de les proteïnes Smad (Bokar et al., 1988; Shi et al., 1998) es van obtenir en forma de ssDNA (sense i antisense) i es van diluir en aigua DEPC a raó de 50mM. 1µL de cada seqüència (sense i antisense) de cada element de resposta es van diluir en 48µL solució d'hibridació (30mM Hepes KOH pH 7,4; 100mM acetat sòdic; 2mM acetat de magnesi) i es van hibridar amb el programa: 4' 95°C + 10' 70°C + 10' 50°C + 10' 37°C + 5' 20°C + 5' 4°C.

Els oligonucleòtids resultants es varen marcar radioactivament utilitzant la cinasa de polinucleòtids T4 de Fermentas. Així doncs, 5pmols de cada un d'ells es van incubar amb 1µL buffer A (Fermentas); 1µL de $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (10µCi/µL) (PerkinElmer®); 1µL de cinasa de polinucleòtids T4 i fins a 10 amb aigua DEPC durant 30 minuts a 37°C. Seguidament, es va aturar la reacció mitjançant l'addició de 90µL de T.E. (10mM Tris pH8; 1Mm EDTA).

Per purificar la sonda marcada es va utilitzar la reïna Sephadex G-25 (Sigma-Aldrich). Primerament, la reïna es va netejar amb aigua destil·lada, 10g en 160mL. Es va deixar precipitar la reïna i per decantació es varen anar eliminant les partícules que quedaven en suspensió, aquest pas es va repetir 4 vegades. Seguidament, es va equilibrar la reïna en T.E. pH 7,6 i es va autoclavar. S'utilitzà una pipeta pasteur com a columna. Amb llana de vidre es va generar un tap porós que ens deixava passar el líquid però no la reïna. Es va omplir fins aproximadament el coll de la pipeta amb la reïna, sempre tenint en compte que no se'ns asseques i mantenint la pipeta en posició vertical el màxim de recta. Un cop preparada la columna es va afegir curosament al centre d'aquesta els 100µL resultants del

marcatge de la sonda. Quan la columna els va haver absorbit es va omplir la pipeta amb T.E. per tal de fer anar avançant la sonda a través de la reina. Es va anar recollint a raó de 3 gotes per microtub tot el líquid que travessava la columna. A continuació, es va mesurar la radioactivitat de cada un dels tubs i se'n va obtenir un patró bifàsic que corresponia a la sonda marcada (primer pic) i a l'ATP marcat lliure (segon pic). Finalment, el contingut dels microtubs corresponents al primer pic (sonda marcada) es van ajuntar, mesurar, aliquotar i emmagatzemar a -80°C .

9.2. Incubació de la sonda amb el llisat cel·lular.

Les CGCs van ser sembrades en plaques de 100mm i a 6 DIV 1 hora post-tractament es van processar per fraccionament subcel·lular (vegeu apartat 5.). Es van preparar $8\mu\text{g}$ de la fracció nuclear en $10\mu\text{L}$ d'aigua destil·lada i es va incubar amb $10\mu\text{L}$ de mescla de reacció ($1\mu\text{g}$ polyIdC (Sigma-Aldrich); 50mM Hepes pH 7,5; 1mM EDTA; 5% glicerol i $5\mu\text{L}$ de sonda marcada (aprox 20.000 c.p.m.) per mostra) durant 20 minuts a temperatura ambient per tal de que el factor de transcripció present en la mostra si estava activat, s'unís a l'element de resposta marcat.

9.3. Electroforesi i autoradiografia del resultat.

Un cop incubades les mostres amb l'element de resposta marcat, es va separar per electroforesi en gel de poliacrilamida al 6% en tampó TBE 0,5x (45mM Tris-Borate; 1mM EDTA) la sonda unida de la no unida. L'electroforesi es va fer a 150mV duran 4 hores, prèviament, s'havia aplicat 20 minuts de 100mV al gel per tal d'equilibrar-lo. El gel resultant es va assecat durant 45 minuts a 80°C en el SLAB GEL DRYER GD2000 (Amersham Biosciences) i es va revelar per autoradiografia en films HyperfilmTM ECL (Amersham Biosciences)

10. Anàlisi de l'expressió gènica mitjançant microarray.

10.1. Fonaments moleculars del microarray

L'estratègia general del microarray consisteix en posar a una micro-matriu (vidre, plàstic o silice) oligonucleòtids de DNA que continguin seqüències específiques dels diferents gens que es volen estudiar. Aquestes seqüències serveixen com a sondes que hibriden amb el cDNA o cRNA de les mostres estudiades, també anomenades diana, en condicions altament restrictives. La hibridació entre sonda i diana s'acostuma a detectar i quantificar per fluorescència ja que el cDNA o cRNA diana està marcat amb un fluoròfor. D'aquesta manera, es pot determinar l'abundància de les seqüències d'àcids nucleics diana. Després s'analitza la imatge obtinguda per obtenir un patró d'intensitats de cada casella. Actualment, coexisteixen diferents plataformes per dur a terme l'anàlisi comparativa de l'expressió gènica utilitzant microarrays (els mRNA estudiats es poden marcar de diferents maneres, el DNA immobilitzat en el xip pot ser cDNA o oligonucleòtids de diferent longitud, la hibridació de les mostres al xip pot ser simultània o en xips independents, etc.). D'aquestes plataformes les més utilitzades en recerca científica són aquelles en que s'usa oligonucleòtids i, concretament, la *GeneXip* d'Affymetrix és la més comú.

Aquests xips d'affymetrix poden contenir tot el genoma d'un organisme en forma d'oligonucleòtids específics, cada un d'ells té aproximadament 25 parells de bases. El procediment bàsic utilitzat és molt similar al de l'array de cDNA explicat anteriorment. Breument, el mRNA s'extreu de les cèl·lules i es realitza la transcripció inversa per obtenir el cDNA. Posteriorment, es realitza una transcripció *in vitro* per obtenir cRNA marcat amb biotina. Aquestes molècules de cRNA són exposades a la plataforma durant tota una nit per que hibridin amb la sondes. Després, el xip es marca amb estreptavidina conjugada amb una molècula fluorescent (ficoeritrina) que s'uneix a la biotina. El protocol inclou a més un altre pas per amplificar la senyal mitjançant un anticòs anti-estreptavidina i un anticòs IgG biotinilat. Un escàner s'encarrega d'analitzar les senyals del xip i posteriorment s'utilitzen algoritmes avançats per obtenir les dades dels nivells d'expressió dels gens d'interès.

10.2. Mostres i plataforma utilitzades per l'anàlisi.

Per l'estudi de l'expressió gènica es va utilitzar el GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Array (Affymetrix Inc.) que ens permetia cobrir el genoma de rata en un únic array, ja que s'utilitzen més de 31.000 sondes, analitzant uns 30.000 transcrits i variants d'uns 28.000 gens ben coneguts de rata.

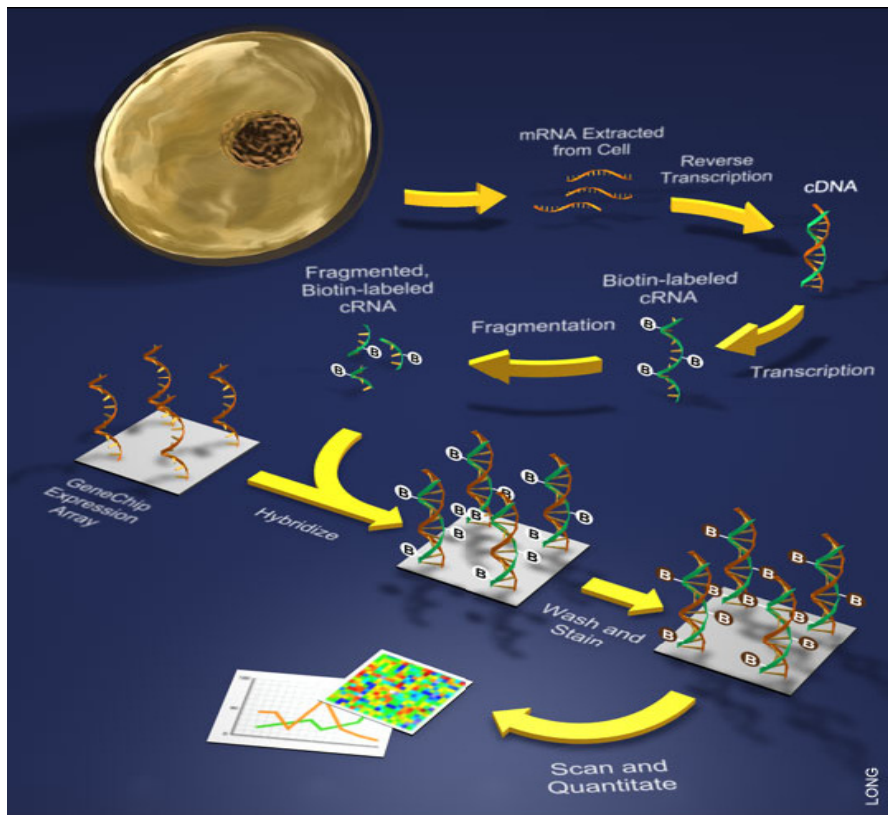


Figura 15. Esquema general del GenChip® d'Affymetrix.

(<http://plasticdog.cheme.columbia.edu>)

Per realitzar el primer estudi de l'expressió gènica es va extreure el mRNA de les cèl·lules a dos temps 3 i 8 hores després del tractament amb NMDA així com sense

tractar, condició control, K5. En el segon estudi les condicions testades foren 30 hores post-tractament amb NMDA de cèl·lules no infectades o infectades amb lentivirus que contenen el shRNA per Nurr1 (Nurr1_1) o scNurr1. En ambdós casos es va utilitzar dos experiments independents. Les mostres de RNA es van enviar al servei de microarray de l'hospital Vall d'Hebron, on es va realitzar una comprovació de la integritat del RNA mitjançant el 2100 Bioanalyzer (Aligent) i posteriorment realitzaren l'estudi de l'expressió gènica utilitzant el xip d'affymetrix. Un cop realitzat l'estudi, el servei ens va enviar les dades brutes d'expressió obtingudes en el xip.

10.3. Anàlisi de les dades obtingudes del microarray.

Les dades d'expressió del xip d'Affymetrix es van obtenir mitjançant el programa GCOS (<http://www.affymetrix.com>). En el primer estudi, donat el seu caràcter més generalista, les dades foren normalitzades amb l'ajuda del programa estadístic RMA (Robust Multiarray Average), que ens permet normalitzar les dades tenint en compte el soroll de fons (Irizarry et al., 2003) i, després es va utilitzar el paquet LIMMA per realitzar l'estudi estadístic i així identificar els gens up-regulats o down-regulats integrant els duplicats utilitzant un valor de p ajustat $< 0,2$. Pels gens amb varies sondes es va escollir la més informativa tenint en compte el valor de p ajustat més petit.

Per l'anàlisi posterior de les dades es va utilitzar el programa estadístic DAVID 2.0 (DAVID Bioinformatics Resources 2008, NIAID/NIH) que està disponible *on line*. Aquest programa ofereix potents eines bioinformàtiques, permetent realitzar un anàlisi ontològic a més de presentar els grups funcionals de gens en *clusters*. Per realitzar aquests anàlisi només s'introduïren els gens que tenien un increment de més d'un cop l'expressió basal i una significació de $p < 0,05$. Els anàlisis es van prioritzar segons el seu score EASE (*Expression Analysis Systemic Explorer*). EASE és un software que permet fer una ràpida interpretació biològica d'una llista de gens resultants d'un microarray, entre d'altres. Bàsicament, el EASE score és una modificació del valor p de Fisher per l'anàlisi del increment de gens. Normalment, a partir de $p \leq 0,05$ es considera que existeix un fort increment de l'expressió gènica (Hosack et al., 2003).

En el segon estudi en que es va utilitzar l'anàlisi via microarray, el tractament de dades a nivell estadístic va ser el mateix que l'esmentat anteriorment. Les dades obtingudes amb el programa GCOS es van sotmetre a la normalització per RMA i al paquet estadístic LIMMA. Es va filtrar els gens regulats a la baixa en presència del shRNA de Nurr_1 comparativament amb el scNurr1 i es va procedir a la cerca en les seqüències d'aquests els elements de resposta de Nurr1 (Maxwell and Muscat, 2006).

11. Immunoprecipitació de cromatina (ChIP).

L'associació entre DNA i proteïnes és una interacció biològica fonamental que té un paper clau en la regulació de l'expressió gènica i el control de l'accessibilitat del DNA en processos com la transcripció, la replicació i altres. Aquestes interaccions es poden estudiar d'una manera focalitzada mitjançant l'ús de la immunoprecipitació de cromatina (ChIP) (Aparicio et al., 2004). Aquesta tècnica ens resulta una eina molt interessant per poder determinar si un determinat factor de transcripció es troba unit al promotor d'un gen determinat. Tanmateix, consta d'una sèrie de passos: l'associació de proteïnes amb el DNA per *cross-linking* químic; l'aïllament i llisi nuclear seguida de fragmentació del DNA; immunoprecipitació mitjançant anticòs específic de la proteïna diana, per obtenir els complexos DNA:proteïna; reversió de la unió entre el DNA i la proteïna i subseqüent anàlisi del DNA.

11.1. Fixació dels factors de transcripció al DNA i obtenció de la mostra.

Per dur a terme la ChIP les cèl·lules varen ser sembrades en plaques de 100mm de diàmetre. A 2 DIV les cèl·lules es van tractar amb NMDA o amb K25, 3 hores o 90 minuts després, segons el cas, es van rentar dues vegades amb PBS en fred i es va fixar els factors de transcripció al DNA mitjançant la incubació amb PBS amb formaldehid (Sigma-Aldrich) al 1% durant 15 minuts a temperatura ambient i en agitació. A continuació, es va afegir glicina 125mM durant 5 minuts per tal de parar la reacció. Després es va rentar 2 cops amb PBS, es va recollir les cèl·lules en un microtub i es va centrifugar a 200g durant 2 minuts. Un cop aspirat el sobrenedant

es va resuspendre el sediment en la solució CHIP (25mM Hepes pH 8,0; 1,5mM MgCl₂; 10mM KCl; 0,1% NP-40; 1mM DTT; còctel d'inhibidors de proteases), es va deixar 10 minuts en gel i es va centrifugar 10 minuts a 9.250g a 4°C. Es va descartar la majoria del sobrenedant i amb el restant es va homogeneïtzar el sediment amb l'homogeneïtzador (*pellet pestle, Motor, Sigma*) 15 vegades i es va centrifugar 10 minuts a 9.250g a 4°C per tal d'obtenir els nuclis. Després es va aspirar tot el sobrenedant i es va resuspendre els nuclis en la solució de Sonicació (50mM Hepes pH 8,0; 140mM NaCl; 1mM EDTA; 0,1% SDS; 0,1% Na-deoxycholate; còctel d'inhibidors de proteases). Es va sonicar les mostres 15 segons 10 vegades deixant 1 minut entre cada sonicació per tal d'obtenir fragments de DNA de 0,2 a 1 Kb. Per acabar, es fa afegir Tritó-X-100 a una concentració final de 1% i es va centrifugar a màxima velocitat durant 10 minuts a 4°C. El sobrenedant resultant, també anomenat *INPUT*, es va aliquotar i guardar a -80°C fins a la seva utilització.

11.2. Immunoprecipitació de la cromatina.

Per tal de fer l'assaig es va utilitzar 2,5µg de cada una de les mostres.

Primerament, es va preparar la proteïna G (Sephadex Sepharose™, Amersham) mitjançant rentat amb el tampó de sonicació. Seguidament, es va dur a terme el *pre-clear* de la mostra incubant-la amb 50µl de proteïna G durant 1 hora en rotació a 4°C i es va centrifugar a 9.250g durant 2 minuts a 4°C. Al sobrenedant resultant se li va afegir 0,5µl d'anticòs de fosfo-CREB (Ser. 133; Cell signaling) i es va deixar en rotació a 4°C tota la nit. A continuació, es va afegir 30µl de proteïna G i es va deixar 2 hores a 4°C en rotació. Es va centrifugar i es va procedir a rentar la reïna i la posterior obtenció del DNA. Primer es va incubar la reïna durant 5 minuts en gel en el tampó *Low salt Immune Complex Wash Buffer* (20mM Tris-HCl pH8; 1% Tritó-X-100; 150mM NaCl; 0,1% SDS; 2mM EDTA) i es va centrifugar a 9.250g 1 minut a 4°C. Després es va incubar en el *High salt Immune Complex Wash Buffer* (20mM Tris-HCl pH8; 1% Tritó-X-100; 500mM NaCl; 0,1% SDS; 2mM EDTA) durant 5 minuts en gel i es va centrifugar 1 minut a 9.250g. A continuació, es va afegir *LiCl Immune Complex Wash Buffer* (10mM Tris-HCl pH8; 0,25M LiCl; 1% Na-deoxycholate; 1% NP-40; 1mM EDTA) es va deixar 5 minuts en gel i es va centrifugar

1 minut a 9.250g a 4°C. Tot seguit, es va rentar 3 vegades la reïna amb T.E. (10mM Tris pH8; 1Mm EDTA) mitjançant incubació durant 5 minuts en rotació a temperatura ambient seguida d'una centrifugació a 9.250g. Posteriorment, es va el·luir el DNA afegint 200µl de tampó d'elució (1% SDS; 0,1M NaHCO₃) i incubant 15 minuts en rotació a temperatura ambient. Es va centrifugar 1 minut a 9.250g i es va transferir el sobrenedant a un microtub i es va repetir el procediment obtenint un volum final de 400µl. Posteriorment, es va afegir 16 µl de 5M NaCl i es va incubar tota la nit a 65°C per tal de revertir la fixació química entre DNA i proteïna. Es va precipitar el DNA per incubació amb etanol un mínim de 2 hores a -20°. La proteïna restant es va eliminar per digestió amb proteïnasa K durant 1h a 45°C. Es va acabar de purificar el DNA mitjançant columna de Qiagen Qiaquick purification Kit.

11.3. Amplificació per PCR del promotor.

Finalment, es va sotmetre a PCR el DNA obtingut amb els primers específics pel promotor IV de *bdnf* i *nr4a2/nurr1* (Tao et al., 1998; McEvoy et al., 2002; Aid et al., 2007). A la taula es poden veure les seqüències i els cicles necessaris utilitzats per la PCR amb cada promotor. El programa i la mescla utilitzats foren: 2' a 94°C + [30" 94°C + 30" 60°C + 30" 72°C]X + 2' 72°C; 0,5µM d'encebadors; 0,1mM dNTPs; 1,5mM de MgCl₂; 1x del tampó de la *Taq* (Invitrogen); 1 unitat de *Taq* i 25ng de DNA de les mostres processades i de l'*INPUT*.

Promotor de	encebador FW (5'-3')	encebador RW (5'-3')	cicles
<i>bdnf</i>	CAAAGCATGCAATGCCCTGGAA	CGGCAGCGGAGCAGTCCTCT	30
<i>nr4a2/nurr1</i>	AAGTGGGCTACCAAGGTGAA	CTGCCAACATGCACCTAAAG	35

Taula 3. Seqüència dels encebadors utilitzats per amplificar els promotors de *bdnf* i *nr4a2/nurr1* i el nombre de cicles utilitzats en cada una de les reaccions.

El resultat de l'amplificació de les mostres processades va ser normalitzat amb el resultat de l'amplificació de l'*INPUT* de la mateixa mostra.

12. Clonatge del promotor de *nr4a2/nurr1* dins el plàsmid pGL3.

Per poder estudiar l'activitat del promotor de Nr4a2/Nurr1 en presència de NMDA es va procedir a clonar-lo dins un plàsmid comercial, pGL3 (Promega). Aquest plàsmid conté el gen luciferasa precedit per un *multiple cloning site (MCS)* on hom pot introduir el promotor a estudiar i mitjançant assaig luciferasa determinar-ne l'activitat en resposta a estímul així com analitzar-ne la regulació per diferents factors de transcripció.

12.1. Obtenció de DNA genòmic.

En primer lloc es va aïllar DNA genòmic per obtenir el motlle d'on clonar el promotor de Nr4a2/Nurr1. Un cerebel de rata de la soca OFA de p8 va ser incubat tota la nit amb proteïnasa K en el seu tampó de llisi (10mM Tris, pH 8,5; 0,5mM EDTA; 0,2% SDS; 20mM NaCl) a 56°C en agitació.

El dia següent, es va centrifugar 13.200g durant 5 minuts i el sobrenedant es va traspasar a un nou microtub amb 500µl d'isopropanol, es va agitar enèrgicament i es va centrifugar a 13.200g 10 minuts. A continuació, es va descartar el sobrenedant i es va netejar el sediment amb etanol 70%, es va deixar assecar. Finalment, es va deixar resuspendre en 40µl de T.E. durant una nit a 56°C i es va guardar a 4°C fins la seva utilització.

12.2. Amplificació de la regió promotora de *nr4a2/nurr1* i inserció de dianes de restricció.

Per tal d'amplificar la regió promotora de *nr4a2/nurr1* en primer lloc es va haver d'identificar la regió concreta al genoma, ja que aquesta havia esta trobada en humà i ratolí però no en rata. Per això, es va analitzar la seqüència de 3.000 parells de bases *up-stream* del gen. L'element de resposta de CREB i la regió que l'envolta en humà i ratolí està situada a -163 i -153 respectivament, nosaltres en rata la varem trobar a la posició -2.084 (vegeu Figura 15 A). Per aquesta raó, varem decidir clonar dos regions per tal d'estudiar l'activitat del promotor. Una que només contenia la

seqüència consens amb ratolí i humà ((-2.419)-(-1.890)) i l'altre era tot el fragment *up-stream* ((-2.419)-(-1)).

Així doncs, es va obtenir la seqüència de 3.000 bp *upstream* del gen de *nr4a2/nurr1*, es va cercar la regió consens i es va dissenyar els encebadors que flanquegessin la seqüència (FW-RW1) o que continguessin tot el promotor (FW-RW2). Donat que el fragment resultant de l'amplificació havia de ser clonat en el plàsmid pGL3, en els encebadors triats se'ls va afegir la seqüència de reconeixement pels enzims de restricció SacI i XhoI (vegeu taula 4). Enzims presents en el MCS de pGL3 i que no tallaven les nostres seqüències a clonar.

	Posició <i>upstream</i>	Seqüència (5'-3')	Producte (bp)
FW	-2.419	AAGAGCTCGAGAGTTACAGTCACGGGA	-
RW 1	-1.911	AACTCGAGACGCAGAGCCGTGCGGAGCC	528
RW 2	-1	AACTCGAGGGCTTCAGCCGAGTGATTGG	2.419

Taula 4. Característiques dels encebadors utilitzats per la clonació del promotor de *nr4a2/nurr1*. Posició de cada un d'ells respecte l'inici de transcripció; seqüència (en verd o blau apareixen les seqüències de restricció de SacI i XhoI respectivament); i el mida del producte resultant.

Les condicions d'amplificació foren: 1µM d'encebadors FW-RW1 i FW-RW2; 1x del tampó de la Platinum® *pfx* (Invitrogen); 1mM MgSO₄; 0,3mM dNTP mix; 3% DMSO; 2,5 unitats de Platinum® *pfx* (Invitrogen); per ambdós fragments, i 750ng de DNA genòmic de motlle i el programa d'amplificació: 2' 94°C + [15" 94°C + 30" 56°C + 45" 68°C] + 2' a 68°C per l'amplificació del fragment ((-2.419)-(-1.890)) i 1,5 µg de DNA motlle i el programa: 2' 94°C + [15" 94°C + 30" 56°C + 2'30" 68°C] + 2' a 68°C pel fragment ((-2.419)-(-1)).

12.3. Clonatge dins el vector pGL3.

Un cop obtinguts els fragments (vegeu Figura 15 B), es varen introduir al plàsmid pGL3. Breument, en primer lloc es varen extreure les bandes del gel d'agarosa de l'electroforesi del resultat de la PCR amb el QIAquick® Gel Extraction kit (Qiagen).

Un cop purificat el DNA es va digerir aquest i 5µg del vector buit amb XhoI (Genecraft) durant 1 hora i 30 minuts. Després, es va digerir amb SacI (Genecraft) 1 hora i 30 minuts. Seguidament, es varen lligar 2µL resultants de la digestió dels fragments amb 1µL de la digestió del pGL3 amb el Quick Ligation™ kit (BioLabs).

El producte de la lligació es va transformar a les cèl·lules DH5α per xoc tèrmic. Breument, 10µL del producte de la lligació es van incubar amb 30µL de cèl·lules DH5α durant 30 minuts en gel. A continuació, es van incubar 90 segons a 42°C i 2 minuts en gel per tal de produir el xoc tèrmic i facilitar, així, la introducció del plàsmid. Seguidament, es va incubar les cèl·lules en LB a 37°C i agitació durant 1 hora. Finalment, es varen sembrar en placa amb LBA per tal de seleccionar les colònies que haguessin introduït el plàsmid ja que pGL3 conté el gen de resistència a ampicil·lina (vegeu mapa del plàsmid apartat 17 materials i mètodes)

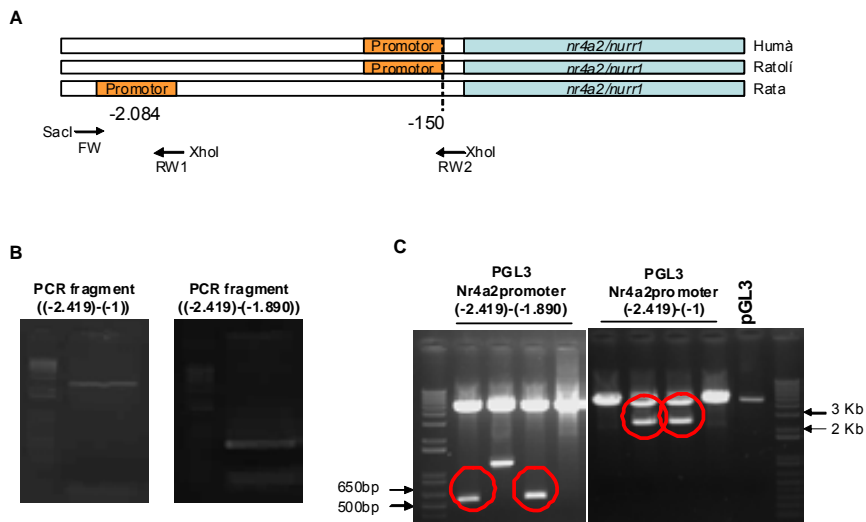


Figura 15. Clonatge del promotor de *nr4a2/nurr1*. A, esquema de la seqüència del promotor

de *nr4a2/nurr1* en humà, ratolí i rata; posició dels encebadors utilitzats pel clonatge. B, electroforesi resultant de la PCR. C, resultat de la digestió de les colònies positives amb XhoI i SacI.

L'endemà, es va créixer 4 colònies per cada lligació en LBA durant 8 hores i es va extreure el plàsmid amb el QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen). Els plàsmids es varen digerir amb XhoI i SalI i es va corre un gel d'agarosa 1% per distingir aquells que havien introduït el fragment dels que no. Finalment, es va comprovar la seqüència dels positius per seqüenciació (Figura 15 C)

13. Determinació de l'activitat del promotor per assaig luciferasa.

Un cop obtinguts els vectors pGL3 *nr4a2/nurr1*promoter (-2.419)-(-1.890) i pGL3 *nr4a2/nurr1*promoter (-2.419)-(-1), es van transfectar a les CGCs per estudiar el comportament del promotor i la seva regulació en presència de NMDA.

13.1. Transfecció dels vectors pGL3 a les CGCs amb lipofectamina.

Les CGCs es van sembrar en plaques de 24 i a 1 DIV es van transfectar amb lipofectamina amb els diferents plàsmids pGL3 conjuntament amb el plàsmid *renilla* que s'utilitza com a control de la transfecció. Així doncs, es va preparar una mescla que contenia: 0,25µg de *renilla* + 0,75µg de cada un dels pGL3 en medi OptiMEM® I (Invitrogen) complementat amb 2mM de glutamina (Optimem-glut) fins a 50µL per pou; i una altre amb 2µL de lipofectamina i 48µL de Optimem-glut per pou, es van vortejar i deixar 5 minuts a temperatura ambient. Seguidament, es van barrejar les 2 mescles, es va vortejar i es va deixar 20 minuts a temperatura ambient. Durant aquests 20 minuts, es va canviar el medi a les CGCs, es va afegir 250µL de BME complementat amb 30mM de glucosa i 2mM de glutamina i el medi retirat es va guardar com a medi condicionat. Als 20 minuts es va afegir 100µL per pou de les barreges de cada un dels pGL3 i es va retornar les plaques a l'incubador durant 3 hores i 15 minuts. Finalment, es va aspirar el medi i es va retornar el medi condicionat.

13.2. Assaig luciferasa.

Les CGCs transfectades a 1 DIV es van tractar a 2 DIV amb NMDA o K25, 4 hores després es va dur a terme l'assaig luciferasa amb el Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega). Breument, es va rentar 2 cops amb PBS i es va afegir a les cèl·lules 100µL de tampó de llisi del Kit (composició desconeguda) per agitació a 1.000 rpm es van desenganxar del pou i es van llisar via congelació-descongelació. Per fer l'assaig es va vortejar les mostres i 30µL de cada una es va transferir a una placa opaca. A cada pou s'hi va afegir 100µL de *Luciferase Assay Reagent II* i es va procedir a la lectura de l'activitat de firefly (*Photinus pyralis*) luciferasa. Seguidament, es va parar la reacció amb l'addició de 100µL de *Stop & Glo® Reagent*, que, a més d'aturar la reacció de firefly, també activa a la *Renilla* (*Renilla reniformis*) luciferasa i es va llegir també l'activitat d'aquesta. Ambdós lectures es van fer en el luminòmetre Clarity BIOTEK®. Les dades de luciferasa es van relativitzar amb les de *renilla*.

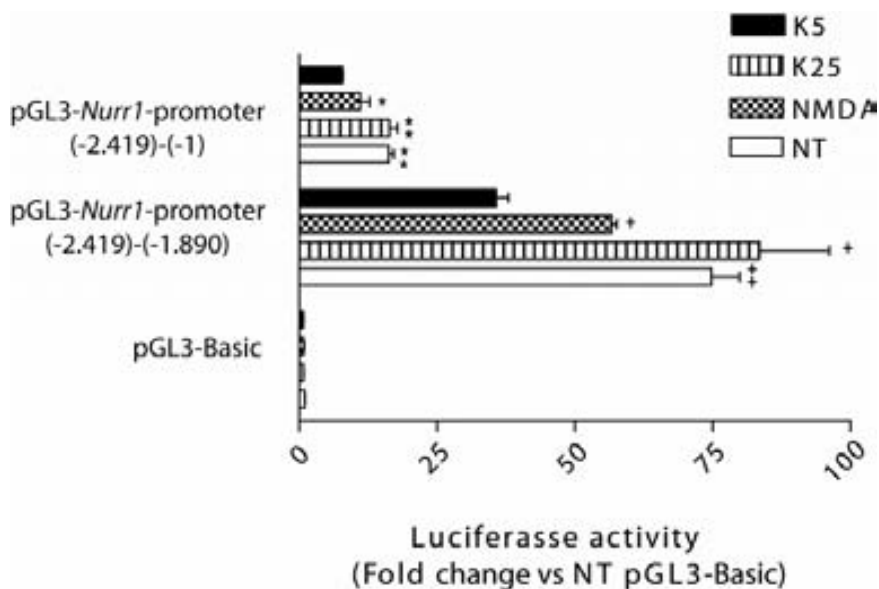


Figura 16. Ambdós clonatsges del promotor de *Nurr1* donen resultats proporcionals en funció del tractament. Les CGCs es van sembrar en 5 mM o 25mM de KCl (K5;NT) i a 1 DIV es van transfectar amb un o altre vector: pGL3-Nurr1- promotor (-2.419)-(-1), pGL3-Nurr1- promotor (-2.419)-(-1.890) o pGL3-Basic juntament amb el vector *renilla* com a control de la

transfecció. A 2 DIV es van tractar amb NMDA (100µM) o K25 i a 4 hores es va fer l'assaig luciferassa. Els resultats es mostren com la mitja ± SEM de tres experiments fets en duplicats.

Donat el resultat que es mostra a la figura 15 varem fixar utilitzar el vector que contenia tot el promotor en el nostre estudi, per tal d'ajustar-nos més a l'activitat real del promotor i les possibles modificacions d'aquesta.

14. RNAi.

La tècnica del RNA d'interferència (RNAi) es el procés pel qual RNAs de doble cadena silencien la expressió de gens específics. Com s'ha adreçat anteriorment a l'apartat 1.3.3 nosaltres hem utilitzat aquesta tècnica per l'estudi de la participació d'algunes proteïnes en els efectes de BMP-6 o NMDA. El funcionament del RNAi resumit breument consistiria de diferents passos: en primer lloc l'enzim DICER reconeix el shRNA (*short hairpin* RNA) i el talla en fragments de RNA doble cadena (siRNA, *small interfering* RNA). Aquests són reconeguts pel complex proteic RISC que separa les dos cadenes de RNA i s'uneix preferiblement a la cadena antisentit. Aquest últim complex reconeix la seqüència homòloga en el mRNA del gen diana i la destrueix provocant el silenciament del gen.

Per tal d'introduir els shRNA que hem utilitzat durant el nostre estudi dins les CGCs hem fet us de vectors lentivirals.

14.1. Vectors lentivirals.

Els vectors retrovirals derivats del lentivirus com HIV1 són eines prometedores tant per la teràpia gènica com per la investigació bàsica, ja que permeten una internalització, integració i transfecció estable eficaç de gens en cèl·lules quiescents (arrestades en G0) i diferenciades com les neurones.

Els lentivirus tenen un genoma complex ja que a part dels gens estructurals essencials (*env*, *gag*, *pol*), contenen gens reguladors que promouen l'expressió viral a través de mecanismes de transcripció i postranscripció (*tat* i *rev*), i gens accessoris

que no són necessaris per la replicació viral però que presenten factors essencials per la virulència del virus (*vpr*, *vif*, *vpu* i *nef*, vegeu Figura 16).

Les partícules lentivirals es generen per coexpressió dels elements d'empaquetament del virió i del DNA del vector experimental en cèl·lules productores HEK 293T. Nosaltres varem utilitzar el sistema de vectors lentivirals de segona generació dissenyats i distribuïts gratuïtament pel Dr. Trono del Laboratory of Virology and Genetics (LVG) and School of Life Sciences Swiss Institute of Technology Lausanne (Suïssa). Els plàsmids utilitzats per generar els diferents lentivirus van ser amablement cedits pel grup del Dr. Joan Comella.

S'usaren tres plàsmids separats, sense seqüències superposades entre elles per minimitzar la possibilitat de recombinació durant la producció dels vectors.

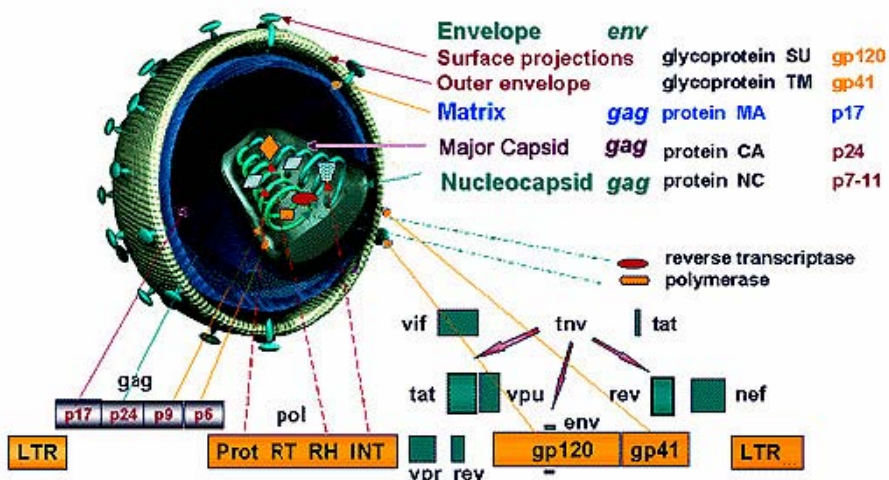


Figura 17. Estructura i genoma dels lentivirus. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTV>
(The universal virus database of the International Committee on Taxonomy of Viruses).

1. **Vector lentiviral, pLVTHM.** Només conté el material genètic a transferir a la cèl·lula diana, flanquejat per dos elements cis-activadors que en el lentivirus real serien necessaris per la seva encapsidació, transcripció reversa i integració. A més,

conté una serie de modificacions per que perdi la capacitat transcripcional de la regió viral LTR un cop s'ha transferit a la cèl·lula diana. Cosa que minimitza el risc d'aparició de recombinants de replicació competents i evita problemes lligats a la interferència de promotors (vegeu mapa a l'apartat 17 d'aquesta secció).

2. Plàsmid d'empaquetament, psPAX2. Aquest conté un promotor CAG (activador de citomegalovirus, CMV, i el promotor i l'intró de la β -actina de pollastre) per promoure una expressió eficient de les proteïnes Gag, Pol, Tat i Rev del virus. Altrament, se li han eliminat els gens accessoris *vif*, *vpr*, *vpu* i *nef* per evitar el seu efecte virulent, ja que no són necessaris per la generació de partícules lentivirals funcionals (vegeu mapa a l'apartat 17 d'aquesta secció).

3. Plàsmid de l'envolta viral, pMD2G. Aquest plàsmid codifica per la glicoproteïna G del virus de la estomatitis vesicular (VSV). Aquesta és una proteïna heteròloga que s'utilitza per pseudotipar les partícules generades per les altres dos construccions. Així doncs, l'envolta final té l'avantatge addicional de tenir una alta estabilitat que permet la concentració de les partícules per ultracentrifugació (Naldini et al., 1996) (vegeu mapa a l'apartat 17 d'aquesta secció).

Les característiques d'aquest sistema de transducció fa que sigui molt atractiu no només per la possibilitat d'integrar un transgen a la cèl·lula hoste i obtenir-ne una sobreexpressió sinó, també per la possibilitat d'introduir un silenciador de l'expressió gènica com un RNA d'interferència de manera estable.

14.2. Generació dels lentivirus.

La generació de lentivirus que continguin seqüències específiques de shRNA es poden dividir en dos parts, la primera en la que s'obté el vector lentiviral amb la seqüència del shRNA introduïda i la segona en la que es generen les partícules víriques.

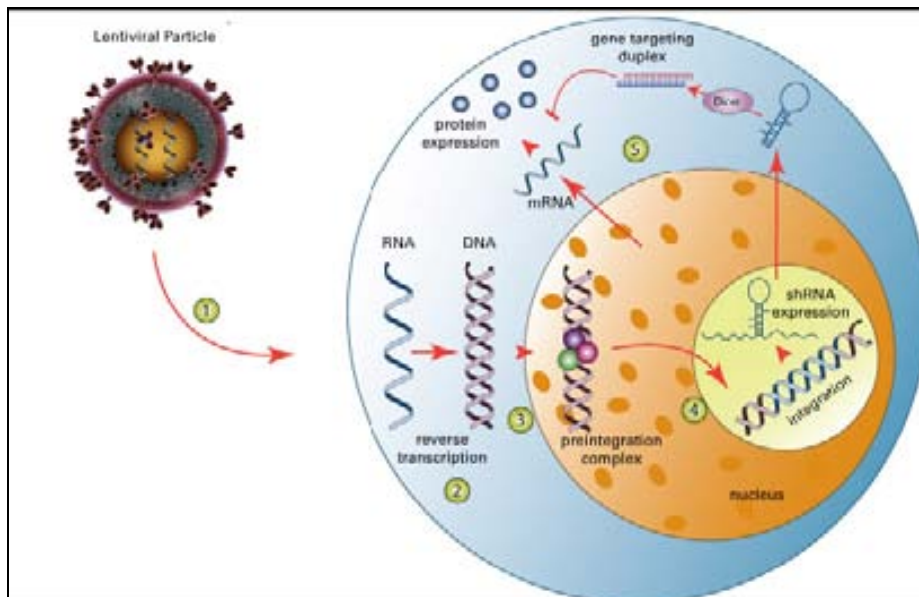


Figura 18. Esquema de transferència genètica d'un vector lentiviral amb un shRNA mitjançant la infecció amb una partícula lentiviral. 1- El lentivirus s'uneix directament a la cèl·lula diana i allibera el RNA genòmic al citoplasma. 2- El genoma viral es retrotranscriu al citoplasma. 3- El complex intermediari de DNA va al nucli de la cèl·lula diana. 4- El complex intermediari de DNA viral s'integra al genoma de l'hoste. 5- La construcció per silenciar s'expressa constitutivament i es processen els shRNAs capaços de silenciar el gen diana. <http://www.dharmacon.com/>

14.2.2. Obtenció del vector pLVTHM-shRNA.

El disseny de les seqüències de RNAi es va realitzar amb el *siDESIGN*[®] Center de *Dharmacon RNAi Technologies* (Thermo Scientific). A partir dels oligonucleòtids escollits entre els suggerits pel programa per cada gen específic, es va dissenyar el shRNA. Per tal d'introduir-lo amb facilitat dins el plàsmid llançadora pSUPER (vegeu mapa a l'apartat 17) també s'afegí a la seqüència les dianes de restricció de BgIII i HindIII (vegeu taula 5 i Figura 19). També es va dissenyar un shRNA amb una seqüència a l'atzar (*scramble*) per utilitzar-lo com a vector lentiviral control, la qual es va comprovar que no pertanyia a cap gen (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

De la mateixa manera, la seqüència del shRNA Nurr1_1 també fou barrejada a l'atzar obtenint scNurr1 que tampoc no pertanyia a cap gen i que també fou utilitzat com a control.

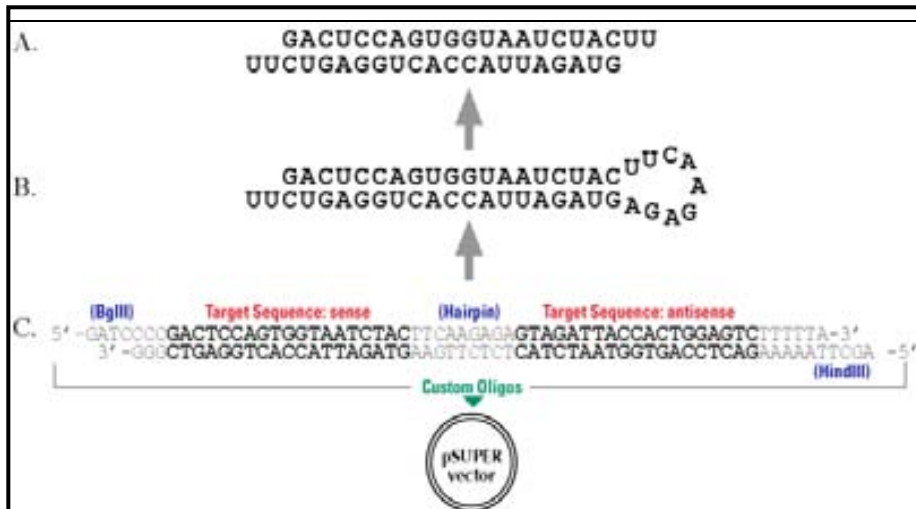


Figura 19. Esquema del disseny i sublonatge d'un shRNA en el vector pSuper. A, Disseny del RNAi. B, Addició del loop i obtenció de la seqüència del shRNA. C, Addició de les dianes de restricció per tal d'introduir la construcció dins el plàsmid pSuper.

Gen	Seqüència de l'oligonucleòtid (5'-3')
<i>nr4a1/nur77</i>	Fw gatccccCTGCAGAACCGCATTGCTAttcaagagaTAGCAATGCGGTTCTGCAGTtttt Rv agctaaaaaCTGCAGAACCGCATTGCTAtctctgaaTAGCAATGCGGTTCTGCAGggg
<i>Nr4a2/Nurr1</i>	Fw gatccccCCATTAAGGTAGAAGACATtcaagagaATGTCTTCTACCTTAATGGtttt Rv agctaaaaaCCATTAAGGTAGAAGACATtctctgaaATGTCTTCTACCTTAATGGggg
<i>nr4a3/NOR1</i>	Fw gatccccAGACAAGAGACGTCGAAATtcaagagaATTTTCGACGCTCTTGTCTtttt Rv agctaaaaaAGACAAGAGACGTCGAAATtctctgaaATTTTCGACGCTCTTGTCTg
<i>Nurr1_2</i>	FW gatccccCCACACAGCGGGTTCGGTTTtcaagagaAAACCGACCCGCTGTGTGGtttt RW agctaaaaaCCACACAGCGGGTTCGGTTTtctctgaaAAACCGACCCGCTGTGTGGggg
<i>scNurr1</i>	FW gatccccAGCGAAAACTTTATCGGAttcaagagaTCCGATAAAGTTTTTCGCTtttt RW agctaaaaaAGCGAAAACTTTATCGGAtctctgaaTCCGATAAAGTTTTTCGCTggg
<i>creb_1</i>	FW gatccccCTGAAGAAGCAGCAGCAAAtcaagagaTTTCGTGCTGCTTCTTCAGtttt RW agctaaaaaCTGAAGAAGCAGCAGCAAAtctctgaaTTTCGTGCTGCTTCTTCAGg
<i>creb_2</i>	FW gatccccGCAAGAGAATGTCGTAGAAAtcaagagaTTCTACGACATTCTCTTGTCTtttt RW agctaaaaaGCAAGAGAATGTCGTAGAAAtctctgaaTTCTACGACATTCTCTTGCggg
<i>Bcl-2</i>	FW gatccccGAATCAAGTGTTCGTATAttcaagagaTATGACGAACACTTGATTCTttt RW agctaaaaaGAATCAAGTGTTCGTATAtctctgaaTATGACGAACACTTGATTCTggg
<i>scramble</i>	Fw gatccccAGCGAAAACTTTATCGGAttcaagagaTCCGATAAAGTTTTTCGCTtttt Rv agctaaaaaAGCGAAAACTTTATCGGAtctctgaaTCCGATAAAGTTTTTCGCTggg

<i>vgf</i>	Fw gatccccCGAAGAGGTGGAGGAGAAAttcaagagaTTTCTCCTCCACCTCTTCGtttt
	Rv agctaaaaCGAAGAGGTGGAGGAGAAAtctcttgaaTTTCTCCTCCACCTCTTCGggg
<i>pcsk1/3</i>	Fw gatccccGGAGTGGAATCACACAGATtcaagagaATCTGTGTGATTCCACTCCtttt
	Rw agctaaaaGGAGTGGAATCACACAGATtctcttgaaATCTGTGTGATTCCACTCCggg
<i>pcsk2</i>	Fw gatccccGAGAGAGACCCAGGATAAttcaagagaTTATCCTGGGGTCTCTCTtttt
	Rw agctaaaaGAGAGAGACCCAGGATAAtctcttgaaTTATCCTGGGGTCTCTCTCggg

Taula 5. Seqüència dels shRNA que es varen introduir dins el vector pSUPER. En majúscules apareix la seqüència de 19 nucleòtids del RNAi.

Un cop dissenyats els oligonucleòtids i rebuts d'Invitrogen, es va procedir a la hibridació de les cadenes complementàries. A continuació, es va subclonar al vector pSuper a través de les dianes de restricció abans esmentades i, posteriorment es va clonar el fragment H1-shRNA (que conté el promotor H1 més la seqüència del shRNA) en el plàsmid lentiviral pLVTHM via les dianes EcoRI i ClaI (Figura 18).

Més detalladament, el plàsmid pSuper es va digerir de manera seqüencial amb els enzims HindIII (Genecraft) i BglII (Genecraft). Es va partir de 5µg de pSuper i es van utilitzar 10 unitats de cada enzim que es varen incubar a 37°C durant 1 hora i 30 minuts cada un. El resultat es va resoldre en un gel d'agarosa al 0,8% i es va procedir a l'extracció de la banda amb el QIAquick gel extraction Kit (QIAGEN). Per altre banda, els oligonucleòtids rebuts d'Invitrogen es varen diluir en aigua DEPC a una concentració de 3mg/mL, 1µL dels oligonucleòtids Fw i Rw de cada un dels gens d'interès es van incubar en tampó d'annealing (50mM Hepes pH 7,4; 100mM NaCl) amb el següent programa: 4' 95°C + 10' 70°C + 10' 50°C + 10' 37°C + 5' 20°C + 5' 4°C. El resultat d'ambdós processos es va lligar amb el Quick Ligation™ kit (BioLabs). 120ng d'oligonucleòtid i 25 ng de pSUPER obert es van diluir en 10µL d'aigua, seguidament, es va afegir 10µL del tampó de reacció del Kit, es va vortejar i s'hi va afegir 2µL de la T4 lligasa del Kit. La mescla es va incubar 10 minuts a temperatura ambient i 5 minuts en gel per tal de parar-la. 10µL del resultat de la reacció es van transformar per xoc tèrmic en cèl·lules DH5α (vegeu apartat 12.3).

Es varen triar 2 colònies de les seleccionades amb ampicil·lina en placa d'agar i es van créixer tota la nit en LBA a 37°C. L'endemà es va purificar el plàsmid amb el QIAquick miniprep Kit (QIAGEN). 5µg del resultat es va digerir de manera

seqüencial amb 10 unitats dels enzims EcoRI (Sigma) i ClaI (Sigma), 2 hores cada un, per tal d'alliberar el fragment H1-shRNA. Alhora, també es va digerir d'igual manera 1,5µg de pLVTHM buit per tal d'obrir-lo. Els resultats de les digestions es van resoldre en un gel del 2,5% d'agarosa. Els fragments H1-shRNA i el pLVTHM obert es van obtenir del gel amb el QIAquick gel extraction Kit (QIAGEN). A continuació, es van lligar 2µL (120ng aprox) del fragment H1-shRNA amb 1µL de pLVTHM obert (25ng aprox) seguint el protocol abans descrit pel Kit de lligació Quickligation Kit (Biolabs) i, posteriorment, 10µL es van transformar per xoc tèrmic a les DH5α.

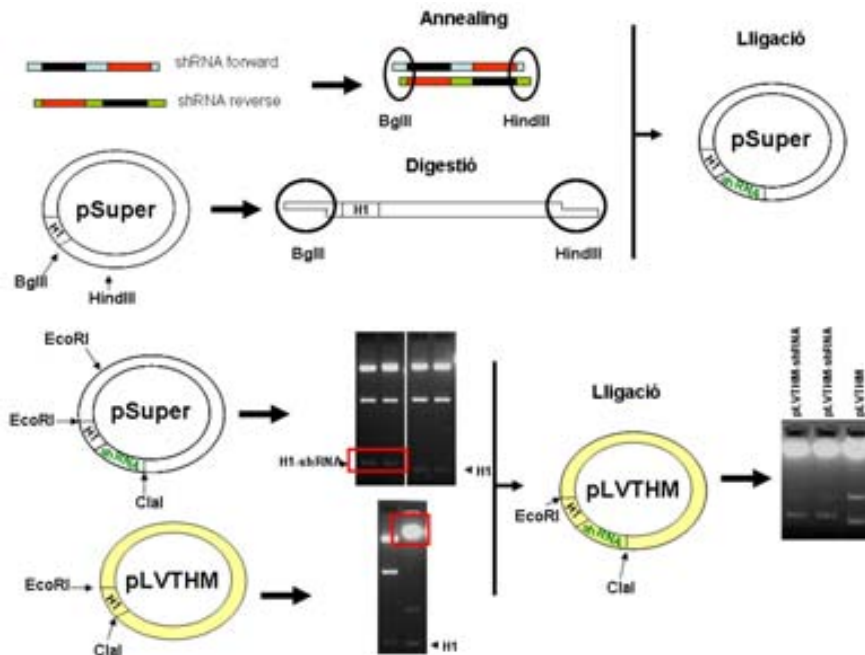


Figura 20. Obtenció del vector lentiviral. Primerament, s'hibriden els oligonucleòtids Fw i Rw, es digereix el vector pSUPER amb BglII i HindIII i és lliguen els resultats d'ambdós processos. A continuació, es subclona el fragment H1-shRNA al vector pLVTHM mitjançant digestió amb EcoRI i ClaI i posterior lligació. Finalment, obtenim el vector lentiviral que conté el shRNA sota el promotor H1.

Altres vegades es triaren 2 colònies de les seleccionades en placa d'agar i es creixeren tota la nit a 37°C. L'endemà es purificà el plàsmid amb el QIAquick miniprep Kit (QIAGEN) i es digerir amb EcoRI i ClaI per tal de detectar aquelles colònies que havien inserit el plàsmid amb el fragment H1-shRNA. Aquelles que resultaren positives es portaren al servei de seqüenciació per una major confirmació. Un cop arribat a aquest punt, el següent pas consisteix en l'obtenció de partícules lentivirals mitjançant la transfecció en les HEK 293T.

14.2.3. Producció dels lentivirus.

Les partícules víriques pseudotipades amb la proteïna G d'estomatitis vesicular es varen obtenir per transfecció transitòria en cèl·lules HEK 293T sembrades en plaques de 100mm de diàmetre amb medi DMEM amb 10% de FBS. Les cèl·lules es van sembrar el dia anterior a la transfecció a una densitat de 300.000 cèl·lules/mL, de manera que en el moment de la transfecció estiguessin a una confluència del 70% aproximadament. Per transfectar les cèl·lules es va utilitzar el mètode del fosfat càlcic. Breument, es va canviar el medi a les 293T a 5mL de medi fresc 30 minuts abans de la transfecció. Seguidament, en un tub es va afegir 20µg del vector lentiviral pLVTHM (que conté el shRNA pel nostre gen d'interès), 15µg de vector psPAX2 (plàsmid d'empaquetament) i 6µg del vector pMD2G (que codifica per proteïnes de l'envolta viral) per placa de 100mm. Tot seguit, també s'hi afegí aigua i HBS (237mM NaCl; 10,2mM KCl; 1,4mM Na₂HPO₄, 42mM Hepes; 10mM glucosa; pH 7,05) i, finalment, s'afegí gota a gota 2,5mM de CaCl₂ per tal de precipitar el DNA. La barreja es deixà 25 minuts a temperatura ambient. S'afegí 1mL a cada placa gota a gota i repartint-lo per tota la superfície. Entre 6 o 8 hores després es va canviar el medi a 10mL de medi fresc i es va tenir durant 48 hores a l'incubador. En aquest punt es va procedir a recollir el medi i a centrifugar-lo a 140.000g a 4°C i durant 2 hores per tal de concentrar els virus. Al sediment resultant s'hi addicionà 150µl (cada 3 plaques de 100mm) de TNE (50mM Tris-HCl pH7,5; 130mM NaCl; 1mM EDTA) i es deixà un mínim de 8 hores en agitació a 4°C per tal de resuspendre els virus. Un cop passat el temps, es van recollir i al·lotjar els virus que foren guardats a -80°C.

14.3. Titulació dels virus.

Per últim, es va procedir a titular els virus per tal d'usar sempre una mateixa concentració en el moment d'infectar les CGCs. Per això, es van sembrar 30.000 cèl·lules 293T per pou en una placa de 24 pous. El dia següent a la tarda, es van deixar les cèl·lules en 250µL i es va infectar amb dilucions seriades dels virus obtinguts (que corresponien a 2µL, 1µL, 0,5µL, 0,25µL, 0,125µL, 0,0625µL, 0,03125µL i 0,015625µL de l'estoc inicial). L'endemà al matí, s'hi va afegir 1mL de medi fresc a cada pou i 48 hores després es van titular els virus via detecció de GFP per citometria de flux (CYTOMICS FC 500, Beckman Coulter). Per tal d'infectar les CGCs s'utilitzà la concentració de 1×10^6 partícules víriques/mL (vegeu apartat 1.3.3).

15. Obtenció de proteïna de cerebel de diferents dies postnatsals.

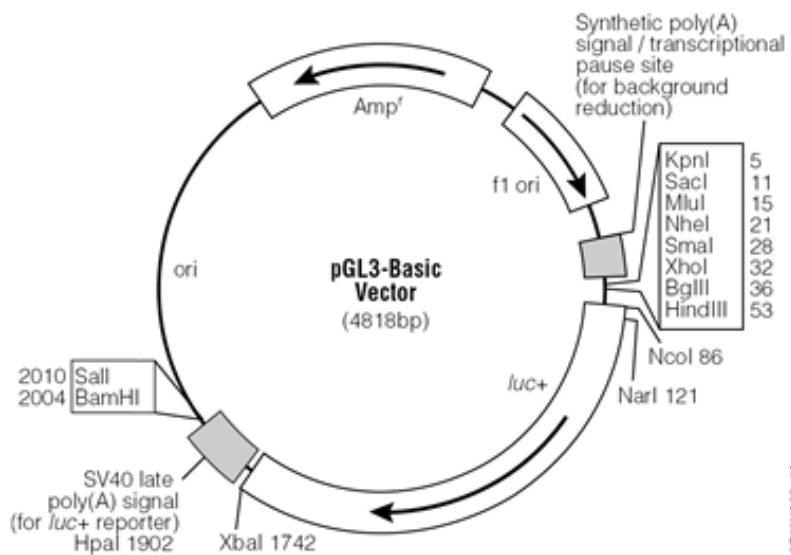
Rates de la soca OFA es varen sacrificar a diferents dies postnatsals (p0,p2,p4,p7,p9,p12,p13, p15 i 2 mesos). Un cop sacrificat l'animal es va procedir a l'extracció del cerebel. De cada un dels cerebels, 50mg varen ser homogeneïtzats amb l'homogeneïtzador (*pellet pestle, Motor, Sigma*) 20 cops amb 1mL de tampó RIPA (50mM Tris Base pH 7.4; 150mM NaCl; 2mM EDTA; 1% NP-40; 0,5% Triton X-100; 0,1% SDS; 1mM Na_3VO_4 ; 25mM NaF; 1mM PMSF) amb còctels de inhibidors de proteases i fosfatases diluïts a raó de 1/200 i 1/100 respectivament. Es va deixar solubilitzar durant 1 hora a 4°C i, seguidament, es va sonicar les mostres durant 15 segons. Finalment, es va centrifugar a 9.250g durant 15 minuts. Els sobrenadants es van guardar a -80°C. Prèviament al seu us se'n va determinar la concentració de proteïna pel mètode de BCA.

16. Anàlisi estadística.

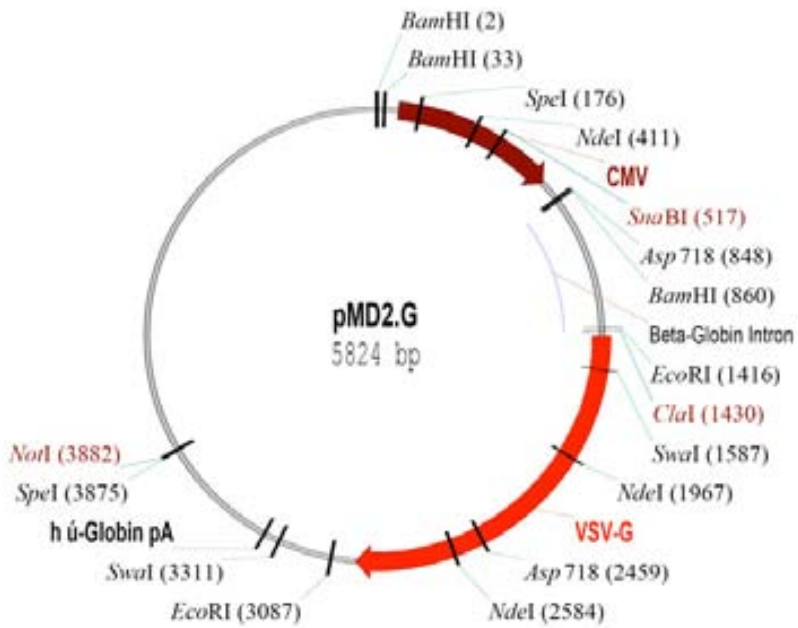
Els resultats estan expressats com una mitja \pm SEM. Els grups experimentals foren comparats per un test ANOVA d'una via, seguit pel test de multicomparació de Tukey. Els valors $p < 0,05$ van ser considerats significatius.

17. Mapes dels plàsmids utilitzats en l'obtenció d'eines per la realització de la tesi.

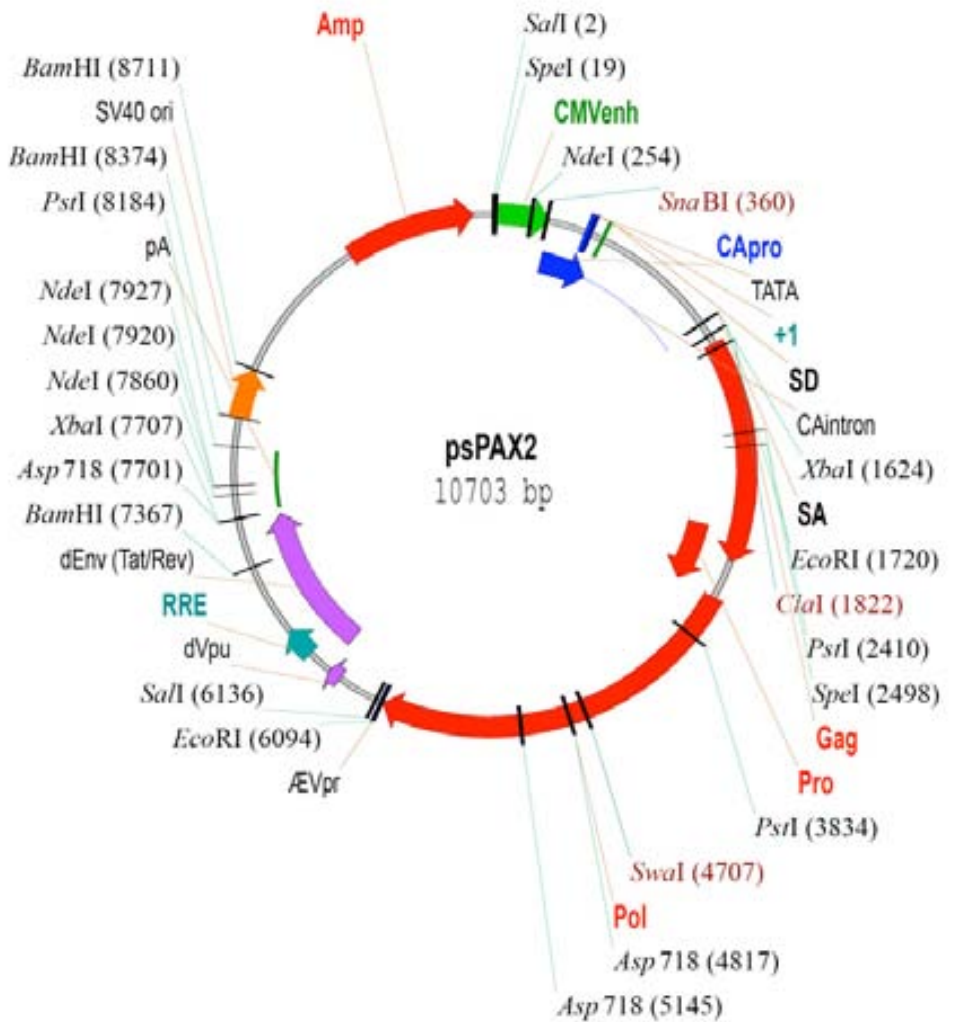
pGL3-Basic:



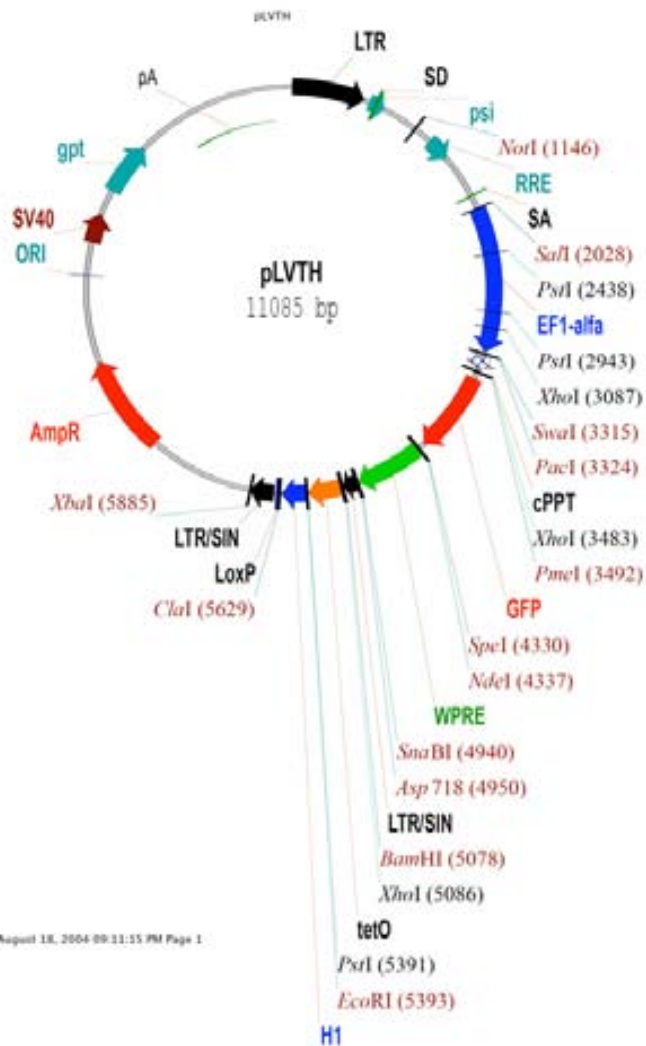
pMD2G:



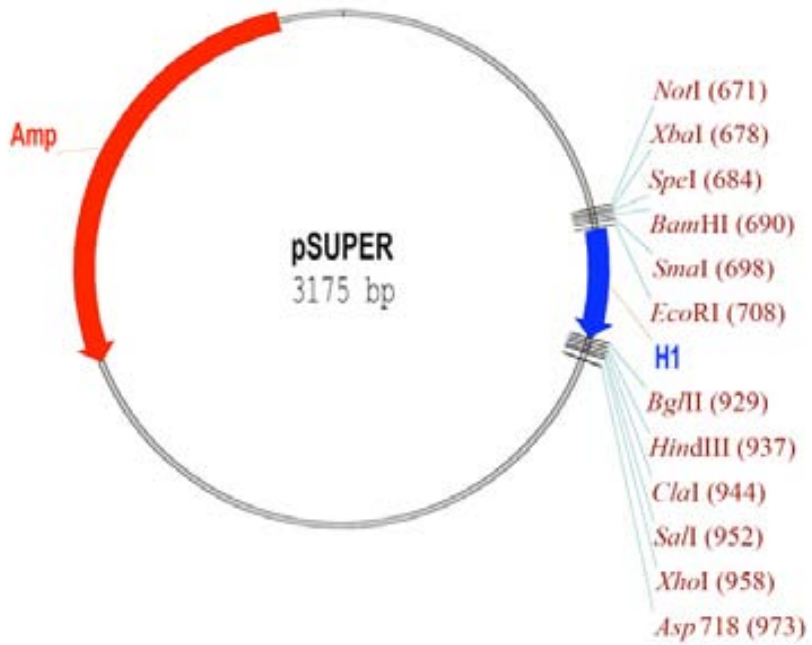
psPAX2:



pLVTHM:



pSUPER:



IV - RESULTATS

1- Treball 1: Bone Morphogenetic Protein-6 Promotes Cerebellar Granule Neurons Survival by Activation of the MEK/ERK/CREB Pathway.

Acceptat a Molecular Biology of the Cell

Bone Morphogenetic Protein-6 Promotes Cerebellar Granule Neurons Survival by Activation of the MEK/ERK/CREB Pathway

Bruna Barneda-Zahonero^{1,2}, Alfredo Miñano-Molina^{1,2}, Nahuai Badiola^{1,2}, Rut Fadó^{1,2}, Xavier Xifró^{1*}, Carlos A. Saura^{1,2} & José Rodríguez-Alvarez^{1,2}

¹Institut de Neurociències and Departament de Bioquímica i Biologia Molecular Universitat Autònoma de Barcelona, Spain; ²Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Spain.

* **Present address:** Departament de Biologia Cel.lular, Universitat de Barcelona and IDIBAPS, Barcelona, Spain

Running head: BMP-6 promotes survival of neurons

Abbreviations: CGCs, cerebellar granule cells; DIV, days in vitro; K5, 5 mM KCl; K25, 25 mM KCl;

Corresponding author: Dr. José Rodríguez Alvarez

Instituto de Neurociencias, Edificio M, Campus de Bellaterra, Universidad Autónoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Valles, Barcelona, Spain

Phone: (34) 935 811 525; Fax: (34) 935 811 573; Email: jose.rodriguez@uab.es

ABSTRACT

Bone morphogenetic proteins (BMPs) have been implicated in the generation and postnatal differentiation of cerebellar granule cells (CGCs). Here, we examined the eventual role of BMPs on the survival of these neurons. Lack of depolarization causes CGCs death by apoptosis *in vivo*, a phenomenon that is mimicked *in vitro* by deprivation of high potassium in cultured CGCs. We have found that BMP-6, but not BMP-7, is able to block low potassium-mediated apoptosis in CGCs. The neuroprotective effect of BMP-6 is not accompanied by an increase of Smad translocation to the nucleus, suggesting that the canonical pathway is not involved. By contrast, activation of the MEK/ERK/CREB pathway by BMP-6 is necessary for its neuroprotective effect, which involves inhibition of caspase activity and an increase in Bcl-2 protein levels. Other pathways involved in the regulation of CGCs survival, like the c-Jun terminal kinase and the phosphatidylinositol 3- kinase (PI3K)-Akt/PKB, were not affected by BMP-6. Moreover, failure of BMP-7 to activate the MEK/ERK/CREB pathway could explain its inability to protect CGCs from low potassium-mediated apoptosis. Thus, this study demonstrates that BMP-6 acting through the non-canonical MEK/ERK/CREB pathway plays a crucial role on CGCs survival.

INTRODUCTION

Cerebellar granule neurons (CGCs) are generated in the external granule layer and migrate to the internal granule layer (Ryder and Cepko, 1994). During their postnatal migration, CGCs require excitatory inputs for proper differentiation and development. Otherwise, CGCs die by apoptosis (Burgoyne and Cambray-Deakin, 1988; Wood et al., 1993). This situation can be mimicked *in vitro* in primary cultures of CGCs. These neurons undergo spontaneous apoptosis when they grow in the presence of low potassium concentration (5mM KCl; K5). By contrast, if they grow in the presence of high potassium concentrations (25mM KCl; K25) or NMDA they develop and survive (Gallo et al., 1987; Xifro et al., 2005).

Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) have been described to have an important role during differentiation of CGCs. For instance, BMP-2 and BMP-4 are able to prevent Shh-induced proliferation, thereby allowing granule neuron differentiation (Rios et al., 2004). Expression of granule cell markers such as *math1* or *Zic* has been reported to be controlled by BMPs (Aruga et al., 1994; Ben Arie et al., 1997). Accordingly, Alder and co-workers, have demonstrated that exposure of neural cells to BMPs induces CGCs phenotype (Alder et al., 1999) whereas CGCs differentiation is greatly impaired in BMP receptors conditional knockout mice (Qin et al., 2006). Moreover, Smad 1 and BMP-4 expression and protein levels peak during CGCs differentiation and migration towards the IGL (Angleley et al., 2003). Besides its role in CGCs differentiation, several reports have suggested that BMPs have an anti-apoptotic effect in many cell types (Harvey et al., 2004; Izumi et al., 2001; Wang et al., 2001), which opens the possibility that they could be also involved on regulation of CGCs survival (Yabe et al., 2002). Moreover, the eventual anti-apoptotic effects of BMPs in the developing cerebellum and the mechanisms involved remain largely unknown.

BMPs signals via two types of receptors (type I; BMPRI and type II; BMPRII) that are expressed as homomeric as well as heteromeric complexes (Massague, 1998; ten Dijke et al., 1994). When BMPR are activated by BMPs, intracellular signaling is mainly triggered by phosphorylation of the receptor regulated Smad (R-Smad; Smad 1, 5 or 8) and their subsequent binding to Smad 4. The heterotrimer R/R-Smad/Smad 4 then translocates to the nucleus where it activates the expression of specific genes (Miyazono, 1999). Some reports have suggested that BMPs can also

activate other intracellular pathways to exert their cellular functions. For instance, BMP-2 induce the differentiation of osteoblasts by activating the phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/Akt pathway (Ghosh-Choudhury et al., 2002). BMP-7 activates the MEK/ERK pathway and PKC in cortical neurons *in vitro* (Cox et al., 2004). On the other hand, controversial studies exist about the activation of stress-activated kinases (SAPK) by BMPs in different cell types (Hallahan et al., 2003; Izumi et al., 2001; Lemonnier et al., 2004).

In this study, we show that BMP-6 protects against K5-induced CGCs apoptosis through inhibition of caspase-3 activation and elevation of Bcl-2 protein levels, which suggests a novel role for BMPs in developing cerebellum. In addition, we provide strong evidence that this effect is independent of the traditional BMPs signaling pathway associated to Smad activation. Our results show for the first time that BMP-6-mediated anti-apoptotic effect is mediated through activation of the MEK/ERK/CREB pathway.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture.

Granule cell cultures were prepared from dissociated cerebella of 8-day-old Wistar rats as previously described (Balazs et al., 1988). Cells were plated (3×10^3 cells/mm²) in D-MEM with GlutaMAXTM (Invitrogen) and 25mM KCl (K25) supplemented with 10% heat inactivated foetal bovine serum, 25,000 units of penicillin, and 25 mg of streptomycin (PAN Biotech Inc., Germany). 10 μ M cytosine- β -D-arabinofuranoside was added to the cultures 24 h after plating to prevent proliferation of non-neuronal cells. Neurons were plated onto poly-L-lysine coated 24-well plates for measurement of cell viability and immunocytochemistry, on 60-mm culture dishes for RNA extraction and Western blotting, on 6-well plates for measurement of caspases-3 activity and on 100-mm plates for subcellular fractionation. At 6 days *in vitro* (DIV) neurons were deprived from serum and/or potassium (K5 or K25) and cultured in the absence or presence of BMP-6 (100ng/ml) or BMP-7 (30ng/ml) (Sigma-Aldrich). In some experiments, cells were preincubated with the MEK inhibitors PD98059 or U0126 (Calbiochem) before replacing the medium. The experimental procedures were performed in accordance with guidelines of the Comissió d'Ètica en l'Experimentació Animal i Humana of the Universitat Autònoma de Barcelona.

Fluorescent analysis of apoptotic nuclei

Apoptosis was assessed by nuclear DNA staining with Hoechst 33258. 24 h after the treatment, cells were washed twice in Tris-buffered saline (TBS) fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 45 min at 4°C and stained with 1 µg/ml Hoechst 33258 (Molecular Probes) for 5 min. Nuclear DNA staining was observed with an inverted microscope (Nikon eclipse TE-2000-E). At least 1,000 cells were individually examined for each experimental condition. Condensed and/or fragmented nuclei were considered as apoptotic nuclei. Data are given as mean ± SEM of values obtained in three or four independent experiments performed in duplicate. Results are expressed as the percentage of apoptotic nuclei vs. total nuclei.

Caspase activity

Cells were incubated for 10 h in K5 in the presence or absence of BMP-6 (100ng/ml), BMP-7 (30ng/ml), staurosporine (1µM) or K25. Cells were collected and pelleted by centrifugation at 1000 rpm for 3 min at 4°C. The supernatant was discarded and cells were washed with PBS at 4°C and centrifuged at 12,300 rpm at 4 °C for 3 min. Caspase activity was determined following the protocol of ENZCHEK CASPASE-3 ASSAY KIT (Molecular Probes). Fluorescence intensity was measured with a microplate reader (Synergy HT, Bio-Tek). Data are mean ± S.E.M of the values obtained in four independent experiments performed in duplicate.

Immunocytochemistry

Neurons were incubated in K5 or K25 in the absence or presence of BMP-6 (100ng/ml) or BMP-7 (30ng/ml) for 1 h (for Smad localization) or 10 h (active caspase 3 fragment). Then, CGC cultures were washed with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde (w/v in PBS) at 4°C for 45 min. Afterwards, they were washed twice with PBS, blocked with 5% foetal calf serum and 3% bovine serum albumin (BSA) in TBS (blocking buffer), and then incubated overnight at 4 °C with antibodies against the active form of caspase-3 (Cell Signalling) or Smad 1, Smad 4 (Upstate) or Smad 5 (Santa Cruz) (1:100 dilution in 5% BSA in TBS/T). Cultures were then thoroughly washed with TBS/T and incubated with a fluorescein isothiocyanate-conjugated secondary antibody (1:500 dilution) in 5% BSA- TBS/T at room temperature for 1 h. After several washes, fluorescence was visualized under an inverted microscope for cleaved caspases-3 staining or confocal microscope (LEICA

TCS 4D) to determine Smad subcellular localization. Three independent experiments were performed in duplicate.

Subcellular fractionation

CGCs were exposed to a low potassium medium (K5) and with or without BMP-6 (100ng/ml), BMP-7 (30ng/ml) or K25 for 1 h. Neurons were washed once with PBS at 4°C, resuspended in PBS, and centrifuged at 1000 rpm at 4°C for 5 min. Pelleted cells were resuspended in buffer containing 0.01M HEPES pH7.9, 0.01M MgCl₂, 0.01M KCl, 0.5mM DTT, 0.1% NP-40, PMSF, 10µg/ml Aprotinin, 20µg/ml Leupeptin, 1mM activated ortovanadate, and incubated on ice for 5 min. Afterwards, cells were centrifuged at 4000 rpm at 4°C for 30 seconds. The resulting supernatant was the cytosolic fraction. Pelleted nuclei was incubated at 300 rpm at 4°C for 30 min with buffer containing high salt (0.01M HEPES pH 7.9, 25% glicerol, 0.42M NaCl, 0.2mM EDTA, 0.5mM DTT, PMSF, 10µg/ml aprotinin, 20µg/ml leupeptin, 1mM activated ortovanadate) to isolate nuclear proteins. Then, samples were centrifuged at 12,300 rpm at 4°C for 15 min. The resulting supernatant was considered as the nuclear fraction. Proteins were stored at -80°C. Both subcellular fractions were subjected to Western blotting analysis.

Immunoblotting

CGC cultures were washed with PBS and total protein was extracted by incubating neurons in lysis buffer containing 20mM Tris pH 7.5, 1% Nonidet P-40, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1mM PMSF, 10µg/ml aprotinin, 20µg/ml leupeptin and 1mM activated ortovanadate. Cell lysates were centrifuged at 12,000 rpm for 10 min at 4°C. Proteins (25 µg for total lysates and 5 µg for subcellular fractions) were resolved on 10% SDS/PAGE gels and transferred to nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences). Membranes were washed with TBS/Tween (TBS with 0.1% Tween 20) and incubated in blocking buffer for 1 h (5% of non-fat dry milk in TBS/Tween) to block non-specific binding. Blots were washed and incubated at 4°C overnight with primary antibodies against BMPRIa, BMPRIb, Smad 5, JNK and Histone H1 from Santa Cruz Technologies; BMPRII, tubulin, panAkt, Bcl-2, Ras and Rap-1 from BD Biosciences; Smad 1 and 4 from Upstate Biotechnology; GAPDH from Ambion Inc.; phospho Akt (Ser⁴⁷³), phospho-p44/42 MAP Kinase and p44/42 MAPK, phospho CREB (Ser¹³³) and CREB from Cell Signaling; active JNK from Promega and Actin from Sigma Aldrich, diluted (1:1000 for all, except Smad 1 and Bcl-2 1:500, active JNK 1:2500 and GAPDH and actin 1:40.000) in blocking buffer. Blots were then

washed and incubated at room temperature for 1 h with horseradish peroxidase–conjugated secondary antibodies (BD Biosciences) diluted 1:5000 in blocking buffer. Immunoreactive bands were visualized using the ECL™ Western blotting detection reagent (Amersham Biosciences, Uppsala Sweden) and quantified by a computer-assisted densitometer. Tubulin and actin were used as loading control and GAPDH and Histone H1 were used to assess the purity of cytosolic and nuclear fractions, respectively.

Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Total RNA was extracted from CGCs cultured in K25 every 2 DIV with Trizol (Invitrogen) accordingly to manufacturer's instructions. 1 µg of total RNA was converted to first strand cDNA using the SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. The resulting cDNA was subjected to PCR analysis. PCR cycling parameters were as follows: 94°C for 2 min for one cycle, followed by 94°C for 30 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 60 s for 40 cycles and 72°C for 5 min with BMPRIa, BMPRIb, BMPRII and 18s primers and 94°C for 2 min for one cycle, followed by 94°C for 30 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 45 s for 35 cycles and 72°C for 5 min with Smad 1, 4 and 5 primers. The PCR products were stained with SYBR Safe™ (Invitrogen). A sample without RNA was used as negative control, whereas neonatal rat brain RNA was used as a positive control (results not shown). The sequences of specific primers are as follows: BMPRIa: (sense) 5' CAG CTA CGC AGG ACA ATA GA 3', (antisense) 5' AGC TGA GTC CAG GAA CCA GT; BMPRIb: (sense) 5' AAG TGT TCT TCA CCA CGG AG 3', (antisense) 5' AGG CCG TAA CTT CTT CAT GC 3'; BMPRII: (sense) 5' GCT TCG CAG AAT CAA GAA CG 3', (antisense) 5' GTG GAC TGA GTG GTG TTG TG 3'. 18s: (sense) 5' TCA AGA ACG AAA GTC GGA GG 3' (antisense) 5' GGA CAT CTA AGG GCA TCA CA 3'; Smad 1: (sense) 5' GAA CTA GAC CAG CCG CTA TG 3', (antisense) 5' GTG GTG GTA GTT GCA GTT CC 3'; Smad 4: (sense) 5' GTT CAG GTA GGA GAG ACC TT 3', (antisense) 5' TAA AGG CTG TGG GTC CGC AT 3'; Smad 5: (sense) 5' GCC AAG CAA GTG TGT CAC TA 3' (antisense) 5' TAG GCA ACA GGC TGA ACA TC.

Ras and Rap1 activity assay.

Ras and Rap1 activation was determined by measuring p21ras.GTP and Rap1.GTP after a pull-down assay. p21ras-GTP and Rap1-GTP were fished with c-raf-RBD-GST and Ral-GDS-GST respectively (expression plasmids were kindly provided by Dr. Néstor Gómez, Universitat Autònoma de Barcelona and Dr Michel Fournier,

Université d'Orléans) conjugated to glutathione-sepharose beads (Amersham Pharmacia Biotech). 400 µg of cell lysate was incubated with 30µl of 50% slurry suspension in binding buffer (20mM Tris pH 7.5, 1% NP-40, 200mM NaCl, 2,5mM MgCl₂, 10mM NaF, 10µg/ml aprotinine, 20µg/ml leupeptine, 1mM Na₃VO₄) at 4°C for 90 min. After incubation, the beads were washed, resuspended in sample buffer and heated at 95°C for 5 minutes to release the coupled proteins. Samples were subjected to 12% SDS-PAGE electrophoresis, transferred to nitrocellulose membranes and detected by immunoblotting using monoclonal anti-Ras (BD Biosciences; 1:1000) and monoclonal anti-Rap1 (BD Biosciences; 1:1000) antibodies.

EMSA

Cells were processed as described for subcellular fractionation. CREB response element (CRE-like) consensus sequence was labelled with [³²P] using T4 polynucleotide kinase by following Promega's protocol. Labelled oligonucleotides were purified with Sephadex G-25 column (Sigma-Aldrich). 10 µg of nuclear extracts were used for DNA-protein binding assay. Unspecific binding was blocked by using 1µg of polydIdC (Sigma-Aldrich). The binding medium contained 50mM HEPES pH 7.5, 5% glycerol and 1mM EDTA. In each reaction 20000 c.p.m. of radiolabelled probe was included. Samples were incubated for 20 min at room temperature. Bound and unbound probes were resolved on 6% polyacrylamide gels with a running buffer containing 45mM Tris-borate (pH 8.3) and 1mM EDTA. Radioactive signals were developed on HyperfilmTM ECL films (Amersham Biosciences) after 1-2 days of exposure at 80°C.

Lentiviral vectors.

Constructs for RNA interference experiments were cloned into the pSUPER.retro.puro plasmid (OligoEngine). Specific oligonucleotides of the Bcl-2 sequence and the scrambled sequence as a control are as follows: shRNA Bcl-2, (forward)
gatccccGAATCAAGTGTTTCGTCATAttcaagagaTATGACGAACACTTGATTCtttt
(reverse)
agctaaaaaGAATCAAGTGTTTCGTCATAtctcttgaaTATGACGAACACTTGATTCggg.
shRNA scramble, which does not recognize any rat coding sequence (forward),
gatccccAGAACACGACGGAACAAGAttcaagagaTCTTGTTCCGTCGTGTTCTtttt,
(reverse)

agctaaaaAGAACACGACGGAACAAGAtctctgaaTCTTGTTCCGTCGTGTTCTggg.
Oligonucleotides were obtained from Invitrogen and were cloned between *BglII/HindIII* sites of pSUPER.retro.puro plasmid. Lentiviral constructs were achieved by digesting *EcoRI-ClaI* sites from pSUPER-sh to replace H1 promoter with H1-shRNA cassette in pLVTHM.

Lentiviruses were propagated using methods described previously (Naldini et al., 1996; Zufferey et al., 1998). Briefly, human embryonic kidney 293T (HEK293T) cells were seeded at a density of 2.5×10^6 cells in 100 mm dishes. The following day, cells were transfected with 20 μ g of pLVTHM derived constructs, 15 μ g of pSPAX2, and 8 μ g of pM2G. The transfection was routinely performed by the calcium phosphate transfection method (Cullen, 1987). Cells were allowed to produce lentiviruses for 48 h. After 48 h, the medium was centrifuged at 1,200 g for 5 min, and the supernatant was concentrated at 141,000 g for 120 min and then resuspended in 50 μ l of PBS containing 1% BSA. Lentiviruses were stored at -80°C . Biological titers of the viral preparations expressed as a number of transducing units per milliliter (TU/ml) were determined by transducing HEK293T cells in limiting dilutions. After 72 h of infection, the percentage of green fluorescent protein (GFP)-positive cells was determined by using a cytometer and viruses at 1×10^6 TU/ml were used in the experiments.

Viral Infection

Herpes virus simplex (HSV) with green fluorescent protein (HSV-GFP) or mCREB (a dominant-negative mutant of CREB that lacks Ser 133; tagged with GFP) (HSV-MCREBGFP) were provided by Dr Nestler (Han et al., 2006). Cells were infected at 4DIV with HSV-MCREB or HSV-GFP (control) and at 6DIV cells were deprived from serum and/or potassium (K5 or K25) and treated with or without BMP-6 (100ng/ml). Nuclei condensation and chromatin fragmentation was monitored at 24 h in neurons expressing GFP.

Lentiviral infection was performed at the day of plating. Cells remained in contact with the lentivirus for 5 h and then the medium was replaced with D-MEM with GlutaMAXTM (Invitrogen) containing K25 supplemented with 10% heat inactivated FBS, 25,000 units of penicillin, and 25 mg of streptomycin. At 6 DIV treatments were performed as described above and activation of caspase-3 and chromatin condensation was assessed at 10 h and 24 h respectively.

Statistical Analysis

Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Tukey multiple comparison test. A value of $P < 0.05$ was considered as statistically significant.

RESULTS

BMP-6 protects against K5-induced apoptosis in mature CGCs.

Previous studies have described that BMPs are able to promote cell survival in the CNS (Chang et al., 2003; Gratacos et al., 2002; Iantosca et al., 1999; Izumi et al., 2001; Wang et al., 2001; Yabe et al., 2002). Before studying the eventual effect of BMP-6 on survival of cultured CGCs under pro-apoptotic conditions, we analyzed the expression of BMP receptors and Smad proteins at different days in vitro (DIV). Protein and mRNA for BMP receptor (BMPR) type Ia, Ib and II were detected at all DIV in cultured CGCs (Supplemental Fig. 1A and B). When we examined the expression levels of R-Smads (Smad 1/5) and Smad 4 we found expression of those Smads at all DIV (Supplemental Fig. 1A). We did not find any significant differences in protein levels of those smads when monitored by Western blot (Supplemental Fig. 1B). These data suggest that cultured CGCs should be able to form active heterotetrameric receptor complexes capable to mediate BMPs signalling.

To address the eventual effect of BMPs on CGCs survival in pro-apoptotic conditions (K5 containing medium), neurons were grown in K25 and medium was switched to low potassium conditions (K5) in the presence or absence of BMPs at 6 DIV. When cultures were treated with BMP-6, the number of condensed or fragmented nuclei was reduced by 45% (Figure 1). By contrast, no reduction on condensed nuclei was observed in cultures treated with BMP-7 or BMP-2 (Figure 1 and data not shown).

Since caspase-3 is involved in K5-mediated CGCs apoptotic death (Armstrong et al., 1997; Moran et al., 1999; Xifro et al., 2006), we wondered whether the pro-survival effect of BMP-6 was due to inhibition of caspase-3 activity. To this aim, we determined the presence of active caspase-3 and the DEVDase activity in our cultures. As shown in Figure 2, the number of immunoreactive cells for active caspase-3 as well as DEVDase activity was increased in CGCs cultures when medium was switched from K25 to K5. Treatment with BMP-6 significantly reduced

both the number of immunoreactive cells for active caspase-3 (Figure 2A,B) and caspase activity in the cultures (Figure 2C). By contrast, and in agreement with the absence of effects on chromatin condensation, the addition of BMP-7 neither reduced the number of immunoreactive cells for active caspase-3 (Figure 2A,B) nor the K5-mediated caspase activation (Figure 2C).

Inhibition of caspase activity by BMPs is not mediated by nuclear translocation of Smads.

The effects of BMPs are thought to be canonically mediated by nuclear translocation of the complex Smad 4/Smad 1 or 5, which can act as co-activators or co-repressors of gene transcription (Miyazono et al., 2005). Since we detected the presence of Smad 1, 4 and 5 proteins in our culture system (Supplemental Figure 1), we then tested whether smad translocation could be observed in mature CGCs after BMPs treatment. For this purpose, we analyzed by confocal microscopy the localization of Smad 1, 4 and 5 in CGCs 1 h after switching the medium to K5 containing vehicle or BMPs. We found the presence of Smad 1, 4 and 5 in the cytoplasm as well as in the nucleus of CGCs in all conditions tested (Figure 3A and Supplemental Figure 2A and B). These results, which were confirmed by subcellular fractionation and Western blot analysis, revealed no significant differences on nuclear phosphoSmad 1 levels in the presence or absence of BMPs. Similar results were obtained for Smad 4 (Supplemental Figure 2C). Altogether, these data indicate that the anti-apoptotic effect of BMP-6 is not due to an increase in the nuclear translocation of Smad proteins, suggesting the involvement of a non-canonical pathway.

BMP-6 induces MEK/ERK pathway activation

Since PI3K/Akt has been described to be responsible for the inhibition of K5-mediated apoptosis of CGCs observed with K25, IGF-1 or NMDA (D'Mello et al., 1993; Subramaniam et al., 2003; Xifro et al., 2005), we decided to explore the role of this pro-survival pathway on the anti-apoptotic effect of BMP-6 in CGCs. We examined the time-course of Akt phosphorylation in CGCs when the medium was switched to K5 in the presence of vehicle or BMP-6. A reduction on Akt phosphorylation was observed in K5 cultured cells, which was not reverted by BMP-6 treatment (Figure 4A). These results suggest that the PI3K/Akt pathway is not involved in the BMP-6 neuroprotective effect in CGCs.

Besides the activation of survival promoting signal pathways, blockade of K5-mediated apoptosis of CGCs have been also associated to inhibition of the c-jun N-terminal kinases (JNKs). For instance, pharmacological or synaptic activity-dependent inhibition of JNKs activity is able to reduce K5-mediated apoptosis (Harris et al., 2002; Watson et al., 1998; Xifro et al., 2006). However, inhibition of JNKs activity does not seem to be involved in BMP-6 antiapoptotic effect. Western blot analysis of phospho-JNK showed that treatment with BMP-6 was not able to reduce K5-mediated phosphorylation of JNK (Figure 4B).

The regulation of the extracellular signal regulated kinase kinase / extracellular signal regulated kinases (MEK/ERK) pathway has a more controversial role on the survival of CGCs. Although the MEK/ERK pathway has been described to mediate survival in CGCs, it is still unclear whether K5-induced apoptosis of CGCs is associated to an increase or a decrease of MEK/ERK activation (Lafon-Cazal et al., 2002; Subramaniam et al., 2005) (Zhu et al., 2005). The activity of the MEK/ERK pathway can be estimated by determining the phosphorylation of ERK. CGCs showed a significant decrease in ERK phosphorylation the first 2 h after switching the medium to K5. BMP-6 was able to increase the phosphorylation of ERK beyond the levels observed in K25 cells. Inhibition of MEK with PD98059 returned pERK to K5 levels (Supplemental Fig. 4). That increase was significantly different to the levels of phosphorylated ERK observed in K5 (Figure 4C). By contrast, the activation of MEK/ERK in K5-treated cells was not affected by BMP-7 (Supplemental Figure 3A).

MEK/ERK pathway mediates BMP-6 neuroprotection in CGCs

Since BMP-6 activates the MEK/ERK pathway in CGCs, we next examined whether MEK/ERK activation was involved in its anti-apoptotic effect. For this purpose we used a specific MEK inhibitor, PD98059 (PD). As shown in Figure 5, preincubation of CGCs with PD98059 for 1 h abolished the anti-apoptotic effect of BMP-6 measured as number of cells presenting condensed or fragmented chromatin (Figure 5A,B). Moreover, the MEK inhibitor was also able to block the BMP-6 mediated reduction of cells immunoreactive for active caspase-3 (Figure 5C,D) and caspase activity (Figure 5E). Similar results were obtained with another MEK inhibitor U0126 (Supplemental Figure. 5). All these data support the notion that MEK/ERK activity is essential for the anti-apoptotic effect of BMP-6 in cultured CGCs. Activation of monomeric G-proteins,

like Rap-1 or Ras, have been described to participate in the regulation of MEK/ERK pathway in response to survival stimuli in CGCs (Obara et al., 2007). Pull-down assay followed by Western blot analysis revealed activation of Rap1 in BMP-6-treated CGCs cell lysates (Figure 5F). By contrast, activation of Rap-1 was neither observed in BMP-7 nor in K5 cultured CGCs (Supplemental Figure 3E). Furthermore, we found that Ras was similarly activated by both BMP-6 and -7 but not in K5 conditions (Supplemental Figure 3D).

cAMP Response Element-Binding Protein (CREB) acts downstream of the MEK/ERK pathway in BMP-6-treated CGCs

The cAMP-response element binding protein (CREB) has a key role on the survival of CGCs (Bonni et al., 1999; Jia et al., 2007; Monti et al., 2002; Yabe et al., 2002; Zhong et al., 2004). It is well known that CREB is phosphorylated and activated by the MEK/ERK pathway. In this context, we next addressed the question whether CREB activation was necessary for the survival effect of BMP-6 in CGCs. Therefore, we analyzed CREB phosphorylation in K5 cultures by Western blot in the presence or absence of BMP-6 and/or the MEK inhibitor PD98059. As shown in supplemental figure 3B, the levels of CREB phosphorylation at serine 133 was significantly decreased after KCI-deprivation compared to K25 conditions. Addition of BMP-6 to deprived cultures was able to reverse the K5-mediated decrease on CREB phosphorylation, maintaining the level of phospho-CREB similar to that of K25 treated CGCs (Figure 6A). The effect of BMP-6 was dependent on MEK/ERK activation since the addition of PD 9059 reduced phospho-CREB levels to K5 levels. By contrast, BMP-7 did not affect CREB phosphorylation (Supplemental Figure 3B). These results suggest that MEK/ERK pathway mediates CREB activation in BMP-6 treated-cells. Accordingly, when we analyzed the CREB DNA binding activity by EMSA assay with a probe containing a CRE-response element (CRE-like) consensus sequence, we observed that BMP-6, but not BMP-7, rescued the CREB binding activity that was abolished in K5 conditions and, that inhibition of MEK was able to revert the BMP-6 effect (Figure 6B and Supplemental Figure 3C).

These experiments suggested that MEK/ERK-mediated activation of CREB could be involved in the neuroprotective effect of BMP-6 in CGCs. Therefore, we asked whether expression of a mutated inactive form of CREB could block the neuroprotective effect of BMP-6. We used Herpes Simplex Viruses (HSV) containing a construct encoding the green-fluorescent protein (HSV-GFP) or a construct

encoding a dominant-negative CREB fused to GFP (HSV-MCREBGFP) to infect CGCs (Carlezon, Jr. et al., 2005). Subcellular localization of HSV-GFP and HSV-MCREBGFP was clearly different. Whereas GFP alone seemed to be expressed in all subcellular compartments, the MCREBGFP fusion protein seemed to have a more nuclear localization (Figure 6D), suggesting that it was exerting its function as a nuclear CREB inhibitor. To evaluate the role of CREB in the BMP-6-mediated neuroprotection, we infected the cells with the virus at 4 DIV and performed the potassium deprivation at 6 DIV. The number of apoptotic nuclei in cells expressing GFP was determined 24 h later. We found that inhibition of CREB blocked K25- and BMP-6-mediated neuroprotection (Figure 6D and E), supporting the notion that CREB is involved in the pro-survival effect of BMP-6 in CGCs.

BMP-6 activation of CREB mediates caspase-3 inhibition by increasing Bcl-2 protein levels.

To further investigate the role of CREB activation on BMP-6-mediated neuroprotective effect, we determined the presence of active-caspase-3 by Western blot in cells infected with HSV-GFP or HSV-MCREBGFP. As reported in figure 7A, HSV-MCREBGFP was able to block the effect of BMP-6 on cleaved caspase-3. By contrast, the presence of HSV-GFP did not affect the levels of cleaved caspase-3 observed in BMP-6 treated cells.

B-cell leukemia/lymphoma-2 gene (Bcl-2) (Xiang et al., 2006) is a CREB regulated gene that has been reported to inhibit caspase activation and apoptosis. Western blot analysis indicated that BMP-6 significantly increased Bcl-2 protein levels compared to K5 conditions (Figure 7B). When MEK/ERK pathway was inhibited with PD 98059, a clear reduction in BMP-6-mediated increase in Bcl-2 was observed. A similar inhibition was observed in K5-cultured CGCs treated with BMP-6 after HSV-MCREBGFP infection. To further explore the importance of Bcl-2 in BMP-6-mediated neuroprotection we used lentiviruses to block the endogenous synthesis of Bcl-2. Although viral-mediated neurotoxicity was kept to minimum levels, an increase in caspase-3 cleavage and apoptosis was observed in K5 and K25 cultures (Figure D and F). We found higher levels of the caspase-3 active form in the presence of Bcl-2 shRNA comparing to scramble shRNA in BMP-6-treated cells (Figure 7C, D and E). In conclusion, silencing Bcl-2 expression reverses the BMP-6-mediated neuroprotective effect in CGCs (Figure 7F).

DISCUSSION

BMPs have previously been proposed to induce the generation of cerebellar granule cells progenitors (Alder et al., 1999) and to regulate their postnatal differentiation during their migration towards the internal granular layer (Qin et al., 2006). While CGCs differentiate, they require excitatory inputs from the mossy fibres and trophic support from extracellular factors to survive (Burgoyne and Cambray-Deakin, 1988; D'Mello et al., 1997; Gallo et al., 1987; Wood et al., 1993). At present, it is largely unknown the effect of BMPs on CGCs survival. Since cultured CGCs provide an *in vitro* system to explore the molecular factors involved on CGCs survival during their postnatal migration from the external to the internal cellular layer in the cerebellum, we took advantage of them to test the effect of BMPs on CGCs survival and to explore the molecular mechanisms involved.

Biological actions of BMPs are triggered by binding to homomeric as well as heteromeric receptor complexes containing BMPRI and/or BMPRII and signalling through Smad proteins (Miyazono et al., 2005). Although several reports have shown a role of BMPs on cell fate and development in the cerebellum, few data exist about the expression of both BMPRs and Smad proteins in the postnatal rodent. Angley and co-workers showed the presence of BMP-4 and Smad 1 in the postnatal cerebellum (Angley et al., 2003), whereas no reports have addressed the study of BMPR and other Smads. In our CGC cultures we detected the expression of BMPRI, BMPRII, Smad 1, 4 and 5 suggesting that CGCs cultures could be sensitive to BMPs.

CGCs in culture need to be depolarized or cultured in the presence of trophic factors to survive. Thus, CGCs die by apoptosis when cultured in a low-potassium (K5; non-depolarizing) medium. When potassium deprivation apoptosis was triggered in mature cultures (6 or 7 DIV), the addition of BMP-6, but not BMP-2 or -7, was able to block the effect of K5 on condensed chromatin nuclei and activation of caspase-3. Importantly, this data show that members from the same BMPs subfamily (BMP-6 and BMP-7) could have different roles on the SNC. By contrast, Yabe and co-workers reported that both BMP-6 and BMP-7 were able to promote the survival of CGCs (Yabe et al., 2002). The fact that they used immature CGCs could explain the discrepancy with our results. In agreement with different effects of BMP-6 and BMP-

7 on CGCs, Yabe and co-workers found that BMP-6, but not BMP-7, promoted neurite outgrowth.

Our results may also explain the increase in CGCs apoptosis in *Bmpr1a* and *Bmpr1b* double knockout mutants (Qin et al., 2006). The neurotrophic effect of BMP-6 on CGCs supports previous reports showing that BMP-6 is a neurotrophic factor for mesencephalic, septal cholinergic and calbindin-positive striatal neurons (Gratacos et al., 2002; Jordan et al., 1997; Nonner et al., 2001). Also, BMP-6 has been reported to reduce ischemia-induced brain damage in rats (Wang et al., 2001). These data indicate that besides their effects on proliferation and differentiation of CGCs (Alder et al., 1999; Angley et al., 2003; Qin et al., 2006), BMPs have also a protective role against apoptosis mediated by synaptic activity deprivation. Thus, the presence of BMPs in the postnatal cerebellum could facilitate the development and maturation of CGCs by acting through different mechanisms.

It is well established that canonical BMPs signalling is mediated by BMP receptors activation followed by nuclear translocation of Smad protein-complexes (formed by R-Smads and Co-Smad) which in turn modulate gene expression. Unexpectedly, when we analyzed the subcellular distribution of Smads proteins in CGCs cultures we observed the presence of both R-Smads and Co-Smads in the cytosol and nucleus in all conditions, whereas their localization was unchanged when cells were treated with BMPs. We could not detect changes on R-Smads and Co-Smads protein levels in the nuclear fraction after the addition of BMP-6 or BMP-7. These results contrast with a previous study showing that BMP-4 is able to promote Smad 1 nuclear translocation in CGCs cultures (Angley et al., 2003). Thus, the key question was to know the mechanism involved on the neuroprotective effect mediated by BMP-6 in CGCs.

A great insight in the molecular mechanisms that control CGCs survival has aroused during the last decade from studies using cultured CGCs. Nowadays, it is well accepted that the PI3 kinase-Akt/PKB (D'Mello et al., 1997; Datta et al., 1997; Dudek, 1997 219 /id), MEK/ERK (Borodinsky et al., 2002; Lafon-Cazal et al., 2002; Xifro et al., 2005) and the c-Jun N-terminal kinases (JNKs) pathways are directly involved (Coffey et al., 2002; Watson et al., 1998; Xifro et al., 2006). Our results indicate that neither PI3 kinase nor JNKs pathways are involved in neuroprotective effect of BMP-6 since no changes in the activation of both pathways were observed

in CGCs in K5 conditions in the presence or absence of BMP-6. Several studies suggest that an early increase in ERK activation is involved in the neuroprotection provided by extracellular factors to CGCs cultured in K5 (Bonni et al., 1999). On the other hand, some reports also suggest that delayed activation of ERK is associated to CGCs death in K5 (Subramaniam et al., 2003). Thus, neuroprotection in K5 conditions would probably need an early positive and a delayed negative regulation of the ERK pathway. This has been already described for IGF-1 mediated neuroprotection (Subramaniam et al., 2005). Accordingly, we have observed that addition of BMP-6 induced an early activation of MEK/ERK determined by ERK phosphorylation. Although it remains to be studied whether BMP-6 treatment would block the delayed K5-mediated increase in ERK phosphorylation, the fact that pharmacological inhibition of MEK was able to block the BMP-6 dependent decrease in apoptotic cell number and caspase activity, clearly indicates that BMP-6 protects CGCs from potassium- and serum deprivation-induced apoptosis by a MEK/ERK signalling-dependent mechanism.

However, the link between BMP-6 and MEK/ERK activation remains unclear. Several reports have suggested that activation of the monomeric G-proteins Ras and Rap-1 are involved in MEK/ERK pathway activation (Gao et al., 2006; Je et al., 2006; Marampon et al., 2008). Recently, it has been described that several pro-survival factors activate MEK/ERK in a Ras and/or Rap-1 dependent manner in cultured CGCs (Obara et al., 2007). A pioneer study (Yue et al., 1999) suggested that BMPs activation of MEK/ERK in epithelial cells was mediated by Ras. In this context we have observed that both BMP-6 and BMP-7 are able to activate Ras. By contrast, BMP-6, but not BMP-7, is able to activate Rap-1. The differential activation of Rap-1 by BMP-6 and BMP-7 could explain why BMP-6, but not BMP-7, is able to promote the activation of the MEK/ERK pathway. Our data support a previous report suggesting a selective activation of MEK/ERK by Rap-1 in PC12 cells (York et al., 1998).

One of the main targets of the MEK/ERK pathway is CREB. CREB activation has been implicated in synaptic plasticity, learning and memory and cell survival (Carlezon, Jr. et al., 2005; Lonze and Ginty, 2002). Moreover, CREB activation has been reported to be a necessary step in CGCs survival and differentiation during the postnatal development (Monti et al., 2002; Zhong et al., 2004). In this context, we have observed that BMP-6, but not BMP-7, activates CREB via the MEK/ERK

pathway and this activation is required for the decrease in caspase-3 activity. Several mechanisms could be involved in caspase-3 inhibition. Bcl-2 is an anti-apoptotic protein positively regulated by CREB at the transcriptional level (Xiang et al., 2006). It has been also reported that Bcl-2 has a key role preventing cell death in cultured CGCs (Tanabe et al., 1997). Accordingly, we describe that inhibition of caspase-3 activation by BMP-6 is mediated by MEK/ERK/CREB-dependent increase of Bcl-2 levels.

In summary, our results demonstrate that BMP-6 protects CGCs from apoptosis induced by potassium deprivation of excitatory stimuli by a non-canonical pathway involving MEK/ERK/CREB signalling. Activation of this pathway leads to an increase in the anti-apoptotic protein Bcl-2 and inhibition of caspase-3 activation. Our data suggest that BMPs, apart from the previously reported actions on CGCs progenitor cells generation and differentiation, has a third biological role as promoters of CGCs survival. Moreover, the failure of another BMP subfamily member as BMP-7 to promote survival of CGCs, indicates the functional diversity and complexity of closed-related BMPs in the CNS.

Acknowledgments: This work was supported by grants from Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2005-05106), Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2008-01904 and RENEVAS) and CIBERNED (CB06/05/0042) to J.R.A. B.B was a recipient of a pre-doctoral fellowship from the Universitat Autònoma de Barcelona N.B was recipient of a predoctoral fellowship from the Gobierno Vasco. R.F was a recipient of a predoctoral fellowship from the Generalitat de Catalunya.

REFERENCES

- Alder J, Lee KJ, Jessell TM, Hatten ME. (1999). Generation of cerebellar granule neurons in vivo by transplantation of BMP-treated neural progenitor cells. *Nat Neurosci.* 2:535-540.
- Angley C, Kumar M, Dinsio KJ, Hall AK, Siegel RE. (2003). Signaling by bone morphogenetic proteins and Smad1 modulates the postnatal differentiation of cerebellar cells. *J. Neurosci.* 23:260-268.
- Armstrong RC, Aja TJ, Hoang KD, Gaur S, Bai X, Alnemri ES, Litwack G, Karanewsky DS, Fritz LC, Tomaselli KJ. (1997). Activation of the CED3/ICE-related protease CPP32 in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis but not necrosis. *J. Neurosci.* 17:553-562.

- Aruga J, Yokota N, Hashimoto M, Furuichi T, Fukuda M, Mikoshiba K. (1994). A novel zinc finger protein, zic, is involved in neurogenesis, especially in the cell lineage of cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* 63:1880-1890.
- Balazs R, Gallo V, Kingsbury A. (1988). Effect of depolarization on the maturation of cerebellar granule cells in culture. *Brain Res.* 468:269-276.
- Ben Arie N, Bellen HJ, Armstrong DL, McCall AE, Gordadze PR, Guo Q, Matzuk MM, Zoghbi HY. (1997). Math1 is essential for genesis of cerebellar granule neurons. *Nature* 390:169-172.
- Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME. (1999). Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* 286:1358-1362.
- Borodinsky LN, Coso OA, Fisman ML. (2002). Contribution of Ca²⁺ calmodulin-dependent protein kinase II and mitogen-activated protein kinase kinase to neural activity-induced neurite outgrowth and survival of cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* 80:1062-1070.
- Burgoyne RD, Cambray-Deakin MA. (1988). The cellular neurobiology of neuronal development: the cerebellar granule cell. *Brain Res.* 472:77-101.
- Carlezon WA, Jr., Duman RS, Nestler EJ. (2005). The many faces of CREB. *Trends Neurosci.* 28:436-445.
- Chang CF, Lin SZ, Chiang YH, Morales M, Chou J, Lein P, Chen HL, Hoffer BJ, Wang Y. (2003). Intravenous administration of bone morphogenetic protein-7 after ischemia improves motor function in stroke rats. *Stroke* 34:558-564.
- Coffey ET, Smiciene G, Hongisto V, Cao J, Brecht S, Herdegen T, Courtney MJ. (2002). c-Jun N-terminal protein kinase (JNK) 2/3 is specifically activated by stress, mediating c-Jun activation, in the presence of constitutive JNK1 activity in cerebellar neurons. *J Neurosci* 22:4335-4345.
- Cox S, Harvey BK, Sanchez JF, Wang JY, Wang Y. (2004). Mediation of BMP7 neuroprotection by MAPK and PKC IN rat primary cortical cultures. *Brain Res.* 1010:55-61.
- Cullen BR. (1987). Use of eukaryotic expression technology in the functional analysis of cloned genes. *Methods Enzymol.* 152:684-704.
- D'Mello SR, Borodezt K, Soltoff SP. (1997). Insulin-like growth factor and potassium depolarization maintain neuronal survival by distinct pathways: possible involvement of PI 3-kinase in IGF-1 signaling. *J. Neurosci.* 17:1548-1560.
- D'Mello SR, Galli C, Ciotti T, Calissano P. (1993). Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90:10989-10993.

Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91:231-241.

Gallo V, Kingsbury A, Balázs R, Jorgensen OS. (1987). The Role of Depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J Neurosci* 7:2203-2213.

Gao L, Feng Y, Bowers R, Becker-Hapak M, Gardner J, Council L, Linette G, Zhao H, Cornelius LA. (2006). Ras-associated protein-1 regulates extracellular signal-regulated kinase activation and migration in melanoma cells: two processes important to melanoma tumorigenesis and metastasis. *Cancer Res.* 66:7880-7888.

Ghosh-Choudhury N, Abboud SL, Nishimura R, Celeste A, Mahimainathan L, Choudhury GG. (2002). Requirement of BMP-2-induced phosphatidylinositol 3-kinase and Akt serine/threonine kinase in osteoblast differentiation and Smad-dependent BMP-2 gene transcription. *J. Biol. Chem.* 277:33361-33368.

Gratacos E, Gavalda N, Alberch J. (2002). Bone morphogenetic protein-6 is a neurotrophic factor for calbindin-positive striatal neurons. *J. Neurosci. Res.* 70:638-644.

Hallahan AR, Pritchard JI, Chandraratna RA, Ellenbogen RG, Geyer JR, Overland RP, Strand AD, Tapscott SJ, Olson JM. (2003). BMP-2 mediates retinoid-induced apoptosis in medulloblastoma cells through a paracrine effect. *Nat. Med.* 9:1033-1038.

Han MH, Bolanos CA, Green TA, Olson VG, Neve RL, Liu RJ, Aghajanian GK, Nestler EJ. (2006). Role of cAMP response element-binding protein in the rat locus ceruleus: regulation of neuronal activity and opiate withdrawal behaviors. *J Neurosci.* 26:4624-4629.

Harris C, Maroney AC, Johnson EM, Jr. (2002). Identification of JNK-dependent and -independent components of cerebellar granule neuron apoptosis. *J Neurochem.* 83:992-1001.

Harvey BK, Mark A, Chou J, Chen GJ, Hoffer BJ, Wang Y. (2004). Neurotrophic effects of bone morphogenetic protein-7 in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 1022:88-95.

Iantosca MR, McPherson CE, Ho SY, Maxwell GD. (1999). Bone morphogenetic proteins-2 and -4 attenuate apoptosis in a cerebellar primitive neuroectodermal tumor cell line. *J Neurosci. Res.* 56:248-258.

Izumi M, Fujio Y, Kunisada K, Negoro S, Tone E, Funamoto M, Osugi T, Oshima Y, Nakaoka Y, Kishimoto T, Yamauchi-Takahara K, Hirota H. (2001). Bone Morphogenetic Protein-2 Inhibits Serum Deprivation-induced Apoptosis of Neonatal Cardiac Myocytes through Activation of the Smad1 Pathway. *J. Biol. Chem.* 276:31133-31141.

Je HS, Yang F, Zhou J, Lu B. (2006). Neurotrophin 3 induces structural and functional modification of synapses through distinct molecular mechanisms. *J. Cell Biol.* 175:1029-1042.

- Jia Y, Zhou J, Tai Y, Wang Y. (2007). TRPC channels promote cerebellar granule neuron survival. *Nat. Neurosci.*
- Jordan J, Bottner M, Schluesener HJ, Unsicker K, Kriegstein K. (1997). Bone Morphogenetic Proteins: Neurotrophic Roles for Midbrain Dopaminergic Neurons and Implications of Astroglial Cells. *Eur. J. Neurosci.* 9:1699-1710.
- Lafon-Cazal M, Perez V, Bockaert J, Marin P. (2002). Akt mediates the anti-apoptotic effect of NMDA but not that induced by potassium depolarization in cultured cerebellar granule cells. *Eur. J. Neurosci.* 16:575-583.
- Lemonnier J, Ghayor C, Guicheux J, Caverzasio J. (2004). Protein kinase C-independent activation of protein kinase D is involved in BMP-2-induced activation of stress mitogen-activated protein kinases JNK and p38 and osteoblastic cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 279:259-264.
- Lonze BE, Ginty DD. (2002). Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35:605-623.
- Marampon F, Casimiro MC, Fu M, Powell MJ, Popov VM, Lindsay J, Zani BM, Ciccarelli C, Watanabe G, Lee RJ, Pestell RG. (2008). Nerve Growth Factor Regulation of Cyclin D1 in PC12 Cells through a p21RAS ERK-Pathway Requires Cooperative Interactions between Sp1 and NF- κ B. *Mol. Biol. Cell.*
- Massague J. (1998). TGF- β signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 67:753-791.
- Miyazono K. (1999). Signal transduction by bone morphogenetic protein receptors: functional roles of Smad proteins. *Bone* 25:91-93.
- Miyazono K, Maeda S, Imamura T. (2005). BMP receptor signaling: Transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 16:251-263.
- Monti B, Marri L, Contestabile A. (2002). NMDA receptor-dependent CREB activation in survival of cerebellar granule cells during in vivo and in vitro development. *Eur. J. Neurosci.* 16:1490-1498.
- Moran J, Itoh T, Reddy UR, Chen M, Alnemri ES, Pleasure D. (1999). Caspase-3 expression by cerebellar granule neurons is regulated by calcium and cyclic AMP. *J. Neurochem.* 73:568-577.
- Naldini L, Blomer U, Gage FH, Trono D, Verma IM. (1996). Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93:11382-11388.
- Nonner D, Barrett EF, Kaplan P, Barrett JN. (2001). Bone morphogenetic proteins (BMP6 and BMP7) enhance the protective effect of neurotrophins on cultured septal cholinergic neurons during hypoglycemia. *J. Neurochem.* 77:691-699.

Obara Y, Horgan AM, Stork PJ. (2007). The requirement of Ras and Rap1 for the activation of ERKs by cAMP, PACAP, and KCl in cerebellar granule cells. *J Neurochem.* 101:470-482.

Qin L, Wine-Lee L, Ahn KJ, Crenshaw EB, III. (2006). Genetic Analyses Demonstrate That Bone Morphogenetic Protein Signaling Is Required for Embryonic Cerebellar Development. *J. Neurosci.* 26:1896-1905.

Rios I, varez-Rodriguez R, Marti E, Pons S. (2004). Bmp2 antagonizes sonic hedgehog-mediated proliferation of cerebellar granule neurones through Smad5 signalling. *Development* 131:3159-3168.

Ryder EF, Cepko CL. (1994). Migration patterns of clonally related granule cells and their progenitors in the developing chick cerebellum. *Neuron* 12:1011-1028.

Subramaniam S, Shahani N, Strelau J, Laliberte C, Brandt R, Kaplan D, Unsicker K. (2005). Insulin-like growth factor 1 inhibits extracellular signal-regulated kinase to promote neuronal survival via the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase A/c-Raf pathway. *J. Neurosci.* 25:2838-2852.

Subramaniam S, Strelau J, Unsicker K. (2003). Growth Differentiation Factor-15 Prevents Low Potassium-induced Cell Death of Cerebellar Granule Neurons by Differential Regulation of Akt and ERK Pathways. *J. Biol. Chem.* 278:8904-8912.

Tanabe H, Eguchi Y, Kamada S, Martinou JC, Tsujimoto Y. (1997). Susceptibility of cerebellar granule neurons derived from Bcl-2-deficient and transgenic mice to cell death. *Eur. J Neurosci.* 9:848-856.

ten Dijke P, Yamashita H, Ichijo H, Franzen P, Laiho M, Miyazono K, Heldin CH. (1994). Characterization of type I receptors for transforming growth factor-beta and activin. *Science* 264:101-104.

Wang Y, Chang CF, Morales M, Chou J, Chen HL, Chiang YH, Lin SZ, Cadet JL, Deng X, Wang JY, Chen SY, Kaplan PL, Hoffer BJ. (2001). Bone Morphogenetic Protein-6 Reduces Ischemia-Induced Brain Damage in Rats. *Stroke* 32:2170-2178.

Watson A, Eilers A, Lallemand D, Kyriakis J, Rubin LL, Ham J. (1998). Phosphorylation of c-Jun is necessary for apoptosis induced by survival signal withdrawal in cerebellar granule neurons. *J Neurosci.* 18:751-762.

Wood KA, Dipasquale B, Youle RJ. (1993). In situ labeling of granule cells for apoptosis-associated DNA fragmentation reveals different mechanisms of cell loss in developing cerebellum. *Neuron* 11:621-632.

Xiang H, Wang J, Boxer LM. (2006). Role of the cyclic AMP response element in the bcl-2 promoter in the regulation of endogenous Bcl-2 expression and apoptosis in murine B cells. *Mol. Cell Biol.* 26:8599-8606.

Xifro X, Falluel-Morel A, Miñano A, Aubert N, Fado R, Malagelada C, Vaudry D, Vaudry H, Gonzalez B, Rodriguez-Alvarez J. (2006). N-Methyl-DD-aspartate blocks activation of JNK and mitochondrial apoptotic pathway induced by potassium deprivation in cerebellar granule cells. *J. Biol. Chem.* 281:6801-6812.

Xifro X, Malagelada C, Miñano A, Rodriguez-Alvarez J. (2005). Brief exposure to NMDA produces long-term protection of cerebellar granule cells from apoptosis. *Eur. J. Neurosci.* 21:827-840.

Yabe T, Samuels I, Schwartz JP. (2002). Bone morphogenetic proteins BMP-6 and BMP-7 have differential effects on survival and neurite outgrowth of cerebellar granule cell neurons. *J. Neurosci. Res.* 68:161-168.

York RD, Yao H, Dillon T, Ellig CL, Eckert SP, McCleskey EW, Stork PJS. (1998). Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature* 392:622-626.

Yue J, Frey RS, Mulder KM. (1999). Cross-talk between the Smad1 and Ras/MEK signaling pathways for TGFbeta. *Oncogene* 18:2033-2037.

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

Zhu D, Wu X, Strauss KI, Lipsky RH, Qureshi Z, Terhakopian A, Novelli A, Banaudha K, Marini AM. (2005). N-methyl-D-aspartate and TrkB receptors protect neurons against glutamate excitotoxicity through an extracellular signal-regulated kinase pathway. *J. Neurosci. Res.* 80:104-113.

Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L, Trono D. (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J. Virol.* 72:9873-9880.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. BMP-6 protects against low potassium induced apoptosis in CGCs.

Cerebellar granule cells cultures (6DIV) were placed in serum-free medium containing 25 mM (K25) or 5 mM (K5) KCl and when indicated, BMP-6 (100ng/ml) or BMP-7 (30ng/ml). Chromatin condensation was assayed 24 h later by staining with Hoechst 33258. (A) Condensed or fragmented nuclei were counted and represented as percentage vs. total nuclei. Results are the mean \pm SEM from three independent experiments performed in triplicate. ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$ vs. K5. (B) Fluorescence photomicrographs of representative fields from 7DIV cultures treated as indicated. Yellow arrows show condensed nuclei.

Figure 2. BMP-6 inhibits K5-induced caspase-3 activation.

Cerebellar granule neurons (6DIV) were placed in serum-free medium containing 25 mM (K25) or 5 mM (K5) KCl and when indicated with BMP-6 (100ng/ml) or BMP-7 (30ng/ml). Activation of caspase-3 was assessed 10 h later by immunocytochemistry against its active fragment (A and B) and by an activity assay (C). Both approaches were performed in three independent experiments by triplicate. ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$ vs. K5.

Figure 3. BMP associated Smads are localized in the cytoplasm as well as in the nucleus of cultured CGCs.

Cerebellar granule cells cultures (6DIV) were placed in serum-free medium containing 25mM (K25) or 5mM (K5) KCl and BMP-6 (100ng/ml) or BMP-7 (30ng/ml). (A) After 1 h, cells were subjected to immunocytochemistry for Smad 1. Representative microphotographs of confocal microscope images are shown for each treatment. Hoechst staining was used to visualize cell nuclei (merge). Yellow and red arrows indicate cytoplasmic and nuclear localization, respectively. (B) Representative Western blots of phosphorylated and total Smad 1 in cytosolic (C) and nuclear (N) fractions. Histone H1 and GAPDH were used to monitor the purity of nuclear and cytosolic fractions, respectively. (C) Ratio between phosphorylated and total Smad 1 in the nuclear fraction. Results are the mean \pm SEM of three independent experiments. No significant differences were observed.

Figure 4. BMP-6 treatment induces ERK phosphorylation.

Cerebellar granule neurons (6 DIV) were switched to a serum free medium with low potassium (K5) and/or BMP-6 (100ng/ml). Cell lysates were obtained at the indicated

times after treatment and subjected to Western blot analysis with (A) phospho-Akt and Akt, (B) phospho-JNK and JNK and (C) phospho-ERK and ERK antibodies. Results are the mean \pm SEM of four independent experiments. Significant increase in ERK phosphorylation induced by BMP-6 treatment was observed at short times (5' and 15') and at 8 h. ** $p < 0.01$; + $p < 0.05$; ### $p < 0.01$ vs. K5 at 5, 15 min and 8 h, respectively.

Figure 5. ERK pathway activation has a key role in BMP-6 neuroprotection.

At 6 DIV, CGCs cultures were placed in a serum-free medium and treated with high (K25) or low (K5) potassium with or without BMP-6. The MEK inhibitor PD98059 (50 μ M, PD) was added 1 h before the treatment. (A-B) Chromatin condensation was assayed 24h later by staining with Hoechst 33258. Condensed nuclei were counted and represented as percentage vs. total nuclei. Results are the mean \pm SEM from three independent experiments performed in triplicate. (C-D) The presence of the active form of caspase-3 was monitored 10 h after treatment by immunocytochemistry (see Material & Methods). Quantification of positive immunostained cells was performed by triplicate in four experiments. Results are the mean \pm SEM. (E) Caspase activity was determined by a fluorimetric method after 10 h (see Material & Methods). Results are the mean \pm SEM from three independent experiments performed in duplicate. (F) Cell lysates of indicated treatments were subjected to a pull down assay with GST-Ral-GDS. Rap1 was detected by Western blotting. Two additional assays gave similar results. ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$ vs. K5; ^x $p < 0.01$ and ^x $p < 0.05$ vs. BMP-6 + PD.

Figure 6. CREB mediates BMP-6 neuroprotective effect.

Mature CGCs cultures (6DIV) were placed in a serum-free medium and treated with high or low potassium (K25 or K5) with or without BMP-6 and the MEK inhibitor, PD98059 (50 μ M). (A) Phospho-CREB and total CREB levels were assayed by Western blot at 5 min. Results are the mean \pm SEM of four independent experiments. (B) CGCs were treated for 1 h as indicated and nuclear extracts were prepared for EMSA mobility assay with a CRE probe. A representative assay is shown. Two additional assays gave similar results. (C-E) Cells were infected at 4 DIV with HSV-GFP or HSV-MCREBGFP, and treated as described at 6 DIV. A representative Western blot showing the decrease in CREB activation in HSV-MCREBGFP infected CGCs cultures is shown in C. Data represent the mean and SEM (between brackets) from four independent western blots. Representative

microphotographies of NT infected cells are shown in D. Condensed or fragmented nuclei of GFP expressing cells were determined with Hoechst 33258 24 h after treatment. Data represent the percentage of condensed or fragmented nuclei vs. total nuclei in GFP expressing cells (E). Results are the mean \pm SEM from three to five independent experiments performed in duplicate. ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$ vs. K5; + $p < 0.05$ vs. K5 + BMP-6; ### $p < 0.01$ vs. K5 + BMP-6 + HSV-MCREBGFP; \$\$ K25 + HSV-MCREBGFP.

Figure 7. Bcl-2 acts downstream of the MEK/ERK/CREB pathway in the BMP-6 neuroprotective effect.

Cerebellar granule neurons were infected at 4 DIV with HSV-GFP or HSV-MCREBGFP or plated in the presence of lentivirus of Bcl-2 shRNA or scramble shRNA as described in Materials & Methods. At 6 DIV cells were switched to K5 and treated with BMP-6 or/and PD98059 as indicated. Cleaved caspase-3 was assessed by Western blot (A, E) or immunocytochemistry (D) 10 h after the treatment. Bcl-2 levels (B, C) were assessed by Western blot 6 h after the treatment. Condensed or fragmented nuclei of treated cells were determined (F) with Hoechst 33258 24 h after treatment. Data represent the percentage of condensed or fragmented nuclei vs. total nuclei. Data in K5 were considered as 100%. Actin was used as loading control in Western blot determinations. Results are the mean \pm SEM from three to four independent experiments and representative blots are shown in A,B,C and E. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$ vs. K5; ++ $p < 0.01$ and + $p < 0.05$ vs. K5 + BMP-6; \$\$ $p < 0.01$ vs. K5 + BMP-6 HSV-GFP. ### $p < 0.01$ vs. K5 + BMP-6 + shRNA scramble; && $p < 0.01$ vs. K5 + shRNA Bcl-2.

Figure 8. BMPs role during postnatal cerebellum development.

BMPs and their receptors are expressed in embryonic and postnatal cerebellum and have different roles in the generation, migration and differentiation of CGCs. a) BMP-6 and -7 are necessary for the generation of CGCs precursors at E14-E15 in the proliferation zone of the rhombic limb (Alder et al., 1999; Qin et al., 2006). b) In the external granule cell layer (EGL), BMP-2 allows CGCs precursors to enter their differentiation program by antagonizing sonic hedgehog-mediated signaling (Gao et al., 2006). c) CGCs complete their differentiation during the migration from the EGL towards the internal granule cell layer (IGL). It has been reported that BMP-4, which is expressed in the EGL and in migrating CGCs, promotes the differentiation of CGCs in culture. d) Lack of afferent stimulation during CGCs migration towards the

IGL causes apoptotic death. Our results show that BMP-6 promotes CGCs survival in culture, suggesting that it could be an important factor regulating CGCs survival during their migration towards IGL (A). Schematic representation of the mechanisms involved in BMP-6-mediated neuroprotection of K5-mediated CGC apoptosis. BMP-6 activates the MEK/ERK/CREB/Bcl-2 pathway leading to inhibition of caspase activation induced by K5 resulting in protection (reduced) of K5-mediated apoptosis (B).

Supplemental figure 1. CGCs express BMP receptors and Smads *in vitro*.

Cells were plated in high potassium (25mM, K25). RNA and protein were collected at different days *in vitro* (DIV) and subjected to (A) RT-PCR or (B) Western blot for BMP receptor Ia, Ib and II and Smads 1, 4 and 5. 18s RNA (RT-PCR) and tubulin (Western blot) were used as control of internal gene expression and as loading control, respectively.

Supplemental figure 2. BMP associated Smads are localized in the cytoplasm as well as in the nucleus of cultured CGCs.

Cerebellar granule neurons cultures (6DIV) were placed in serum-free medium containing 25mM (K25) or 5mM (K5) KCl and when indicated, BMP-6 (100ng/ml) or BMP-7 (30ng/ml). (A, B) After 1 h, cells were subjected to immunocytochemistry for Smad 5 and 4. Representative microphotographs of confocal microscope are shown for each treatment. Hoechst staining was used to visualize cell nuclei (merge). Yellow and red arrows indicate cytoplasmic and nuclear localization, respectively. (C) Representative Western blot of Smad 4 distribution in cytosolic (c) and nuclear (n) fraction. Histone H1 and GAPDH were used to monitor the purity of nuclear and cytosolic fractions, respectively. No significant differences between treatments were observed when three independent experiments were analyzed.

Supplemental figure 3. BMP-7 is not able to activate the MEK/ERK/CREB pathway as BMP-6 although both induce Ras activation.

Cerebellar granule neurons (6DIV) were placed in serum-free medium containing 25mM (K25) or 5mM (K5) KCl and BMP-7 (30ng/ml) or BMP-6 (100ng/ml). Cells were collected at 1 min to assess phosphorylated and total ERK levels (A) and at 5 min to analyze phosphorylated and total levels of CREB by Western blot (B). After 1 h, cell lysates were obtained as described in Materials & Methods and EMSA assays with the CRE probe was performed (C). Pull down assays of Ras-GTP and Rap1-

GTP were performed at 10 min and 1 min, respectively (D and E). Representative experiments are shown.

Supplemental Figure 4. MEK inhibitor PD98059 blocks BMP-6 mediated ERK activation.

Mature CGCs cultures were switched to a K5 and serum-free medium with or without BMP-6 and the MEK inhibitor. PD98059 (50 μ M) was added 1 h before the treatment with BMP-6. Cells were lysed 1 min after the treatment and subjected to Western blot analysis with antibodies against total and phosphorylated ERK 1/2. Results are presented as mean \pm SEM of three independent experiments. ** $p < 0.01$ vs. K5; ** $p < 0.01$ vs. K5 + BMP-6. A representative Western blot is shown.

Supplemental Figure 5. MEK inhibitor U0126 blocks BMP-6 mediated neuroprotection.

CGCs cultures (6 DIV) were placed in a serum-free medium containing high or low potassium (K25 or K5) and with or without BMP-6. When indicated, the MEK inhibitor U0126 (1 μ M) was added 30 min before medium replacement. (A) Chromatin condensation was assayed by Hoechst 33258 staining at 24h. Condensed nuclei were counted and represented as percentage vs. total nuclei. Results are the mean \pm SEM from three independent experiments performed in triplicate. (B) The presence of the active form of caspase-3 was monitored 10 h after treatment by immunocytochemistry (see Material & Methods). Quantification of positive immunostained cells from three experiments performed in triplicate is shown. Results are the mean \pm SEM. (C) Caspase activity was determined by a fluorimetric method 10 h after treatment (see Material & Methods). Results are the mean \pm SEM from three independent experiments performed in duplicate. *** $p < 0.001$ and * $p < 0.05$ vs. K5; *** $p < 0.001$ and ** $p < 0.01$ vs. BMP6 + U0126.

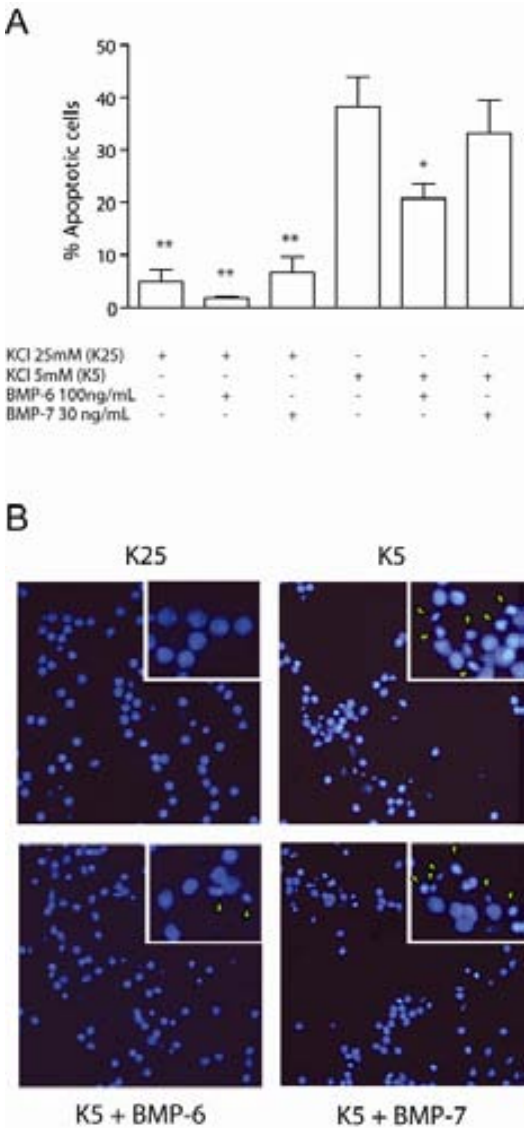


Figure 1. Barneda-Zahonero et al.,

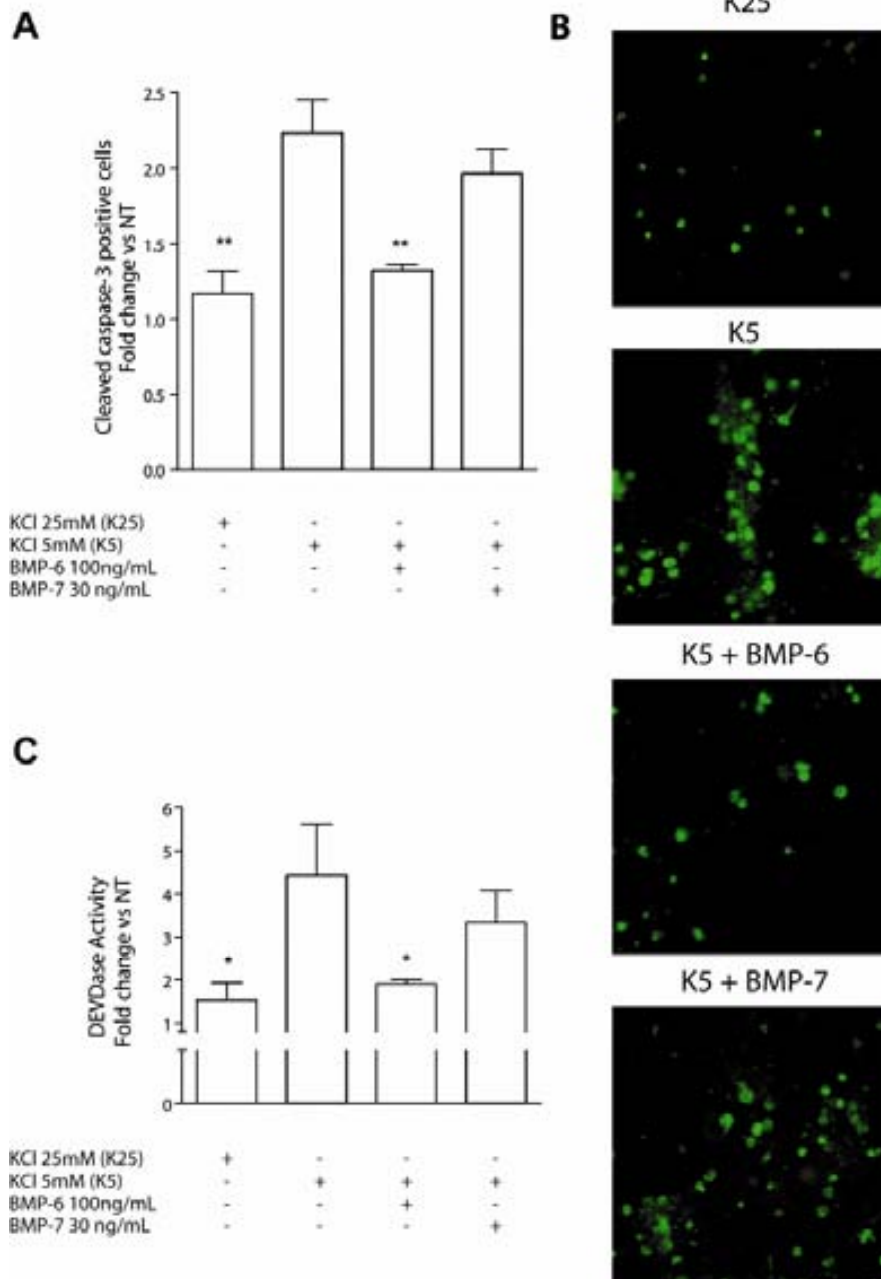


Figure 2. Barneda-Zahonero et al.

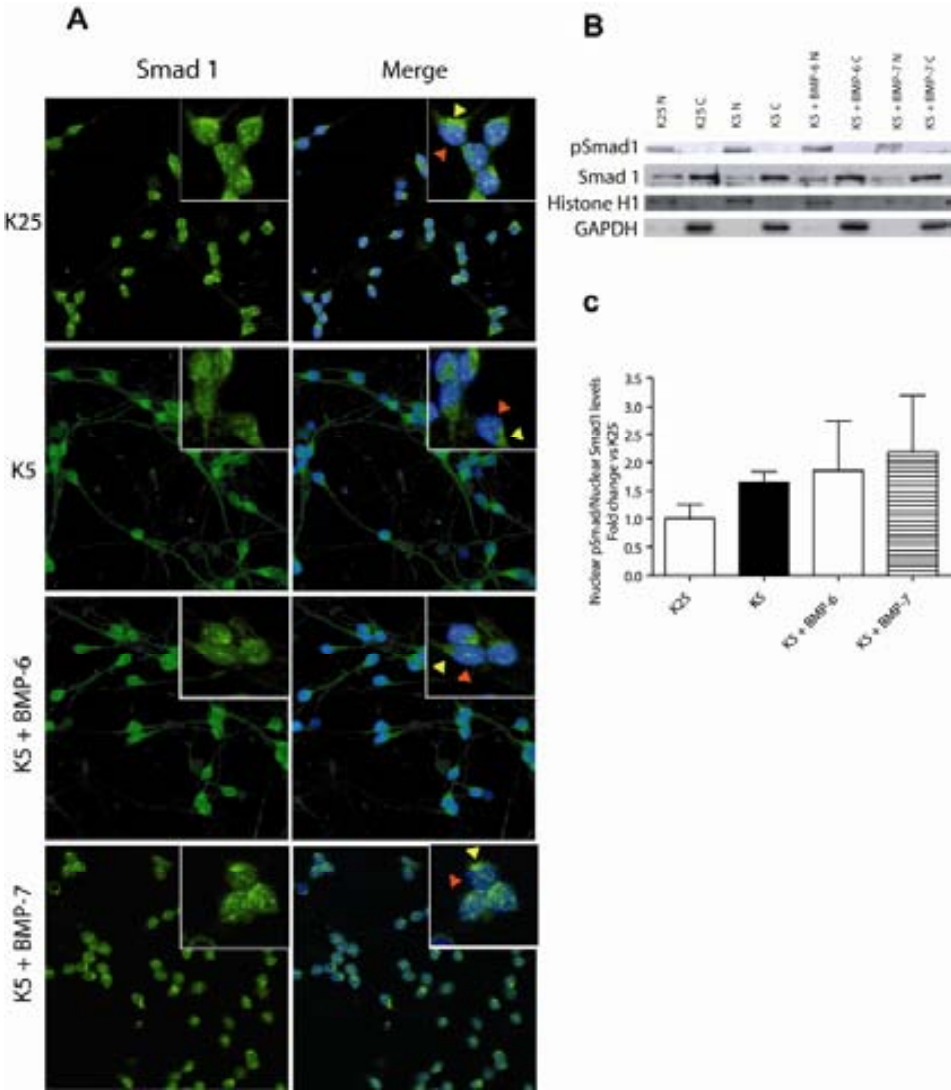


Figure 3. Barneda-Zahonero et al.,

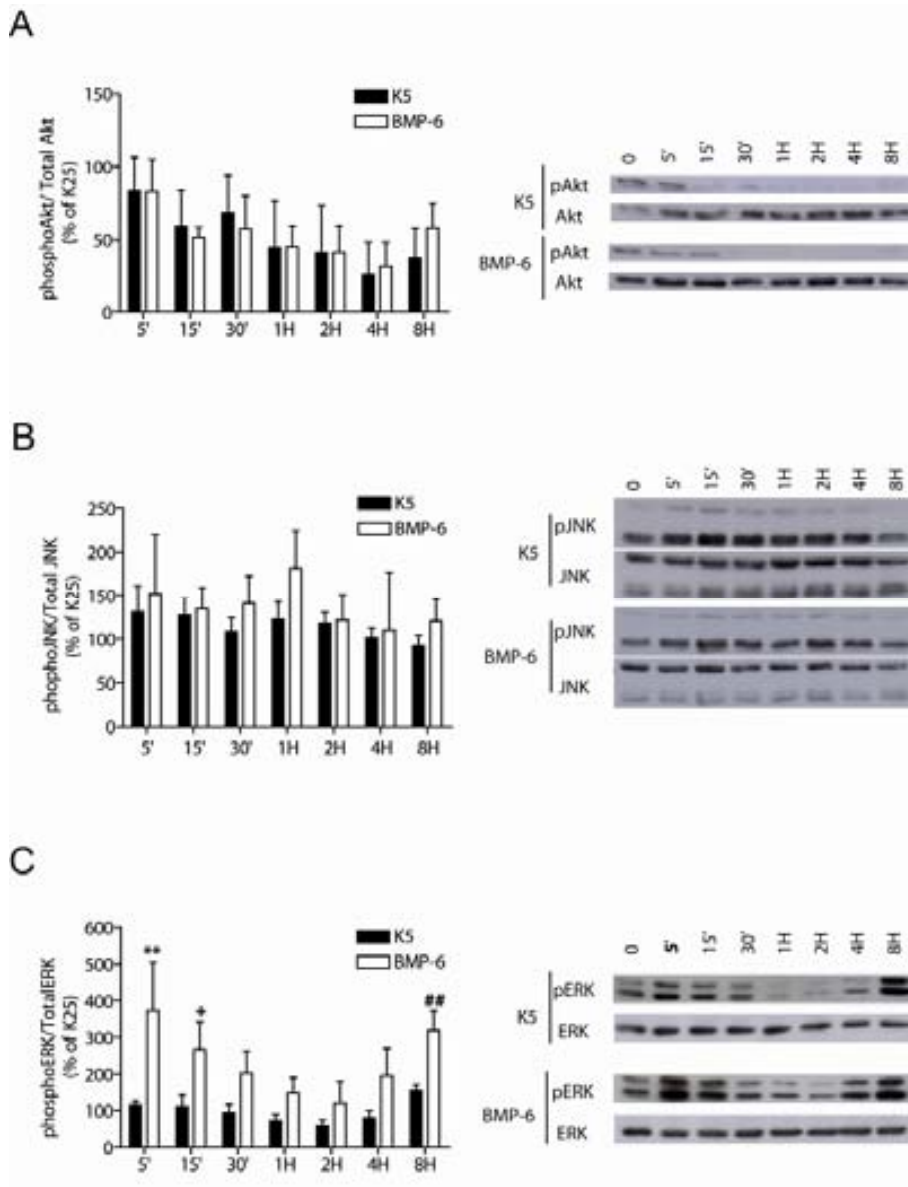


Figure 4. Barneda Zahonero et al.,

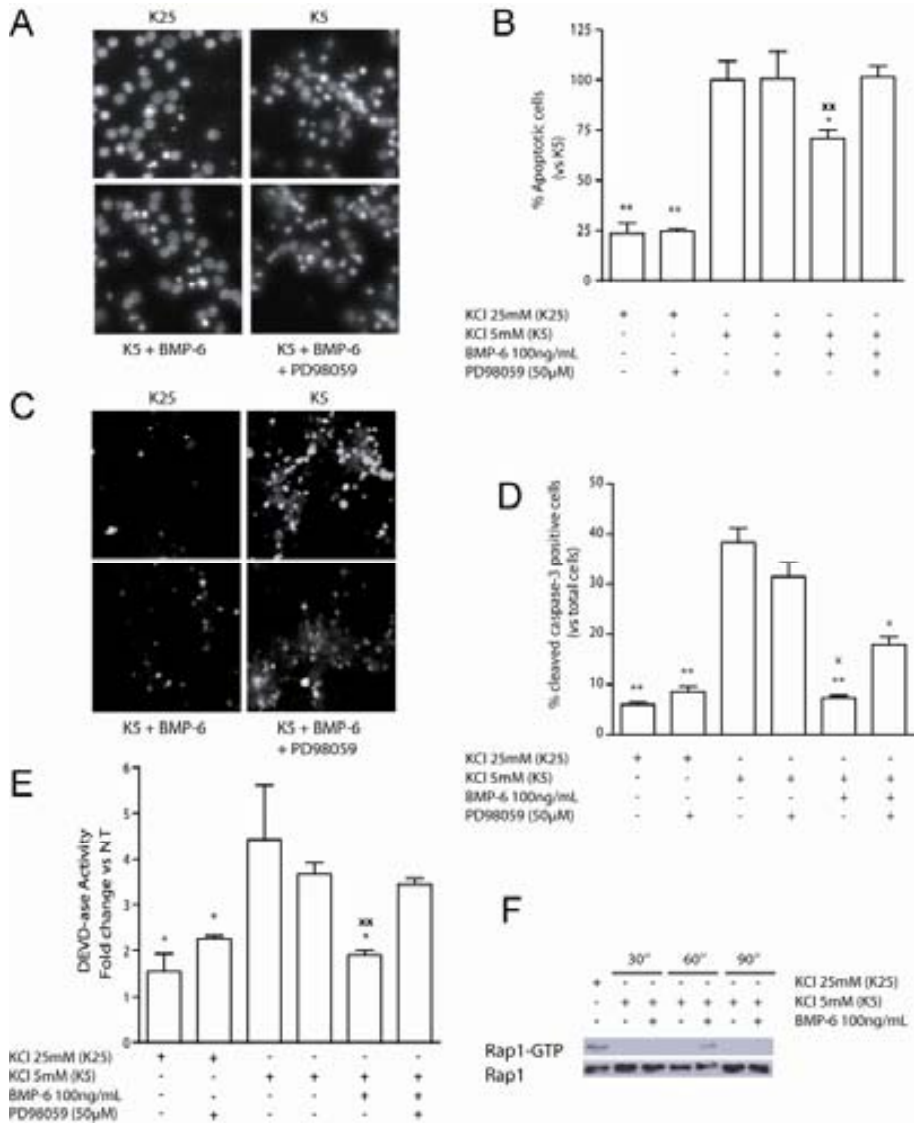


Figure 5. Barneda-Zahonero et al.,

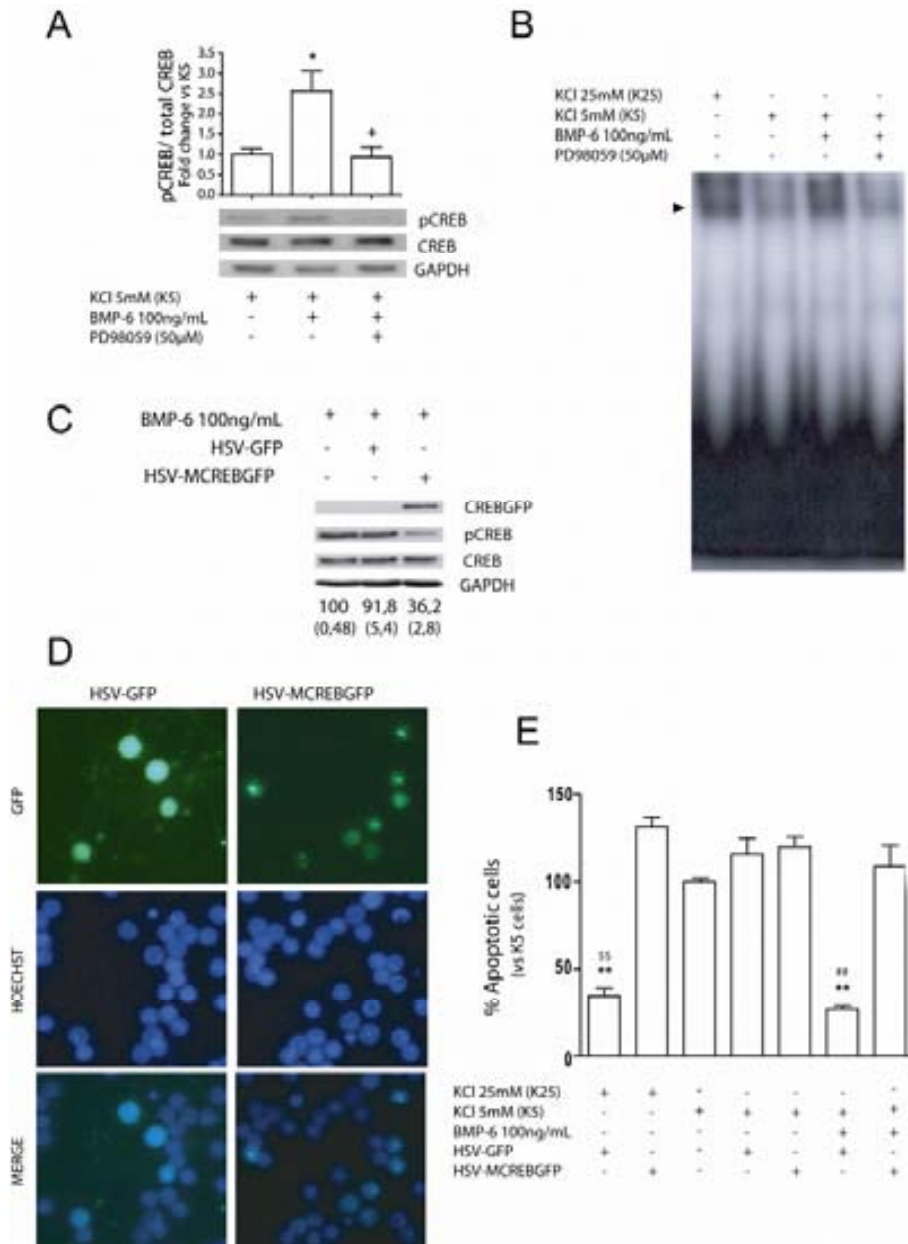


Figure 6. Barneda-Zahonero et al.,

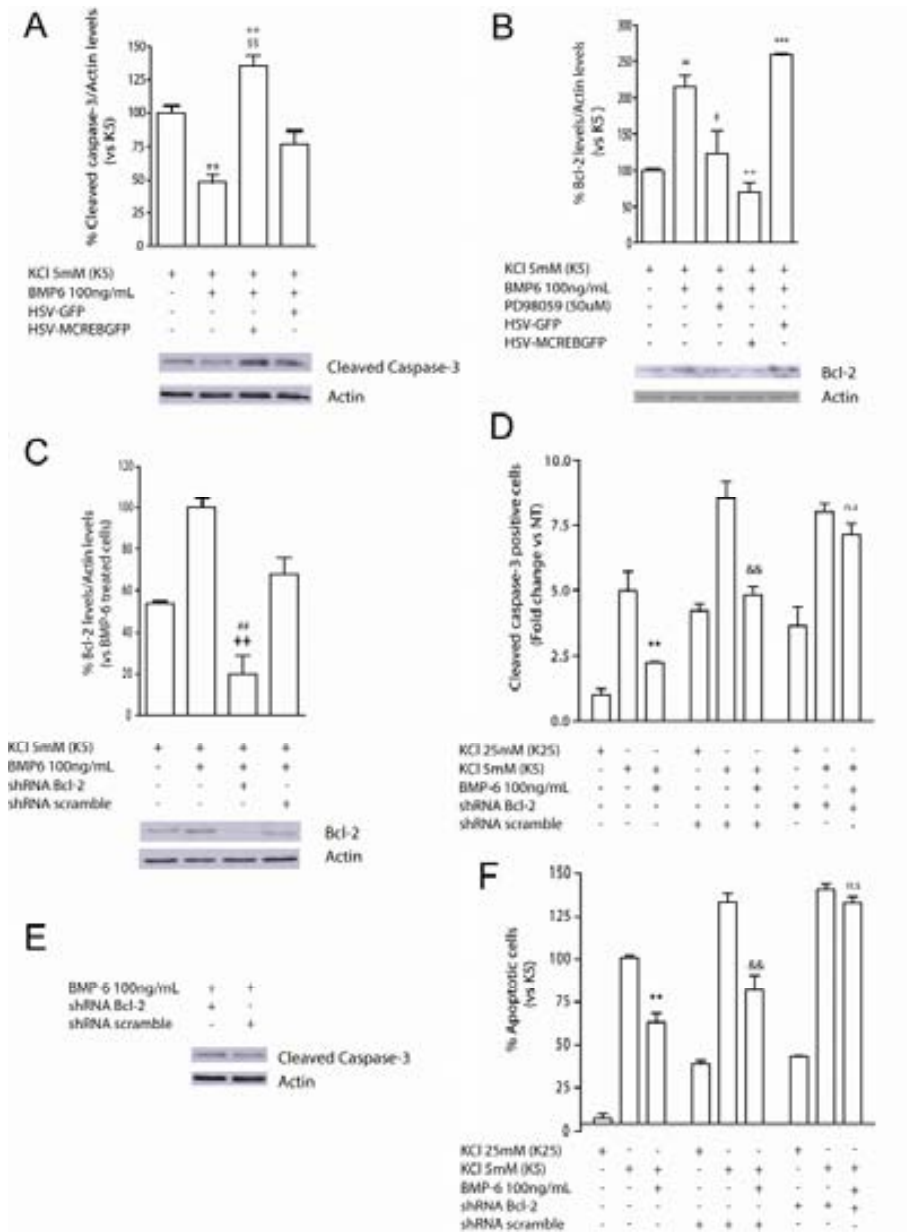


Figure 7. Barneda-Zahonero et al.,

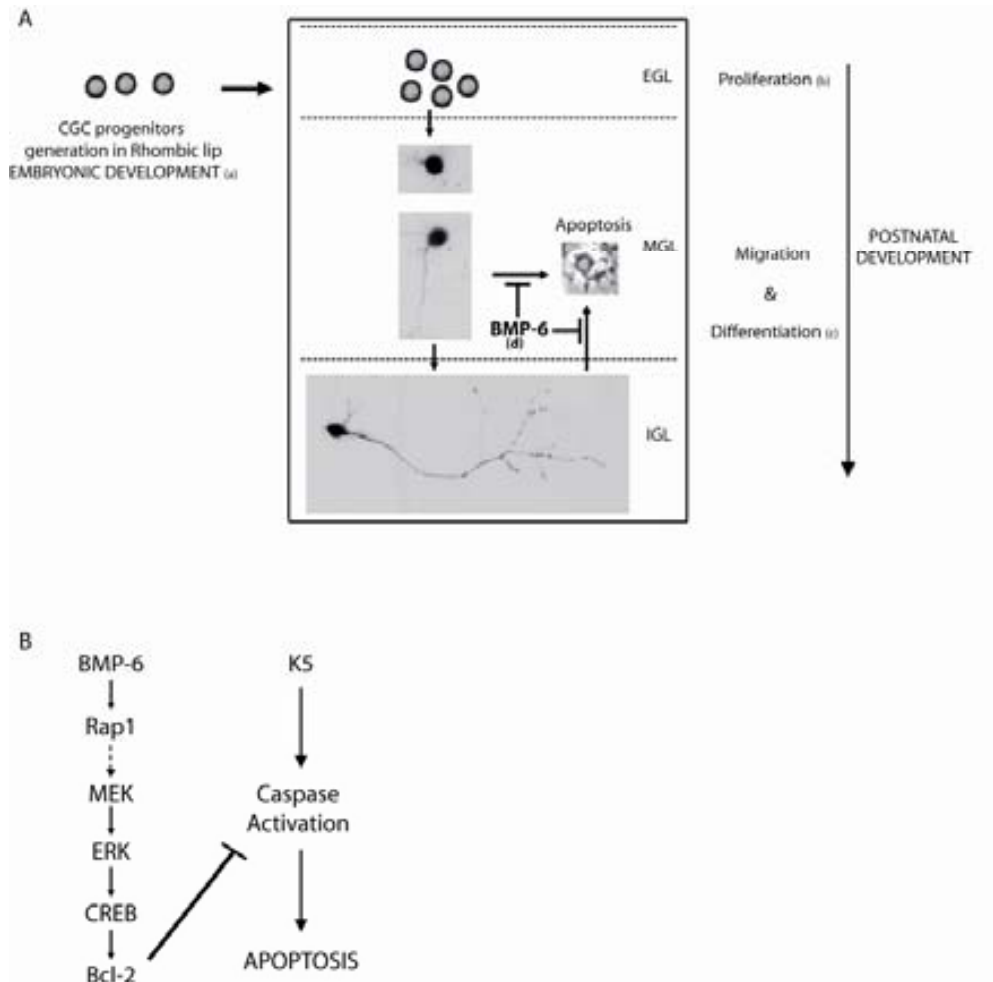
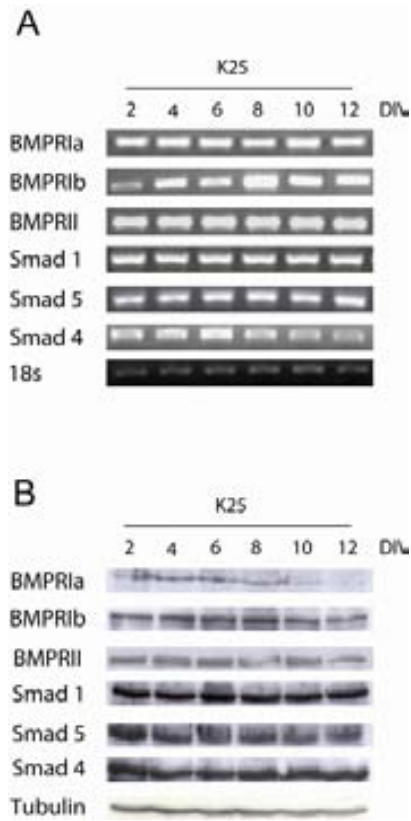
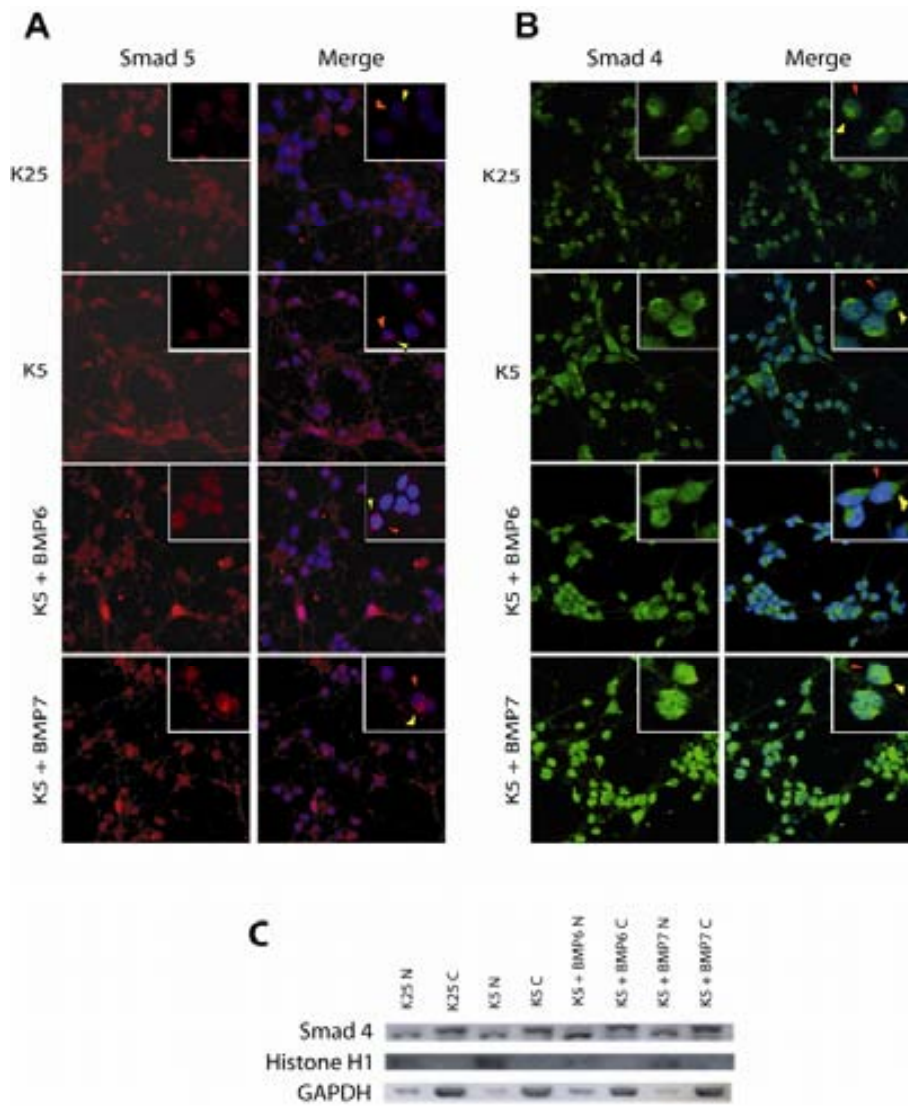


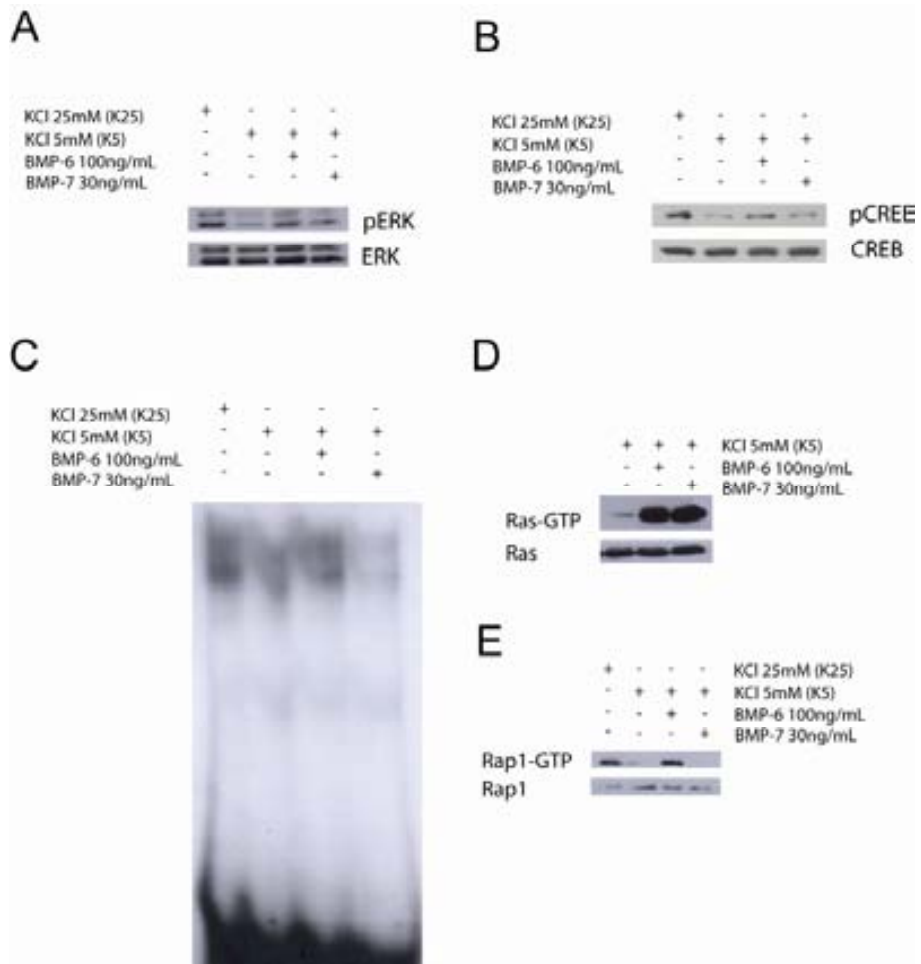
Figure 8. Barneda-Zahonero et al.,

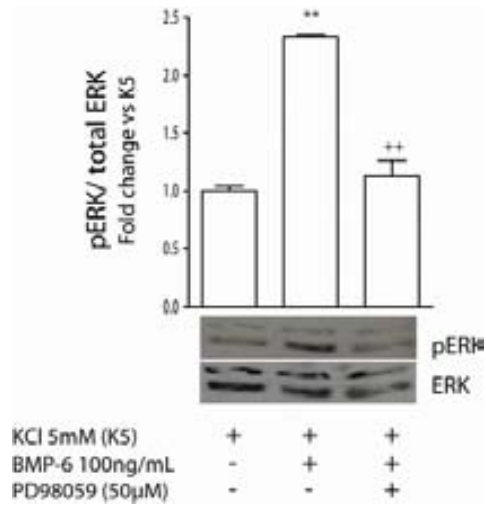


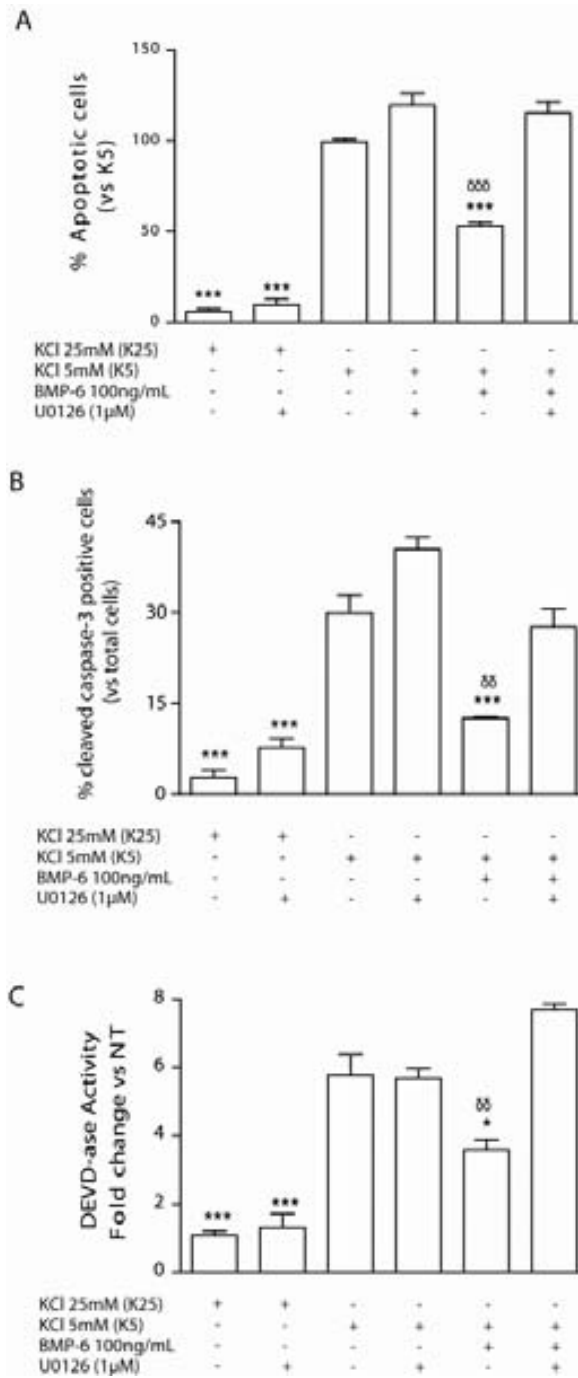
Supplemental figure 1. Barneda-Zahonero et al.,



Supplemental figure 2. Barneda-Zahonero et al.,

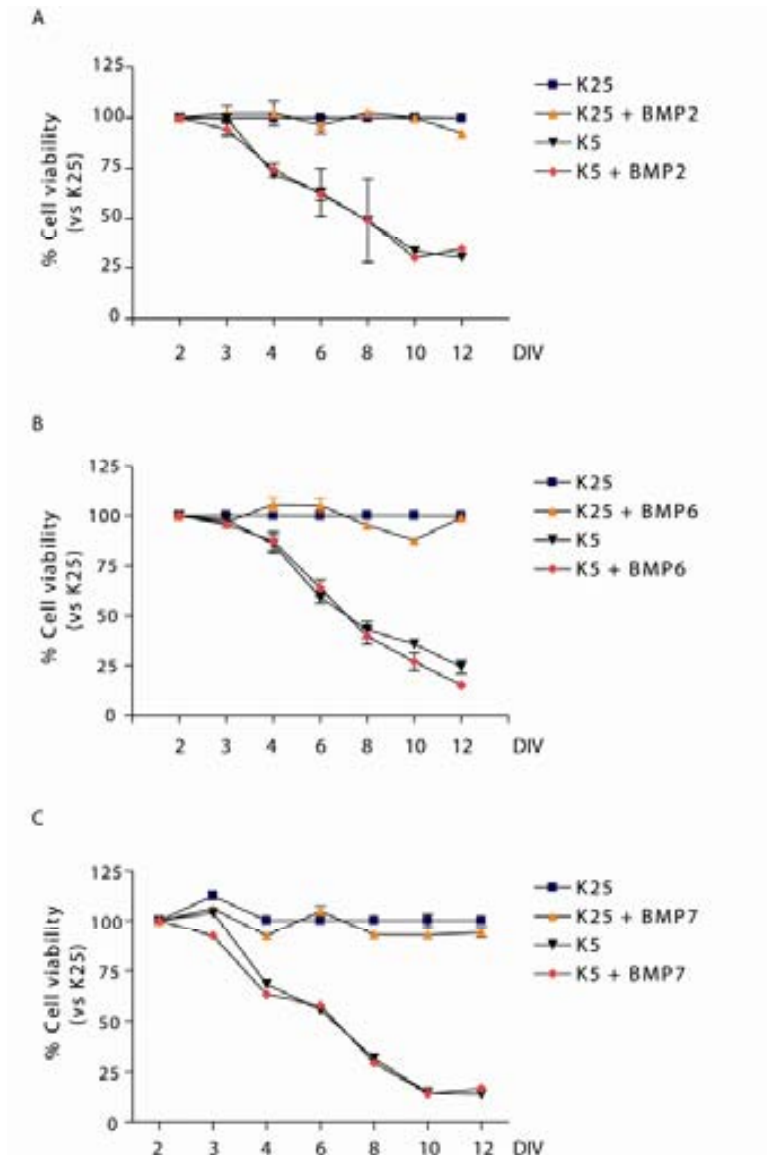




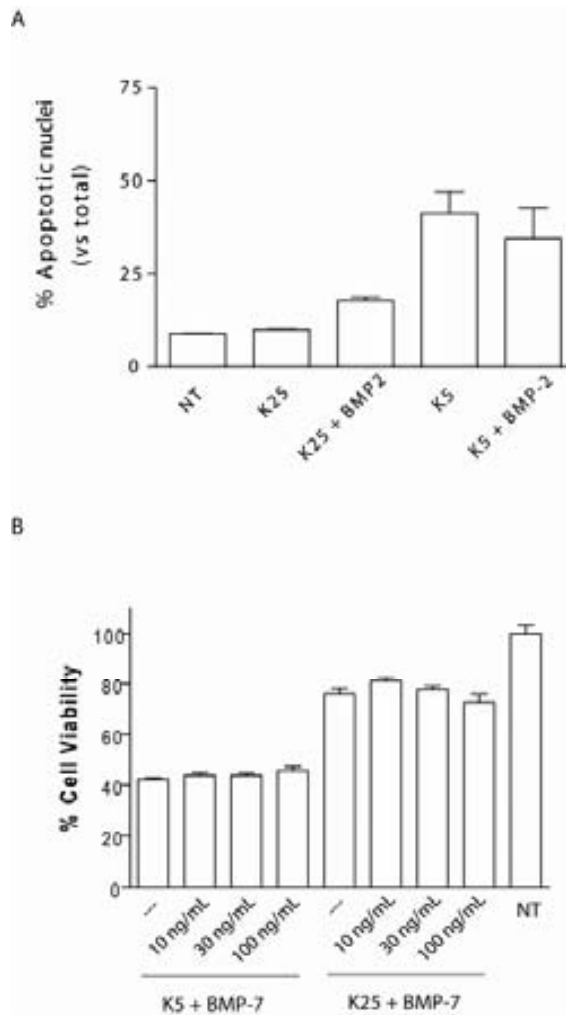


Supplemental figure 5. Barneda-Zahonero et al.,

2- Resultats annexos al Treball 1.



Annex 1 figura 1. BMP-2, 6 i 7 no protegeixen les granulars en estadis immadurs del cultiu. Les CGCs es van sembrar en medi D-MEM amb FBS en 5 o 25 mM de KCl (K5 o K25 respectivament) i es varen tractar amb BMP-2 (100ng/mL; A) o BMP-6 (100ng/mL; B) o BMP-7 (30ng/mL;C). Cada 2 DIV es va assajar la viabilitat cel·lular per MTT. Els resultats es mostren com la mitja \pm SEM de tres o quatre experiments independents.



Annex 1 figura 2. BMP-2 i BMP-7 no rescaten la mort per K5 en neurones madures. Les CGCs van ser sembrades en D-MEM amb K25, a 6 DIV se'ls va canviar el medi per medi sense sèrum amb presència o absència de 25mM de KCl (K25 o K5 respectivament) afegint BMP-2 (100ng/mL) o BMP-7 (a les concentracions indicades). A les 24 hores del tractament es va assajar la viabilitat per recompte de nuclis amb la cromatina fragmentada i/o condensada o pel mètode del MTT. Els resultats mostren la mitja \pm SEM de tres experiments independents.



Annex q figura 3. El tractament amb BMPs no indueix canvis en l'estat de fosforilació de p90rsk. Les CGCs van ser sembrades en 25mM de KCl. A 6 DIV se'ls va canviar el medi per medi sense sèrum amb presència o absència de 25mM de KCl (K25 o K5 respectivament) afegint BMP-6 o BMP-7. 1 minut post-tractament es varen obtenir llisats que es van sotmetre a Western blot amb anticossos per les formes total i fosforilada de p90rsk. Es mostra un experiment representatiu.