

| | |
|-------|--|
| Ac | Adenilato ciclasa |
| ACTH | Hormona adrenocorticotropa |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ADNc | ADN complementario |
| AMPc | Adenosina monofosfato cíclico |
| AP-1 | Proteína activadora-1 |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ARNm | ARN mensajero |
| ARNr | ARN ribosómico |
| ATF-1 | Factor de transcripción activador-1 |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| BDNF | Factor neurotrófico derivado de cerebro |
| BSA | Albúmina bovina |
| CaM | Calmodulina |
| CAT | Cloranfenicol acetil transferasa |
| CaMKs | Calmodulina quinasas |
| CBP | Proteína de unión a CREB |
| CCK | Colecistoquinina |
| cpm | Cuentas por minuto |
| CRE | Elemento de respuesta al AMPc |
| CREB | Proteína de unión al elemento CRE |
| CREM | Elemento modulador de la respuesta al AMPc |
| DAG | Diacilglicerol |
| DEPC | Dietil pirocarbonato |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| EDTA | Ácido etilenaminotetraacético |
| Epac | Exchange proteins activated by cAMP |
| ERK | Quinasa regulada por señales extracelulares |
| E.S | Error estándar |
| FCS | Suero fetal de ternera |
| FGFb | Factor de crecimiento de fibroblastos básico |
| GABA | Ácido gamma-amino butírico |
| GDP | Guanosín difosfato |

| | |
|-----------------|---|
| GEF | Factor intercambiador de nucleótidos de guanina |
| GH | Hormona de crecimiento |
| GnRH | Hormona liberadora de gonadotropinas |
| Grb2 | Proteína de unión a receptor de factor de crecimiento-2 |
| GHRH | Hormona liberadora de hormona de crecimiento |
| GTP | Guanosín trifosfato |
| HEPES | Ácido N-2-hidroxietilpiperazino-N'-2-etanosulfanílico |
| HGF | Factor de crecimiento de hepatocitos |
| HIV | Virus de la inmunodeficiencia humana |
| HS | Suero de caballo |
| IEGs | Genes de expresión temprana |
| IgG | Inmunoglobulina G |
| IP ₃ | Inositol trifosfato |
| IRS | Sustratos del receptor de insulina |
| K ⁺ | Potasio |
| Kb | Kilobases |
| KDa | Kilodaltons |
| KID | Dominio inducible de quinasa |
| LTP | Long term potentiation |
| L-VSCCs | Canales de calcio dependientes de voltaje, tipo L |
| mA | Miliamperios |
| MAP-2 | Proteína asociada a los microtúbulos-2 |
| MAPK | Proteína quinasa activada por mitógenos |
| MAPKK | MAPK quinasa |
| MEK | MAPK/ERK quinasa |
| MOPS | Ácido-3-N-morfolinol propano sulfónico |
| n | Número de elementos de la muestra |
| NGF | Factor de crecimiento nervioso |
| NPY | Neuropéptido Y |
| ns | no significativo |
| NT-3 | Neurotropina-3 |
| NT-4/5 | Neurotropina-4/5 |
| ONPG | o-nitrofenil-β-D-galactopiranósido |

| | |
|-----------------------|--|
| p | probabilidad de error |
| P ^{32α} -CTP | Citosín-trifosfato-fosfato ³² |
| P ^{32α} -UTP | Uridín-trifosfato-fosfato ³² |
| pb | Pares de bases |
| PBS | Tampón fosfato salino |
| PI3K | Fosfatidil inositol-3' quinasa |
| PKA | Proteína quinasa A |
| PKB | Proteína quinasa B |
| PLCγ | Fosfolipasa C |
| Pm | Peso molecular |
| PMSF | Fluoruro de fenil metil sulfonilo |
| PRL | Prolactina |
| PSA | Persulfato amónico |
| PVDF | Polivinil difluoruro |
| Rp-cAMPS | Adenosina-3', 5'-monofósforo-trioato; isómero Rp |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| Rsk | Proteína quinasa ribosomal S6 |
| SDS | Dodecil sulfato sódico |
| Shc | SH ₂ domain-containing protein |
| SNC | Sistema nervioso central |
| SNCa | Suero normal de cabra |
| SNP | Sistema nervioso periférico |
| SRF | Factor de respuesta al suero |
| SS | Somatostatina |
| SS-14 | Tetradecapéptido cíclico somatostatina |
| SS-28 | Forma lineal elongada de SS (28 aminoácidos) |
| SS-IR | Somatostatina inmunoreactiva |
| TAE | Tampón tris-EDTA |
| TEMED | Tetrametil-etilendiamina |
| TLC | Cromatografía en capa fina |
| TRH | Hormona liberadora de tirotropina |
| trkB | Receptor tirosina quinasa tipo B |
| TSH | Hormona tirotrópica |

| | |
|-------|--------------------------------------|
| TTX | Tetrodotoxina |
| U.D.A | Unidades densitométricas arbitrarias |
| VIP | Péptido intestinal vasoactivo |

SUMMARY

Introduction

The regulation of neuronal gene expression by electrical activity is well documented. Numerous studies have shown that membrane depolarization causes not only rapid alteration in protein phosphorylation (Nairn et al., 1985) but also activation of new programs of gene expression in neuronal type cells (Greenberg et al., 1985 and 1986; Morgan et al., 1986; Black et al., 1987; Saffen et al., 1988; Bartel et al., 1989). Genes regulated by depolarization include those that encode neuropeptides and neurotransmitter biosynthetic enzymes (Morris et al., 1988; Van Mnguyen et al., 1990; Lu et al., 1991). Changes in gene expression are important mechanisms by which neurons transform short-lasting electrical events into long-lasting morphological alterations that may be responsible for plasticity related events such as memory formation (Morgan et al., 1991). Ca^{2+} entry into neurons through voltage ion channels serves as the trigger for electrical activity-dependent transcriptional responses (Ghosh et al., 1995). Ca^{2+} influx through L-type voltage-sensitive Ca^{2+} channels (L-VSCCs) stimulates phosphorylation of the transcription factor cAMP response element binding protein (CREB) on Ser-133 leading to an increase in cAMP response element (CRE)-dependent genes.

The neuropeptide somatostatin (SS) is widely distributed throughout the nervous system. Brain SS mRNA is detectable by day seven of embryonic life (Zing et al., 1984). SS depletion during early development has profound effects on the maturation of dendritic morphology (Kungel et al., 1997). cAMP regulates SS biosynthesis in primary cultures of fetal rat hypothalamic cells and in cloned isolates of NIH-T3 fibroblast cells transfected with the rat SS gene (Montminy et al., 1986b). The rat SS gene contains the palindromic sequence, CRE, that is necessary for its transcriptional regulation by cAMP (Montminy et al., 1986a) and is recognized by the specific binding protein, CREB (Montminy et al., 1996). Previous work from our laboratory (Tolón et al., 1994 and 2000) provided evidence that elevated extracellular K^+ concentrations increased the level of SS mRNA. The signalling pathways involved in K^+ -induced SS mRNA levels are still unknown.

Brain derived neurotrophic factor (BDNF) is a neurotrophic factor predominantly expressed in the CNS, in particular in the hippocampus and cerebral cortex (Maisonpierre et al., 1990). This neurotrophic factor has a potent neuronal differentiation activity in vivo (Carnahan et al., 1995; Nawa et al., 1994) and in vitro (Carnahan et al., 1995; Loudes et al., 2000; Nawa et al., 1993; Rage et al., 1999, Villuendas et al., 2001) that increases levels of several neuropeptides such as SS. BDNF is activated by neuronal activity (Tao et al., 1998; Morgan et al., 1986). Neurotrophins have been proposed to be mediators of activity-dependent synaptic plasticity. In neurons, CREB is a major mediator of neuronal neurotrophin response (Finkbeiner et al., 1997).

The aim of this work was to establish which of the signalling pathways involved in the activation of CREB by K^+ mediates K^+ -induced SS mRNA levels. In addition, we investigated whether K^+ -induced depolarization triggers SS gene transcription and the DNA regulatory elements that mediate the transcriptional response. The signalling pathways through which BDNF induces SS gene expression have been studied. To investigate the transcriptional activity of BDNF on the SS gene and to define the DNA regulatory elements that mediate BDNF-induced SS gene transcription, PC12trkB and cultured cerebrocortical cells, transiently transfected with different constructions of SS promoter were used.

Experimental procedures

Cell cultures

A) PC12trkB cells

PC12trkB cells were grown in culture medium, DMEM containing 6% FCS and 6% HS. They were seeded in 35 mm culture dishes at a density of about 7×10^5 cells per dish, 24 hours before transfection. The cells were kept in a humidified atmosphere of 5% CO_2 : 95% air at 37°C.

B) Cerebrocortical cells

Sprague-Dawley rats, obtained from our own animal facilities, were used in all the experiments. Primary cultures of embryonic cerebrocortical cells were carried out as previously described (de los Frailes et al., 1988). For the kinase studies, the dispersed cells were plated in poly-L-ornithine coated culture dishes at a density of $5-6 \times 10^6$ cells/35 mm. For transfection experiments, cells were plated at a density of 3×10^6 cells/60 mm plate.

Depolarization studies

After 10-11 days in culture, media were removed and 1.5 ml of fresh serum-free DMEM containing 1 μ M TTX and the specific kinase inhibitors were added. 56mM K⁺ was added for different time periods. At the end of incubation, cells were processed and used for kinase proteins, transcriptional factor (CREB) and SS mRNA determination.

BDNF studies

After 3-4 days in culture, media were removed and fetal rat cerebral cortical cells were incubated in fresh serum-free DMEM containing the specific kinase inhibitors. BDNF (50ng/ml) was added for different time periods. At the end of incubation, cells were processed and used for kinase proteins, transcriptional factor (CREB) and SS mRNA determinations.

Cell extracts and Western immunoblot

The processing of the cells and kinase activity determination were done as previously described (Fernández et al., 2005; Palacios et al., 2005). Cells were collected in lysis buffer and sonicated. Total protein extracts (10-30 μ g) were resolved by SDS/PAGE and transferred to a PVDF membrane. After blocking the membranes, immunodetection was performed using an antiserum specific for tyrosine- and threonine-phosphorylated forms of p44 (ERK1) and p42 (ERK2) MAPKs (1:15000 dilution), or an antibody that recognizes phospho-Ser¹³³ CREB (Ser¹³³; 1: 500 dilution), or an antibody that recognizes phospho-Ser⁴⁷³ Akt (Ser⁴⁷³; 1:1000 dilution). Membranes were systematically reprobated

with phosphorylation state-independent antibodies, ERK1, ERK2, CREB and Akt.

Immunocytochemistry

Immunocytochemistry was performed as previously described (Fernández et al., 2005). Cells were plated on poly-D-Lysine-coated glass coverslips in 24-well culture plates. CREB-labelling indices indicative of the activation rate of somatostatinergic cells were determined by double-labelling immunocytochemistry staining for SS and phospho-Ser¹³³ CREB (Ser¹³³).

Extraction of RNA and Northern blot analysis

Total RNA extraction and Northern blot analysis were performed as previously described (Tolón et al. 1994).

Plasmids and transfections

Dr M. Vallejo kindly provided the plasmids SS65-CAT, SS65 Δ CRE-CAT, SS900-CAT and SS900 Δ CRE-CAT. The plasmids SS65-Luc, SS65 Δ CRE-Luc, SS900Luc and SS900 Δ CRE-Luc were constructed using DNA fragments obtained by PCR amplification of somatostatin gene sequences in the plasmid pOCAT (5.26 Kb). We used primers or amplimers to incorporate XhoI and HindIII restriction sites. The resulting fragment was digested with the appropriate restriction enzymes, purified on agarose gel, and ligated into the promoterless plasmid pGL2-Basic (5,59 Kb) that had been digested with XhoI and HindIII. pGL2-Basic contains the reporter gene Luc.

A) PC12trkB cells transfections

PC12trkB cells were seeded into 35 mm culture dishes at an approximate density of 7×10^5 cells per dish 24 hours before transfection. DNA (SS65-CAT, SS65 Δ CRE-CAT, SS900-CAT and SS900 Δ CRE-CAT) (17-18 μ g total) was transfected using the Lipofectamine reagent according to the manufacturer's protocol.

B) Cerebrocortical cell transfections

Cerebrocortical cells were seeded into 60 mm culture dishes at an approximate density of 3×10^6 cells/60 mm plate 24 hours before transfection. DNA (SS65-Luc, SS65 Δ CRE-Luc, SS900-Luc and SS900 Δ CRE-Luc) (12-14 μ g total) was transfected using the FuGene reagent according to the manufacturer's protocol. Following 24 hours incubation, the cells were treated with K^+ (56 mM) for 24 hours or BDNF (50ng/ml) for 48 hours, after which they were washed, lysed and analysed for CAT and luciferase activity. CAT activity was normalized to galactosidase activity and luciferase activity was normalized to renilla activity, and results are expressed as a percentage of their own control group.

Conclusions

The present study analyses, for the first time, the signalling pathways involved in K^+ and BDNF-induced SS mRNA in primary rat cerebrocortical cell cultures. We show that K^+ activates the MAPK (ERK 1/2) pathway, and that the cAMP/PKA and CaMKs pathways are involved in this activation. We also show that K^+ activates the transcription factor CREB, which is necessary for K^+ to induce SS expression. CREB activation occurs in two phases: early and late. The cAMP/PKA y CaMKs pathways are involved in the early phase of CREB phosphorylation and the MAPK (ERK 1/2) and CaMKs pathways in the late phase .

We found that K^+ -induced SS mRNA is mediated by the activation of cAMP/PKA y CaMKs pathways, thus suggesting that the early activation of CREB is involved in the induction of SS by K^+ . The somatostatin gene contains the CRE, that is recognized by CREB and mediates its transcriptional responses. In this study, we demonstrate for the first time, using transient transfections of primary cultures, that K^+ induces the transcriptional regulation of the SS gene through the CRE sequence located in the SS promoter .

In this study, we confirm that BDNF activates the MAPK (ERK 1/2) and PI3K/Akt pathways. Our results suggest that BDNF-induced MAPK (ERK 1/2)

activation is cAMP-dependent and PKA-independent. The CaMKs and PI3K/Akt pathways are also involved in BDNF-induced MAPK (ERK 1/2) activation. We demonstrate that cAMP/PKA, MAPK (ERK 1/2) and CaMKs pathways are involved in the BDNF activation of the PI3K/Akt pathway.

We confirm that BDNF activates CREB and demonstrate that the MAPK (ERK 1/2), cAMP/PKA and PI3K/Akt pathways are involved in its activation. Our results suggest that MAPK (ERK 1/2) is the major pathway involved in CREB activation by BDNF. This study evidences for the first time that the cAMP/PKA, CaMKs, PI3K/Akt and MAPK (ERK 1/2) pathways are involved in the induction of SS mRNA by BDNF.

To determine the transcriptional regulation of the SS gene by BDNF we performed transient transfections of cultured cerebrocortical cells and PC12trkB cells with different constructions of the SS promoter. We present evidence for the first time, that BDNF induces the transcriptional activity of the SS gene through the CRE sequence located in the SS promoter.

INTRODUCCIÓN

1. SOMATOSTATINA

En 1973 se purificó y caracterizó en hipotálamo, un péptido con capacidad de inhibir la liberación de GH en cultivos de células hipofisarias de rata. Se trataba de un neuropéptido formado por 14 residuos de aminoácidos que se denominó somatostatina-14 (SS-14) (Brazeau et al., 1973).

Posteriormente, se identificó otra forma de somatostatina inmunoreactiva con un peso molecular superior. Se trataba de una molécula de SS-14 alargada en su extremo N-terminal con otros 14 aminoácidos (Pradayrol et al., 1980; Schally et al., 1980). Tras la identificación de la auténtica molécula precursora, se la denominó somatostatina-28 (SS-28). Ambas formas se encuentran presentes en cerebro y tejidos extracelulares y ejercen funciones similares.

1.1. Estructura

Como otros neuropéptidos, la somatostatina (SS) se sintetiza como un gran precursor polipeptídico, la preprosomatostatina de 116 aminoácidos. En su extremo amino-terminal presenta una región hidrofóbica de 24 aminoácidos, la secuencia "leader" o péptido señal, el cual se escinde dando lugar a una proteína de 92 aminoácidos, la prosomatostatina, que posee en su extremo carboxi-terminal la somatostatina-14 y la 28. Esta prohormona, mediante un proceso de maduración y la acción de determinadas enzimas en el aparato de Golgi, da lugar a al menos 7 péptidos diferentes, de los cuales los más abundantes y mejor caracterizados son SS-14 y SS-28.

La SS-14 está formada por 14 residuos de aminoácidos en forma de anillo que se une por un puente disulfuro formado por dos residuos de cisteína (Figura 1).

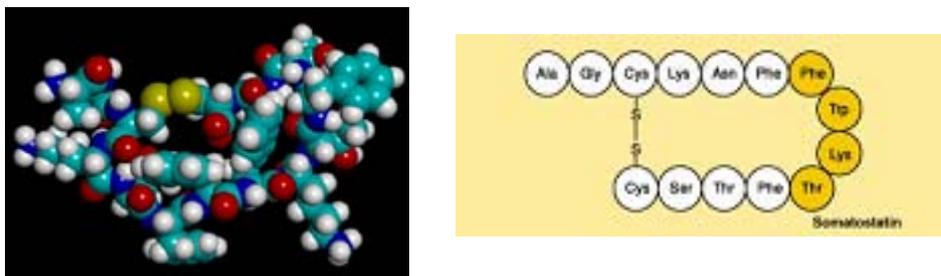


Figura 1. Estructura cristalográfica y secuencia de aminoácidos de la somatostatina-14

El gen humano y el de rata que codifican específicamente para SS-14 (Montminy et al., 1984; Shen et al., 1984; Taviani et al., 1984), así como los ADNc que codifican los diferentes péptidos pertenecientes a la familia de la somatostatina (Funckes et al., 1983; Goodman et al., 1980; Magazín et al., 1982; Taylor et al., 1981) han sido aislados y secuenciados.

El gen que codifica para la SS de rata incluye dos exones de 238 y 367 pares de bases (pb) separados por un único intrón de 621 pb. En la secuencia nucleotídica se localiza una variante de la “TATA” box (TTTAAA) que se encuentra 26 pb por delante del sitio de inicio de la transcripción, y una secuencia homóloga a la “CAAT” box (GGCTAAT), localizada 92 pb por delante del sitio de inicio de la transcripción (Montminy et al., 1984).

En humanos, el gen de la SS se localiza en el cromosoma 3 y también está compuesto por dos exones separados por un intrón de 877 pb. Comparando los dos genes, se observa que todas las secuencias en el ARNm están muy conservadas (90%).

La región del promotor y las proteínas de unión al ADN involucradas en la expresión basal y en la regulación del gen de la SS, han sido ampliamente estudiados mediante la construcción de genes quiméricos compuestos por la región 5' del gen, con diversos grados de delección, unida a la secuencia codificadora de genes “marcadores” tales como el correspondiente a la enzima cloranfenicol-acetil transferasa (CAT) y luciferasa (Luc).

El AMPc regula la transcripción del gen de la SS a través de una secuencia consenso de respuesta al AMPc, conocida como el elemento de respuesta a CREB (CRE) presente en el promotor del gen de la SS y necesaria para su regulación transcripcional por el AMPc, localizada entre los nucleótidos -48 y -32 (Montminy et al., 1996). Se trata de una secuencia palindrómica de 8 pares de bases (5'-TGACGTCA-3') (Montminy et al., 1986a; Comb et al., 1986; Short et al., 1986), altamente conservada en muchos otros genes cuya expresión también es regulada por el AMPc (Wynshaw-Boris et al., 1984). Esta secuencia palindrómica está flanqueada en su extremo 5' por un dominio rico en GC y en su extremo 3' por secuencias ricas en AG, secuencias necesarias para que se produzca la respuesta al AMPc (Montminy et al., 1986a).

1.2. Distribución anatómica

La SS se encuentra ampliamente distribuida por el SNP y SNC, en el interior del cuerpo neuronal y en las terminaciones nerviosas (Foster et al., 1985).

En el SNC, la SS se ha detectado en las terminaciones nerviosas adyacentes a los capilares del sistema porta-hipofisario en la eminencia media (Johansson et al., 1984; Krisch, 1978). Dichas terminaciones pertenecen a neuronas localizadas en el núcleo periventricular y en el área media preóptica (Alpert et al., 1976), que proyectan además a distintas estructuras extrahipotalámicas (Krisch, 1978) tales como el hipocampo, el septum, la hipófisis posterior, etc.

La SS también se expresa en otros núcleos hipotalámicos como el arcuato ventromedial y el supraquiasmático (Harmar et al., 1987) y fuera del hipotálamo se localiza en el hipocampo (Roberts et al., 1984), tálamo, caudado (Takagi et al., 1983) y núcleos del tronco cerebral (Forssmann et al., 1979).

Está presente en regiones concretas del sistema nervioso como corteza cerebral (Naus et al., 1988), y las áreas visual (Bodenant et al., 1991), somatosensorial (Katz et al., 1992) y auditiva del cerebro (Kungel et al., 1995;

Shiosaka et al., 1981; Takatsuki et al., 1982 y 1981). En el cerebro, el ARNm de la SS comienza a detectarse en el día 7 de vida embrionaria, observándose un mayor incremento entre los días 14 y 20 del desarrollo embrionario (Zing. et al., 1984), sin apreciarse variaciones desde esta etapa hasta la vida adulta. Así, su patrón de expresión (péptido, mensajero y niveles de receptor) es abundante durante la etapa prenatal y disminuye previo a la formación de las sinapsis (Reichlin, 1983).

Además, la SS está presente en neuronas de todas las vías sensoriales (Harmar et al., 1987), pudiendo estar relacionada con la integración de señales sensoriales en el SNC.

En los tejidos extracerebrales la SS se localiza en las células D del páncreas, tracto gastrointestinal (Polak et al., 1975), células C del tiroides (Buffa et al., 1979), glándulas submaxilares (Girod et al., 1980), placenta (Watkis et al., 1980), y tracto urinario (Bolaffi et al., 1980).

Debido a su ubicuidad, la SS presenta una gran diversidad de acciones biológicas (Koerker et al., 1974; Konturek et al., 1976; Polak et al., 1975) pudiendo llevar a cabo funciones neurotransmisoras y neuromoduladoras. En su regulación hipofisaria funciona como una neurohormona mientras que en otros tejidos actúa por mecanismos autocrinos o paracrinos. Esta diversidad funcional junto con su amplia distribución anatómica sugieren que la SS tenga una especificidad funcional tisular.

1.3. Regulación de la somatostatina en corteza cerebral

La regulación de la SS en la corteza cerebral ha sido menos estudiada que en el hipotálamo. Su liberación se estimula en respuesta a agentes despolarizantes de la membrana por un mecanismo dependiente de la entrada del calcio al igual que sucede en hipotálamo (Tolón et al., 1994; Delfs et al., 1980; Iversen et al., 1978; Lee et al., 1978; Robbins et al., 1982).

Su liberación en neuronas está regulada por una serie de neurotransmisores y neuropéptidos (Arimura et al., 1981; Reichlin, 1983).

Acetilcolina y dopamina aumentan su liberación en corteza (Robbins, 1985a), mientras que GABA e histamina la disminuyen.

Varios neuropéptidos estimulan la secreción de la SS en células de corteza cerebral en cultivo, como la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), neurotensina, VIP (De los Frailes et al., 1991; Robbins et al., 1985b), colecistoquinina (CCK), met-enkefalina y GHRH (De los Frailes et al., 1992).

La SS cerebral también está bajo el control de hormonas periféricas, tales como las hormonas tiroideas, que ejercen un control muy crítico siendo estimuladoras a dosis bajas e inhibitoras a dosis altas (De los Frailes et al., 1989). Las gonadotropinas modifican los niveles del ARNm de la SS en el hipotálamo (Fernández et al., 1992). Hormonas hipofisarias como GH y TSH se comportan como estimuladoras (Rogers et al., 1988), mientras que la prolactina (PRL) no ejerce ningún efecto y la hormona corticotropa (ACTH) inhibe su síntesis (Goodman et al., 1985).

Su liberación también puede ser inducida por 3',5', dibutiryl cAMP y por el inhibidor de fosfodiesterasas, 1,3 dimetilxantina (Robbins et al., 1982).

En cuanto a los factores que regulan la síntesis de la SS en corteza cerebral, se sabe que el tratamiento con calcio estimula la secreción y síntesis del neuropéptido (Zeytin et al., 1987);

Entre los factores neurotróficos que intervienen en la regulación de la expresión de la SS se encuentra el BDNF. BDNF es un potente inductor de la diferenciación neuronal *in vivo*, promoviendo un aumento en los niveles de expresión de la SS, la sustancia P y el NPY en cerebro de ratas neonatas (Nawa et al., 1994). En células cerebrales, el BDNF aumenta la síntesis de diferentes neuropéptidos como el neuropéptido Y (NPY) y la SS (Nawa et al., 1993; Villuendas et al., 2001; Mizuno et al., 1994; Marty et al., 1999; Rage et al., 1999; Carnahan et al., 1995; Givalois et al., 2006). Además el BDNF aumenta el contenido del ARNm de la SS en células de corteza cerebral (Villuendas et al., 2001).

La reducción de la expresión del BDNF en cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer (Phillips et al., 1991), está a menudo asociada a una reducción en los niveles de la SS y del NPY (Kowall et al., 1988).

1.4. Acciones biológicas

La SS es un neuropéptido que se sintetiza en múltiples tejidos donde realiza funciones específicas coordinando procesos fisiológicos como el crecimiento y desarrollo en diferentes especies (Sheridan et al., 2000). La SS ejerce una extensa y variada gama de efectos sobre la secreción de varias hormonas hipofisarias y no hipofisarias, fundamentalmente del sistema gastro-entero-pancreático.

A nivel hipofisario inhibe la liberación de GH (Krulich et al, 1968) en respuesta a diversos estímulos, así como la secreción pulsátil de esta hormona, la que se produce durante el sueño y en situaciones de estrés. Además la SS inhibe la liberación de TSH en respuesta a TRH (Hirooka et al., 1978).

Aparte de su función neuroendocrina, la SS se sintetiza en diversas áreas del SNC actuando como neurotransmisor en muchas regiones como la médula espinal, el tronco encefálico y la corteza cerebral (Harrison, 1994). Se ha observado que la SS es capaz de inducir el crecimiento de neuritas promoviendo la diferenciación neuronal, sugiriendo que la SS es un importante factor trófico durante el desarrollo del SNC (Ferreiro et al., 1994; Bulloch, 1987). En células de meningioma humano (Shally, 1988) ejerce acciones antiproliferativas; y la SS participa en la maduración del SNC induciendo apoptosis de células cerebrocorticales fetales y postnatales (Mato et al., 1996).

Además la SS juega un papel importante en procesos de aprendizaje, y memoria (Matsuoka et al, 1995). En la enfermedad de Alzheimer, los niveles del péptido de la SS, así como los niveles de su ARNm y su receptor están disminuidos en hipocampo y corteza cerebral (Davis et al., 1999; Van-Uden et al., 1999; Nilsson et al., 2001). La SS está implicada en la demencia frontotemporal y en la encefalitis ocasionada por el HIV (Barnea et al., 1999;

Braun et al., 2002). Se ha descrito que la SS participa en un tipo de demencia producida en la diabetes (XiaoMing et al., 2004), donde los niveles de su ARNm, así como del péptido están significativamente disminuidos en hipocampo y corteza.

Las acciones extrahipofisarias que ejerce son muy amplias, siendo casi siempre de tipo inhibitor. Bloquea la liberación de la insulina, glucagón (Weir et al., 1985 ; Reichlin et al., 1983) y otras hormonas peptídicas del sistema gastro-entero-pancreático (gastrina, motilina y VIP) (Pittenger et al, 1985).

2. ACTIVIDAD NEURONAL INDUCIDA POR DESPOLARIZACIÓN CON K⁺

Numerosos estudios demuestran que la despolarización de la membrana no sólo produce una rápida alteración en la fosforilación de proteínas (Nairn et al., 1985), sino también la activación de la expresión de diferentes genes en células de tipo neuronal (Greenberg et al., 1985, 1986; Morgan et al., 1986; Black et al., 1987; Saffen et al., 1988; Bartel et al., 1989; Tao et al., 1998). Estos cambios en la expresión génica son mecanismos muy importantes que transforman acontecimientos eléctricos de corta duración en alteraciones morfológicas de larga duración que pueden ser responsables de cambios en la plasticidad neuronal y en la formación de los procesos de memoria (Morgan et al., 1991). Los cambios inducidos tras la despolarización de la membrana pueden venir mediados por variaciones en los niveles del Ca²⁺ (Bartel et al., 1989; Greenberg et al., 1986; Morgan et al., 1986) y nucleótidos cíclicos que, a su vez, modifican la actividad de diferentes quinasas, como paso final en el mecanismo regulador.

Entre los genes regulados por despolarización se incluyen aquellos que codifican para neuropéptidos, enzimas que participan en la biosíntesis de los neurotransmisores (Morris et al., 1988; Van Mgyuen et al., 1990; Lu et al., 1991), y un conjunto de “genes de respuesta temprana” (early genes) implicados en el control del crecimiento y diferenciación de muchos tipos celulares (Bartel et al., 1989; Saffen et al., 1988).

2.1. Implicación del calcio

El calcio es un mediador crítico en la señalización trans-sináptica en neuronas y afecta a una amplia variedad de respuestas neuronales (Kennedy, 1989).

La despolarización de la membrana permite la entrada del calcio a través de los canales de calcio dependientes de voltaje (VSCCs), concretamente el tipo L (Tolón et al., 2000). Estos canales se activan por potenciales despolarizantes, que son los de mayor conductancia y están relacionados con la generación de potenciales de acción y la transmisión de la señal recibida en la membrana hasta el interior de la célula.

El flujo del Ca^{2+} a través de los canales L-VSCCs juega un importante papel en la regulación de la expresión génica en respuesta a la activación sináptica en cultivos primarios de neuronas corticales (Murphy et al., 1991) y también media la expresión génica en respuesta a la despolarización de la membrana en la línea celular PC12 (Greenberg et al., 1986; Morgan et al., 1986). En el cerebro, la entrada del Ca^{2+} a la célula activa la adenilato-ciclasa (Ac) lo que produce un aumento del AMPc (Grewal et al., 2000a).

El grupo de Wakabayashi (Wakabayashi et al., 1977) fue el primero en evidenciar que la SS se liberaba en respuesta a estímulos despolarizantes, demostrando que altas concentraciones de K^+ producían un aumento de su liberación en sinaptosomas hipotalámicos.

Estudios posteriores (Tolón et al., 1994; Tolón et al., 2000; Tapia-Arancibia et al., 1989) demostraron que la despolarización de la membrana con elevadas concentraciones de K^+ , produce un aumento del ARNm y de la liberación de la SS, siendo procesos calcio dependientes.

2.2. Implicación de la adenilato ciclasa-AMPc

Los niveles celulares del AMPc vienen determinados por la actividad de la Ac, la enzima responsable de su síntesis y por la fosfodiesterasa, la enzima que lo hidroliza. La Ac se localiza en la membrana celular tanto en neuronas

como en otros tipos celulares (Ross et al., 1980). La síntesis del AMPc requiere la unión previa de GTP al complejo formado por la enzima y el receptor, terminando con la hidrólisis del GTP a GDP. El AMPc producido en el interior de la célula se une a la proteína diana activándola (Figura 2).

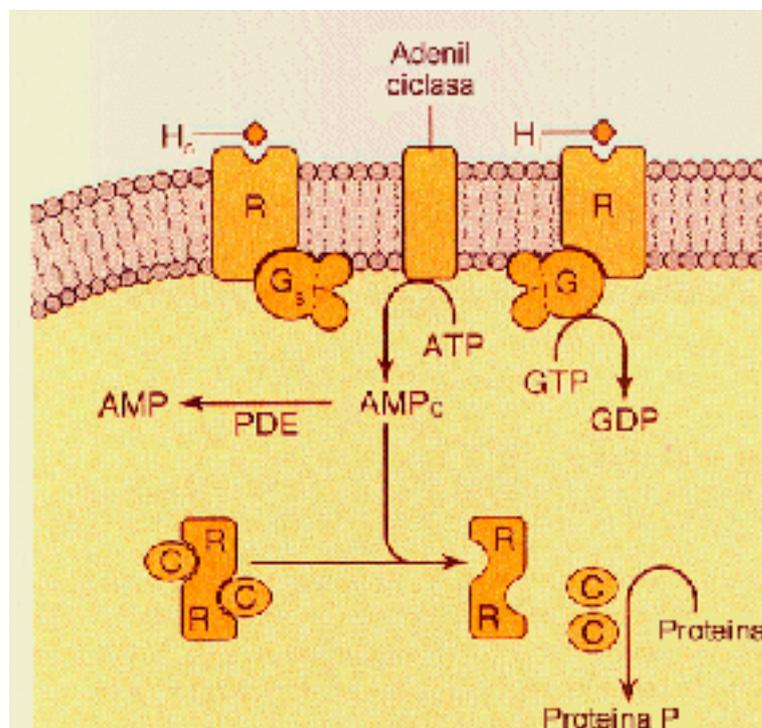


Figura 2. Esquema de la actividad de la adenilato ciclasa

La activación de esta ruta puede producirse por agentes extracelulares como glucagón, epinefrina, VIP, polipéptido inhibidor gástrico e isoproterenol, que actúan a través de un receptor de superficie acoplado a la adenilato ciclasa (Chichara et al., 1979; Robbins et al., 1985b; Shimatsu et al., 1982; Tapia-Arancibia et al., 1984) ó por otras sustancias que actúan a través de un mecanismo post-receptor como son forskolin, teofilina o análogos del AMPc (Montminy et al., 1986b; Patel et al., 1979) produciendo un aumento en los niveles del AMPc. Un aumento del AMPc también se produce por despolarización de la membrana con K^+ (Tolón et al., 2000; Iuvone et al., 1991; Sheng et al., 1990).

La activación de la ruta de la Ac-AMPc, juega un papel primordial en la estimulación de la liberación de la SS en los islotes pancreáticos (Patel et al.,

1979; Patton et al., 1977; Reichlin, 1983), en células gastrointestinales (Ciba et al., 1978) y en células cerebrales embrionarias en cultivo (Montminy et al., 1986b; Robbins et al., 1982).

El AMPc activa la transcripción del gen de la SS en cultivos primarios de neuronas diencefálicas de embriones de rata (Montminy et al., 1986b), en cultivos de la línea celular PC12 y en fibroblastos NIH-T3 transfectados con el gen de la SS de rata (Montminy et al., 1986a y 1986b).

El AMPc promueve a través de diferentes mecanismos intracelulares la fosforilación y la activación del factor de transcripción CREB, que tras su unión al elemento de respuesta del AMPc, el CRE (Montminy et al., 1996) induce la transcripción del gen de la SS.

2.3. Mecanismos de señalización intracelular

Como mencionamos anteriormente, tras la despolarización de la membrana neuronal por K^+ , se produce la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L (L-VSCCs) lo que permiten la entrada de Ca^{2+} al interior celular. El Ca^{2+} es detectado por la calmodulina (CaM), proteína de localización muy ubicua, que se encuentra en casi todos los tipos celulares, siendo el cerebro uno de los tejidos en los que existe una mayor concentración (Cheung, 1980; Sobue et al., 1983).

Los canales L-VSCCs presentan una región COOH-terminal, denominada región IQ, a la que se une el complejo Ca^{2+} -CaM (Peterson et al., 1999; Lee et al., 1999). El complejo Ca^{2+} -CaM interacciona y modula la funcionalidad de un gran número de proteínas, incluidas proteínas serina/threonina quinasas. La fosforilación de proteínas es uno de los mecanismos más comunes de regulación celular, y las neuronas contienen altos niveles de diferentes proteínas quinasas (Soderling, 2000). En la corteza cerebral, la actividad de la Ac está regulada por las fluctuaciones de la concentración intracelular del Ca^{2+} (Brostrom et al., 1978). El complejo Ca^{2+} -CaM activa por un lado la vía CaMKs y por otro, la Ac, que una vez activada induce la síntesis del AMPc, permitiendo la activación de diferentes vías de señalización intracelular como son: la vía

AMPC/PKA y la vía MAPK (ERK1/2). La activación de las vías de señalización transmite las señales del Ca^{2+} al núcleo, donde se activan ciertos factores de transcripción, como es el factor de transcripción CREB, importante en la expresión de determinados genes que regulan supervivencia y plasticidad neuronal (Shaywitz et al., 1999). Existe otro factor de transcripción que se activa por la unión del complejo Ca^{2+} -CaM a la región IQ del canal L-VSCCs, es el factor de transcripción MEF2 (Dolmetsch et al., 2001), implicado en procesos de diferenciación muscular y supervivencia neuronal (Mao et al., 1999; Naya et al., 1999).

2.3.1. Vía de señalización de la AMPC/PKA

La PKA es un heterotetrámero formado por dos subunidades catalíticas y dos reguladoras. Cada subunidad reguladora tiene dos sitios de unión al AMPC. Tras la unión del AMPC a las subunidades reguladoras, se liberan las subunidades catalíticas activándose la PKA (Montminy et al., 1996).

Una vez activada, la PKA se transloca al núcleo (Hagiwara et al., 1992, 1993) donde, entre otros efectos, fosforila y activa proteínas quinasas y una serie de factores de transcripción que regulan la expresión génica (Montminy, 1997) y la transcripción estimulada por el Ca^{2+} (Ginty et al., 1991; Impey et al., 1994; Thompson et al., 1995).

Uno de los factores de transcripción activados es CREB (Hagiwara et al., 1993; González et al., 1989a), que regula la expresión de genes específicos que tienen en su promotor la secuencia consenso CRE (Montminy 1997; Shaywitz et al., 1999).

Estudios previos de nuestro laboratorio (Tolón et al., 2000) han demostrado que la despolarización de la membrana con altas concentraciones de K^+ induce un aumento del ARNm de la SS que es mediado por el aumento del AMPC.

2.3.2. Vía de señalización de la MAPK (ERK 1/2)

Rosen fue el primero en demostrar que el flujo del Ca^{2+} a través de los canales L-VSCCs activaba la vía Ras/MAPK (Rosen et al., 1994). Las MAPKs

son una familia de serina/threonina quinasas con una gran variedad de dianas celulares, sugiriendo una función reguladora de muchas respuestas celulares. Fue denominada MAPK por su capacidad para fosforilar la proteína asociada a microtúbulo MAP-2 (Ray et al., 1987) y la proteína Tau, permitiendo su disociación de los microtúbulos (Drewes et al., 1993; Lu et al., 1993).

Además, MAPK fosforila y activa otra variedad de enzimas citoplasmáticas de señalización como la serina/threonina quinasa pp90^{rsk} (Blenis, 1993) y factores de transcripción nucleares como c-myc (Davis, 1993) y CREB (Bading et al., 1991). Por tanto, la activación de MAPK puede estar implicada en la regulación del citoesqueleto, señalización citoplasmática y expresión génica.

Hemos comentado previamente que la despolarización induce un flujo del Ca²⁺ a través de los canales L-VSCCs, y la formación de un complejo Ca²⁺-CaM activo. La CaM es un regulador común de la activación de Ras a través de los factores de intercambio de nucleótidos de guanina, GEF (Farnsworth et al., 1995, Zippel et al., 2000) (Ver Figura 4). El Ca²⁺ puede directamente, sin unirse a la CaM, activar Ras y ERK, siendo esta activación muy rápida (Baldassa et al., 2003).

Una vez activada, Ras es capaz de activar la proteína quinasa Raf-1 posiblemente mediante una interacción directa Ras-Raf-1 (Crews et al., 1993). Raf-1, a su vez, se une y activa mediante fosforilación, la enzima MAPK quinasa (MAPKK) o MEK (Crews et al., 1993; Kyriakis et al., 1992), de la que existen dos isoformas conocidas como MEK1 y MEK2. Estas quinasas activan mediante una doble fosforilación en residuos de threonina y tirosina a sus únicos sustratos conocidos, las proteínas MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos), también denominadas ERKs (quinasas activadas por señales extracelulares). De estas enzimas existen varias isoformas, siendo las mejor conocidas ERK1 y ERK2 de Pm 44 y 42 KDa, respectivamente. Ambas son proteínas serina/threonina quinasas que fosforilan lugares ricos en prolina (Marshall, 1994). Una vez activadas, las MAPKs (ERK 1/2) se traslocan al núcleo (Chen et al., 1992) donde fosforilan y activan proteínas quinasas y una serie de factores de transcripción que permiten la expresión génica.

En respuesta a factores de crecimiento (Xing et al., 1996; 1998), a despolarización con K^+ y a factores neurotróficos (Impey et al., 1998a) fosforilan sustratos entre los que se encuentra la familia de proteínas quinasas ribosomales S6 o Rsk (Rsk 1, 2 y 3) (Serger et al., 1995), que están implicadas en la activación de factores de transcripción, como la proteína de unión al CRE (CREB).

En los últimos años se ha descrito la existencia de interacciones entre las vías MAPK (ERK 1/2) y AMPc/PKA. Esta interacción ocurre a nivel del complejo Rap1/B-Raf (Grewal et al., 2000a; Baldassa et al., 2003) que es activado por la PKA, y este complejo activa ERKs. Rap1 además puede activarse por un mecanismo independiente de la PKA. En esta activación están implicadas las proteínas Epac (Exchange proteins activated by cAMP) que se activan por unión al AMPc y activan pequeñas GTPasas de la familia Ras, entre ellas, la mencionada Rap1 (Kawasaki et al., 1998). Además, existe otra interacción que ocurre a nivel del AMPc/PKA y MAPK (ERK 1/2) (Vossler et al., 1997; Schmitt et al., 2001). En esta interacción está también implicada la proteína Rap1. Esta proteína activa una quinasa de la familia de Raf denominada B-Raf, capaz a su vez de activar ERK 1/2 (Figura 3).

La MAPK y la PKA están fuertemente implicadas en la activación del factor transcripcional CREB. Existen estudios que muestran que la interacción PKA-Rap1/B-Raf-ERKs podría tener un papel importante en la regulación de la expresión génica controlada por CREB, a nivel de la estimulación y el reclutamiento de los coactivadores transcripcionales CBP y p300 (Grewal et al., 2000b).

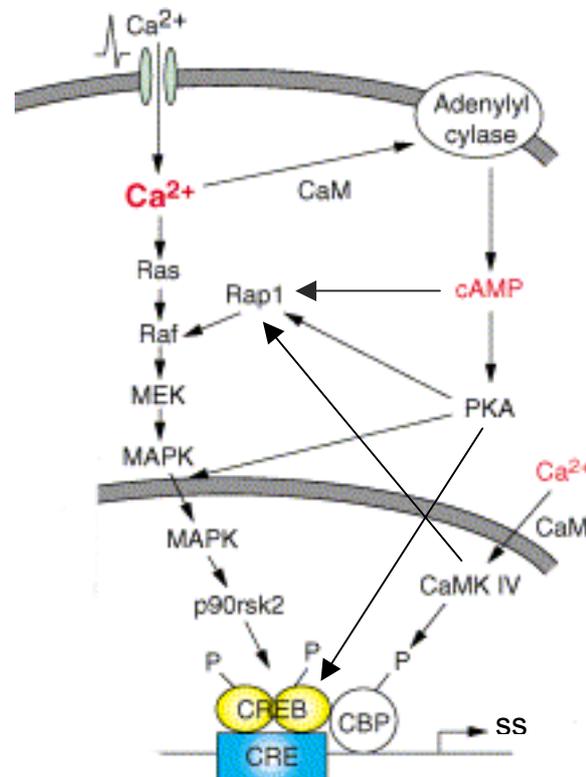


Figura 3. Interacción entre las vías de señalización intracelular activadas por despolarización en neuronas corticales.

Además, la PKA actúa como moduladora de la duración y la magnitud de la activación de ERKs (Baldassa et al., 2003). ERKs presenta una activación rápida cuando se activa vía Ras, ya que ésta proteína se localiza en la membrana plasmática. En cambio, cuando se produce la activación de ERKs vía PKA-Rap1, la activación es más lenta debido a que Rap1 es de localización intracelular y esto explica su desfase o retraso en la activación (Figura 4).

Otra de las vías que interacciona con la vía MAPK (ERK 1/2) es la vía CaMKs (Soderling, 1999). La CaMKIV fosforila la proteína Rap1b in vitro (Sahyoun et al., 1991). Rap1 a través de su unión con B-Raf activa la vía MAPK (ERK 1/2).

2.3.3. Vía de señalización de las CaMKs

Tras la despolarización de la membrana aumenta la concentración del Ca^{2+} intracelular con la consiguiente formación del complejo Ca^{2+} -CaM, que se une y

activa las CaMKs (Calmodulina quinasas). Las CaMKs en estado basal se encuentran inactivas debido a que presentan un dominio inhibitor. Cuando se une el complejo Ca^{2+} -CaM se elimina este dominio y se activan las CaMKs que posteriormente, fosforilan sus sustratos. Además, las CaMKs pueden autofosforilarse en el residuo Thr286 cuando se elimina el dominio inhibitor, de manera que pueden fosforilar sustratos de manera Ca^{2+} -independiente (Hanson et al., 1992).

Las CaMKs son una familia de proteínas serina/threonina quinasas. Existen varios tipos de CaMKs siendo la CaMK II y IV las que principalmente activan CREB en el residuo serina 133 (Enslin et al., 1994).

La *CaMKII* se encuentra altamente expresada en el SNC y en otros tejidos (Hanson et al., 1992). Se localiza en el citoplasma y en el núcleo (Brocke et al., 1995). *In vitro*, fosforila un gran número de sustratos, como son el factor transcripcional CREB (Dash et al., 1991; Sheng et al., 1991), C/EBP β (Wegner et al., 1992) y una amplia variedad de proteínas implicadas en la función neuronal (Hanson et al., 1992). También está implicada en la regulación del ciclo celular, contracción de músculo liso y en los procesos de secreción (Schulman, 1993).

La *CaMKIV* no está tan ampliamente distribuida como la CaMKII, su ARNm está altamente expresado en el cerebelo, testículos, bazo y timo (Frangakis et al., 1991; Jones et al., 1991; Means et al., 1991; Ohmstede et al., 1989); se localiza en el núcleo (Jensen et al. 1991; Brocke et al., 1995), lo que permite que la quinasa esté preparada para activar a los factores de transcripción. Entre los factores que fosforila *in vitro*, se encuentra el factor transcripcional CREB y el SRF (factor de respuesta al suero) (Cruzalegui et al., 1993), además del coactivador CBP (Hu et al., 1999).

Tanto la CaMKII como la CaMKIV fosforilan CREB en el residuo serina 133, pero la CaMKII además fosforila otros sitios dentro del dominio de activación de CREB, en los residuos serina 142 y 143 (Sun et al., 1994; Enslin et al., 1994; Matthews et al., 1994; Parker et al., 1998). Esta triple fosforilación de CREB en los residuos Ser133, Ser142 y Ser143, es inducida por la despolarización de la

membrana en cultivos primarios de neuronas y en células PC12, fosforilándose primero el residuo Ser133 y posteriormente los residuos Ser142 y Ser143 (Kornhauser et al., 2002).

Existe cierta controversia en la literatura acerca del papel jugado por cada CaMKs en la fosforilación de CREB. Algunos autores consideran a la CaMKIV como la única responsable de la fosforilación de CREB y de la expresión génica dependiente de CREB (Deisseroth et al., 1996, 1998; Bito et al., 1996; Hardingham et al., 1999; Ho et al., 2000).

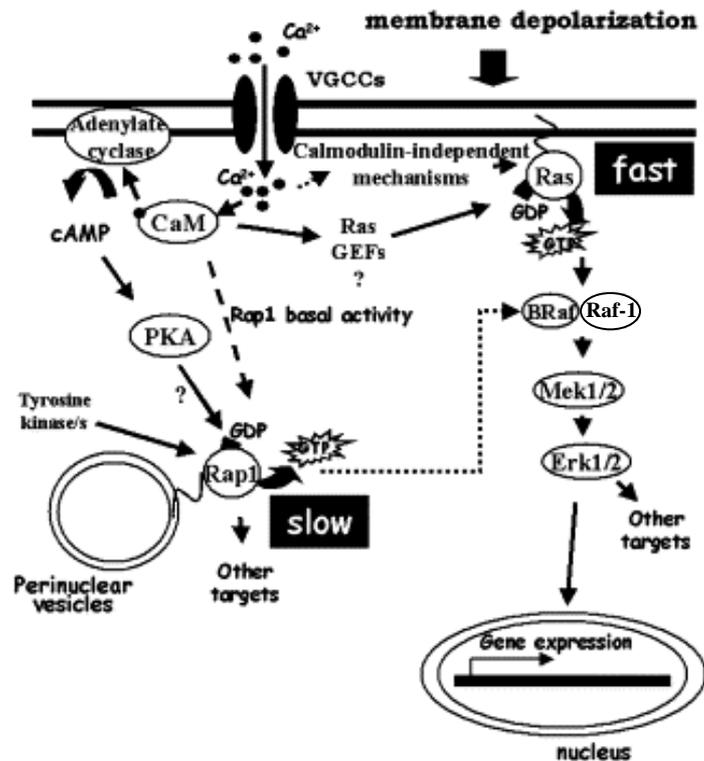


Figura 4. Mecanismos de señalización intracelular inducidos por despolarización en neuronas corticales.

3. FACTOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DE CEREBRO (BDNF)

El BDNF es un factor neurotrófico de la familia de las neurotropinas que fue aislado del cerebro de cerdo donde promueve el crecimiento de neuronas sensoriales (Barde et al., 1982). Tras su clonaje se observó una gran homología en su secuencia con el NGF (factor de crecimiento nervioso)

(Leibrock et al., 1989). Ésto condujo al descubrimiento de una familia de factores neurotróficos relacionados funcional y estructuralmente entre sí, que se denominó neurotropinas.

3.1. Estructura

Se trata de una proteína de 252 aminoácidos, de los que 51 son idénticos al NGF de varias especies. Estos residuos comunes incluyen seis cisteínas, tres triptófanos y dos restos de fenilalanina así como la mayoría de los residuos de valina y ácido aspártico en idéntica posición que en el NGF. Esta estructura conservada del BDNF se mantiene también en la región precursora (Leibrock et al., 1989).

El gen del BDNF contiene cuatro exones 5' unidos a cuatro promotores y un exón en la región 3' que codifica la proteína precursora pre-proBDNF. La fusión diferencial de exones alternativos y la utilización de dos sitios diferentes de poliadenilación en cada una de las cuatro unidades de transcripción, genera ocho ARNm diferentes del BDNF (Timmusk et al., 1993). Este sistema multi-promotor del gen del BDNF permite su expresión específica en tejidos y una activación diferencial de su expresión en las distintas etapas del desarrollo (Timmusk et al., 1994).

3.2. Distribución anatómica

El BDNF se expresa fundamentalmente en hipocampo y corteza cerebral (Ernfors et al., 1990; Hofer et al., 1990; Phillips et al., 1990), pero también se localiza en corazón, pulmón y tejido muscular de rata (Maisonpierre et al., 1990). En humanos se expresa también en riñón, pulmón y ojo (Yancopoulos et al., 1990).

En la rata, se inicia su expresión entre los días 11 y 12 del desarrollo embrionario, paralelo al comienzo de la neurogénesis de ambos sistemas nerviosos, central y periférico (Maisonpierre et al., 1990). Su expresión es relativamente baja en el embrión, aumentando después del nacimiento hasta alcanzar niveles más elevados en la etapa adulta. Esto puede explicar una

función más tardía en el desarrollo, mediando la maduración y/o mantenimiento de neuronas (Yancopoulos et al., 1990).

3.3. Acciones biológicas

El BDNF ejerce sus acciones mediante su unión al receptor trkB de la familia de receptores quinasas. En el SNC el receptor del BDNF, TrkB, está colocalizado con el BDNF (Kokaia et al., 1993; Cohen-Cory et al., 1996), sugiriendo que el BDNF no sólo tiene una acción neurotrófica derivada de la célula post-sináptica sino que podría actuar a nivel local de forma paracrina o autocrina. Además, el BDNF puede unirse a otro receptor de baja afinidad como es el p75 (Chao et al., 1995), que en ausencia del receptor TrkB media las respuestas de las neurotrofinas (Friedman et al., 1999).

En el SNP, las neuronas sensoriales derivadas de la placa y cresta neural (Berg et al., 1992; Cerdón-Cardo et al., 1991), neuronas del núcleo ganglionar (Oppenheim et al., 1992) y las motoneuronas espinales (Yan et al., 1992) responden al estímulo del BDNF. Además, el BDNF ejerce un efecto en la supervivencia de motoneuronas *in vivo*, ya que las rescata de la muerte celular inducida por una lesión del tejido nervioso (Sendtner et al., 1996). En los últimos años, se ha identificado un nuevo papel del BDNF modulando el proceso de mielinización (Chan et al., 2001).

En el SNC, el BDNF actúa como promotor de supervivencia en las neuronas colinérgicas del cerebro anterior (Davies et al., 1986), las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra (Hyman et al., 1991), las neuronas ganglionares de la retina (Rodríguez-Tebar et al., 1989) y las motoneuronas faciales (Sendtner et al., 1992). El BDNF juega un papel importante en la supervivencia y diferenciación de determinadas poblaciones de neuronas durante el desarrollo (Lindsay et al., 1985; Alderson et al., 1990; Knüsel et al., 1991; Ghosh et al., 1994; Mamounas et al., 1995; Schwartz et al., 1997).

El BDNF también promueve diferenciación neuronal en cultivos celulares de la cresta neural (Sieber-Blum, 1991) e induce una prematura maduración de células ganglionares de la raíz dorsal (Wright et al., 1992).

El BDNF regula la expresión de neuropéptidos como son el neuropéptido Y (NPY), la colecistoquinina (CCK) y la SS (Nawa et al., 1993); y neurotransmisores como GABA, tanto *in vivo* como *in vitro*.

3.4. Interacción de BDNF con SS

El BDNF participa en numerosos aspectos de la plasticidad neuronal. Entre sus acciones, se ha centrado un gran interés en su efecto estimulador de la biosíntesis de neuropéptidos en el SNC.

Se ha demostrado que, *in vitro*, el BDNF estimula la secreción, el contenido del péptido y del ARNm de la SS en neuronas corticales (Nawa et al., 1993; Tolón et al., 1994), estriatales (Mizuno et al., 1994), de hipocampo (Marty et al., 1999) e hipotálamo (Rage et al., 1999).

La administración *in vivo* de BDNF resulta en un aumento de la expresión de la SS en corteza cerebral (Nawa et al., 1994), estriado e hipocampo (Carnahan et al., 1995) y núcleo periventricular del hipotálamo (Givalois et al., 2006). En ratones con delección del gen del BDNF, la deficiencia del BDNF se acompaña de una disminución drástica de la densidad de células inmunoreactivas a la SS, tanto en hipocampo como en corteza cerebral (Grosse et al., 2005). El BDNF es un activador selectivo de la diferenciación de neuronas somatostatinérgicas en el núcleo periventricular del hipotálamo (Loudes et al., 2000) donde incrementa su tamaño y arborización. No se han observado cambios en el número de neuronas somatostatinérgicas, tras la exposición a BDNF, lo que sugiere que no promueve su supervivencia (Rage et al., 1999).

En el hipotálamo, una de las regiones del cerebro más rica en SS, se han observado niveles altos de la expresión del receptor trkB y se ha demostrado su presencia en las células somatostatinérgicas (Rage et al., 1999). Estos hechos sugieren que el BDNF regula directamente la expresión de la SS por mecanismos autocrinos o paracrinos, al menos en áreas concretas del cerebro.

Durante el desarrollo, la actividad neuronal induce la expresión del BDNF y de varios neuropéptidos, entre los que se encuentra la SS. En cultivos de células corticales embrionarias, la inducción de la SS por despolarización con K^+ se inhibe cuando se bloquea el BDNF (Villuendas, 1998). En el hipocampo, la exposición *in vitro* a bicuculina induce la expresión de la SS, efecto que se anula cuando se bloquea el receptor de neurotropinas trkB (Marty et al., 1999). Estos estudios sugieren que BDNF es un mediador crítico en la inducción de la SS por actividad neuronal.

La estrecha asociación entre el BDNF y la SS es evidente también en el envejecimiento, donde se produce una disminución paralela de ambos. En la rata vieja la infusión del BDNF incrementa los niveles de la SS en corteza cerebral e hipocampo (Croll et al., 1999). En primates existe paralelismo en la disminución del BDNF y la SS en diversas áreas de la corteza cerebral (Hayashi et al., 1997) e hipocampo, lo que sugiere que la disminución de la expresión génica del BDNF puede causar el declinar de los niveles de la SS en primates durante el proceso de envejecimiento.

3.5. Mecanismos de señalización intracelular

La señalización intracelular del BDNF está mediada por la unión a su receptor TrkB. En el proceso de activación del complejo BDNF-TrkB se produce una dimerización del receptor, seguida de una autofosforilación de sus residuos tirosina (Ibáñez et al., 1993). El receptor trkB una vez activado permite la activación de múltiples vías de señalización, que en definitiva activan diferentes factores de transcripción entre los que se encuentra CREB, principal mediador de la acción del BDNF sobre la expresión génica en neuronas cerebrocorticales (Finkbeiner et al., 1997).

3.5.1. Vía de señalización de la MAPK (ERK 1/2)

La activación de la vía MAPK (ERK 1/2) por BDNF está ampliamente documentada (Finkbeiner et al., 1997; Friedman et al., 1999; Grewal et al., 1999; Finkbeiner, 2000). El receptor trkB activado por BDNF (Figura 5) interacciona con la proteína intracelular adaptadora Shc, que no tiene función

catalítica, tan sólo media la asociación con otra proteína denominada Grb-2 que a su vez activa Sos. Este complejo proteico es translocado a la membrana plasmática donde la proteína Sos activa Ras, facilitando el intercambio de GTP (guanosín-trifosfato) por GDP (guanosín-difosfato). Una vez activada, Ras interacciona directamente con la quinasa Raf que induce una activación secuencial de MEK. MEK cataliza la fosforilación de MAPK (ERK 1/2) y ésta es translocada al núcleo (Segal et al., 1996) donde fosforila entre otros sustratos al factor transcripcional CREB y al coactivador CBP (Grewal et al., 1999).

3.5.2. Vía de señalización de la PI3K/Akt

Tras la unión del BDNF a su receptor TrkB (Figura 5), se produce el reclutamiento y activación de varias proteínas de señalización citoplasmáticas como son la familia de proteínas adaptadoras Shc (SH2 domain-containing protein), que se une a otra proteína, Grb2 que a su vez activa Gab1/IRS-1/IRS-2, siendo estas proteínas las encargadas de activar la enzima PI3K (Nonomura et al., 1996; Holgado-Madruga et al., 1997; Korhonen et al., 1999; Yamada et al., 1997; Friedman et al., 1999).

En neuronas, BDNF puede activar la vía PI3K/Akt por un mecanismo dependiente del calcio. El BDNF incrementa los niveles del Ca^{2+} y éste activa la vía PI3K/Akt (Egea et al., 2001), a través de la unión de la CaM con el dominio SH2 localizado en la subunidad reguladora p85 de la PI3K. El complejo Ca^{2+} -CaM produce un cambio conformacional en la PI3K induciendo su activación (Cheng et al., 2003).

Existen numerosos trabajos que han demostrado la implicación de la vía PI3K en los procesos que median la supervivencia celular inducida por BDNF (Nonomura et al., 1996; Finkbeiner 2000; Datta et al., 1999; Kandel et al., 1999): aumento de la expresión de miembros de la familia bcl-2 (Oriike et al., 2001), inactivación de la proteína pro-apoptótica Bad (Datta et al., 1997) o inhibición de la activación de caspasas (Zhou et al., 2000).

La vía PI3K/Akt puede fosforilar al factor de transcripción CREB (Finkbeiner, 2000), permitiendo la transcripción de genes implicados en supervivencia como el bcl-2.

En neuronas se ha observado que el BDNF promueve la supervivencia a través de la activación de la cascada de señalización que incluye la activación de PLC γ y PI3K/Akt y la inducción del gen c-fos (Nonomura et al., 1996).

3.5.3. Vía de señalización de la PLC γ

El BDNF produce una rápida activación de la PLC γ (Figura 5) incrementando los niveles del inositol-trifosfato (IP $_3$) en cultivos de células corticales embrionarias (Widmer et al., 1992 y 1993).

El inositol-trifosfato producido se une a sus receptores en la superficie del retículo endoplásmico de donde se libera al espacio citoplasmático el calcio que proviene de los depósitos intracelulares (Vetter et al., 1991; Berninger et al., 1993; Baxter et al., 1995). En neuronas, la PLC γ fosforila y activa al factor transcripcional CREB (Vetter et al., 1991).

3.5.4. Vía de señalización de las CaMKs

En células cerebrocorticales del día 0 postnatal, BDNF activa la vía de las CaMKs (Finkbeiner et al., 1997). Estas CaMKs actúan como unas CREB quinasas que fosforilan y activan CREB. En cuanto a la isoforma que fosforila CREB existen ciertas divergencias. Aunque algunos autores han demostrado que tanto la CaMKII como la CaMKIV pueden fosforilar CREB (Enslin et al., 1994), mayoritariamente se admite que la CaMKIV es la isoforma que fosforila CREB debido a su localización nuclear (Deisseroth, et al., 1998; Finkbeiner et al., 1997; Wu et al., 2001; Matthews et al., 1994).

La divergencia entre cual de las CaMKs fosforila CREB, está también motivada por los inhibidores “específicos” de cada CaMKs utilizados en los estudios. Existen principalmente 2 tipos de inhibidores de CaMKs, KN62 y KN93. La diana de acción de cada inhibidor en concreto es controvertida. Hay autores que consideran que el KN62 inhibe indistintamente la CaMKIV y

CaMKII (Enslin et al., 1994). Otros autores lo consideran como un inhibidor específico de la CaMKIV (Finkbeiner et al., 1997; Redmond et al., 2002) y otros como inhibidor específico de la CaMKII (Tokumitsu et al., 1990). Lo mismo ocurre con el inhibidor KN93, considerado como inhibidor específico de la CaMKIV (Finkbeiner et al., 1997) o como un inhibidor específico de la CaMKII (Marley et al., 1996; Haisenleder et al., 2003). El BDNF puede activar CREB por la vía de las CaMKs, concretamente por la CaMKIV (Finkbeiner et al., 1997) por un mecanismo independiente de Ras.

3.5.5. Vía de señalización de la AMPc/PKA

En la mayoría de los estudios se ha puesto de manifiesto que las vías activadas por el BDNF son las vías MAPK (ERK 1/2) (Finkbeiner et al., 1997; Friedman et al., 1999; Grewal et al., 1999; Finkbeiner, 2000), PLC γ (Nonomura et al., 1996; Widmer et al., 1992 y 1993) y PI3K/Akt (Friedman et al., 1999; Finkbeiner et al., 2000; Yao et al., 1995) (Figura 5). Algunos estudios han evidenciado que el AMPc y su efector PKA, pueden modular la respuesta de las neuronas a las neurotrofinas (Wang et al., 1998; Gallo et al., 2002; Boulanger et al., 1999). En cultivos de retina de pollo el BDNF induce la activación de la PKA (Gallo et al., 2002).

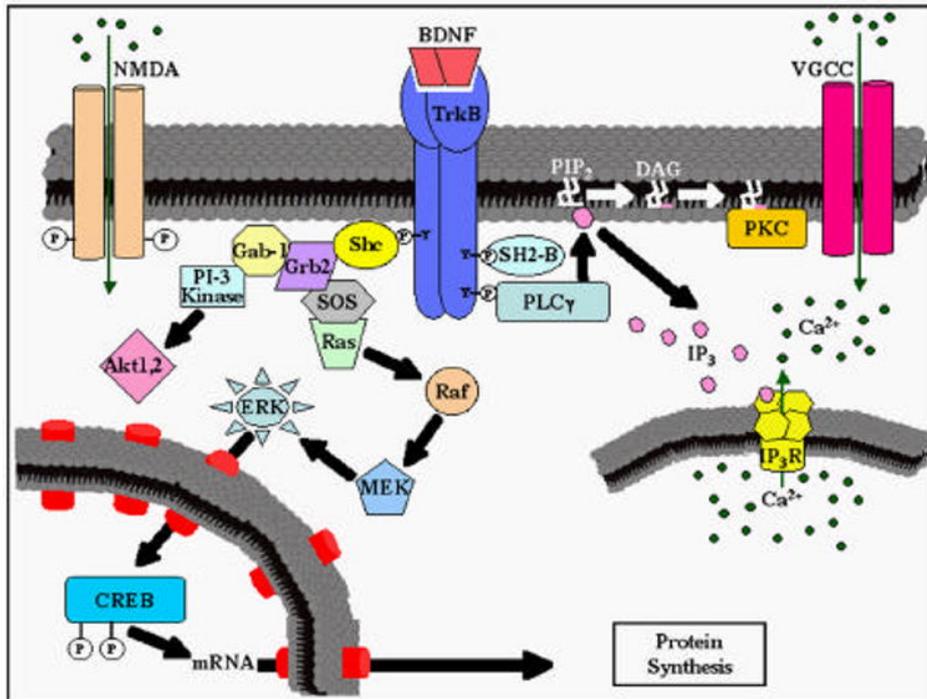


Figura 5. Vías de señalización intracelular activadas por BDNF.

4. EXPRESIÓN GÉNICA REGULADA POR CREB

Las señales extracelulares, ya sea mediante la unión de la molécula ligando a su receptor, o bien mediante despolarización de la membrana, permiten la activación de una serie de moléculas de señalización intracelular, entre las que se encuentran las proteínas quinasas. Muchas de estas vías de señalización convergen en la activación de factores de transcripción que se unen a sus elementos de respuesta específicos presentes en el promotor del gen y modulan su transcripción.

4.1. Factor transcripcional CREB

CREB es una proteína perteneciente a la superfamilia de factores de transcripción bZIP, que se caracteriza por presentar un dominio básico de unión al ADN (Dwarki et al., 1990) y un dominio "leucine zipper" que permite la dimerización de estos factores (Yun et al., 1990; Dwarki et al., 1990). A esta superfamilia pertenecen también otros dos factores de transcripción: el

elemento modulador de la respuesta al AMPc (CREM) y el factor de transcripción activador 1 (ATF-1). Los tres factores presentan una gran homología, especialmente en su dominio bZIP, lo que permite que puedan formar homo y heterodímeros y unirse a una secuencia consenso denominada elemento de respuesta al AMPc (CRE) presente en el promotor de genes que responden al AMPc y/o calcio (Montminy et al., 1990; Sheng et al., 1991; Shaywitz et al., 1999; Mayr et al., 2001).

Aparte del dominio bZIP que permite la unión al ADN y la dimerización, estos factores de transcripción presentan otro dominio que facilita la interacción con coactivadores y otros componentes de la maquinaria transcripcional necesarios para la síntesis de ARN, el dominio KID.

Existen varias isoformas de CREB siendo las más abundantes CREB α y CREB Δ que contienen el dominio bZIP y dos dominios ricos en glutamina denominados Q1 y Q2/CAD (dominio activo constitutivo) que están separados por un dominio denominado KID (dominio inducible de kinasa) (Figura 6).

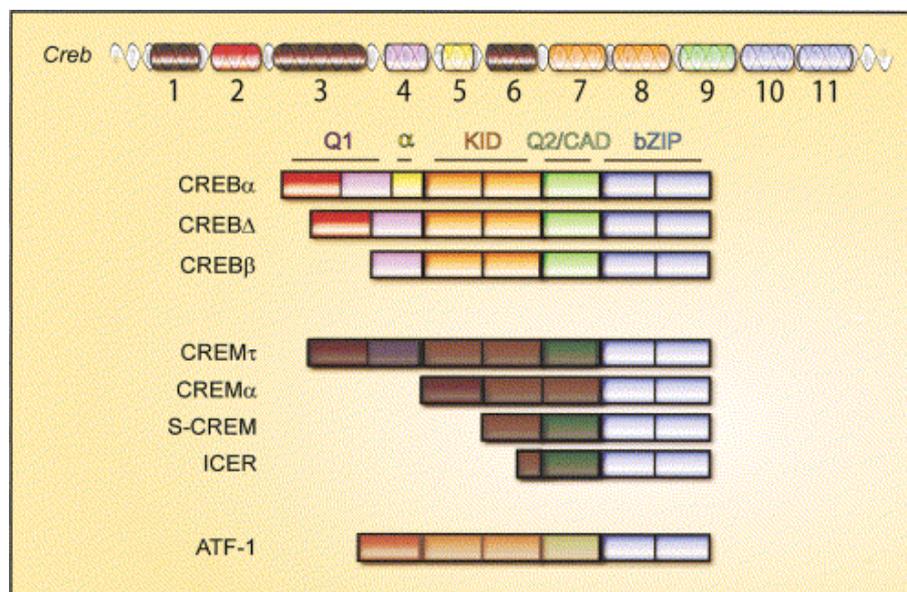


Figura 6. Factores de transcripción pertenecientes a la familia de CREB.

Dentro del dominio KID se encuentra un residuo Ser133 que es activado por una variedad de proteínas quinasas. La primera quinasas conocida que fosforila

CREB en el residuo Ser133 fue la PKA (Montminy et al., 1986a; González et al., 1989b; Yamamoto et al., 1988; Hagiwara et al., 1993; Brindle et al., 1995). Posteriormente, se han encontrado otras quinasas que también fosforilan CREB, como son las quinasas dependientes de calcio/calmodulina (Finkbeiner et al., 1997; Matthews et al., 1994; Bito et al., 1996), la vía Ras/MAPK (Rosen et al., 1994; Xing et al., 1996) y la vía PI3K/Akt (Finkbeiner, 2000).

CREB, aparte de ser fosforilado en el residuo Ser133, puede ser fosforilado en otros dos residuos, Ser142 y 143 (Kornhauser et al., 2002). En cultivos de neuronas corticales se ha observado que tras la despolarización de la membrana con K^+ , CREB es fosforilado en los residuos Ser 133, 142 y 143; en cambio, cuando se exponen las neuronas a BDNF sólo se fosforila en Ser 133. Las quinasas que fosforilan el residuo Ser142 son la CaMKII (Enslin et al., 1994; Sun et al., 1994; Matthwes et al., 1994) y la caseína quinasa II (Parker et al., 1998), que además de fosforilar el residuo Ser142, puede fosforilar el residuo Ser 143.

Esta triple fosforilación sólo ocurre por despolarización de la membrana, y la cinética de fosforilación que presentan los tres residuos de Ser es distinta. Primero se fosforila la Ser133 y a continuación, las Ser142 y Ser143.

La inducción de la expresión génica por CREB requiere la participación de coactivadores, siendo el mejor caracterizado el CBP (proteína de unión a CREB).

El CBP es una proteína de 265 KDa que se une específicamente a través de su dominio KIX al dominio KID de CREB fosforilado (Chrivia et al., 1993). Actúa como un “adaptador” permitiendo la unión y estabilización de CREB a la maquinaria transcripcional (Kwok et al., 1994), además de contribuir al reclutamiento de la ARN polimerasa II y facilitar el desenrollamiento del ADN haciéndolo más accesible a la maquinaria transcripcional debido a su función de histona acetil transferasa (Struhl, 1998; Shaywitz et al., 1999) (Figura 7). Puesto que la señalización por el calcio desencadena la activación de diferentes vías de señalización que fosforilan CREB en Ser133, parece lógico pensar que estas mismas vías puedan activar el CBP. Existen estudios (Hu et

al., 1999) que demuestran la existencia de un dominio dentro de la región N-terminal del CBP, que es fosforilado por la CaMKIV. Aunque se ha visto que presenta otro dominio diana para la PKA, éste parece no ser importante para la activación del CBP y el desencadenamiento de la transcripción génica. El residuo que fosforila la CaMKIV es la Ser301 (Impey et al., 2002).

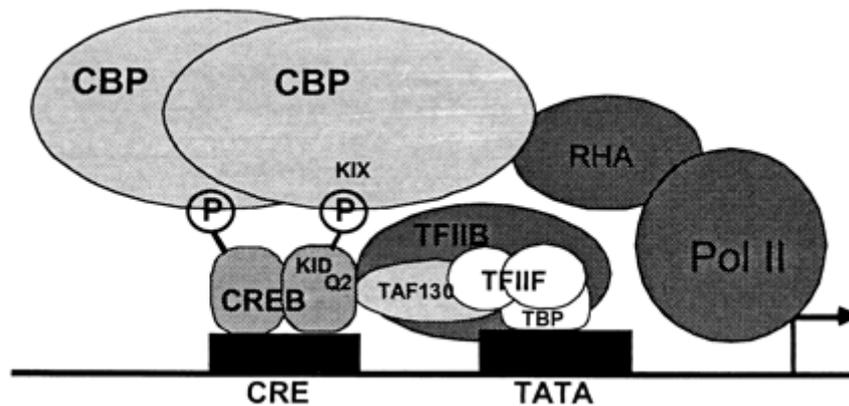


Figura 7. Maquinaria transcripcional implicado en la transcripción dependiente de CREB.

En el modelo propuesto tradicionalmente de la transcripción dependiente de CREB, la fosforilación de la Ser133 permite el reclutamiento del CBP al promotor del gen (Chrivia et al., 1993; Goldman et al., 1997). Hay estudios que ponen de manifiesto que la fosforilación de ambos residuos Ser142 y Ser133, bloquea la transcripción debido a que se produce un cambio conformacional de CREB que impide su unión con el CBP (Chrivia et al., 1993). Hay autores que proponen un mecanismo independiente del co-activador CBP cuando ocurre la triple fosforilación de CREB (Kornhauser et al., 2002). Estos autores sugieren un modelo de transcripción en el que CREB, fosforilado en los 3 residuos, puede interactuar con otro dominio distinto del CBP, además de permitir el reclutamiento de otros co-activadores distintos al promotor del gen.

La activación de CREB (Ser133) por despolarización de la membrana presenta una cinética de activación con una fase temprana y una fase tardía. Esta cinética está regulada principalmente por las vías CaMKIV y Ras/MAPK, siendo la CaMKIV la que fosforila CREB en su fase temprana de activación (Bito et al., 1996; Wu et al., 2001); mientras que la vía Ras/MAPK es la responsable de la activación más tardía (Impey et al., 1998a; Wu et al., 2001).

La activación tardía es la que desencadena la expresión génica dependiente de CREB (Dolmetsch et al., 2001; Impey et al., 1998a; West et al., 2001; Wu et al., 2001). Cuando CREB es activado por el BDNF también participan las dos vías anteriormente citadas, observándose una única fase de activación de CREB (Finkbeiner et al., 1997).

El mecanismo por el que CREB activa la transcripción y lleva a cabo una respuesta celular específica, dependen del tipo de estímulo y está determinado por la interacción con los factores y coactivadores concretos que cooperan con CREB, así como por la actividad de las vías que regulan esos complejos.

4.2. Regulación de la expresión del gen de la SS: Implicación de CREB en la expresión del gen de la SS

En neuronas, los neurotransmisores, factores de crecimiento y la actividad eléctrica modifican la expresión de una serie de genes denominados genes de expresión temprana (IEGs). Muchos de ellos codifican factores de transcripción que regulan la expresión de otros genes de expresión tardía (Sheng et al., 1990). Entre los genes de expresión temprana que se activan se encuentran c-fos y c-jun cuyas proteínas forman el complejo AP-1 (proteína activadora 1) (Lee et al., 1988). Este complejo modula la transcripción de otros genes que contienen un sitio de unión AP-1 en su secuencia y que pueden ser inducidos durante horas o días. Entre los genes de expresión tardía se encuentran los que codifican factores de crecimiento y sus receptores, proteínas que regulan el ciclo celular como las ciclinas (Sherr et al., 1995), enzimas que catalizan la síntesis de neurotransmisores y neuropéptidos como son la SS y el VIP (Sheng et al., 1990).

En el promotor de la SS, además de la secuencia CRE, existe un secuencia TRE donde se une el complejo AP-1 que es un importante activador transcripcional y que puede actuar como cofactor de CREB y facilitar la inducción del gen de la SS. Existen elementos represores, localizados entre los nucleótidos -750 y -550 que son importantes en la modulación adecuada de

los niveles de expresión del gen de la somatostatina en el sistema nervioso (Vallejo et al., 1995b).

El elemento CRE además de ser reconocido por el factor transcripcional CREB, puede también ser reconocido por otros factores de transcripción como son el C/EBP β y C/ATF que funcionan como potentes transactivadores de la transcripción del gen de la SS en condiciones basales a través de mecanismos independientes de CREB (Vallejo et al., 1995a).

Tanto la despolarización de la membrana como los factores neurotróficos fosforilan CREB a través de la activación de las vías de señalización intracelular específicas que cada estímulo activa. Independientemente de las vías que se activen, todas confluyen en un punto común, la activación del factor transcripcional CREB que una vez activado interacciona con el CBP, formando el complejo CREB-CBP que se une al elemento CRE del promotor e inicia la transcripción génica. Gracias a la función de histona acetil transferasa del CBP, se produce un cambio conformacional en la estructura de la cromatina que permite el acoplamiento de la maquinaria transcripcional al promotor.

5. ACTIVIDAD Y PLASTICIDAD NEURONAL

La plasticidad neuronal es una característica del cerebro que permite que la estructura y función neuronal se adapte a determinados patrones de estimulación eléctrica.

La actividad cerebral inducida por despolarización y el consiguiente flujo del calcio al citoplasma, tienen un fuerte impacto en la plasticidad neuronal con consecuencias funcionales en supervivencia, aprendizaje y memoria. Para promover estos cambios permanentes, las señales del calcio regulan la expresión de nuevos genes (West et al., 2001). Numerosos estudios han evidenciado (Ginty, 1997; West et al., 2002) que la actividad neuronal promueve la activación transcripcional de genes de expresión temprana, entre los que se han identificado al menos 50 tipos. Algunos de estos genes, como c-fos, codifican factores de transcripción que regulan la expresión de genes de expresión tardía. Los genes de expresión tardía codifican proteínas que afectan

distintos aspectos de la función neuronal, y que incluyen factores de crecimiento, enzimas sintetizadoras de neurotransmisores, canales iónicos, proteínas de la vesícula sináptica y proteínas estructurales. Algunos productos de estos genes son importantes en supervivencia y diferenciación, sinaptogénesis, comportamiento, aprendizaje y memoria.

El AMPc, a través de sus acciones en la expresión génica, participa en la consolidación de varios tipos de memoria, tanto en mamíferos como en animales inferiores, *Drosophila* o *Aplysia*. Numerosos estudios han evidenciado la importancia del sistema CREB-CRE en la consolidación de la memoria a largo plazo (Impey et al., 1998b; Stevens, 1994).

El BDNF, uno de los genes inducidos por actividad neuronal mejor estudiados, es un mediador de la plasticidad sináptica dependiente de actividad (Thoenen, 1995). La actividad neuronal puede modular los efectos de las neurotrofinas en supervivencia neuronal, morfología dendrítica y eficacia sináptica. Ratones con delección del gen del BDNF tienen afectación de LTP (Long Term Potentiation) en hipocampo (Korte et al., 1995). El efecto de la despolarización sobre supervivencia neuronal está mediado por el BDNF (West et al., 2002). El BDNF inducido por despolarización de la membrana activa la expresión de otros genes efectores. En este sentido, la inducción de la expresión de la SS por despolarización está mediada por el BDNF, según hemos observado en nuestro laboratorio (Villuendas, 1998). La SS participa en funciones de neurotransmisión, secreción y proliferación (Moller et al., 2003). Funcionalmente, la SS está implicada en varios desórdenes del SNC como Alzheimer, Huntington y Parkinson.

OBJETIVOS

La actividad neuronal, a través de la inducción de nuevos genes, permite el desarrollo y función del cerebro tanto a nivel de la estructura de la neurona como de su función. De esta manera, el desarrollo del SNC está predeterminado por la existencia de un programa de expresión génica que va estableciendo la síntesis coordinada ontogénicamente de factores neurotróficos que promueven la maduración, diferenciación y las respuestas adaptativas de las neuronas adultas. Los factores neurotróficos modulan sus respuestas promoviendo en sus células diana, entre otros factores, la síntesis de neuropéptidos.

En estudios previos demostramos que la actividad neuronal inducida por despolarización de la membrana con altas concentraciones de K^+ , inducía la síntesis de la SS que depende además de la inducción previa de BDNF. BDNF es un factor neurotrófico cuya activación es enormemente sensible a la actividad neuronal.

En el presente trabajo se ha planteado **estudiar los mecanismos intracelulares mediante los que la despolarización de la membrana con K^+ y el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) regulan la expresión génica de la SS durante el desarrollo del sistema nervioso central**. Para ello, se han establecido los siguientes objetivos:

1. **Identificar las vías de señalización intracelular que participan en la inducción del gen de la SS por la activación de la membrana por despolarización con K^+** . Con este objeto, se ha seguido el siguiente procedimiento:
 - 1.1 Identificar las vías de señalización intracelular que son activadas por despolarización con K^+ .
 - 1.2 Analizar el efecto de la despolarización de la membrana con K^+ sobre la activación del factor transcripcional CREB, dado su importante papel en la activación de genes por actividad neuronal inducida por despolarización de la membrana con K^+ . Analizar si

la activación de CREB se produce en las células somatostatinérgicas.

1.3 Estudiar los mecanismos de señalización intracelular que activan CREB por despolarización de la membrana con K^+ .

1.4 Identificar qué vías de señalización intracelular activadas por despolarización de la membrana median la inducción del ARNm de la SS.

2. Investigar si la inducción del ARNm de la SS por despolarización con K^+ se debe o no a un estímulo de su actividad transcripcional.

2.1 Establecer las secuencias del promotor del gen de la SS que median su activación transcripcional por despolarización con K^+ .

3. Estudiar las vías de señalización intracelular que intervienen en la inducción del gen de la SS por BDNF. Para ello, se ha seguido el siguiente procedimiento:

3.1 Identificar las vías de señalización intracelular que son activadas por BDNF.

3.2 Analizar los mecanismos intracelulares mediante los que BDNF activa el factor transcripcional CREB.

3.3 Identificar las vías de señalización intracelular que participan en la inducción del ARNm de la SS por BDNF.

4. Investigar qué secuencias del promotor del gen de la SS regulan su activación transcripcional por BDNF.

4.1 Estudiar si BDNF ejerce una regulación transcripcional del gen de la SS.

MATERIAL Y MÉTODOS

I. CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS CEREBROCORTICALES DE EMBRIONES DE RATA (E-17).

Material biológico

Para el cultivo de células cerebrocorticales se utilizaron ratas Sprague-Dawley , en el día 17 de vida embrionaria (E17). Tras anestesiar a las madres con Fluothane (halotano) (AstraZeneca Farmacéutica, S.A, España), se extrajeron los embriones por procedimientos quirúrgicos asépticos, y se colocaron en placas Petri con solución salina de Hank's (Biowhittaker, Walkersville, MD, USA). Después de ser extraídos de los sacos embrionarios, los embriones se decapitaron y se diseccionaron los hemisferios cerebrales con la ayuda de una lupa binocular. Tras ser liberados de las meninges, se depositaron en tubos cónicos estériles que contenían 10 ml de solución salina de Hank's (Biowhittaker).

Técnica del cultivo

Una vez realizada la extracción y separación de los hemisferios cerebrales se trasladó el material obtenido a una campana de flujo laminar. Después de lavar los tejidos en solución salina de Hank's, se resuspendieron en medio DMEM (GibcoBRL, Invitrogen, Life Technologies, Paisley, Escocia, Reino Unido) suplementado con sueros y se dispersaron mecánicamente con pipeta de 10 ml unas 4-5 veces. Esta suspensión celular se transfirió a una placa Petri y para su dispersión se realizaron 3 pases a través de una aguja de 20 gauges. La suspensión celular se recogió en un tubo de 15 ml y se centrifugó durante 5 minutos a 750 rpm; tras decantación del sobrenadante, se resuspendieron las células en 10 ml de medio de cultivo y se completó su dispersión mediante 2 pases a través de una aguja de 21 gauges de diámetro y 1 pase a través de una aguja de 22 gauges. Esta suspensión celular se diluyó en nuevo medio de cultivo a una concentración apropiada dependiendo del estudio a realizar:

- Para los *estudios de señalización celular y del análisis del ARNm*, la concentración de células fue de $5-6 \times 10^6$ células/1.5 ml, que se sembraron en placas Petri de 35 mm (Corning Glass Work, Corning NY, USA).
- Para los *estudios de transfecciones transitorias de cultivos primarios de células cerebrocorticales*, la concentración inicial fue de 10×10^6 células/5 ml, que se sembraron en placas Petri de 100mm (Corning Glass Work). Tras 72 horas de incubación, se levantaron las células y se sembraron a una densidad de 3×10^6 células/3 ml, en placas Petri de 60 mm (Corning Glass Work).
- Para los *estudios inmunocitoquímicos*, las suspensiones celulares se diluyeron en medio de cultivo hasta alcanzar una concentración de 3×10^4 células/0,5 ml, realizándose la siembra en placas multipocillo (24 pocillos, Corning Glass Work).

Todas las placas utilizadas en los estudios se trataron previamente con poli-L-Ornitina a una concentración de 0,015 mg/ml (Sigma, St.Louis, MO, USA) durante 16-20 horas (en el caso de los estudios de señalización celular, análisis del ARNm y de transfecciones transitorias) o con poli-D-Lisina (Sigma) a una concentración de 15 mg/ml durante 16-20 horas (para los estudios inmunocitoquímicos). Posteriormente se lavaron con agua destilada estéril y se dejaron secar en condiciones estériles hasta su utilización.

Medio de cultivo

Para los estudios de señalización celular, análisis del ARNm de SS e inmunocitoquímicos, los cultivos se realizaron en DMEM glucosa 4,5 g/l (GibcoBRL), suplementado con insulina 80 mU/ml (Roche Diagnostic GMBH, Roche Applied Science, Mannheim, Alemania), L-glutamina 200 mg/ml (Biowhittaker), penicilina-estreptomina 100 U/ml (Biowhittaker), suero fetal bovino (FCS) 15% (GibcoBRL).

El FCS se utilizó sólo durante los períodos de preincubación, no estando presente nunca durante los experimentos. Para los estudios de transfecciones transitorias, el medio inicial que se utilizó fue el anteriormente descrito, que se mantuvo durante 5 horas, reemplazándose posteriormente por un medio DMEM glucosa 4,5 g/l, suplementado con penicilina- estreptomycin 50 U/ml, piruvato sódico 1% (Sigma), N1 1% (Sigma) y FGF-b 20 ng/ml (PeproTech EC, Londres, Reino Unido). El FGF-b se utilizó sólo durante los períodos de preincubación, suprimiéndolo durante los experimentos.

Todos los medios de cultivo utilizados se prepararon frescos antes de cada experimento y se filtraron en condiciones estériles en unidades de filtración (0,22 µm, Millex[®]-GS, Millipore Ibérica, Madrid, España) antes de su uso.

Procedimiento del cultivo

Las células se incubaron en el medio descrito, suplementado con 15% FCS, en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂, saturada de humedad y a 37°C. El tiempo de incubación con los sueros varió dependiendo del tipo de experimento. Tras este período de incubación se retiraron los medios, se añadió nuevo medio DMEM libre de sueros y se incubaron las células durante el tiempo y las condiciones apropiadas para cada diseño experimental.

Para los estudios de transfección, la células se mantuvieron durante 5 horas con sueros y posteriormente se las cambió al medio anteriormente descrito con FGF-b, tratándose las células durante el tiempo y las condiciones apropiadas para cada experimento.

Al final de cada experimento, las células se procesaron de diferentes formas, dependiendo de los parámetros a analizar y de acuerdo a las técnicas que se detallan mas adelante.

II. CULTIVO DE LA LÍNEA CELULAR PC12trkB

Una parte de los estudios de transfección celular transitoria se realizó en la línea celular PC12 que expresa el receptor para BDNF, trkB (línea celular exis-

tente en nuestro laboratorio). Esta línea celular procede de un feocromocitoma adrenal de rata.

Medio de cultivo

Los cultivos de las células PC12trkB se realizaron en medio DMEM con 1 g/l de glucosa (GibcoBRL) suplementado con: L-glutamina 200 mM, FCS 6%, suero de caballo (HS) 6% (GibcoBRL) y genitocina G418 0,4 mg/ml (Sigma).

Procedimiento del cultivo

Las células PC12trkB se crecieron en el medio descrito, en frascos de 75 cm² (Sarstedt Int., Newton, NC, USA) en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂, saturada de humedad a 37°C. El medio de cultivo se reemplazó cada dos días, llevándose a cabo nuevos pases celulares cada tres o cuatro días según la confluencia celular. Cuando se alcanzó la densidad celular apropiada, las células se despegaron de los frascos de mantenimiento mediante espátulas de plástico. La suspensión celular se centrifugó durante 5 minutos a 750 rpm y las células resultantes se resuspendieron en medio de cultivo completo y se realizó el conteo celular en cámara de Neubauer. A continuación las suspensiones celulares se diluyeron en nuevo medio de cultivo hasta alcanzar la concentración de 7×10^5 células/1,5 ml, procediéndose finalmente a la siembra en placas Petri de 35 mm. Después de 24 horas de incubación se retiraron los medios, se lavaron las placas con medio sin sueros y se añadió 1,4 ml de medio sin sueros. Por último se añadió la mezcla de transfección a las placas. Tras 5 horas de incubación a 37°C, se les añadió a las placas 1 ml de medio con sueros. Después de 48 horas de incubación se retiraron los medios, se lavaron las placas con medio sin sueros y por último se añadió nuevo medio de cultivo libre de sueros para realizar los tratamientos con el BDNF.

Al final de cada experimento, las células se procesaron para la determinación de la actividad transcripcional del promotor del gen de la SS mediante la realización de los ensayos de actividad CAT y β -galactosidasa.

III. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

Estos estudios se llevaron a cabo en cultivos primarios de células cerebrocorticales en placas de 35 mm de diámetro.

Obtención de extractos celulares totales

Tras los diferentes tratamientos, las células se lavaron con PBS y se recogieron en solución de lisis [HEPES 50 mM, pirofosfato sódico 10 mM (Sigma), FNa 100 mM (Sigma), EDTA 2 mM (Sigma), VO_4Na_3 2 mM (Sigma), triton 1% (Bio-Rad Laboratories, CA, USA), glicerol 10% (Merck KgaA, Darmstadt, Alemania), PMSF 2mM (Sigma), aprotinina 10 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma), leupeptina 10 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma)] y se incubaron durante 15 minutos en hielo; la lisis se completó mediante una breve sonicación de 20 segundos. A continuación, los extractos celulares se centrifugaron a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4°C y el sobrenadante se guardó a -20°C hasta su utilización.

Cuantificación de las proteínas

Con el fin de aplicar la misma cantidad de proteínas en cada gel, para normalizar los datos, se procedió a la cuantificación de proteínas totales en el sobrenadante por el método de Bradford. La absorbancia a 595 nm se midió en un espectrofotómetro Génesis™ 5(Spectronic™ Instruments, Inc., Rochester, NY, USA) y se empleó albúmina sérica bovina para construir la curva patrón.

Electroforesis y transferencia de las proteínas

La preparación de los geles se realizó siguiendo los protocolos habituales para geles de proteínas (Laemmli, 1970). El método de electroforesis se basó en un sistema discontinuo donde los proteínas se empaquetan en un gel de alineamiento (“stacking”) antes de entrar en el gel de separación lo que permite una excelente resolución.

En la preparación del gel de separación se mezcló la cantidad apropiada de poliacrilamida (30% acrilamida (Bio-Rad) y 0,8% bisacrilamida (Bio-Rad)), para una concentración final del 10%, Tris-ClH 0,4 M pH 8,8, SDS 0,1% (ICN Biomedicals, Inc, Ohio, USA), persulfato amónico (PSA) 0,1% (Sigma) y 10 μ l de TEMED (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Reino Unido). La solución del gel de alineamiento consistió en una mezcla más diluida de poliacrilamida al 3%, Tris-ClH 0,125 M pH 6,8 y SDS 0,1%. Los agentes polimerizantes PSA y TEMED se añadieron en último lugar.

Para la electroforesis se prepararon los extractos de proteínas (10-30 μ g proteínas/muestra) igualando el volumen final con buffer de lisis y posteriormente, añadiendo tampón de carga 6x (Tris-ClH 0,5 M pH 6,8, SDS 10%, glicerol 30% y β -mercaptoetanol 6%, azul de bromofenol 0,012%) para obtener una concentración final 1x. A continuación, se inactivaron las proteasas endógenas y se desnaturalizaron las proteínas manteniendo las muestras a 90°C durante 5 minutos antes de ser aplicadas en el gel.

La electroforesis se realizó a 35 mA en un tampón compuesto por Tris 25 mM pH 8,3, SDS 1% y glicina 192 mM, en constante recirculación.

Concluida la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de Polyscreen^R de PVDF (polivinil difluoruro) de HybondTM-P (Amersham Pharmacia Biotech) mediante una corriente continua de 20 V aplicada durante 16 horas a 4°C y en un tampón que contenía Tris base 25 mM, glicina 190 mM y metanol 20%.

Detección de las proteínas (Inmunoblot)

Una vez transferidas las proteínas, se procedió a la detección de las mismas mediante el uso de anticuerpos específicos. Para ello primero se incubó la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente, con una *solución de bloqueo* [leche desnatada 5% (Bio-Rad Laboratories), Tris-ClH 10 mM pH 7,5, ClNa 100 mM, Tween-20 0,5% (Merck)], con el fin de bloquear los sitios de unión inespecífica de la membrana. Posteriormente, la membrana se incubó

con el *primer anticuerpo fosforilado* durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C (dependiendo del anticuerpo), diluido en Tris-ClH 10 mM pH 7,5, ClNa 100 mM, Tween-20 0,05% y leche desnatada 0,5%. Tras esta incubación se realizaron tres lavados de 10 minutos en *solución de lavado*, (Tris-ClH 10 mM pH 7,5, ClNa 100 mM y Tween-20 0,1%), y posteriormente, se procedió a la incubación de la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente con el *anticuerpo secundario* específico conjugado con peroxidasa y diluido en la misma solución que el anticuerpo primario. A continuación las membranas se lavaron tres veces durante 10 minutos con PBS. La detección de las proteínas se realizó incubando las membranas durante 5 minutos con el sustrato de la peroxidasa que se encuentra unida al anticuerpo secundario; de este modo se produce una reacción de quimioluminiscencia y la luz producida es capaz de impresionar una película de radiografía (Kodak, X-OMAT R, Rochester, NY, USA). Como sustrato de la reacción de quimioluminiscencia se utilizó el reactivo ECL plus (Amersham Pharmacia Biotech). Después de revelar la película, las bandas correspondientes a las proteínas específicas se digitalizaron con un analizador de imagen (Scanner S700, OKI, España) y la intensidad de cada banda se cuantificó mediante su análisis densitométrico en un programa informático (Adobe Photoshop cs versión 8,0,1 y NIH Image-J).

Para confirmar que los cambios observados en los niveles de la proteína fosforilada eran debidos a cambios en la fosforilación y no a diferencia de carga proteica, las membranas se lavaron con Restore™ Western Blot Stripping Buffer (Pierce, Rockford, Illinois, USA) durante 45-50 minutos a temperatura ambiente con objeto de eliminar los anticuerpos fosforilados, y se incubaron en presencia de anticuerpos que reconocían específicamente las formas fosforiladas y no fosforiladas de las proteínas quinasas respectivas. Las autorradiografías se obtuvieron mediante exposición a temperatura ambiente en placas X-Omat K (Kodak) con una pantalla intensificadora y durante un tiempo variable entre 5 y 10 minutos. Las señales de detección fueron digitalizadas y analizadas como se ha expuesto anteriormente.

Los resultados obtenidos se expresaron como unidades densitométricas arbitrarias corregidas respecto a la señal de la banda de proteínas quinasas totales, que fue considerada como control de carga.

Detección inmunológica de las proteínas quinasas

Después de cada tratamiento, se obtuvieron los extractos de proteínas siguiendo el protocolo descrito anteriormente. La presencia de las formas activas de cada proteína quinasa objeto de estudio se analizó mediante Western blot siguiendo el protocolo descrito en el apartado anterior. Los anticuerpos primarios específicos utilizados en estos estudios fueron los siguientes: anticuerpo monoclonal que reconoce las formas fosforiladas de MAPK (ERK 1/ 2) (Sigma); anticuerpo policlonal que reconoce la forma fosforilada de CREB (Ser¹³³) (Cell Signaling Technology™, Danvers, MA, USA); anticuerpo policlonal que reconoce la forma fosforilada de Akt (Ser⁴⁷³) suministrado por Cell Signaling Technology™.

Para reconocer la cantidad total de proteína quinasa (fosforilada y no fosforilada), los anticuerpos utilizados fueron los siguientes: anti-MAPK (ERK 1/ 2) (Sigma), anti-CREB (Cell Signaling Technology™) y anti-Akt (Cell Signaling Technology™).

Anticuerpos primarios empleados en el Western Blot

| ANTICUERPO | DILUCIÓN | PROCEDENCIA |
|------------------------------|-----------|---------------------------|
| ERK 1 /2-P | 1: 15.000 | SIGMA |
| ERK 1 /2 | 1: 10.000 | SIGMA |
| Akt-P (Ser ⁴⁷³) | 1: 1.000 | Cell Signaling Technology |
| Akt | 1: 1.000 | Cell Signaling Technology |
| CREB-P (Ser ¹³³) | 1: 500 | Cell Signaling Technology |
| CREB | 1:500 | Cell Signaling Technology |

IV. ANÁLISIS DEL ARNm POR NORTHERN BLOT

Procesamiento de las muestras

Una vez finalizado cada experimento, las placas se mantuvieron en frío, se retiró el medio de cultivo y se añadió a las placas solución de Hank's. Se recogieron las células en esta solución con la ayuda de una espátula de plástico centrifugándose a 14.000 rpm durante 20 minutos. Después se decantó el sobrenadante y los pellets se almacenaron a -80°C hasta su utilización para la extracción del ARN.

Extracción de ARN total

Para aislar el ARN total de los tejidos se utilizaron dos métodos de extracción: el método de extracción con guanidina-tiocinato-fenol cloroformo descrito por Chomczynski y Sacchi (Chomczynski, 1987), y el método de extracción con Trizol Reagent (Invitrogen Life Technologies). El ARN total, una vez extraído, se resuspendió en agua DEPC (dietil pirocarbonato 0,01%). Se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm, y se estimó su pureza mediante el cociente de la absorbancia a 260 nm y 280 nm. Las muestras cuyo cociente 260/280 no se encontraba en el rango 1,7-2,1 fueron desechadas (contaminación proteica).

Para el análisis del ARNm se utilizaron “pooles” de ARN total procedentes de al menos tres placas. El análisis se repitió al menos tres veces en “pooles” de distintos experimentos. Se realizó análisis estadístico de los resultados obtenidos.

Gel desnaturalizante

El gel de agarosa al 1% se realizó siguiendo los protocolos habituales para geles de ARN con formaldehído (Maniatis et al., 1982). En la preparación del gel se mezcló la cantidad apropiada de agarosa (Bethesda Research Laboratories, BRL, Gaithersburg, MD, USA), con agua destilada solubilizándola por ebullición. Cuando la temperatura bajó a 60°C, se añadieron los siguientes componentes: MOPS 1x [ácido 3-(N-morfolinol, propanosulfónico) 20 mM, acetato sódico 10 mM, EDTA 1 mM pH 7] y formaldehído 0,22 M. Por último se añadió bromuro de etidio (500 ng/ml) como marcador, para la identificación de las cantidades reales de ARN total aplicadas de cada muestra.

Preparación y transferencia de las muestras

La cantidad de ARN total utilizada fue de 7 µg. El ARN de cada muestra se concentró en una evapo-concentradora (Savant Instruments, Farmingdale, NY, USA) y se resuspendió en 9 µl de un tampón desnaturalizante compuesto por MOPS 1x, formaldehído 2,2 M, formamida 50% y tampón de carga 1x (glicerol

50%, azul de bromofenol 0,4%, xylene cyanol 0,4% y EDTA 1 mM pH 8). Las muestras se incubaron a 65°C durante 15 minutos, para posteriormente aplicarlas en el gel. La electroforesis se realizó a 35 mA en un tampón compuesto por MOPS 1x y formaldehído 15% en constante recirculación.

Concluída la electroforesis, el gel se lavó durante 30 minutos en TAE 1x (Tris 10 mM, acetato sódico 5 mM, EDTA 0,5 mM pH 8) para eliminar el formaldehído. Posteriormente se realizó la transferencia a una membrana de nylon Nytran-N13 (Schleider-Schuell, Keene, USA), en tampón TAE 1x a 4°C y mediante una corriente continua de 15 V aplicada durante 16 horas. Finalizada la transferencia, las membranas se fijaron con luz ultravioleta (0,12 J) en un Cross-linker UV (Hoefer Scientific Instruments, CA, USA). Con el fin de constatar que las cargas del ARN total eran homogéneas, se fotografiaron las bandas del ARNr de las membranas, mediante visualización bajo luz ultravioleta. Las membranas así validadas se lavaron en una solución de SSC 0,2x (SSC 1x; ClNa 0,15 M, citrato sódico 15 mM pH 7) y SDS 10% durante 30 minutos antes de realizarse la hibridación con la sonda marcada.

Construcción de las sondas e hibridación

Los niveles del ARNm de la SS se cuantificaron por hibridación de las membranas obtenidas por Northern blot con sondas específicas antisense de ARN, tras marcaje con UTP-P^{32α} por el método del kit Riboprobe, según las recomendaciones de la casa comercial (Promega, Boehringer Ingelheim, Madison, Wi, USA).

El ADNc de la SS se encontraba insertado en el vector de expresión pSP65 (Goodman et al., 1983) y fue linearizado con la enzima Sal I. La ribosonda antisense marcada con UTP- P^{32α} se obtuvo mediante la utilización de la polimerasa SP6.

Las membranas se prehibridaron durante 3-4 horas a 65°C en una solución compuesta por SSC 5x, fosfato 50 mM pH 6,5, solución Denhardt's 10x, formamida desionizada 50% y 500 µg/ml de ADN desnaturalizado de esperma de salmón. La hibridación se realizó durante 20 horas a igual temperatura y en

una solución similar a la anterior pero con 100 µg/ml de ADN desnaturalizado y 6×10^6 cpm/ml de sonda marcada de la SS. Concluida la hibridación, las membranas se lavaron durante dos períodos de 30 minutos a 65°C en una solución de SSC 2x y SDS 0,1% y otras dos veces en SSC 0,2x y SDS 0,1%. Por último, se obtuvieron las autorradiografías de las membranas mediante exposición en placas X-Omat K (Kodak) con dos pantallas intensificadoras, a -80°C y durante un período de tiempo variable comprendido entre 1- 3 días.

Para comparar la uniformidad de la carga aplicada y transferida del gel desnaturalizante, las membranas se hibridaron con una sonda de ADN antisentido de ARNr 18S marcada con d-CTP-P^{32α}. Las señales obtenidas en las autorradiografías se digitalizaron mediante un analizador de imagen (S700 Scanner, OKI, España) y posteriormente se cuantificaron mediante su análisis densitométrico en un programa informático (Adobe-Photoshop 8,0,1 y NIH ImageJ). Los resultados obtenidos se expresaron como unidades densitométricas arbitrarias corregidas respecto a la señal de la banda 18S que fue elegida como control de carga.

V. TÉCNICAS INMUNOCITOQUÍMICAS

Fijación y preparación de los cultivos celulares

Los estudios inmunocitoquímicos se efectuaron sobre cubreobjetos alojados en placas multipocillo (24 pocillos, Corning Glass Work). Transcurrido el tiempo de incubación establecido se retiró el medio de cultivo y las células se fijaron mediante inmersión en una solución de paraformaldehído al 4% en PBS 0,1 M pH 7,4, durante 15 minutos a 4°C. Tras eliminar los restos de fijador mediante lavados con PBS 0,1 M (3x5 minutos), las células se incubaron con una solución de 0,05% de Tritón X-100 en PBS 0,1 M durante 20 minutos a temperatura ambiente con el fin de permeabilizar la célula y así permitir la entrada del anticuerpo a la célula. Después de nuevos lavados en PBS (3x5 minutos), y para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos, las células permanecieron durante 20 minutos en una solución de bloqueo conteniendo

5% de suero normal de cabra (SNCa) (DAKO, Barcelona, España), en PBS 0,1 M y finalmente se sometieron a análisis inmunocitoquímico.

Inmunocitoquímica: Técnica de inmunofluorescencia

Se realizaron técnicas de inmunofluorescencia para la detección de formas fosforiladas de CREB (Ser¹³³) (mouse monoclonal IgG_{1κ}) (Upstate) y para la identificación del tipo celular donde se localizaban las formas activadas.

Transcurrido el período de bloqueo, las células se incubaron con el correspondiente *anticuerpo primario monoclonal fosforilado* (dilución 1:100) durante 16-20 horas a 4°C. A continuación las células se lavaron con PBS 0,1 M (3x5 minutos) y se mantuvieron durante 20 minutos a temperatura ambiente en una solución de bloqueo conteniendo 5% de SNCa, y posteriormente se incubaron con un anticuerpo secundario fluorescente anti IgG de ratón (obtenido en cabra) conjugado con fluorocromo (Alexa Fluor® 568 goat anti-mouse IgG (H+L) (Molecular Probes, Inc, OR, USA), a una dilución 1:500 en una solución de 5% SNCa y 0,1% de Tritón X-100 en PBS 0,1 M, diluida 1:10. Tras la incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad (a partir de éste momento todo el procedimiento se realizó en oscuridad), las células se lavaron con PBS 0,1 M (3x5 minutos) y se volvieron a mantener durante 20 minutos a temperatura ambiente en una solución de bloqueo conteniendo 5% de SNCa. Posteriormente para identificar las células somatostatinérgicas se incubó con un anticuerpo anti-SS (anticuerpo policlonal producido en nuestro laboratorio, Tolón et al., 1994) a una dilución 1:100 en una solución de 5% SNCa y 0,1% de Tritón X-100 en PBS 0,1 M, diluida 1:10 durante 16-20 horas a 4°C.

Finalizada la incubación, las células se lavaron con PBS 0,1 M (3x5 minutos), se volvieron a bloquear y se incubaron con el *anticuerpo secundario policlonal fluorescente* anti IgG de conejo (obtenido en cabra) conjugado con fluorocromo (Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) (Molecular Probes), a una dilución 1:500 durante 30 minutos. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS 0,1M (3x5 minutos) y por último los cubreobjetos se

montaron en portaobjetos sobre una gota de sustancia antidecolorante *no-fade* (50mg de p-fenilendiamina disuelta en PBS 0,01M- glicerina 1:9 ajustando a pH 8 con tampón carbonato-bicarbonato 0,5 M, pH 9,2) que contenía bisbenzimidida (Hoechst 33342, que tiñe todos los núcleos al unirse al ADN) a una concentración de 3×10^{-5} M.

Las preparaciones fueron analizadas en un microscopio de fluorescencia Nikon, Eclipse E400 (Tokio, Japón) equipado con filtros para detectar la fluorescencia. Las zonas de interés se fotografiaron con una cámara fotográfica Nikon Digital Sight DS-L (Tokio, Japón).

VI. SUBCLONAJE DEL PROMOTOR DE SS

Vectores utilizados

La construcción de los plásmidos de expresión que contenían las distintas secuencias del promotor de la SS unidas al gen reportero de luciferasa, se realizó a partir del ADNc del promotor de la SS generado por PCR como se detalla a continuación. El subclonaje del promotor de la SS se ha realizado en colaboración con el laboratorio del Dr. Mario Vallejo, Instituto de Investigaciones Biomédicas (CSIC).

Para la obtención del ADNc se realizó una PCR a partir del plásmido pOCAT (5,26 Kb) que tenía clonado el promotor de la SS.

En la PCR se utilizaron primers específicos para generar un sitio XhoI y HindIII. La secuencia del cebador sentido que se utilizó para generar el sitio XhoI fue:

5'- CAC TCG AGC AGG AAA CAG CTA TGA C - 3'

Y la secuencia del cebador antisentido que se utilizó para incorporar el sitio HindIII fue:

5'- CAA AGC TTT AGC TTC CTT AGC TCC TGA - 3'

Las condiciones de la PCR utilizadas fueron 95°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos a 95°C durante 30 segundos, 56°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos, seguido de una incubación a 72°C durante 7 minutos. El producto de la PCR fue digerido con XhoI y HindIII (Invitrogen™, Life Technologies) y clonado en el plásmido pGL2-Basic (5,59 Kb) (Promega, Madison, WI, USA) para la expresión del gen reportero de la luciferasa bajo el control del promotor de la SS. De esta forma se obtuvieron las siguientes construcciones:

SS65-Luc, SS65 Δ CRE-Luc, SS900-Luc y SS900 Δ CRE-Luc.

Como control de la eficiencia de transfección se utilizó el vector de expresión pRSV-Luc, que contiene el gen que codifica para la enzima luciferasa; y para normalizar los datos obtenidos de luciferasa, se realizó la cotransfección con el vector renilla y se midió su actividad.

Transformación, crecimiento bacteriano y extracción del ADN plasmídico

Antes de comenzar con los estudios de transfección transitoria se amplificaron los vectores. Se transformaron cepas bacterianas competentes (XL-2 Blue células ultracompetentes, Stratagene, La Jolla, CA, USA) en presencia de 5- 10 μ g de vector durante 30 minutos en hielo, tras lo cual se realizó un choque de calor, manteniendo los tubos a 37°C durante 4 minutos seguido de 5 minutos en hielo. A continuación se añadió a cada tubo 1 ml de medio LB [bactotripton 2% (DIFCO Soria Melguizo, Madrid, España), extracto de levadura 0,5% (DIFCO Soria Melguizo), KH₂PO₄ 15 mM (Merck), K₂HPO₄ 80 mM (Merck), glicerol 0,5% (Merck)] y se dejó durante 1 hora a 37°C en agitación, para que las bacterias se recuperaran y replicaran.

Posteriormente, se procedió a la selección de las bacterias que habían incorporado el vector, mediante la siembra en placas Petri previamente preparadas con medio LB suplementado con 1,5% de bactoagar y el antibiótico adecuado (ampicilina 100 μ g/ml) (Sigma), al cual sólo son resistentes las

bacterias transformadas. Se dejaron crecer durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente se cogió una colonia de cada plásmido y se procedió a su crecimiento. Primero se hizo un preinóculo en 10 ml de medio LB suplementado con ampicilina, durante 5-6 horas a 37°C en agitación hasta obtener una densidad óptica de 0,4-0,5 a una longitud de onda de 550 nm. Se añadió 1 ml de cada inóculo a un matraz que contenía 500 ml de medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml) permitiendo el crecimiento de las bacterias durante la noche en las mismas condiciones descritas anteriormente.

Al día siguiente, el contenido del matraz se vertió en botes de centrifuga que se centrifugaron a 8.000 rpm durante 10 minutos a 4°C, obteniéndose un precipitado de bacterias. La extracción del ADN plasmídico se realizó según el método del QUIAGEN siguiendo el protocolo indicado en el Kit “QUIAGEN Plasmid Maxi Kit Plasmid Purification” (QUIAGEN, Valencia, CA, USA).

VII. TRANSFECCIONES TRANSITORIAS

Transfección transitoria mediada por Lipofectamina

Después de la dispersión celular, como se explicó en el apartado II, las células PC12trkB se resuspendieron en el medio de cultivo y se sembraron a una densidad de 7×10^5 células/placa. El día de la transfección, las células tenían una confluencia del 70-80%.

La introducción de los diferentes vectores al interior de las células PC12trkB (transfección) se realizó siguiendo el protocolo indicado en el Kit de LIPOFECTAMINE™ Reagent (Invitrogen™, Life Technologies) adaptado a las condiciones de cultivo de la línea celular utilizada. La mezcla de lípidos suministrada está formada por un lípido neutro: dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE) y un lípido catiónico (DOSPA) los cuales favorecen la entrada de ADN a través de la membrana plasmática. La transfección se realizó siguiendo el protocolo que se describe a continuación.

Como control de la actividad promotora, un grupo de células se transfectó con el plásmido pRSV unido al gen reportero CAT (pRSV-CAT) (5 µg). Para la

normalización de los resultados se cotransfectaron con el plásmido pRSV- β gal (5 μ g). Las distintas construcciones del promotor de SS (SS65-CAT, SS65 Δ CRE-CAT, SS900-CAT, SS900 Δ CRE-CAT) (12 μ g) se cotransfectaron con el plásmido pRSV- β gal, diluido en 100 μ l de medio OPTIMEM (GibcoBRL). Por otro lado, se preparó otra solución que contenía 25 μ l de lipofectamina en 100 μ l de medio OPTIMEM. Todas las soluciones se prepararon en tubos estériles de poliestireno. Posteriormente, se combinaron ambas soluciones (solución del ADN y solución de lipofectamina) y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Mientras los complejos de ADN-lipofectamina se formaban, se reemplazó el medio de las células por medio sin sueros y se añadió la mezcla ADN-lipofectamina gota a gota, incubándose a 37°C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂ durante 5 horas. Tras la incubación, se añadió 1 ml de medio con sueros a las placas y se dejó durante 48 horas. Transcurrido este tiempo, se reemplazó el medio por medio sin sueros y se llevaron a cabo los experimentos.

Una vez finalizados los experimentos, las células se recogieron en Tris CIH 0,25 M pH 7,8 y se lisaron con 4 ciclos de congelación/descongelación. El lisado se centrifugó durante 15 minutos a 13.000 rpm y se recogió el sobrenadante (extracto celular) para la cuantificación de la actividad CAT, el ensayo de la actividad de β -galactosidasa y determinación de proteínas por el método de Bradford.

Transfección transitoria mediada por FuGENE

La transfección de las células cerebrocorticales procedentes de embriones de rata de 17 días de preñez con los diferentes vectores que contienen el promotor de la SS unido al gen reportero de la luciferasa, se realizó siguiendo el protocolo indicado en el kit de FuGENE (Roche Diagnostics, IN, USA) adaptado a las condiciones de nuestro cultivo primario. El reactivo FuGENE se trata de una mezcla de lípidos que favorecen la entrada de ADN a través de la membrana plasmática.

Como se describió en el apartado I, tras la incubación de las células en medio con sueros, se reemplazó dicho medio por un medio DMEM

suplementado con N1 y FGFb (25 ng/ml). Así se mantuvieron alrededor de 3 días y posteriormente se “levantaron” y se sembraron en placas de 60mm con una densidad de 3×10^6 células /3 ml. Las células se mantuvieron con el medio DMEM suplementado con N1 y FGFb (25 ng/ml) durante 24 horas.

Transcurridas las 24 horas se procedió a la transfección con FuGENE según el siguiente protocolo.

Como control de la actividad promotora, un grupo de células se transfectó con el plásmido pRSV unido al gen reportero de la luciferasa (pRSV-Luc)(6 µg). Se preincubaron 5 µg de ADN de las distintas construcciones del promotor de SS (SS65-Luc, SS65ΔCRE-Luc, SS900Luc, SS900 ΔCRE-Luc) junto al FuGENE utilizando una relación 3:1 (µl FuGene : µg DNA), en medio DMEM suplementado con N1 pero sin FGFb. La mezcla ADN-FuGENE se incubó durante 30- 35 minutos a temperatura ambiente, lavándose con PBS estéril las placas a transfectar durante este período. Posteriormente, se añadió a las placas medio DMEM con N1 y sin FGFb, y a continuación se añadió la mezcla de transfección gota a gota. Para la normalización de los resultados se cotransfectaron con el plásmido de la renilla (10% de la cantidad total de ADN transfectado). Tras 18- 20 horas de incubación se reemplazó el medio por medio DMEM con N1 y sin FGFb para llevar a cabo los experimentos.

Una vez finalizados los experimentos, las células se lavaron 2 veces con PBS y se añadió el buffer de lisis donde se recogieron las células con ayuda de una espátula de plástico. Se transfirieron los extractos a tubos eppendorf estériles y tras una breve agitación en el vortex, se centrifugaron durante 15-20 minutos a 14.000 rpm y se recogió el sobrenadante para la cuantificación de la actividad luciferasa y de la renilla.

Ensayo de la actividad CAT

Para la realización del ensayo CAT (Cloranfenicol Acetil Transferasa) se preparó una mezcla de reacción en un volumen final de 150 µl compuesta por: 70 µl de Tris-ClH 1 M pH 7.8, 20 µl de acetil-CoA 4 mM (Boehringer Mannheim,

Alemania), 1 μ l de [C^{14}] – Cloranfenicol (54 mCi/ mmol) de Amersham y 40 μ g de extracto celular.

Tras un período de incubación de dos horas a 37°C, se añadió a las muestras 1 ml de acetato etílico y se agitó vigorosamente durante 30 segundos. Los tubos se centrifugaron 1 minuto a 13.000 rpm y se transfirió la fase superior a tubos nuevos. Los extractos se concentraron en una evapo-concentradora y se resuspendieron en 10 μ l de acetato etílico, para ser aplicados en una placa de sílica gel TLC (cromatografía en capa fina) de Merck. La cromatografía se realizó durante 30 minutos en una cubeta que contenía una mezcla de cloroformo/metanol (19:1) y que había sido previamente equilibrada durante 2 horas. Concluida la cromatografía, la placa se dejó secar al aire y se obtuvieron las autorradiografías mediante exposición con una pantalla intensificadora a temperatura ambiente durante un período de 24- 48 horas. Las señales obtenidas de las autorradiografías, se digitalizaron mediante un analizador de imagen (S700 Scanner, OKI, España) y posteriormente se cuantificaron mediante su análisis densitométrico en un programa informático (Adobe-Photoshop 8,0,1 y NIH ImageJ). Los resultados obtenidos se expresaron como unidades densitométricas arbitrarias.

Ensayo de la actividad β -galactosidasa

Con objeto de normalizar la eficiencia de la transfección realizada con Lipofectamina Plus en la línea PC12trkB, se valoró la actividad β -galactosidasa siguiendo el protocolo descrito en el manual técnico de InvitrogenTM.

Un volumen de muestra de 20 μ l se mezcló con HPO_4Na_2 0,1 M pH 7,3, Cl_2Mg 0,1 M, β -mercaptoetanol 4,5 M (Sigma), ONPG 4 mg/ml (2-nitrofenol- β -D-galactopiranosido) (Sigma) y se incubó a 37°C hasta manifestarse la actividad enzimática por una reacción colorimétrica. El cambio de color en la muestra es el resultado de la actividad de la enzima β -galactosidasa que hidroliza el sustrato ONPG a o-nitrofenol que es de color amarillo. La reacción se paró añadiendo a cada muestra 150 μ l de HCO_3Na 1 M. La eficiencia de transfección se cuantificó midiendo la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 410 nm.

Los resultados obtenidos a partir de estos experimentos se expresaron como el porcentaje de la actividad CAT / actividad β -galactosidasa con respecto al grupo control, el cual se estableció como el 100%.

Ensayo de la actividad luciferasa

El ensayo de la actividad luciferasa se realizó siguiendo el protocolo descrito en el manual de “Dual Luciferasa assay system” (Promega).

Al final de cada experimento, las células se lavaron con PBS y se recogieron en tubos eppendorf en presencia de un tampón de lisis (Passive lysis buffer, Promega) a temperatura ambiente. Tras agitar los tubos en el vortex durante un par de segundos, se centrifugaron a 14.000 rpm durante 15-20 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se recogieron en tubos nuevos para la cuantificación de la actividad luciferasa.

El ensayo de actividad luciferasa se realizó tomando de cada muestra un volumen de 20 μ l. A continuación se añadió a cada muestra 30 μ l de luciferina (Promega) y se midió la reacción en el luminómetro (Lumat LB 9507, Berthold Technologies, Alemania).

Ensayo de la actividad renilla

Para normalizar la eficiencia de transfección entre los diferentes experimentos y tratamientos, y una vez medida la actividad luciferasa, se valoró en cada una de las muestras la actividad de la renilla siguiendo el protocolo descrito en el manual técnico de Promega.

En los mismos tubos donde medimos la actividad luciferasa añadimos 30 μ l del reactivo Stop&Glo que contiene el sustrato para la Renilla luciferasa, la coelenterazina, transformándola en coelenteramida y emitiendo una luz que es medida en el luminómetro.

VII. DISEÑOS EXPERIMENTALES

A) Efecto del K⁺ en la señalización celular, activación de CREB e inducción del ARNm de SS.

Todos estos estudios se realizaron en las células cerebrocorticales de embriones de rata de 17 días de preñez. Las células se mantuvieron en cultivo en las condiciones estándar, medio DMEM con sueros, durante 10-11 días. A continuación, se procedió a su utilización en los diferentes diseños experimentales.

1. Activación de la vía MAPK (ERK 1/ 2) por K⁺: tiempo-respuesta.

Se emplearon placas de cultivo de 35 mm de diámetro donde se sembraron 5-6x10⁶ células/1,5 ml. Se prepararon soluciones concentradas de ClK (Merck) en medio DMEM sin suero. Las células se preincubaron durante 24 horas en medio DMEM sin suero y posteriormente se les añadió TTX 1 µM (Sigma) durante 4 horas para bloquear los canales de Na⁺. A continuación, se incubaron en presencia de K⁺ (56 mM) durante los siguientes tiempos: 5, 15, 30, 60 minutos y 24 horas. El procesamiento de las muestras y el análisis de las proteínas quinasas por Western blot se llevó a cabo como se describió en el apartado III.

1.a Efecto del bloqueo de la vías MAPK (ERK 1/2), AMPc/PKA y CaMKs sobre la activación de la vía MAPK (ERK 1/2) inducida por K⁺.

Las células se preincubaron 10-11 días y se mantuvieron 24 horas sin suero y 4 horas con TTX 1 µM como se ha descrito anteriormente. A continuación, se incubaron durante 45 minutos en presencia de los distintos inhibidores: PD098059 (1, 10 y 100 µM) (inhibidor específico de la vía MAPK) (Alexis Corp., San Diego, CA, USA); Rp-cAMPS (adenosina-3', 5'-monofósforotioato) (2,5 , 10 y 20 µM) que actúa como antagonista competitivo del AMPc (Alexis Corp.); H89 (5, 10, 20 y 40 µM) que inhibe la vía PKA (Biomol, Plymouth Meeting, PA, USA); y los inhibidores específicos de la vía de las CaMKs, KN62

(10, 30 y 45 μM) y KN93 (10 y 30 μM) (Sigma). Posteriormente, se añadió K^+ (56 mM) durante 5 minutos. Otros grupos recibieron únicamente el inhibidor. Finalmente, las muestras se procesaron para el análisis de proteínas quinasas por Western blot según el protocolo anteriormente descrito.

2. Activación del factor transcripcional CREB por K^+ : tiempo-respuesta.

Se emplearon placas de cultivo de 35 mm de diámetro donde se sembraron $5\text{-}6 \times 10^6$ células/1,5 ml. Se prepararon soluciones concentradas de ClK en medio DMEM sin suero. Las células se preincubaron durante 24 horas en medio DMEM sin suero, posteriormente se les añadió TTX 1 μM durante 4 horas. A continuación, se incubaron en presencia de K^+ (56 mM) durante los siguientes tiempos: 5, 15, 30 minutos y 24 horas. La preparación de las muestras y el análisis de las proteínas quinasas por Western blot se llevó a cabo como se describió en el apartado III.

Para el estudio del tipo celular en el cual se fosforila CREB (Ser133) como consecuencia de la despolarización por K^+ , se llevaron a cabo en paralelo estudios inmunocitoquímicos de dichos cultivos. Para ello las células cerebrocorticales, en placa multipocillo, se incubaron en presencia de K^+ (56 mM) durante 5 y 30 minutos. Para los estudios inmunocitoquímicos las muestras se analizaron siguiendo el protocolo descrito en el apartado V.

2.a Efecto del bloqueo de las vías AMPc/PKA, MAPK (ERK 1/2) y CaMKs sobre la activación del factor transcripcional CREB inducida por K^+ .

Siguiendo el mismo procedimiento que en el apartado anterior, las células se preincubaron y mantuvieron 24 horas sin suero y 4 horas con TTX 1 μM . A continuación, se incubaron durante 45 minutos en presencia de los distintos inhibidores: PD098059 (1, 10 y 100 μM) (inhibidor específico de la vía MAPK); Rp-cAMPS (2,5, 10 y 20 μM); H89 (5, 10, 20 y 40 μM) y KN62 (10, 30 y 45 μM) y KN93 (10 y 30 μM).

Tras la incubación con los inhibidores, se añadió K^+ (56 mM) durante 5 y 30 minutos. Otros grupos recibieron únicamente el inhibidor. Finalmente, las

muestras se procesaron para el análisis de proteínas quinasas por Western blot.

También se realizaron en paralelo estudios inmunocitoquímicos, utilizando los mismos inhibidores específicos de cada vía. Para ello las células cerebrocorticales, en placa multipocillo, se incubaron en presencia de los inhibidores durante 45 minutos y posteriormente añadimos K^+ (56 mM) durante 5 y 30 minutos. Para los estudios inmunocitoquímicos las muestras se analizaron siguiendo el protocolo descrito en el apartado V.

3. Estudios sobre la inducción del gen de la SS por K^+ .

3.a Efecto del bloqueo de las vías AMPc/PKA, MAPK (ERK 1/2) y CaMKs sobre la inducción del ARNm de la SS por K^+ .

Las células se preincubaron y mantuvieron 24 horas sin suero y 4 horas con TTX 1 μ M como se ha descrito anteriormente. A continuación se incubaron durante 45 minutos en presencia de los siguientes inhibidores: PD098058 (10 μ M), Rp-cAMPS (2,5 μ M), H89 (5, 10, y 20 μ M) y KN62 (10, 30 y 45 μ M) y KN93 (10 μ M).

Posteriormente, se añadió K^+ (56 mM) durante 24 horas. Finalmente, las células se procesaron para la cuantificación del ARNm de la SS, como se ha descrito en el apartado IV.

B) Efectos del BDNF en la señalización celular, activación de CREB e inducción del ARNm de la SS.

Todos estos estudios se realizaron en las células cerebrocorticales de embriones de rata de 17 días de preñez que se mantuvieron en cultivo en las condiciones estándar, medio DMEM con suero, durante 3-4 días. A continuación, se procedió a su utilización en los diferentes diseños experimentales.

1. Efecto del BDNF sobre la activación de la vía MAPK (ERK 1/ 2): tiempo-respuesta.

Se emplearon placas de cultivo de 35 mm de diámetro donde se sembraron $5-6 \times 10^6$ células/1,5 ml. Tras 3-4 días de incubación como se ha descrito en el anterior apartado, las células se preincubaron durante 24 horas en medio DMEM sin sueros. A continuación, se incubaron en presencia de BDNF (50 ng/ml) durante los siguientes tiempos: 1, 5, 10, 30, 60 minutos y 24 horas. Las soluciones concentradas de BDNF (PeproTech EC, Londres, Reino Unido) se prepararon en medio DMEM sin suero que se almacena a -80°C . El procesamiento de las muestras y el análisis de las proteínas quinasas por Western blot se llevó a cabo como se describió en el apartado III.

1.a Efecto del bloqueo de la vías MAPK (ERK 1/2), AMPc/PKA, CaMKs y PI3K/Akt sobre la activación de la vía MAPK (ERK 1/2) inducida por BDNF.

Las células se preincubaron y mantuvieron 24 horas sin suero. A continuación, se incubaron durante 45 minutos en presencia de los distintos inhibidores: PD098059 (10 y 30 μM); Rp-cAMPS (2,5 , 10 y 20 μM) y H89 (5, 10 y 20 μM); KN62 (10 y 30 μM) y LY294002 (5, 10, 20 y 40 μM). Posteriormente, se añadió BDNF (50 ng/ml) durante 10 minutos. Otros grupos recibieron únicamente el inhibidor. Finalmente, las muestras se procesaron para el análisis de proteínas quinasas por Western blot según el protocolo anteriormente descrito.

2. Efecto del BDNF sobre la activación de la vía PI3K/Akt: tiempo-respuesta.

Se emplearon placas de cultivo de 35 mm de diámetro donde se sembraron $5-6 \times 10^6$ células/1,5 ml. Tras 3-4 días de incubación como se ha descrito en el anterior apartado, las células se preincubaron durante 24 horas en medio DMEM sin sueros. A continuación, se incubaron en presencia de BDNF (50 ng/ml) durante los siguientes tiempos: 1, 5, 10, 30, 60 minutos y 2 horas. El

procesamiento de las muestras y el análisis de las proteínas quinasas por Western blot se llevó a cabo como se describió en el apartado III.

2.a Efecto del bloqueo de las vías PI3K/Akt, MAPK (ERK 1/2), AMPc/PKA y CaMKs sobre la activación de la vía PI3K/Akt inducida por BDNF.

Las células se preincubaron y mantuvieron 24 horas sin suero. A continuación, se incubaron durante 45 minutos en presencia de los distintos inhibidores: LY294002 (5, 10 y 20 μ M); PD098059 (20 y 30 μ M); Rp-cAMPS (20 y 50 μ M); KN62 (10 y 30 μ M) y KN93 (10 y 30 μ M).

Posteriormente, se añadió BDNF (50 ng/ml) durante 10 minutos. Otros grupos recibieron únicamente el inhibidor. Finalmente, las muestras se procesaron para el análisis de proteínas quinasas por Western blot según el protocolo anteriormente descrito.

3. Efecto del BDNF sobre la activación del factor transcripcional CREB: tiempo-respuesta.

Se emplearon placas de cultivo de 35 mm de diámetro donde se sembraron $5-6 \times 10^6$ células/1,5 ml. Las células se preincubaron durante 24 horas en medio DMEM sin suero. A continuación, se incubaron en presencia del BDNF (50 ng/ml) durante los siguientes tiempos: 1, 5, 10, 30, 60 minutos y 2 horas. La preparación de las muestras y el análisis de las proteínas quinasas por Western blot se llevó a cabo como se describió en el apartado III.

3.a Efecto del bloqueo de las vías AMPc/PKA, MAPK (ERK 1/2), CaMKs y PI3K/Akt sobre la activación del factor transcripcional CREB inducida por BDNF.

Siguiendo el mismo procedimiento que en el apartado anterior, las células se preincubaron y mantuvieron 24 horas sin suero. Transcurridas las 24 horas, se incubaron durante 45 minutos en presencia de los distintos inhibidores: PD098059 (20 μ M); Rp-cAMPS (20 y 50 μ M) y H89 (10, 20 y 40 μ M); KN62 (10 y 30 μ M); KN93 (10 y 30 μ M); y LY294002 (5, 10, 20 y 40 μ M).

Tras la incubación con los inhibidores, se añadió BDNF (50 ng/ml) durante 10 minutos. Otros grupos recibieron únicamente el inhibidor. Finalmente, las muestras se procesaron para el análisis de proteínas quinasas por Western blot.

4. Estudio del efecto del BDNF sobre la expresión del ARNm de la SS.

4.a Efecto del bloqueo de las vías AMPc/PKA, MAPK (ERK 1/2), CaMKs y PI3K/Akt sobre la inducción del ARNm de la SS por BDNF.

Tras mantener durante 24 horas las células sin suero, se incubaron durante 45 minutos en presencia de los siguientes inhibidores: PD098058 (20 y 30 μ M), Rp-cAMPS (20 y 50 μ M), H89 (5, 10 y 20 μ M), KN62 (10 y 30 μ M) y LY294002 (5, 10, 20 y 40 μ M). Posteriormente, se añadió BDNF (50 ng/ml) durante 48 horas. Finalmente, las células se procesaron para la cuantificación del ARNm de la SS, como se ha descrito en el apartado IV.

C) Regulación transcripcional del gen de la SS

A. Regulación transcripcional por K⁺

1. Transfecciones transitorias de cultivos primarios

Se emplearon placas de cultivo de 60 mm de diámetro donde se sembraron 3×10^6 células/ 3 ml en medio DMEM glucosa 4,5 g/l (GibcoBRL), suplementado con penicilina- estreptomicina 1%, piruvato sódico 1%, N1 1% y FGF-b 20 ng/ml. Tras el período de preincubación de 24 horas, las células se transfectaron, en medio sin FGF-b, con las distintas construcciones del promotor de la SS (5 μ g) además del vector de renilla (10% del total de ADN plásmidico a transfectar). Como control de transfección utilizamos el vector pRSV-Luc (6 μ g) que contiene el gen de la enzima luciferasa. Después de 16-18 horas de incubación se retiró el medio y las células se lavaron con PBS 1x estéril. A continuación se les añadió el medio anteriormente citado sin FGF-b y se incubaron K⁺ (56 mM) durante 24 horas. Posteriormente, las células se procesaron para la realización de ensayos de actividad luciferasa y actividad renilla.

B. Regulación transcripcional por BDNF

1. Estudios realizados en la línea celular PC12trkB

Se emplearon placas de cultivo de 35 mm de diámetro donde se sembraron 7×10^5 células/ 1,5 ml en medio DMEM sueros durante 24 horas. Tras la incubación, se lavaron las células con medio sin sueros y se procedió a realizar la transfección en medio sin sueros con las distintas construcciones del promotor de la SS (12 μ g) además del vector pRSV- β gal (5 μ g). Como control de la transfección utilizamos el vector pRSV-CAT (5 μ g) que contiene el gen de la enzima cloranfenicol acetil transferasa. Después de 5 horas de incubación, se retiró el medio y se les añadió medio con sueros durante 48 horas. Posteriormente, se les retiró el medio, se lavaron las células con medio sin sueros y se les añadió medio de cultivo DMEM libre de sueros durante 24 horas. Tras la preincubación de 24 horas, se les añadió BDNF (50 ng/ml) durante 48 horas. Finalizada la incubación, las células se recogieron y se procesaron para la realización del ensayo CAT, ensayo β -gal y la cuantificación de proteínas.

2. Estudios realizados en cultivos primarios

El procedimiento experimental que se realizó fue el mismo que se ha descrito para K⁺, excepto que la duración del tratamiento fueron 48 horas de incubación con BDNF (50 ng/ml).

V. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

En todos los casos, el número de placas de cultivo por cada grupo fue de 3 ó 4. Cada experimento fue repetido al menos en tres ocasiones. Los resultados se expresan como media \pm E.S.

El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA para muestras dependientes e independientes, en su caso. La comparación entre los grupos se realizó mediante el test t de Fischer para datos no pareados y mediante el test de Student para datos pareados. Las diferencias entre los grupos se

consideraron significativas cuando sus medias mostraron una probabilidad de error $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR IMPLICADOS EN LA INDUCCIÓN DEL ARNm DE LA SS POR DESPOLARIZACIÓN CON K⁺

En estudios previos de nuestro laboratorio demostramos que la despolarización, inducida por la exposición de células cerebrocorticales de embriones de rata obtenidas en el día 17 de vida embrionaria (E17), a altas concentraciones de potasio, induce un aumento en los niveles del ARNm de la SS (Tolón, 1994). La despolarización con K⁺ produce la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje (VSCCs) permitiendo la entrada del Ca²⁺ al interior celular. Esta entrada del Ca²⁺ induce la expresión de múltiples genes a través de la activación de diferentes vías de señalización intracelular.

Los estudios que se describen a continuación se realizaron con el fin de conocer la vías de señalización intracelular que participan en la inducción del ARNm de la SS por despolarización con K⁺.

1.1. ESTUDIO DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN ACTIVADAS POR K⁺

1.1.1. Activación de la vía MAPK (ERK 1/2) por K⁺. Estudio tiempo-respuesta

Para estudiar la activación de la vía MAPK (ERK 1/2) en nuestro sistema, las células cerebrocorticales de embriones de rata se mantuvieron durante 10-11 días en medio DMEM suplementado con 15% de FCS, suprimiendo el suero 24 horas antes de la realización de los experimentos. A continuación, se incubaron en presencia de K⁺ (56 mM) durante 5, 15, 30, 60 minutos y 24 horas. El estudio de la activación de la vía MAPK (ERK 1/2) se realizó mediante Western blot donde se determinó las variaciones en la concentración de la forma fosforilada de las isoenzimas ERK1 y ERK2 en respuesta al tratamiento con K⁺, empleando un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente la forma fosforilada de ambas proteínas. Como control de la cantidad total de

ERK 1/2, la misma membrana se incubó con un anticuerpo policlonal que reconoce tanto las formas fosforiladas como no fosforiladas de ERK 1/2.

Los datos obtenidos se representan en la Figura 1, donde el panel A, parte superior, muestra una autorradiografía representativa correspondiente a un Western blot, utilizando un anticuerpo monoclonal que reconoce las formas fosforiladas de MAPK (ERK 1/2). La parte inferior muestra una autorradiografía representativa correspondiente a un Western blot utilizando un anticuerpo policlonal que reconoce las ERK 1/2 totales. En el panel B, se muestra la cuantificación densitométrica de dicha proteína, en porcentaje respecto al grupo control. Se observa que el tratamiento con K^+ induce un aumento de las formas fosforiladas de ERK 1/2 que es máximo a los 5 minutos regresando a los niveles basales a los 60 minutos. Los niveles de ERK 1/2 total no se modifican en este tiempo, indicando que K^+ induce específicamente la actividad de la MAPK (ERK 1/2) y no su nivel de expresión.

Estos resultados confirman que **la vía de señalización MAPK (ERK 1/2) se activa en presencia de K^+ en células cerebrocorticales de embriones de rata.**

1.1.2. Efecto del bloqueo de las vías MAPK (ERK 1/2), AMPc/PKA y CaMKs sobre la activación de la vía MAPK inducida por K^+

Una vez establecido que K^+ activaba la vía MAPK (ERK 1/2) en nuestro sistema, nos planteamos estudiar la posible participación de otras vías de señalización, además de la propia vía MAPK (ERK 1/2), sobre la activación de MAPK (ERK 1/2) en respuesta a K^+ .

Realizamos un estudio dosis-respuesta del bloqueo de cada vía por su inhibidor correspondiente para confirmar en nuestro sistema, la efectividad del bloqueo de las quinasas respectivas por parte de estos inhibidores y hallar la dosis mínima de inhibidor capaz de bloquear cada vía, con el fin de minimizar la inhibición inespecífica de otras quinasas.

Siguiendo el diseño experimental habitual, tras permanecer 10-11 días en medio DMEM suplementado con 15% FCS, las células fueron privadas de suero durante 24 horas, a continuación se incubaron durante 45 minutos en presencia de los distintos inhibidores: PD098059 (1, 10 y 100 μM), Rp-cAMPS (2,5, 10 y 20 μM), H89 (5, 10, 20 y 40 μM), KN62 (10, 30 y 45 μM) y KN93 (10 y 30 μM). Posteriormente, se añadió K^+ (56 mM) durante 5 minutos. Otros grupos recibieron únicamente el inhibidor correspondiente.

Como puede observarse (Figura 2), el PD098059 bloquea específicamente la activación de la vía MAPK (ERK 1/2) inducida por K^+ de forma dosis-dependiente, siendo la dosis de 10 μM la dosis mínima que bloquea completamente esta vía.

Cuando bloqueamos la vía AMPc/PKA con los inhibidores Rp-cAMPS y H89, se observa (Figuras 3 y 4) que ambos inhibidores bloquean la vía MAPK (ERK 1/2), siendo la dosis mínima bloqueante de 2,5 μM para el Rp-cAMPS y de 20 μM para el H89. A ninguna de las dosis del Rp-cAMPS utilizadas se observa un bloqueo total.

Al bloquear la vía CaMKs con los inhibidores KN62 y KN93, observamos (Figura 5) un bloqueo total de la vía MAPK (ERK 1/2) con ambos inhibidores, siendo la dosis mínima bloqueante de 10 μM para ambos inhibidores.

Estos resultados indican que **en la activación de la vía MAPK (ERK 1/2) por K^+ participan las vías MAPK (ERK 1/2), AMPc/PKA y CaMKs.**

1.2. ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN CREB POR K^+

Uno de los factores transcripcionales, activado por estímulos extracelulares, mejor caracterizado es CREB. Estudios previos han demostrado que CREB regula la transcripción génica de numerosos genes, en respuesta a diversos estímulos (Shaywitz et al., 1999). CREB es activado por varias proteínas quinasas entre las que se incluyen la AMPc/PKA, la MAPK (ERK 1/2) y la

CaMKs. Estas quinasas fosforilan CREB en un determinado residuo, serina 133 (Ser¹³³) (Montminy, 1997; Ginty, 1994; Xing et al., 1996; Hansen, 1999). La fosforilación de CREB en Ser133 es crítica y necesaria pero no suficiente para la inducción de genes de expresión temprana por despolarización por K⁺ y factores de crecimiento (Montminy, 1997; Ginty, 1994; Bonni, 1995). El reclutamiento y la activación de determinados coactivadores que se asocian a CREB, y la interacción con otros factores de transcripción, regulan la capacidad de CREB para inducir la expresión de genes específicos en respuesta a un estímulo determinado (Shaywitz et al., 1999).

Puesto que el factor de transcripción CREB juega un papel crítico en la activación de genes por actividad neuronal inducida por despolarización con K⁺, nos planteamos analizar la secuencia de cambios en la fosforilación y activación de CREB (Ser133) en función del tiempo de exposición a K⁺. Además, para comprobar si la activación de CREB se producía en las células somatostatinérgicas, se realizaron paralelamente estudios de inmunofluorescencia.

1.2.1. Activación del factor de transcripción CREB en respuesta a K⁺. Estudio tiempo-respuesta

En primer lugar se estudió la capacidad del K⁺ para activar CREB en nuestro sistema de cultivo. La fosforilación de CREB en el residuo Ser133 que se correlaciona con su actividad transcripcional, se evaluó mediante la cuantificación de la forma fosforilada de CREB.

Tras mantener las células durante 10-11 días en medio DMEM suplementado con 15% FCS, se privaron de suero durante 24 horas. A continuación, se incubaron en presencia de K⁺ (56 mM) durante 5, 15, 30 minutos y 24 horas. La fosforilación de CREB en respuesta a K⁺ se determinó mediante Western blot utilizando un anticuerpo policlonal que reconoce específicamente la proteína fosforilada en el residuo Ser133. Posteriormente, la misma membrana se incubó con un anticuerpo capaz de reconocer el CREB total, la forma fosforilada y no fosforilada con el objeto de corregir las

variaciones de CREB fosforilado respecto a la concentración de CREB total, y verificar que el tratamiento con K^+ no modifica su nivel de expresión.

Los resultados obtenidos se representan en la Figura 6, donde el panel A, muestra una autorradiografía representativa correspondiente a un Western blot. En el panel B se muestra la cuantificación densitométrica de dicha proteína, en porcentaje respecto al grupo control. El tratamiento con K^+ induce un incremento en los niveles de CREB fosforilado, presentando dos picos de activación máxima. Un primer pico que se observa a los 5 minutos (*activación temprana*) y un segundo pico que empieza a apreciarse a partir de los 30 minutos (*activación tardía*), manteniéndose activado tras 24 horas de la exposición a K^+ . La concentración de CREB total no cambia en este tiempo indicando que K^+ induce específicamente la activación de la proteína y no su nivel de expresión.

Estos resultados indican que K^+ activa CREB (Ser¹³³) en las células cerebrocorticales, lo que sugiere su participación en la regulación de la transcripción génica inducida por despolarización por K^+ .

Para verificar si la despolarización con K^+ activaba CREB en las células somatostatinérgicas, se llevaron a cabo estudios inmunocitoquímicos. Para ello, las células se cultivaron sobre cubres en placas multipocillo y se expusieron a K^+ (56 mM) durante 5 y 30 minutos. Posteriormente, una vez fijado el cultivo celular, se analizaron las muestras por métodos de inmunofluorescencia con doble marcaje. La detección de CREB activado se realizó mediante el empleo de un anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo que tiñe los núcleos en rojo. Para la identificación de las células somatostatinérgicas se utilizó un anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo que las tiñe en verde.

En la Figura 7 se muestran imágenes representativas del estudio. En las células cerebrocorticales tratadas con K^+ (56 mM) se observa un claro aumento de neuronas CREB positivas con respecto a los controles no tratados tanto a los 5 como a los 30 minutos, observándose además que CREB es activado en

las células somatostatinérgicas, células con tinción naranja (indicado con las cabezas de flecha).

Estos resultados demuestran que **la activación de CREB inducida por K^+ ocurre en parte en las células somatostatinérgicas.**

1.2.2. Estudio del efecto del bloqueo de las vías AMPc/PKA, MAPK (ERK 1/2) y CaMKs sobre la activación de CREB inducida por K^+

Inicialmente CREB se consideró sustrato exclusivo de la PKA (González et al., 1989a; Yamamoto et al., 1988); posteriormente, se demostró la capacidad de otras quinasas, entre ellas la vía MAPK (ERK 1/2) de activar este factor de transcripción (Ginty et al., 1994; Xing et al., 1996; Impey et al., 1998a). La despolarización de la membrana por K^+ produce un aumento del calcio intracelular capaz de activar las vías AMPc/PKA y la vía CaMKs, ambas implicadas en la activación de CREB (Wu et al., 2001; Impey et al., 1998a).

Los siguientes experimentos se dirigieron a investigar las vías de señalización que median la fosforilación de CREB por K^+ , empleando la estrategia de bloqueo de las vías de señalización mediante inhibidores específicos. Dado que en nuestro sistema, como está descrito en la literatura (Wu et al. 2001), CREB presenta dos fases de activación (activación temprana y tardía), estudiamos las vías de señalización implicadas en la activación de CREB en las dos fases.

Siguiendo el diseño experimental habitual, tras permanecer 10-11 días en medio DMEM suplementado con 15% FCS, las células fueron deprivadas de suero durante 24 horas, y a continuación se incubaron durante 45 minutos en presencia de los distintos inhibidores: Rp-cAMPS (2,5, 10 y 20 μ M), H89 (5, 10, 20 y 40 μ M), PD098059 (1, 10 y 100 μ M) KN62 (10, 30 y 45 μ M) y KN93 (10 y 30 μ M). Posteriormente, se añadió K^+ (56 mM) durante 5 y 30 minutos, tiempos que corresponden a los dos picos de máxima activación de CREB. Otros grupos recibieron únicamente el inhibidor correspondiente.

Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 8 y 9, donde se observa que el bloqueo de la vía AMPc/PKA con el Rp-cAMPS abole completamente la activación temprana de CREB por K^+ , siendo la dosis mínima bloqueante de 2,5 μ M. Sin embargo, como se observa en la Figura 10, una dosis similar del Rp-cAMPS no altera significativamente la inducción tardía de CREB. El H89 induce un bloqueo marcado pero no total con las dosis de 20 y 40 μ M.

Paralelamente, se realizaron estudios de inmunofluorescencia para confirmar los resultados obtenidos por Western blot. Los datos obtenidos mediante inmunofluorescencia (Figura 11) muestran que en presencia del inhibidor Rp-cAMPS hay una clara disminución en el número de células CREB positivas respecto a las tratadas con K^+ .

Estos resultados indican que **la vía AMPc/PKA participa en la activación temprana de CREB (Ser¹³³) inducida por K^+ (Figura 18).**

Cuando bloqueamos la vía MAPK (ERK 1/2) con el inhibidor PD098059 no se observa, a ninguna de las dosis utilizadas, bloqueo de la activación temprana de CREB (Figura 12). Sin embargo, se observa un bloqueo completo de la activación tardía de CREB (Figuras 13) con la dosis de 10 μ M.

Puesto que el bloqueo de la vía MAPK (ERK 1/2) sólo inhibe la inducción tardía de CREB, los estudios de inmunofluorescencia para analizar el efecto del bloqueo de la vía MAPK (ERK 1/2) sobre la activación de CREB, se realizaron tras 30 minutos de exposición a K^+ . Los resultados obtenidos (Figura 14) muestran que en presencia del inhibidor PD098059 hay una clara disminución en el número de células CREB positivas respecto a las tratadas con K^+ .

Estos resultados indican que **la vía MAPK participa en la activación tardía de CREB (Ser¹³³) inducida por K^+ (Figura 18).**

Al bloquear la vía CaMKs con los inhibidores KN62 y KN93, observamos (Figura 15) un bloqueo de la activación temprana de CREB con ambos inhibidores. La inhibición con el KN62 sólo es evidente con la dosis más alta

utilizada (45 μM), mientras que con el KN93 el efecto inhibitor se pone de manifiesto con la dosis más baja, 10 μM .

Sin embargo, cuando analizamos el efecto de estos inhibidores en la activación tardía de CREB (Figura 16), observamos que ambos inhibidores bloquean dicha activación, a dosis similares de 10 μM .

En los estudios de inmunofluorescencia a los 5 minutos de exposición a K^+ (Figura 17), se observa que en presencia del inhibidor de la vía de las CaMKs, el KN93, a dosis de 10 μM , se produce una clara disminución en el número de células CREB positivas respecto a las tratadas con K^+ .

Estos resultados indican que **la vía de las CaMKs participa tanto en la activación temprana como tardía de CREB inducidas por K^+ (Figura 18).**

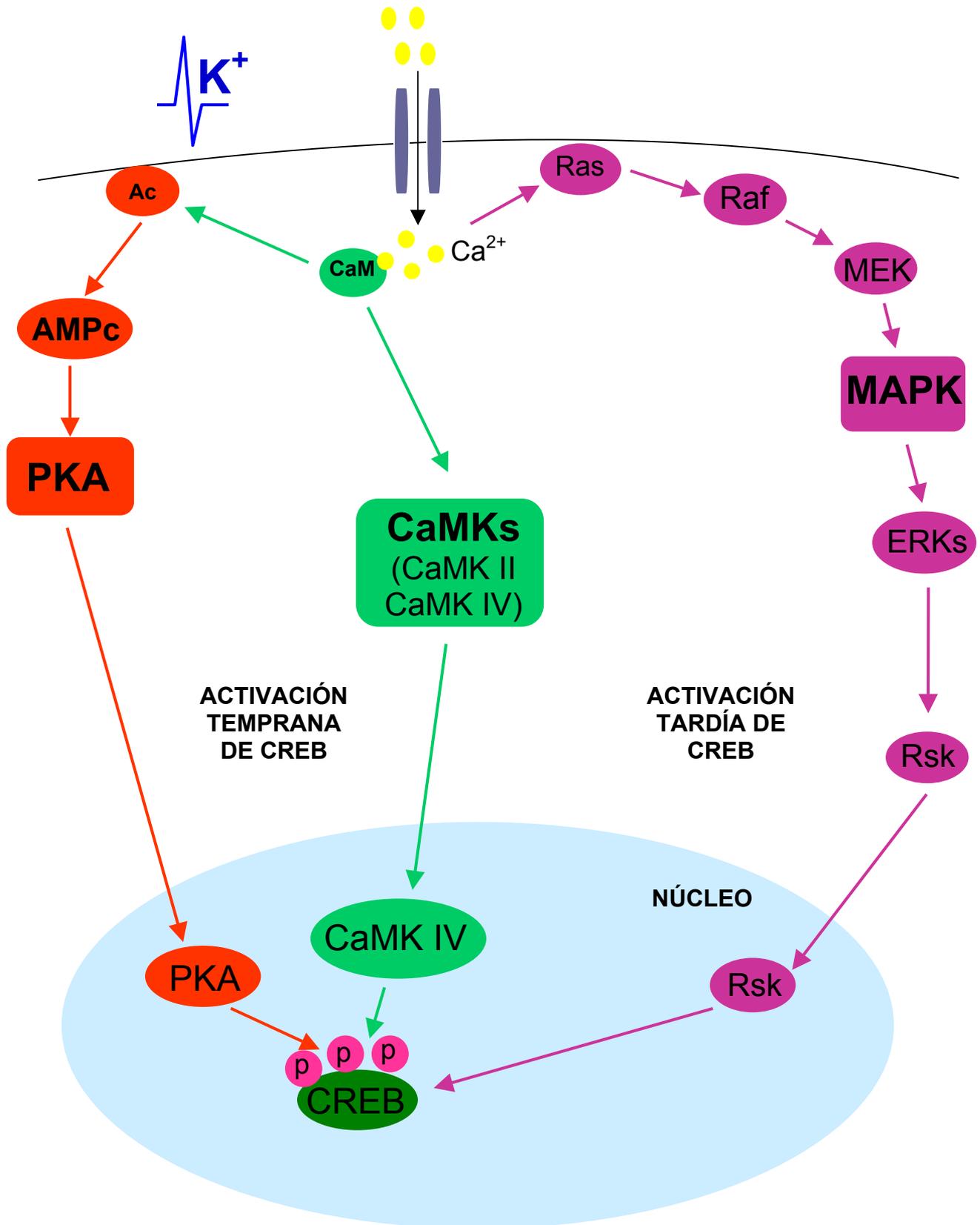


Figura 18. Vías de señalización intracelular que participan en la activación de CREB por despolarización de membrana con K^+ .

1.3. ESTUDIO DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LA INDUCCIÓN DEL ARNm DE LA SS POR K⁺

En estudios previos de nuestro laboratorio (Tolón et al., 1994 y 2000) se demostró que en células cerebrocorticales de embriones de rata, los niveles del ARNm de la SS se inducían tras despolarizar la membrana con altas concentraciones de K⁺ durante 24 horas. Es bien sabido que la actividad neuronal inducida por despolarización con altas concentraciones de K⁺ y la consecuente entrada del Ca²⁺ induce la expresión de múltiples genes, y que este efecto, está mediado por la activación de diferentes vías de señalización intracelular: AMPc/PKA, MAPK (ERK 1/2) y CaMKs (Rosen et al., 1994; Grewal et al., 2000a; Baldassa et al., 2003; Ghosh et al., 1995). Una vez establecidas las vías de señalización que activaban el factor de transcripción CREB, nos planteamos estudiar cuales de estas vías estaban implicadas en la inducción del ARNm de la SS por K⁺.

1.3.1. Efecto del bloqueo de las vías AMPc/PKA, MAPK (ERK 1/2) y CaMKs sobre la inducción del ARNm de la SS por K⁺

Estos experimentos se realizaron siguiendo el diseño experimental habitual. Tras permanecer 10-11 días en medio DMEM suplementado con 15% FCS, las células fueron privadas de suero durante 24 horas, a continuación se incubaron durante 45 minutos en presencia de los distintos inhibidores: Rp-cAMPS (2,5µM), H89 (5, 10 y 20µM), PD098059 (10µM), KN62 (10, 30 y 45 µM) y KN93 (10µM). Posteriormente, se añadió K⁺ (56 mM) durante 24 horas ya que en estudios previos de nuestro laboratorio (Tolón et al, 1994) se observó que a este tiempo se produce la inducción máxima del ARNm de la SS por K⁺.

Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 19 y 20, donde el panel A, muestra una autorradiografía representativa correspondiente a un Northern blot hibridado con una ribosonda de la SS marcada con d-UTP-^{32α}P. En el panel B, se muestra su cuantificación densitométrica en porcentaje respecto al grupo control. El bloqueo de la vía AMPc/PKA con los inhibidores

H89 y Rp-cAMPS (Figuras 19 y 20) abole completamente la inducción del ARNm de la SS incluso con las dosis mínimas empleadas (5 μ M y 2,5 μ M respectivamente).

Estos resultados son la primera evidencia indicando que **la vía AMPc/PKA es crucial en la inducción del ARNm de la SS por despolarización por K⁺, apareciendo como una de las vías fundamentales en su inducción.**

Cuando bloqueamos la vía MAPK (ERK 1/2) (Figura 20) con el inhibidor PD098059, observamos una pequeña disminución de la inducción del ARNm de SS que no llega a ser significativa.

Estos resultados indican que **la activación de la vía MAPK (ERK 1/2) no participa en la inducción del ARNm de la SS por K⁺.**

En la Figura 21 se muestra el efecto del bloqueo de la vía CaMKs con los dos inhibidores, el KN62 y KN93, sobre la inducción del ARNm de la SS, observándose que las dosis mínimas utilizadas de ambos inhibidores (KN62 10 μ M y KN93 10 μ M), bloquean completamente la inducción del ARNm de la SS por K⁺.

Estos resultados indican por primera vez que **la vía CaMKs también participa en la inducción del ARNm de la SS por K⁺.**

Nuestros resultados indican que las vías que participan en la inducción del ARNm de la SS por K⁺ son fundamentalmente la vía AMPc/PKA y la vía CaMKs (Figura 22).

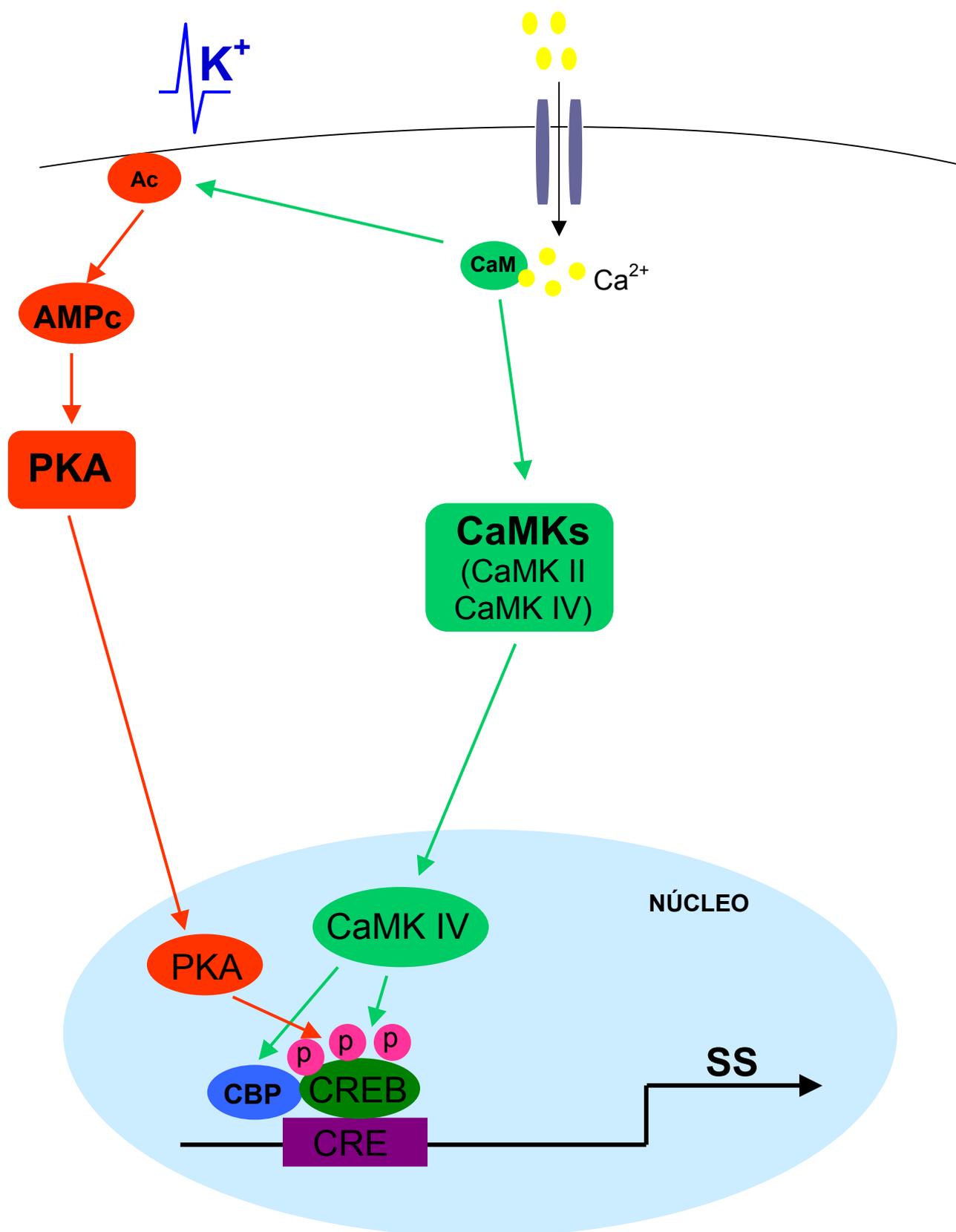


Figura 22. Vías de señalización intracelular que participan en la inducción del ARNm de SS por despolarización de membrana con K^+ .

1.4. ESTUDIO DE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LA SS POR K⁺

Las señales extracelulares conducen a la activación de una serie de moléculas de señalización intracelular, entre las que se encuentran las proteínas quinasas. Muchas de estas rutas de transducción de señales convergen en la activación de factores de transcripción, los cuales, una vez activados, se unen a sus elementos de respuesta presentes en el promotor de los genes modulando su transcripción.

Nuestros resultados previos muestran que K⁺ activa el factor transcripcional CREB. CREB tras su activación se une al CRE, secuencia consenso presente en el promotor de la SS (Montminy et al. 1986a), activando su transcripción. El sistema CREB-CRE es un candidato idóneo a ser el mediador de la regulación transcripcional de la SS por K⁺. Por lo tanto, investigamos si existe una regulación transcripcional de la SS por K⁺, y la posible implicación del sistema CREB-CRE.

1.4.1. Efecto del K⁺ sobre la actividad transcripcional del gen de la SS en células cerebrocorticales

Estos estudios se llevaron a cabo mediante transfecciones transitorias de células cerebrocorticales en cultivos primarios. Se utilizaron diferentes construcciones del promotor de la SS unidas a un gen reportero de luciferasa (SS65-Luc, SS65 Δ CRE-Luc, SS900-Luc y SS900 Δ CRE-Luc), subclonadas con la colaboración del laboratorio del Dr. Mario Vallejo (IIB, CSIC), tal y como se describe en material y métodos (apartado VI y VII). Para la normalización de los resultados se cotransfectaron junto con el plásmido renilla. Como control de eficiencia de transfección un grupo de células se transfectó con el promotor pRSV-Luc.

Como podemos observar en la Figura 23, tras el tratamiento con K⁺, se produce un drástico incremento en la actividad luciferasa en las células transfectadas con ambas construcciones del promotor de la SS, SS65 y SS900. Este aumento es menor en células transfectadas con la construcción SS900,

que corresponde al promotor completo de la SS, que en las transfectadas con el SS65. Las células transfectadas con las construcciones del promotor SS65 y SS900, que contienen el elemento CRE, presentan una actividad luciferasa dos veces superior a la observada en las células transfectadas con las construcciones del promotor SS65 Δ CRE y SS900 Δ CRE, que carecen del elemento CRE y no responden a la despolarización inducida por K⁺.

Estos resultados son la primera evidencia de que la actividad neuronal inducida por despolarización con K⁺ induce la transcripción del gen de la SS. Además, demuestran que esta regulación transcripcional está mediada por el elemento de respuesta CRE presente en el promotor de la SS.

2. MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR IMPLICADOS EN LA INDUCCIÓN DEL ARNm DE LA SS POR BDNF

Las neurotropinas ejercen sus acciones mediante la activación de receptores de la familia de receptores tirosina quinasa tipo trkB. BDNF y NT-4/5 se unen a los receptores trkB con mayor afinidad que NT-3. Estos receptores una vez activados, interaccionan con varias proteínas intracelulares que contienen los dominios SHC a nivel de los dominios de autofosforilación del receptor (Friedman et al., 1999). En estudios previos de nuestro laboratorio (Villuendas et al., 2001) demostramos que el BDNF induce la expresión de la SS inmunoreactiva y de su ARNm en células cerebrocorticales fetales.

Los estudios que se describen a continuación se realizaron con el fin de conocer los mecanismos intracelulares mediante los cuales el BDNF induce la expresión del ARNm de la SS.

2.1. IDENTIFICACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN ACTIVADAS POR BDNF

2.1.1. Activación de la vía MAPK (ERK 1/2) por BDNF. Estudio tiempo-respuesta

Para estudiar la activación de la vía MAPK (ERK1/2), las células cerebrocorticales de embriones de rata se mantuvieron durante 3-4 días en medio DMEM suplementado con 15% de FCS y posteriormente en medio privado de suero durante 24 horas. A continuación, se incubaron en presencia de BDNF (50 ng/ml) durante 1, 5, 10, 30, 60 minutos y 24 horas. El estudio de la activación de la vía MAPK (ERK 1/2) se realizó mediante Western blot donde se determinó las variaciones en la concentración de la forma fosforilada de las isoenzimas ERK1 y ERK2 en respuesta al tratamiento con el BDNF, empleando un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente la forma fosforilada de ambas proteínas. Como control de la posible variación de la cantidad de ERK 1/2 total, la misma membrana se incubó con un anticuerpo que reconoce tanto las formas fosforiladas como no fosforiladas de ERK 1/2.

Los datos obtenidos se representan en la Figura 24, donde el panel A, parte superior, muestra una autorradiografía representativa correspondiente a un Western blot, utilizando un anticuerpo monoclonal que reconoce las formas fosforiladas de MAPK (ERK 1/2). La parte inferior muestra una autorradiografía representativa correspondiente a un Western blot utilizando un anticuerpo policlonal que reconoce las ERK 1/2 totales, formas fosforiladas y no fosforiladas. En el panel B, se muestra la cuantificación densitométrica de dicha proteína en porcentaje respecto al grupo control. Se observa que el BDNF induce un aumento de las formas fosforiladas de ERK 1/2 que es máximo a los 10 minutos regresando a los niveles basales a las 24 horas. Los niveles de ERK total no se modifican en este tiempo, indicando la ausencia de cambios en la concentración de la proteína y confirmando, por tanto, que el BDNF induce específicamente la activación de la MAPK (ERK 1/2) y no su nivel de expresión.

Estos resultados confirman que **la vía de señalización MAPK (ERK 1/2) se activa en presencia del BDNF en células cerebrocorticales.**

2.1.2. Efecto del bloqueo de las vías MAPK (ERK 1/2), AMPc/PKA, CaMKs y PI3K/Akt sobre la activación de la vía MAPK inducida por BDNF

Una vez confirmado que el BDNF producía la activación de la vía MAPK (ERK 1/2) en nuestro sistema, nos planteamos estudiar la posible participación de otras vías de señalización como la propia vía MAPK (ERK 1/2), la vía AMPc/PKA y la vía CaMKs en la activación de MAPK (ERK 1/2) en respuesta a BDNF.

Realizamos un estudio dosis-respuesta del bloqueo de cada vía por su inhibidor correspondiente para confirmar en nuestro sistema la efectividad del bloqueo de las quinasas respectivas por parte de estos inhibidores y hallar la mínima dosis eficaz capaz de bloquear cada vía, con el fin de minimizar la inhibición inespecífica de otras quinasas.

Siguiendo el diseño experimental habitual, tras permanecer 3-4 días en medio DMEM suplementado con 15% FCS, las células fueron deprivadas de suero durante 24 horas, a continuación, se incubaron durante 45 minutos en presencia de los distintos inhibidores: PD098059 (10 y 30 μ M), H89 (5, 10, 20 μ M), Rp-cAMPS (2,5, 10 y 20 μ M), KN62 (10 y 30 μ M), LY294002 (5, 10, 20 y 40 μ M). Posteriormente, se añadió BDNF (50 ng/ml) durante 10 minutos. Otros grupos recibieron únicamente el inhibidor correspondiente.

Como puede observarse (Figura 25), el PD098059 bloquea parcialmente la activación de la vía MAPK (ERK 1/2) inducida por BDNF, siendo este efecto evidente con la dosis máxima utilizada de 30 μ M.

Cuando bloqueamos la vía AMPc/PKA con los inhibidores H89 y Rp-cAMPS, se observa (Figuras 25 y 26) que el inhibidor H89 no produce ningún efecto en la activación de ERK 1/2 mientras que el inhibidor Rp-cAMPS la bloquea parcialmente a la dosis de 20 μ M, la más alta ensayada.

Al bloquear la vía CaMKs con el inhibidor KN62, observamos (Figura 26) un bloqueo parcial de la vía MAPK (ERK 1/2) siendo este efecto evidente a la dosis mínima ensayada (10 μ M).

Los inhibidores específicos de las vías MAPK (ERK 1/2), AMPc/PKA y CaMKs, ejercen una inhibición parcial de la activación de la vía MAPK (ERK 1/2), pero cuando se añaden todos los inhibidores simultáneamente (Figura 27), se observa un bloqueo total de la vía.

Estos resultados indican que **BDNF induce la activación de la vía MAPK (ERK1/2), y que en este proceso están parcialmente implicadas las vías MAPK (ERK 1/2), AMPc/PKA y CaMKs.**

Cuando bloqueamos la vía PI3K/Akt con el inhibidor LY294002 (Figura 28), observamos una inhibición parcial de la vía MAPK (ERK 1/2) con dosis elevadas de inhibidor (40 μ M). **Estos resultados sugieren una participación de la vía PI3K/Akt en la activación de la vía MAPK (ERK 1/2) por BDNF.**

2.1.3. Activación de la vía PI3K/Akt por BDNF. Estudio tiempo-respuesta

La vía PI3K/Akt es regulada por múltiples factores de crecimiento. En numerosos estudios se ha puesto de manifiesto que el BDNF induce *in vitro*, ciertas proteínas a través de la vía PI3K/Akt (Stroppolo et al., 2001; Bramham et al., 2005; Bogush, et al., 2007). El siguiente estudio se realizó con objeto de investigar si la vía PI3K/Akt es activada en nuestro sistema por el BDNF.

El procedimiento experimental fue semejante al descrito anteriormente. Las células cerebrocorticales se mantuvieron durante 3-4 días en medio DMEM suplementado con 15% de FCS y posteriormente en medio sin suero durante 24 horas. A continuación, se incubaron en presencia del BDNF (50 ng/ml) durante 1, 5, 10, 30, 60 minutos y 2 horas.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 29 donde se observa una activación de Akt por BDNF que empieza a los 5 minutos, llegando a un máximo de activación a los 10 minutos y manteniéndose ligeramente activada a las 2 horas.

Estos resultados indican que **la vía de señalización PI3K/Akt se activa por el BDNF en las células cerebrocorticales.**

2.1.4. Efecto del bloqueo de las vías PI3K/Akt, MAPK (ERK 1/2), AMPc/PKA y CaMKs sobre la activación de la vía PI3K inducida por BDNF

Para comprobar si la activación de la vía PI3K/Akt por BDNF, se bloquea por su inhibidor específico LY294002, las células se incubaron con dosis crecientes del inhibidor (5, 10 y 20 μ M) durante 45 minutos. Posteriormente, se añadió BDNF (50 ng/ml) durante 10 minutos. Otros grupos de células recibieron únicamente el inhibidor. Como se observa en la Figura 30, la presencia de LY294002 bloquea completamente la activación de la vía PI3K/Akt con dosis

de 10 y 20 μM .

Estos resultados confirman que **la activación de la vía PI3K/Akt por BDNF, se bloquea específicamente en presencia de su inhibidor LY294002.**

Estudios previos (Kimberley et al., 2004; Sable et al., 1997; Yu et al., 2001; Cheng et al., 2003) han demostrado que en la activación de PI3K/Akt pueden participar otras vías de señalización activadas por BDNF. Para conocer si esto ocurría también en nuestro modelo experimental, bloqueamos la vía AMPc/PKA con el inhibidor Rp-cAMPS. Como se observa en la Figura 31, el inhibidor Rp-cAMPS bloquea totalmente la vía PI3K/Akt con la dosis de 50 μM , la máxima utilizada.

Asimismo, como puede observarse en la Figura 31, el inhibidor de la vía MAPK (ERK 1/2), el PD098059, bloquea completamente la activación de la vía PI3K/Akt inducida por el BDNF, siendo este efecto significativo con la dosis de 20 μM , la mínima dosis utilizada. Del mismo modo, al bloquear la vía CaMKs (Figura 32) con los inhibidores KN62 (10 y 30 μM) y KN93 (10 y 30 μM), observamos que el inhibidor KN62 bloquea completamente la vía PI3K/Akt con la dosis de 30 μM . El inhibidor KN93 no modifica la activación de la vía PI3K/Akt por BDNF a ninguna de las dosis utilizadas.

Estos datos indican que **BDNF induce la activación de la vía PI3K/Akt a través de la activación per se de la vía PI3K/Akt. Además, las vías MAPK (ERK 1/2), AMPc/PKA y CaMKs participan en la activación de la vía PI3K/Akt por BDNF.**

2.2. ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN CREB POR BDNF

2.2.1. Activación de CREB por BDNF. Estudio tiempo-respuesta

Estudios previos han demostrado que el factor de transcripción CREB es el principal mediador de la acción del BDNF sobre la expresión génica en cultivos

primarios de células cerebrocorticales embrionarias postnatales (Finkbeiner et al., 1997).

Para confirmar que CREB se activa en nuestro sistema, células cerebrocorticales de embriones de rata se mantuvieron durante 3-4 días en medio DMEM suplementado con 15% de FCS y posteriormente en medio sin suero durante 24 horas. A continuación, se incubaron en presencia de BDNF (50 ng/ml) durante 1, 5, 10, 30, 60 minutos y 2 horas.

Los resultados obtenidos se representan en la Figura 33, donde se observa que el tratamiento con el BDNF induce un incremento en los niveles de CREB fosforilado, presentando un pico máximo de activación a los 10 minutos y regresando a los niveles basales a los 30 minutos. La concentración de CREB total no cambia en este tiempo, indicando que BDNF modifica específicamente la activación de la proteína y no su nivel de expresión.

Estos resultados confirman que **BDNF activa CREB (Ser¹³³) en las células cerebrocorticales embrionarias, lo que sugiere su participación en la regulación de la transcripción génica inducida por BDNF.**

2.2.2. Efecto del bloqueo de las vías AMPc/PKA, MAPK (ERK 1/2), CaMKs y PI3K/Akt sobre la activación de CREB inducida por BDNF

Con el fin de establecer las vías implicadas en la activación de CREB por el BDNF realizamos un estudio dosis-respuesta del bloqueo de cada vía por el inhibidor correspondiente.

Siguiendo el diseño experimental habitual, tras permanecer 3-4 días en medio DMEM suplementado con 15% FCS, las células fueron deprivadas de suero durante 24 horas, y a continuación, se incubaron durante 45 minutos en presencia de los distintos inhibidores: PD098059 (20 µM), Rp-cAMPS (20 y 50 µM), H89 (10, 20 y 40 µM), KN62 (10 y 30 µM) y KN93(10 y 30 µM), LY294002 (5, 10, 20 y 40 µM). Posteriormente, se añadió BDNF (50 ng/ml) durante 10 minutos. Otros grupos recibieron únicamente el inhibidor correspondiente.

Cuando se bloquea la vía AMPc/PKA con los inhibidores Rp-cAMPS y H89 (Figuras 34 y 35), se observa un bloqueo de la activación de CREB (Ser¹³³) que es parcial incluso con las dosis más altas utilizadas.

Estos datos indican que **la vía AMPc/PKA activada por BDNF participa en la activación de CREB (Ser¹³³) (Figura 38).**

Como se observa en la Figura 34, el inhibidor de la vía MAPK (ERK 1/2), PD098059, bloquea parcialmente la activación de CREB (Ser¹³³) inducida por BDNF, efecto que se pone de manifiesto con la dosis de 20 µM.

Estos resultados indican que **en la activación de CREB (Ser¹³³) por BDNF participa la vía MAPK (ERK 1/2) (Figura 38).**

La Figura 36 muestra que los inhibidores específicos de la vía CaMKs, el KN62 y KN93, no modifican la respuesta de CREB (Ser¹³³) a BDNF a ninguna de las dosis estudiadas.

Estos resultados indican que **la vía CaMKs no participa en la activación de CREB (Ser¹³³) por BDNF (Figura 38).**

El bloqueo de la vía PI3K/Akt (Figura 37) con su inhibidor específico, el LY294002, inhibe totalmente la activación de CREB con dosis elevadas de inhibidor (40 µM), lo que sugiere que **la vía PI3K/Akt participa en la activación de CREB por BDNF (Figura 38).**

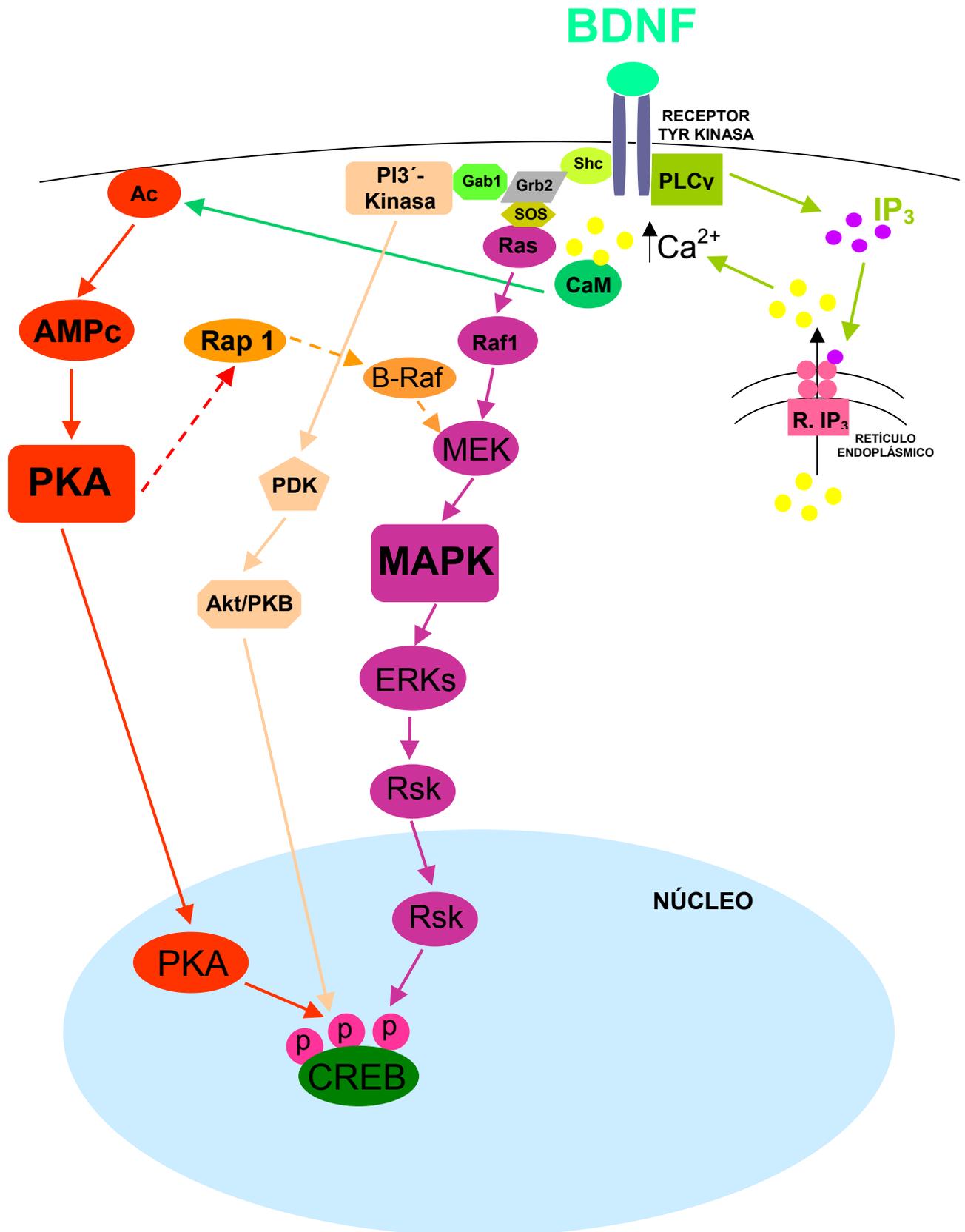


Figura 38. Vías de señalización intracelular que participan en la activación de CREB por BDNF.

2.3. IDENTIFICACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LA INDUCCIÓN DEL ARNm DE LA SS POR BDNF

En estudios previos de nuestro laboratorio (Villuendas et al., 2001) se demostró que en células cerebrocorticales embrionarias, los niveles del ARNm de la SS aumentaban tras el tratamiento con el BDNF. El estudio que describimos a continuación se realizó con objeto de establecer las vías de señalización celular que están implicadas en la inducción del ARNm de la SS por el BDNF.

2.3.1. Efecto del bloqueo de las vías AMPc/PKA, MAPK (ERK 1/2), CaMKs y PI3K/Akt sobre la inducción del ARNm de la SS por BDNF

Una vez conocidas las vías de señalización que se activan en respuesta al estímulo con el BDNF y cuales de éstas regulan la fosforilación de CREB, analizamos qué vías están implicadas en la inducción del ARNm de la SS por el BDNF.

Para realizar estos experimentos, se siguió el diseño experimental habitual. Tras permanecer 3-4 días en medio DMEM suplementado con 15% FCS, las células fueron deprivadas de suero durante 24 horas. A continuación, se incubaron durante 45 minutos en presencia de los distintos inhibidores: H89 (5, 10 y 20 μ M), Rp-cAMPS (20 y 50 μ M), PD098059 (20 y 30 μ M), KN62 (10, 30 μ M) y LY294002 (5, 10, 20 y 40 μ M). Posteriormente, se añadió el BDNF (50 ng/ml) durante 48 horas ya que en estudios previos de nuestro laboratorio (Villuendas et al., 2001) fue a este tiempo cuando se observó la máxima inducción del ARNm de la SS.

Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 39, 40 y 41, donde el panel A, muestra una autorradiografía representativa correspondiente a un Northern blot hibridado con una ribosonda de la SS marcada con d-UTP- $P^{32\alpha}$. En los paneles 39B, 40B y 41B, se muestra su cuantificación densitométrica en

porcentaje respecto al grupo control. Cuando bloqueamos la vía AMPc/PKA con el inhibidor H89 se observa un bloqueo de la inducción del ARNm de la SS relacionado con la dosis y que llega a ser completo con la dosis más alta utilizada (20 μ M) (Figura 39). En cambio, con el otro inhibidor de la vía AMPc/PKA, Rp-cAMPS, no se observa ningún grado de bloqueo de la inducción del ARNm de la SS (Figura 40) incluso a dosis altas (50 μ M).

Estos resultados indican por primera vez que **la vía AMPc/PKA participa fuertemente en la inducción del ARNm de la SS por BDNF.**

Cuando analizamos la implicación de la vía MAPK (ERK 1/2) (Figura 40) utilizando el inhibidor PD098059, observamos un bloqueo marcado de la inducción del ARNm de la SS con la dosis más alta utilizada (30 μ M).

Estos resultados son la primera evidencia de **la participación de la vía MAPK (ERK 1/2) participa en la inducción del ARNm de la SS por BDNF.**

En la Figura 40 se muestra que el bloqueo de la vía CaMKs con el inhibidor KN62, también promueve un bloqueo casi total de la inducción del ARNm de la SS por BDNF con la dosis de 30 μ M.

Estos resultados sugieren por primera vez que **la vía CaMKs también participa en la inducción del ARNm de la SS por BDNF.**

El inhibidor específico de la vía PI3K/Akt, LY294002 (5, 10, 20 y 40 μ M) (Figura 41), produce un bloqueo de la inducción del ARNm de la SS con la dosis más alta utilizada (40 μ M).

Estos datos son la primera demostración que **la vía PI3K/Akt participa en la inducción del ARNm de la SS por BDNF.**

Este conjunto de datos sugieren que **las vías MAPK (ERK 1/2) y CaMKs son prioritarias en la inducción del ARNm de la SS por BDNF participando asimismo las vías AMPc/PKA y PI3K/Akt (Figura 42).**

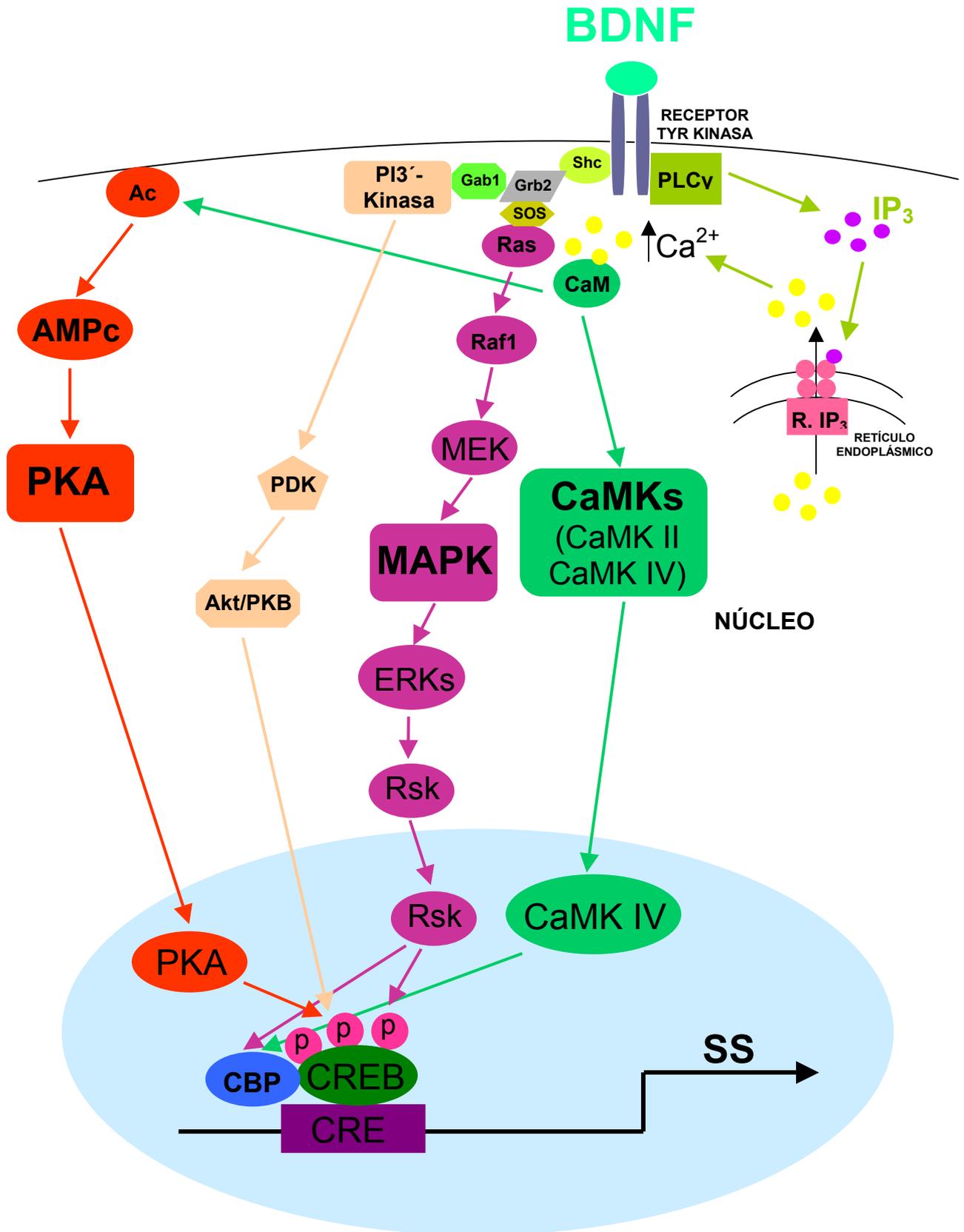


Figura 42. Vías de señalización intracelular que participan en la inducción del ARNm de SS por BDNF.

2.4. ESTUDIO DE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LA SS POR BDNF

En estudios realizados en nuestro laboratorio (Tolón et al., 1994) y otros laboratorios (Nawa et al., 1993) se pone de manifiesto que el BDNF induce los niveles de la proteína y del ARNm de la SS. Como se ha mencionado en el apartado 1.4, en el promotor de la SS existe una secuencia consenso, el CRE (5'-TGACGTCA-3'), a la que se une el factor de transcripción CREB, promoviendo su transcripción. Dado que CREB es un mediador crucial de la inducción génica de BDNF en neuronas y que como hemos demostrado anteriormente es activado por BDNF en nuestro modelo experimental, el sistema CREB-CRE aparece como un candidato idóneo a ser el mediador de la regulación transcripcional de la SS por el BDNF.

Para esclarecer si el BDNF activa la transcripción del gen de la SS, hemos realizado transfecciones transitorias con las diferentes construcciones del promotor de la SS en dos modelos experimentales: la línea celular PC12trkB y cultivos primarios de células cerebrocorticales embrionarias.

2.4.1. Efecto del BDNF sobre la actividad transcripcional del promotor del gen de la SS unido a cloranfenicol acetil transferasa (CAT) en la línea celular PC12trkB

Estos experimentos se han realizado en la línea celular PC12trkB, cedida por G.D. Yancopoulos, que es una variante de PC12 transfectada con el receptor de neurotropinas, trkB. Se han utilizado plásmidos, cedidos por el Dr. Mario Vallejo, en los que el gen que codifica la enzima bacteriana cloranfenicol acetil transferasa (CAT) se coloca bajo la influencia del promotor del gen de la SS. Los plásmidos utilizados son SS65-CAT, SS65 Δ CRE-CAT, SS900-CAT y SS900 Δ CRE-CAT.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 43, donde el panel A, representa una autorradiografía representativa de un ensayo CAT y en el panel B se muestra la cuantificación densitométrica de los ensayos CAT. Se observa

que aquellas células transfectadas con el promotor SS65 y tratadas con BDNF presentan un incremento de la actividad CAT que se abole en las células transfectadas con el promotor SS65 Δ CRE. Esto indica que el BDNF activa la transcripción génica de la SS y que ésta se ejerce a través del elemento CRE presente en su promotor. Cuando se transfectan las células con el promotor completo de la SS, el SS900, y se tratan con BDNF, se observa también un aumento de la actividad CAT aunque de menor intensidad que la observada con el promotor SS65.

Estos resultados ponen por primera vez en evidencia que **existe una regulación transcripcional de la SS por BDNF y que esta está mediada por el elemento CRE presente en el promotor de la SS.**

2.4.2. Efecto del BDNF sobre la actividad transcripcional del promotor del gen de la SS unido a luciferasa en cultivos primarios de células cerebrocorticales embrionarias

Con el fin de aproximarnos al modelo de regulación transcripcional que tiene lugar *in vivo* se han realizado transfecciones transitorias de cultivos primarios de células cerebrocorticales. Para este estudio, se subclonaron en colaboración con el laboratorio del Dr. Mario Vallejo (IIB, CSIC), las diferentes construcciones del promotor de la SS unidas a un gen reportero de luciferasa (SS65-Luc, SS65 Δ CRE-Luc, SS900-Luc y SS900 Δ CRE-Luc), tal y como se describe en material y métodos (apartado VI y VII).

Las células cerebrocorticales se transfectaron con diferentes construcciones del promotor del gen de la SS. Para la normalización de los resultados se cotransfectaron junto con el plásmido renilla. Como control de eficiencia de transfección un grupo de células se transfectó con el promotor pRSV-Luc.

Como podemos observar en la Figura 44, el BDNF induce un drástico incremento de la actividad luciferasa en las células transfectadas con la construcción del promotor SS65, que es superior al observado con el SS900. El efecto del BDNF sobre la inducción transcripcional de la SS es además más

evidente que el observado en las células PC12trkB. En las células transfectadas con las construcciones del promotor de la SS delecionadas del CRE, SS65 Δ CRE y SS900 Δ CRE, el BDNF no produce ningún incremento de la actividad luciferasa.

Estos resultados indican por primera vez que **existe una regulación transcripcional de la SS por BDNF en células cerebrocorticales embrionarias y que ésta está mediada por el elemento CRE presente en el promotor de la SS.**

DISCUSIÓN

1. CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS CEREBROCORTICALES EMBRIONARIAS DE RATA

El presente estudio ha sido realizado fundamentalmente en cultivos primarios de células cerebrocorticales de embriones de rata. Este modelo experimental permite el análisis *in vitro* del funcionamiento de un órgano de enorme complejidad como es el cerebro. Estos cultivos al ser mixtos, contienen neuronas y glia, aproximándose a la composición del tejido nervioso *in vivo*. Se han utilizado como donantes embriones de rata de 17 días de preñez ya que en esta edad del desarrollo embrionario existe una proporción mayor de neuronas respecto a células de glia, que disminuye en estadios posteriores (Dobbing, 1976). Además, en estudios previos habíamos observado que en esta edad embrionaria se produce una mayor inducción del ARNm de la SS por despolarización de la membrana con K^+ (Tolón et al., 1994) y por BDNF (Villuendas et al., 2001).

2. EFECTO DE LA DESPOLARIZACIÓN CON K^+ SOBRE LA ACTIVACIÓN DE SEÑALES INTRACELULARES EN CÉLULAS CEREBROCORTICALES EMBRIONARIAS

En trabajos previos de nuestro laboratorio (Tolón et al., 1994 y 2000) se demostró que al tratar las células cerebrocorticales en cultivo con altas concentraciones de K^+ , se producía un aumento de la liberación y contenido de la SS y de los niveles de su ARNm. Además, se observó que tras la despolarización de la membrana se producía un aumento de los niveles del AMPc (Tolón et al., 2000) que era dependiente de la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje (VSCCs), L-VSCCs (Tolón et al., 2000), y la consecuente entrada de calcio al interior celular.

Uno de los objetivos del presente estudio ha sido investigar los mecanismos celulares que conducen a la inducción del gen de la SS tras la activación de la membrana neuronal por despolarización con K^+ . Para ello, hemos investigado las vías de señalización intracelular que son activadas por despolarización con K^+ y posteriormente, hemos analizado cuáles de estas vías de señalización

Intracelular implicadas en la inducción del ARNm de la SS por despolarización.

2.1. Activación de la vía MAPK (ERK 1/2). Efecto del bloqueo de las vías MAPK(ERK 1/2), AMPc/PKA y CaMKs sobre la activación de la vía MAPK (ERK 1/2)

La despolarización de la membrana celular por altas concentraciones de K^+ se acompaña de un incremento del flujo de Ca^{2+} al interior celular y un aumento de los niveles del AMPc. El Ca^{2+} y el AMPc, actuando como segundos mensajeros, inician la activación de diferentes vías de señalización intracelular (Montminy et al., 1996; Rosen et al., 1994; Schulman, 1993; Ghosh et al., 1995; Dolmetsch et al., 2001).

Rosen (Rosen et al., 1994) fue el primero que demostró en las células PC12, que tras la despolarización de la membrana con K^+ , se producía una entrada de Ca^{2+} a través de los canales L-VSCCs que conllevaba la activación de la vía Ras/MAPK. Esta activación de la vía Ras/MAPK por despolarización de la membrana también se observa en otros tipos celulares como las células cromafines de origen bovino (Ely et al., 1990; Pavlovic-Surjancev et al., 1992). En este trabajo **hemos comprobado que en cultivo primario de células cerebrocorticales, la vía MAPK (ERK 1/2) se activa por despolarización con K^+** (Figura 1). Esta activación ocurre rápidamente a los 5 minutos y va disminuyendo progresivamente alcanzando los niveles basales tras 1 hora de estimulación. Este pico de inducción rápido podría deberse según propone Baldassa (Baldassa et al., 2003) a la activación de Ras, proteína localizada en la membrana plasmática; mientras que la inducción lenta estaría relacionada con la activación de la vía PKA-Rap1/B-Raf, ya que la proteína Rap1 es de localización intracelular.

Es conocida la interacción existente entre la vía MAPK (ERK 1/2) y la PKA. La PKA interacciona con la vía MAPK (ERK 1/2) a través del complejo Rap1/B-Raf (Grewal et al., 2000a). Nuestros resultados, en los que observamos un bloqueo de la activación de la vía MAPK (ERK 1/2) en presencia de los

inhibidores específicos de la vía AMPc/PKA, el Rp-cAMPS y el H89 (Figuras 3 y 4), sugieren la interacción descrita anteriormente entre las vías MAPK (ERK 1/2) y PKA en la inducción de ERK 1/2 por despolarización con K^+ .

Otra vía que también se ha observado que interacciona con la vía MAPK (ERK 1/2) es la vía de las CaMKs (Soderling, 1999; Sahyoun et al., 1991). Estos autores proponen que la CaMKIV fosforila Rap1 *in vitro*, que a través de su unión con B-Raf, activa la vía MAPK (ERK 1/2). Nosotros observamos que el bloqueo de la vía CaMKs con los dos inhibidores utilizados, el KN62 y el KN93 (Figura 5), inhiben la activación de las ERKs inducida por despolarización con K^+ . Estos resultados sugieren que existe una interacción entre la vía CaMKs y MAPK (ERK 1/2) en la inducción de ERKs por despolarización con K^+ como ha sido descrito.

En este estudio se han utilizado los inhibidores de la vía de las CaMKs, el KN62 y KN93. Como hemos comentado en la introducción, existe una gran controversia acerca de cual de las CaMKs es la diana de cada inhibidor. Nosotros hemos observado que si bien ambos inhiben la vía MAPK (ERK 1/2), se observa una inhibición más potente con el inhibidor KN93. Hay autores (Finkbeiner et al., 1997) que consideran al inhibidor KN93 como inhibidor específico de la CaMKIV, lo que explicaría la mayor inhibición observada con el KN93.

Nuestros resultados indican que **la despolarización con K^+ activa la vía MAPK (ERK 1/2) en células cerebrocorticales en cultivo** y que esta activación está mediada **por las vías AMPc/PKA y CaMKs**.

3. MECANISMO INTRACELULAR DE LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR TRANSCRIPCIONAL CREB POR K^+

Uno de los factores de transcripción mejor caracterizado, activado por estímulos extracelulares, es CREB. CREB regula procesos de proliferación celular, diferenciación y supervivencia.

Estudios realizados por Shaywitz y Greenberg muestran que CREB regula

la transcripción de numerosos genes en respuesta a diversos estímulos. Entre estos genes se encuentran aquellos que participan en repuestas neuronales de adaptación como cambios de comportamiento provocados por cambios del entorno (Ginty et al., 1993), o en funciones neurales más complejas como son el aprendizaje y la memoria (Frank et al., 1994).

La activación de la membrana neuronal por despolarización con K^+ activa una serie de vías de señalización intracelular que convergen en la activación de factores de transcripción que se unen a elementos de respuesta específicos presentes en diferentes genes y modulan su transcripción.

Entre los factores de transcripción activados por despolarización de la membrana con K^+ se encuentra CREB. La regulación transcripcional de la SS está íntimamente relacionado con la activación de CREB, el acoplamiento al CBP y su consecuente unión al elemento de respuesta CRE presente en su promotor. Estos hechos nos llevaron a estudiar los mecanismos intracelulares que median la activación de CREB por despolarización, para posteriormente, poder definir cuales están implicados en la inducción del gen de la SS por actividad neuronal.

3.1. Activación del factor transcripcional CREB. Efecto del bloqueo de las vías MAPK(ERK 1/2), AMPc/PKA y CaMKs sobre la activación de CREB

Se ha demostrado previamente en una gran variedad de tipos celulares que la despolarización de la membrana induce la fosforilación de CREB en Ser133 (Sheng et al., 1990; Thompson et al., 1995; Deisseroth et al., 1996; Kornhauser et al., 2002). Para determinar la curva de tiempo de inducción de CREB por actividad neuronal en las células cerebrocorticales en cultivo, se monitorizó la fosforilación de CREB en Ser133 a diferentes tiempos después de la despolarización de la membrana.

En este trabajo **hemos confirmado que la despolarización con K^+ activa CREB** (Figura 6) y que además, como ha sido previamente documentado

(Impey et al., 1998a; Wu et al., 2001), presenta una cinética de activación con dos fases: una rápida que se observa a los 5 minutos, y una fase más lenta que se inicia a partir de los 30 minutos y que se prolonga hasta las 24 horas de iniciado el estímulo. La activación prolongada de CREB es necesaria para la transcripción (Bito et al., 1996).

La cinética de activación que presenta CREB, paralela a la descrita por Impey (Impey et al., 1998a) en el área CA1 de hipocampo, puede estar determinada por la activación de distintas vías de señalización intracelular que son inducidas por K^+ . Con el fin de establecer la identidad de las proteínas quinasas que median la cinética de activación de CREB, se utilizaron inhibidores farmacológicos específicos de cada vía. Los resultados obtenidos (Figuras 8, 9, 12 y 15) indican que **en la activación temprana de CREB participan las vías AMPc/PKA y CaMKs**. Nuestros resultados confirman los obtenidos por Wu en células de hipocampo (Wu et al., 2001), donde se pone en evidencia que en la fase de activación temprana de CREB por K^+ , participa la vía CaMKs. Asimismo, en los estudios de Impey (Impey et al., 1998a) llevados a cabo en cultivos primarios de neuronas hipotalámicas, se observó que el inhibidor de la AMPc/PKA, el Rp-cAMPS inhibía la fosforilación de CREB inducida por despolarización con K^+ a los 5 minutos de su inducción.

En cuanto a las vías de señalización que median la activación tardía de CREB, nuestros resultados (Figuras 10, 13 y 16) indican la implicación tanto de la vía MAPK (ERK 1/2) como de la vía CaMKs. Estos datos confirman estudios previos (Wu et al., 2001; Impey et al., 1998a; Wayman et al., 1997) donde se pone de manifiesto que la vía MAPK (ERK 1/2) es la responsable de la fosforilación prolongada de CREB. Sin embargo, no existen evidencias de la implicación de la vía CaMKs en esta fase de activación. La inhibición de la fosforilación tardía de CREB por los inhibidores de las CaMKs observada en este estudio, podría deberse a un efecto de los propios inhibidores sobre un sustrato independiente de las CaMKs, ya que al menos el KN62 interfiere con la entrada del Ca^{2+} a través de los canales L-VSSCs, además de inhibir las CaMKs (Hu et al., 1999).

Nuestros resultados (Figuras 8, 9, 10, 12, 13 15 y 16) confirman que **la fosforilación rápida de CREB por despolarización de la membrana en células cerebrocorticales en cultivo requiere la actividad de las vías AMPc/PKA y CaMKs, mientras que la activación tardía está mediada por la vía MAPK (ERK 1/2) y CaMKs.**

En este estudio se ha utilizado un anticuerpo que reconoce CREB cuando está fosforilado en el residuo Ser133. Estudios previos han evidenciado que la despolarización de la membrana conduce a la inducción de una fosforilación coordinada de CREB en los residuos Ser133, Ser142 y Ser143 (Kornhauser et al., 2002). Mientras que la fosforilación de CREB en Ser133 ocurre dentro de los minutos 1-2 y se prolonga hasta por los menos 60 minutos, la de Ser142 y Ser143 se produce más tardíamente, con un pico máximo a los 15 minutos. Esta cinética de fosforilaciones que refleja lo que se observa en la activación secuencial de CaMKIV y Ras/MAPK/Rsk tras despolarización, parece ser determinante para que tenga lugar la transcripción génica mediada por CREB.

Como hemos observado, la despolarización con K^+ conduce a una rápida fosforilación de CREB en Ser133, sin embargo, la transcripción dependiente de CREB es mucho mas tardía. Este hecho sugiere que además de fosforilarse otros residuos de CREB, CBP u otros coactivadores de transcripción, se coordinen con CREB activado en Ser133 en una efectiva transcripción mediada por CREB.

La activación del factor de transcripción CREB es crucial para la regulación transcripcional de la SS. Dado que nuestro modelo experimental era un cultivo mixto, deseamos conocer si la fosforilación de CREB por K^+ ocurría en las células somatostatinérgicas. Los resultados obtenidos mediante inmunofluorescencia con doble marcaje confirman la inducción de CREB por K^+ en la propia célula somatostatinérgica (Figura 7). Al mismo tiempo, evidenciamos que la inhibición de las vías de señalización implicadas en la activación de CREB reduce dramáticamente la presencia de CREB fosforilado en las células somatostatinérgicas (Figuras 11, 14 y 17). Estos resultados son **la primera evidencia de que la actividad neuronal inducida por**

despolarización con K^+ promueve la fosforilación de CREB en células somatostatinérgicas.

4. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR IMPLICADAS EN LA INDUCCIÓN DEL ARNm DE LA SS POR K^+

En estudios previos (Tolón et al., 1994 y 2000) pusimos de manifiesto que en células cerebrocorticales en cultivo primario, la despolarización de la membrana con K^+ inducía un aumento de los niveles del ARNm de la SS. Esta inducción era dependiente de la entrada del Ca^{2+} a través de los canales L-VSCCs y del concomitante incremento del AMPc.

Por ello, una vez que habíamos establecido las vías de señalización intracelular que se activaban por K^+ en nuestro modelo experimental, y cuales participaban en la fosforilación de CREB, nos planteamos estudiar los mecanismos mediante los que el Ca^{2+} regula la inducción del ARNm de la SS.

4.1. Efecto del bloqueo de las vías AMPc/PKA, MAPK(ERK 1/2) y CaMKs sobre la inducción del ARNm de la SS

Los mecanismos moleculares que activan la expresión génica mediada por señales de Ca^{2+} han sido estudiados en profundidad y al menos tres vías de señalización intracelular encargadas de propagar las señales del Ca^{2+} al núcleo se han descrito: AMPc/PKA, CaMKs y MAPK (ERK 1/2).

Los trabajos realizados por el grupo de Montminy (Montminy et al., 1986a, 1986b y 1996) demostraron la implicación del AMPc en la activación transcripcional del gen de la SS. La vía AMPc/PKA es por lo tanto una fuerte candidata a ser mediadora en la inducción del ARNm de la SS, ya que el aumento del AMPc, tras la despolarización con K^+ , activa la PKA (Montminy et al., 1996).

En este trabajo hemos estudiado la implicación de la vía AMPc/PKA en la inducción del ARNm de la SS, bloqueándola con sus inhibidores específicos, el H89 y el Rp-cAMPS. Observamos (Figuras 19 y 20) que ambos inhibidores abolen completamente la inducción del ARNm de la SS. Estos resultados

demuestran que **la vía AMPc/PKA juega un papel crucial en la inducción del ARNm de SS que se observa tras la despolarización con K⁺**.

Cuando estudiamos la implicación de la vía MAPK (ERK 1/2), observamos que la inhibición de esta vía con el PD098059, no afecta a la inducción del ARNm de la SS (Figura 20). Aunque los niveles del ARNm disminuían ligeramente, este descenso no era significativo. En cambio, el bloqueo de la vía CaMKs con los inhibidores KN62 y KN93 (Figura 21), provoca una inhibición de la inducción del ARNm de la SS de magnitud similar a la observada con los inhibidores de la vía AMPc/PKA. El hecho de que el bloqueo de las vías AMPc/PKA y CaMKs inhiba completamente la inducción del ARNm de la SS y que ambas vías sean a su vez las que median en la activación rápida de CREB, sugiere que **la activación temprana de CREB se requiere para la inducción del ARNm de la SS tras despolarización**.

La vía MAPK (ERK 1/2) es activada por despolarización con K⁺ y participa en la fosforilación tardía de CREB, sin embargo, nuestros resultados indican que no es requerida para la inducción del ARNm de la SS. En consonancia con nuestros hallazgos en cultivos primarios de células cerebrocorticales, el grupo de Hu (Hu et al., 1999) examinó el mecanismo mediante el que la entrada del Ca²⁺ por despolarización con K⁺, activa la transcripción mediada por CREB-CBP. Observaron que la activación de CaMKII, CaMKIV o PKA, pero no de la MAPK, puede conducir a la inducción de la transcripción mediada por CBP. Varios estudios han evidenciado que la actividad transcripcional mediada por el CRE requiere su estimulación por la subunidad catalítica de la PKA. El grupo de Montminy (Montminy et al., 1986a) demostró que el CRE de la SS no responde al AMPc en células PC12 deficientes de PKA.

Estos resultados demuestran por primera vez que tanto la vía AMPc/PKA como la vía CaMKs son necesarias para la inducción del ARNm de la SS.

5. ACTIVACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL GEN DE LA SS INDUCIDA POR K⁺

La despolarización de la membrana neuronal por K⁺ y la subsecuente entrada del Ca²⁺ en el citoplasma, conduce a la inducción de una serie de vías de señalización intracelular que convergen en la activación de factores de transcripción, que una vez activados, reclutan otros componentes de la maquinaria transcripcional y uniéndose a elementos de respuesta específicos que se encuentran en los diferentes genes, modulan su transcripción.

5.1. Implicación del elemento CRE en la regulación transcripcional de la SS por K⁺

Potencialmente, el Ca²⁺ puede regular uno o varios de los pasos implicados en la expresión génica: inducción, elongación, estabilidad o translocación del ARNm. En estudios previos, habíamos observado que la despolarización con K⁺ de células cerebrocorticales embrionarias en cultivo, promovía un incremento en los niveles del ARNm de la SS (Tolón et al., 2000). Además, comprobamos que la despolarización aumentaba la estabilidad del ARNm de la SS, lo que podía contribuir al aumento en los niveles del ARNm de la SS que encontramos tras despolarización (Tolón et al., 1994).

En este trabajo nos planteamos estudiar si la despolarización con K⁺ podría, además de incrementar la estabilidad del ARNm de la SS, inducir la transcripción de su gen.

Es bien conocida la existencia de la secuencia consenso CRE localizada en el promotor de SS, responsable de la activación de la SS por el AMPc (Montminy et al., 1986a), secuencia a la que se une el factor transcripcional CREB que una vez activado, induce la transcripción del gen. Se transfectaron las células cerebrocorticales con las diferentes construcciones del promotor de SS, con o sin deleciones del CRE, unidas al gen reportero de luciferasa (Luc). Nuestros datos (Figura 23) muestran que la despolarización con K⁺ de las células transfectadas con secuencias del promotor de la SS que contienen el elemento CRE, incrementa marcadamente la actividad del gen reportero Luc,

indicando que el K^+ induce la transcripción de la SS. Este efecto no se puso de manifiesto cuando se utilizaron construcciones del promotor carentes del CRE. Nuestros resultados confirman estudios previos utilizando el promotor del gen de la SS humano (Hu et al., 1999).

Además observamos (Figura 23) que en las células transfectadas con el promotor completo (SS900) existe una menor inducción de actividad del gen reportero Luc que en las transfectadas con el promotor SS65, construcción que sólo contiene el elemento CRE. Esto puede deberse a la existencia, en el promotor completo del gen de la SS, de secuencias silenciadoras, localizadas entre los nucleótidos -120 y -250 del promotor, que participan en la regulación negativa de la transcripción (Vallejo et al., 1995b; Goodman, 1990).

Nuestros resultados muestran por primera vez que la despolarización por K^+ induce la transcripción del gen de la SS de rata y que esta activación transcripcional está mediada por el elemento de respuesta CRE presente en el promotor de la SS.

6. EFECTO DE BDNF SOBRE LA ACTIVACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR EN CÉLULAS CEREBROCORTICALES EMBRIONARIAS

El BDNF es un potente activador de la diferenciación neuronal tanto *in vivo* como *in vitro*, induciendo los niveles de varios neuropéptidos, como la SS (Loudes et al., 2000; Nawa et al., 1993 y 1994; Villuendas et al., 2001). Muchos estudios han evidenciado que la expresión de neuropéptidos se afecta por la actividad neuronal (Agoston et al., 1991; Tolón et al., 1994 y 2000) y la influencia de las neurotrofinas en la inducción de la SS por actividad neuronal (Loudes et al., 2000; Villuendas, 1998) ha sido evidenciada. En estudios previos observamos que en células cerebrocorticales en cultivo, la inducción del BDNF precede en el tiempo a la de la SS y que su bloqueo inhibe la inducción de la SS por despolarización. La existencia de esta fuerte interrelación entre el BDNF y la SS nos llevó a identificar los mecanismos

de señalización intracelular a través de los que el BDNF regula la expresión de la SS.

6.1. Activación de la vía MAPK (ERK 1/2). Efecto del bloqueo de las vías MAPK(ERK 1/2), AMPc/PKA, CaMKs y PI3K/Akt sobre la activación de la vía MAPK (ERK 1/2)

Es bien conocido que las acciones del BDNF están mediadas por un receptor de la familia de receptores tirosina quinasa, el trkB. Existe otro receptor de menor afinidad denominado p75. Cuando ambos receptores se co-expresan en la misma célula, el p75 puede modificar la señalización del receptor trkB (Friedman et al., 1999).

TrkB, al igual que otros receptores de neurotropinas, activa varias cascadas de señalización intracelular incluyendo la vía Ras/ERK, la vía PLC γ , la vía PI3K/Akt y la vía PKA (Finkbeiner et al., 1997; Friedman et al., 1999; Grewal et al., 1999; Finkbeiner, 2000; Nonomura et al., 1996; Widmer et al., 1992 y 1993; Yao et al., 1995; Balif et al., 2001; Gallo et al., 2002, Zhang et al., 1999).

En este trabajo **hemos confirmado estudios previos** (Marsh et al., 1993; Hetman et al., 1999) **donde se demuestra que la vía MAPK (ERK 1/2) es activada por el BDNF de forma rápida**, con un pico máximo de activación a los 10 minutos, **y sostenida**, manteniéndose elevada a los 60 minutos (Figura 24). Mecanismos específicos pueden ser responsables de estas dos fases. Se ha observado que la activación rápida inicial de ERK 1/2 por el NGF requiere Ras (York et al., 1998), mientras que la activación sostenida requiere la proteína Rap1. ERK1/2 pueden ser activadas por el BDNF a través de la vía de señalización que incluye el propio receptor, la proteína G de unión a Ras GTP, la quinasa Raf-1 y MEKs, o a través de otras vías de señalización.

Una vez establecido que el BDNF activaba la vía MAPK (ERK 1/2) nos planteamos estudiar las vías que eran responsables de su activación, siguiendo la misma estrategia experimental descrita para el K⁺. El bloqueo con el inhibidor de la vía MAPK (ERK 1/2), el PD098059, produce una atenuación parcial de la

activación de la vía MAPK (ERK 1/2), bloqueo parcial, que también se observa con el inhibidor de las CaMKs, el KN62, y con uno de los inhibidores de la vía AMPc/PKA, el Rp-cAMPS (Figuras 25 y 26). Otro inhibidor de la vía AMPc/PKA, el H89, no modifica la activación de la vía MAPK (ERK 1/2) (Figura 25). Esta inhibición parcial observada con cada uno de los inhibidores de las 3 vías, es total cuando bloqueamos simultáneamente con todos los inhibidores (Figura 27).

El bloqueo parcial de MAPK (ERK 1/2) observado con el inhibidor PD098059, contrasta con estudios previos donde observaron una inhibición total con dosis inferiores, utilizando el mismo modelo experimental, pero donde los donantes de neuronas eran del día 0 postnatal (Finkbeiner et al., 1997). Estudios previos en neuronas granulares indican que en el SNC de mamíferos, las respuestas inducidas por neurotropinas y los mecanismos en ellos implicados siguen un patrón definido temporalmente (Shalizi et al., 2003), lo que podría explicar la discordancia entre nuestros resultados y los estudios previos.

El BDNF activa la vía PLC γ , lo que conlleva un aumento del Ca²⁺ en neuronas procedente de los depósitos intracelulares (Berninger et al., 1993), activación de la vía CaMKs y fosforilación de ERK 1/2 por un mecanismo dependiente de Ras. Nuestros resultados apoyan la participación de esta vía de señalización en la activación de ERK 1/2 por el BDNF. En estudios previos en neuronas procedentes de cerebros obtenidos en el día 0 postnatal, el KN62 no interfiere con la fosforilación de ERK 1/2 por el BDNF (Finkbeiner et al., 1997). La discrepancia con nuestros resultados podría deberse a la diferente edad de los donantes.

La inhibición parcial de la vía MAPK (ERK 1/2) con un inhibidor de la vía AMPc/PKA, el Rp-cAMPS, que hemos observado, sugiere que pueda existir alguna interacción entre ambas vías. Estudios previos han demostrado una interacción entre las vías MAPK (ERK 1/2) y AMPc/PKA a través de Rap1/B-Raf en las células PC12 expuestas a NGF (Grewal et al., 1999).

En contraste con el Rp-cAMPS, el H89 no modifica la fosforilación de ERK1/2 por BDNF (Figura 25). Rp-cAMPS es un análogo del AMPc con efecto inhibitorio y por lo tanto, puede inhibir no sólo PKA sino también otras moléculas con receptores para el AMPc, como Epac (Rehman et al., 2003), comportándose más como un inhibidor del AMPc que de PKA. Por el contrario, el H89 bloquea el sitio de unión del AMPc en la PKA inhibiendo tan sólo los efectos del AMPc que son dependientes de PKA. Aunque la activación de PKA y su participación en la señalización por el BDNF ha sido documentada (Gallo et al., 2002), nuestros resultados sugieren que la PKA no participa en la activación de la vía MAPK (ERK 1/2) por el BDNF en nuestro modelo experimental. La activación de la vía MAPK (ERK 1/2) por el BDNF es, según nuestros resultados, dependiente de AMPc e independiente de PKA.

El hecho de que el bloqueo simultáneo de la vía MAPK (ERK 1/2), la vía CaMKs y la vía AMPc/PKA anule completamente la activación de ERK 1/2 por el BDNF, sugiere la participación de estas tres vías en la activación de ERK 1/2 por el BDNF.

La participación de la vía PI3K/Akt, la cual es activada por el BDNF (Egea et al., 2001; Cheng et al., 2003), en la activación de ERK 1/2 por el BDNF, no parece muy consistente. Tan sólo con una dosis de LY294002 de 40 μ M, se observa una inhibición parcial (Figura 28). El grupo de Chen (Chen et al., 2005) ha observado que la vía PI3K contribuye a la activación de ERK 1/2 en el hipocampo por un mecanismo independiente de Akt.

Estos resultados indican que el BDNF activa la vía MAPK (ERK 1/2) y que en esta activación participan la vía MAPK (ERK 1/2), la vía CaMKs, la vía AMPc/PKA y la vía PI3K/Akt.

6.2. Activación de la vía PI3K/Akt. Efecto del bloqueo de las vías PI3K/Akt, MAPK(ERK 1/2), AMPc/PKA y CaMKs sobre la activación de la vía PI3K/Akt

La activación de la vía PI3K/Akt por el BDNF que ha sido evidenciada en numerosos estudios (Egea et al., 2001; Cheng et al., 2003), está íntimamente relacionada con las acciones del BDNF en supervivencia neuronal. El incremento en los niveles del neuropéptido SS y de su ARNm por el BDNF podría reflejar una mayor supervivencia de las neuronas somatostatinérgicas corticales, aunque el BDNF no promueve la supervivencia de células somatostatinérgicas en el núcleo periventricular del hipotálamo (Rage et al., 1999). Nuestros resultados confirman que el BDNF activa la vía PI3K/Akt (Figura 29). Trabajos previos han demostrado que en esta activación de la vía PI3K/Akt participan otras vías de señalización intracelular, activadas tras la unión del BDNF a su receptor.

Dado que la respuesta celular a un determinado agente depende del tipo celular, fase de desarrollo, edad, etc., analizamos el mecanismo de activación de la vía PI3K/Akt en nuestro modelo experimental. En primer lugar, confirmamos que el inhibidor específico de la vía PI3K/Akt (LY294002) producía una inhibición dosis-respuesta (Figura 30). Igualmente, el Rp-cAMPS, inhibidor competitivo del AMPc, bloquea completamente la activación de la vía PI3K/Akt por el BDNF (Figura 31). La activación de la vía PI3K/Akt por AMPc/PKA vía AMPc-Epac-Rap1 protege los hepatocitos de apoptosis (Kimberley et al., 2004). La estimulación de PKB por AMPc ha sido demostrada (Sable et al., 1997).

El bloqueo de la vía MAPK (ERK 1/2) con PD098059 inhibió por completo la fosforilación de Akt (Figura 31). La inhibición de la activación de ERK 1/2 disminuye la fosforilación de Akt inducida por HGF en hepatocitos (Yu et al., 2001).

Cuando se bloquea la vía CaMKs con el inhibidor KN62, pero no con el KN93, se inhibe totalmente la fosforilación de Akt (Figura 32), confirmando estudios previos que demuestran un papel crucial de la CaM en la activación de Akt por el BDNF (Cheng et al., 2003).

Nuestros resultados sugieren que en la activación de la vía PI3K/Akt por el BDNF participan las vías AMPc/PKA, MAPK (ERK 1/2) y CaMKs.

7. MECANISMO INTRACELULAR DE LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR TRANSCRIPCIONAL CREB POR BDNF

Los trabajos realizados por el grupo de Finkbeiner (Finkbeiner et al., 1997) demostraron cómo en los cultivos primarios de neuronas postnatales, el factor de transcripción CREB, activado por el BDNF, es el principal mediador de sus acciones sobre la expresión génica. CREB está íntimamente implicado en la expresión génica de la SS, neuropéptido inducido por el BDNF. Con el objeto de aproximarnos a los mecanismos que regulan la inducción de la SS por el BDNF, analizamos previamente las vías de señalización que en nuestro modelo experimental median la activación de CREB por el BDNF.

7.1. Activación del factor transcripcional CREB. Efecto del bloqueo de las vías AMPc/PKA, MAPK(ERK 1/2), CaMKs y PI3K/Akt sobre la activación de CREB

Nuestros resultados (Figura 33) confirman que **CREB se activa por el BDNF** presentando un pico de activación máxima a los 10 minutos, en concordancia con estudios previos (Finkbeiner et al., 1997). Esta activación de CREB ocurre en un único residuo de Ser, Ser133, en contraste a lo que sucede cuando CREB es activado por despolarización con K⁺, donde CREB es fosforilado en tres residuos de Ser (Kornhauser et al., 2002).

El patrón de activación de CREB por el BDNF presenta una única fase de activación en vez de dos fases como ocurría por despolarización con K⁺. Con

objeto de conocer las vías de señalización que participaban en esta activación, se bloquearon las diferentes vías de señalización con sus inhibidores específicos. Al bloquear la vía MAPK (ERK 1/2) con el PD098059, observamos una disminución de la activación de CREB (Figura 34), indicando que **la vía MAPK (ERK 1/2) es prioritaria en su activación por el BDNF**. Estos resultados concuerdan con estudios previos (Finkbeiner et al., 1997) en neuronas corticales de donantes postnatales.

Una inhibición parcial se observa también al bloquear la vía AMPc/PKA con el Rp-cAMPS y el H89 (Figuras 34 y 35). La activación de la vía AMPc/PKA por el BDNF ha sido poco explorada, sin embargo, existen algunos estudios que confirman su activación por el BDNF (Gallo et al., 2002) o su mediación en ciertas acciones del BDNF (Wang et al., 1998; Boulanger et al., 1999; Cai et al., 1999; Tartaglia et al., 2001). Esta implicación de la vía AMPc/PKA parece sin embargo, ser específica de la activación de CREB por el BDNF. En efecto, en células PC12, el NGF activa CREB independientemente de la vía AMPc/PKA (Ginty et al., 1994).

Nuestros resultados indican por primera vez la participación de la vía AMPc/PKA en la activación de CREB por el BDNF en cultivos primarios de células cerebrocorticales.

Con los inhibidores de la vía CaMKs, el KN62 y el KN93, (Figura 36), observamos una cierta disminución de la activación de CREB que no es significativa. Estos resultados están en desacuerdo con estudios previos (Finkbeiner et al., 1997), donde demuestran que el KN62, pero no el KN93, inhibe parcialmente la fosforilación de CREB por el BDNF. Esta discrepancia podría estar relacionada con el grado de madurez de las neuronas. En el estudio de Finkbeiner utilizan cultivos de neuronas procedentes del día 0 postnatal, mientras que en el nuestro proceden de embriones de E17. Existe evidencia que las vías de señalización activadas por el BDNF para una determinada acción biológica varían en función del grado de diferenciación de las neuronas (Finkbeiner et al., 1997; Shalizi et al., 2003).

Nuestros resultados sugieren que la vía CaMKs no juega un papel importante en la activación del factor transcripcional CREB por el BDNF.

La activación de la vía PI3K/Akt y la consiguiente fosforilación de CREB están íntimamente relacionadas con las acciones del BDNF en supervivencia neuronal (Finkbeiner, 2000). Nosotros observamos que el bloqueo de la vía PI3K/Akt con el inhibidor LY294002, disminuye la fosforilación de CREB (Figura 37), lo que sugiere de acuerdo con lo observado previamente en neuronas postnatales (Finkbeiner, 2000), que la vía PI3K/Akt participa en la inducción de CREB por el BDNF.

Los resultados de este estudio sugieren que el BDNF activa CREB a través de las vías de señalización MAPK (ERK 1/2), AMPc/PKA y PI3K/Akt.

8. MECANISMO INTRACELULAR DE LA INDUCCIÓN DEL ARNm DE LA SS POR BDNF

El BDNF es un potente regulador de la SS. Nuestros estudios previos *in vitro* (Villuendas et al., 2001) y de otros autores *in vitro* e *in vivo* (Nawa et al., 1993 y 1994; Mizuno et al., 1994; Marty et al., 1999; Rage et al., 1999), demuestran que el BDNF induce la secreción y síntesis del neuropéptido y de los niveles de su ARNm. Además, el BDNF es un mediador de la inducción de la SS por despolarización con K⁺ (Villuendas, 1998; Givalois et al., 2006).

8.1. Efecto del bloqueo de las vías AMPc/PKA, MAPK(ERK 1/2), CaMKs y PI3K/Akt sobre la inducción del ARNm de la SS por BDNF

Una vez establecidas las vías que se activan por el BDNF en nuestro modelo experimental, estudiamos a través de qué mecanismos de señalización intracelular el BDNF induce el ARNm de la SS.

CREB es un factor de transcripción crucial en la regulación transcripcional de la SS. La vía AMPc/PKA es una de las vías de señalización que induce la activación de CREB. Como hemos demostrado en el presente estudio, la activación de CREB por el BDNF está mediada, entre otras, por la vía AMPc/PKA. Cuando, basados en estos hechos, analizamos el papel de la vía AMPc/PKA en la inducción del ARNm de la SS por BDNF, observamos (Figuras 39 y 40) un bloqueo completo con el inhibidor H89 pero no con el Rp-cAMPS. Rp-cAMPS es un inhibidor competitivo del AMPc. El BDNF induce un aumento del AMPc. La falta de un efecto inhibitor del Rp-cAMPS en la inducción del ARNm de la SS por el BDNF, podría deberse a la utilización de dosis de Rp-cAMPS demasiado bajas para competir con todo el AMPc inducido por el BDNF. En esta situación, pequeñas cantidades del AMPc podrían ser suficientes para permitir una activación de la PKA y la consecuente inducción del ARNm de la SS. A favor de esta hipótesis está el hecho de que en esas mismas condiciones experimentales, el bloqueo de CREB es parcial. El CREB que permanece activado podría ser suficiente para mantener activa la maquinaria transcripcional que conlleva la inducción del ARNm de la SS.

Los resultados mencionados en el apartado anterior y las observaciones de otros grupos (Finkbeiner et al., 1997), evidencian la importancia de la vía MAPK (ERK 1/2) en la activación de CREB por el BDNF. El presente estudio demuestra que además esta vía de señalización es necesaria para la inducción de la SS por el BDNF. **Estos resultados son los primeros en demostrar la implicación de la vía MAPK (ERK 1/2) en la inducción del ARNm de la SS por el BDNF.**

Hemos observado en este estudio que la vía CaMKs no participa en la activación de CREB por el BDNF. Sin embargo, el bloqueo con el inhibidor KN62 (Figura 40) inhibe completamente la inducción del ARNm de la SS. La transcripción del gen de la SS ocurre por el acoplamiento a CREB fosforilado de otros coactivadores como el CBP. CBP es activado por la CaMKIV (Hu et al., 1999; Impey et al., 2002). En consecuencia la falta de activación de CBP puede resultar en una disminución de la inducción del ARNm de la SS como

observamos en este estudio, **el cual demuestra por primera vez la implicación de la vía CaMKs en la inducción del ARNm de la SS por el BDNF.**

Es bien conocida la activación de la vía PI3K/Akt por el BDNF (Egea et al., 2001; Cheng et al., 2003) y su participación en los procesos de supervivencia mediados por el BDNF (Nonomura et al., 1996; Finkbeiner, 2000). PI3K/Akt puede ejercer sus acciones de supervivencia regulando la expresión de genes implicados en muerte celular y supervivencia. La SS podría ser un gen regulado por la vía PI3K/Akt, favoreciendo la supervivencia de aquellas células que expresan la SS y en línea con el papel del BDNF en supervivencia celular. En este trabajo nos planteamos estudiar si la vía PI3K/Akt está implicada en la inducción del ARNm de la SS, observando que el inhibidor específico de la vía PI3K/Akt, el LY294002, produce una inhibición dosis-respuesta en la inducción del ARNm de la SS, siendo ésta completa con la dosis máxima utilizada (40 μ M) (Figura 41).

Estos resultados muestran por primera vez la participación de la vía PI3K/Akt en la inducción del ARNm de la SS en células cerebrocorticales en cultivo.

9. ACTIVACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LA SS INDUCIDA POR BDNF

El BDNF induce los niveles de la proteína y del ARNm de la SS como se demostró en estudios previos nuestros (Villuendas et al., 2001) y de otros laboratorios (Nawa et al., 1993 y 1994; Mizuno et al., 1994; Marty et al., 1999; Rage et al., 1999). En este trabajo nos planteamos estudiar si existe una regulación transcripcional de la SS por el BDNF.

9.1. Implicación del elemento CRE en la regulación transcripcional de la SS por BDNF

Como hemos demostrado en este estudio, el BDNF activa al factor transcripcional CREB, es cual es crítico en la inducción génica de la SS. Por lo

tanto, se sugiere que el sistema CRE-CREB sea el candidato idóneo a mediador de la regulación transcripcional de la SS por el BDNF.

Nuestros resultados demuestran que el BDNF induce un claro aumento de la actividad CAT en células PC12trkB transfectadas con los promotores SS65 y SS900 (Figura 43). Este efecto es mucho más evidente cuando se analiza la actividad Luc en las células cerebrocorticales, tanto en las transfectadas con el SS65 como con el SS900 (Figura 44). Esta diferencia en la inducción génica de la SS por el BDNF, puede reflejar diferencias entre ambos tipos celulares en la operatividad o en el tipo de las vías de señalización activadas por el BDNF, en la compleja maquinaria transcripcional involucrada en la inducción génica de la SS o diferencias en el nivel de activación de CREB. Numerosas observaciones apoyan la existencia de especificidad celular en las cascadas de señalización activadas por el BDNF para determinadas acciones (Finkbeiner et al., 1997; Shalizi et al., 2003).

La inducción de las actividades tanto CAT como Luc es más evidente en las células transfectadas con el SS65 que con el SS900. El SS900 corresponde al promotor completo de la SS. En el promotor del gen de la SS, se ha descrito la existencia de dos elementos silenciadores que regulan negativamente su transcripción (Vallejo et al., 1995b; Goodman, 1990). En las células transfectadas con el SS65 y el SS900 delecionados del elemento CRE, se abole completamente la inducción de la actividad CAT y Luc, lo que indica que es el elemento CRE el que confiere la respuesta del gen de la SS al BDNF.

Nuestros resultados demuestran por primera vez que el BDNF induce la transcripción del gen de la SS y que además esta regulación transcripcional está mediada por el elemento CRE presente en su promotor.

CONCLUSIONES

1. La despolarización de la membrana neuronal con K^+ activa la vía MAPK (ERK 1/2). En esta activación participan las vías AMPc/PKA y CaMKs y la propia vía MAPK (ERK 1/2).
2. La despolarización con K^+ induce la activación del factor transcripcional CREB en las células somatostatinérgicas. Esta activación de CREB presenta una cinética bifásica, donde las vías AMPc/PKA y CaMKs participan en la activación temprana de CREB y las vías MAPK (ERK 1/2) y CaMKs en la activación tardía.
3. En la inducción del ARNm de la SS por la despolarización de la membrana con K^+ participan las vías AMPc/PKA y CaMKs.
4. Las vías de señalización involucradas en la activación temprana de CREB y en la inducción del ARNm de la SS son las mismas. Ello sugiere que es la activación temprana de CREB la que promueve la inducción del ARNm de la SS.
5. La despolarización de la membrana con K^+ induce la activación transcripcional del gen de la SS. Esta activación transcripcional está mediada por el elemento CRE presente en el promotor de la SS. Estos resultados constituyen la primera evidencia de la inducción transcripcional de la SS por despolarización de la membrana neuronal.
6. BDNF activa la vía MAPK (ERK 1/2) a través de la propia vía MAPK (ERK 1/2). En esta activación participan además las vías AMPc/PKA, CaMKs y PI3K/Akt.
7. BDNF activa la vía PI3K/Akt a través de la propia vía PI3K/Akt. En esta activación participan además las vías AMPc/PKA, MAPK (ERK 1/2) y CaMKs.
8. BDNF activa CREB a través de las vías MAPK (ERK 1/2), AMPc/PKA y PI3K/Akt, siendo prioritaria en este efecto la vía MAPK (ERK 1/2).

9. BDNF incrementa el ARNm de la SS, demostrándose por primera vez la participación de la vía MAPK (ERK 1/2), CaMKs y PI3K/Akt en esta inducción.
10. BDNF induce la transcripción del gen de la SS, tanto en las células PC12trkB como en las células cerebrocorticales, siendo este efecto mucho más evidente en las células cerebrocorticales. Constituye este hallazgo la primera demostración de la regulación transcripcional de la SS por BDNF.
11. La regulación transcripcional del gen de la SS por BDNF está mediada por el elemento CRE presente en el promotor de la SS.

BIBLIOGRAFÍA

- **Agoston, D.V., Eiden, L.E., Brenneman, D.E.** (1991). Calcium-dependent regulation of the enkephalin phenotype by neuronal activity during early ontogeny. *J. Neurosci. Res.* 28: 140-148.
- **Alderson, R.F., Alterman, A.L., Barde, Y.A., Lindsay, R.M.** (1990). Brain-derived neurotrophic factor increases survival and differentiated functions of rat septal cholinergic neurons in culture. *Neuron* 5: 297-306.
- **Alpert, L.C., Brawer, J.R., Patel, Y.C., Reichlin, S.** (1976). Somatostatinergic neurons in anterior hypothalamus immunohistochemical localization. *Endocrinology* 98: 255-258.
- **Arimura, A., Fishback J.B.** (1981). Somatostatin regulation and secretion. *Neuroendocrinology* 33: 246-256.
- **Bading, H., Greenberg, M.E.** (1991). Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by NMDA receptor activation. *Science* 253: 912-914.
- **Baldassa, S., Zippel, R., Sturani, E.** (2003). Depolarization-induced signaling to Ras, Rap1 and MAPKs in cortical neurons. *Mol. Brain Res.* 119: 111-122.
- **Balif, B.A., Blenis, J.** (2001). Molecular mechanisms mediating mammalian mitogen-activated protein kinase (MAPK) Kinase (MEK)-MAPK cell survival signals. *Cell growth Differ.* 12: 397-408.
- **Barde, Y. Edgar, D., Thoenen, H.** (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* 1: 549-553.
- **Barnea, J., Roberts, R.H.** (1999). Evidence for a synergistic effect of the HIV-1 envelope protein gp120 and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) leading to enhanced expression of somatostatin neurons in aggregate cultures derived from the human fetal cortex. *Brain Res.* 815: 349-357.

- **Bartel, D.P., Sheng, M., Lau, L.F., Greenberg, M.E.** (1989). Growth factors and membrane depolarization activate distinct programs of early response gene expression: dissociation of fos and jun induction. *Genes Dev.* 3: 304-313.
- **Baxter, R.M., Cohen, P., Obermeier, A., Ullrich, A., Downes, C.P., Doza, Y.N.** (1995). Phosphotyrosine residues in the nerve-growth factor receptor (trkA). Their role in the activation of inositolphospholipid metabolism and protein kinase cascades in phaeochromocytoma (PC12) cells. *Eur. J. Biochem.* 234: 84-91.
- **Berg, M., Sternberg, B., Hempstead, B., Chao, M.** (1992). The low-affinity p75 nerve growth factor (NGF) receptor mediates NGF-induced tyrosine phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7106-7110.
- **Berninger, B., García, D.E., Inagaki, N., Hahnel, C., Lindholm, D.** (1993). BDNF and NT3 induce intracellular Ca^{2+} elevation in hippocampal neurones. *Neuroreport* 4: 1303-1306.
- **Bito, H., Deisseroth, K., Tsien, R.W.** (1996). CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca^{2+} and stimulus duration dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell* 87: 1203-1214.
- **Black, I.B., Adler, J.E., Dreyfus, C.F., Friedman, W.F., LaGamma, E.F., Roach, A.H.** (1987). Biochemistry of information storage in the nervous system. *Science* 236: 1263-1268.
- **Blenis, J.** (1993). Signal transduction via the MAP kinases: proceed at your own RSK. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90: 5889-5892.
- **Bodenant, C., Leroux, P., González, B.J., Vaudry, H.** (1991). Transient expression of somatostatin receptors in the rat visual system during development. *Neurosci.* 41: 595-606.
- **Bogush, A., Pedrini, S., Pelta-Heller, J., Chan, T., Yang, Q., Mao, Z., Sluzas, E., Gieringer, T., Ehrlich, M.E.** (2007). AKT and CDK5/p35

- mediate Brain-derived Neurotrophic Factor induction of DARPP-32 in Medium Size Spiny Neurons in vitro. *J. Biol. Chem.* 282: 7352-7359.
- **Bolaffi, J.L., Reichlin, S., Goodman, D.B.P., Forrest, J.N.** (1980). Somatostatin: occurrence in urinary bladder epithelium and renal tubules of the toad *Bufo Marinus*. *Science* 210: 644-646.
 - **Bonni, A., Ginty, D.D., Dudek, H., Greenberg, M.E.** (1995). Serine 133 phosphorylated CREB induces transcription via a cooperative mechanism that confer specificity to neurotrophin signals. *Mol. Cell. Neurosci.* 6, 168-183.
 - **Boulanger, L., Poo, M-M.** (1999). Gating of BDNF-induced synaptic potentiation by cAMP. *Science* 284: 1982-1984.
 - **Bramham, C.R., Messaoudi, E.** (2005). BDNF as a trigger for transsynaptic consolidation in the adult brain. En: *Synaptic plasticity and transsynaptic signalling*: Stanton, P.K., Bramham, C., Scharfman, H.E. (Eds.), Springer US, 159-184.
 - **Braun, H., Schulz, S.V., Holtt, V.** (2002). Expression changes of somatostatin receptor subtypes sst2A, sst2B, sst3 and sst4 after a cortical contusion trauma in rats. *Brain Res.* 930: 191-199.
 - **Brazeau, P., Vale, W., Burgus, R., Ling, N., Butcher, M., Rivier, J., Guillemin, R.** (1973) Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 179: 77-79.
 - **Brocke, L., Srinivasan, M., Schulman, H.** (1995). Developmental and regional expression of multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase isoforms in rat brain. *J. Neurosci.* 15: 6797-6808.
 - **Brostrom, M.A., Brostrom, Ch. O., Breckendrige, B. McL., Wolff, D.J.** (1978). Calcium-dependent regulation of brain adenylate cyclase. En: George, W.J., Ignarro, L.J. (Eds.), *Advances in cyclic nucleotide Research*, Raven Press, New York, 85-99.

- **Buffa, R., Chayvialle, J.A., Fontana, P., Usellini, L., Capella, C., Solcia, E.** (1979). Parafollicular cells of rabbit thyroid store both calcitonin and somatostatin and resemble gut D cells ultrastructurally. *Histochemistry* 62: 281-288.
- **Bulloch, A.** (1987). Somatostatin enhances neurite outgrowth and electrical coupling of regenerating neurons in Helizono. *Brain. Res.* 403: 121-126.
- **Cai, D., Shen, Y., De Bellard, M.E., Tang, S., Filbin, M.T.** (1999). Prior exposure to neurotrophins blocks inhibition of axonal regeneration by MAG and Myelin via a cAMP-dependent mechanism. *Neuron* 22: 89-101.
- **Carnahan, J., Nawa, H.** (1995). Regulation of neuropeptide expression in the brain by neurotrophins. *Mol. Neurobiol.* 10:135-149.
- **Chan, J.R., Cosgaya, J.M., Wu, Y.J., Shooter, E.M.** (2001). Neurotrophins are key mediators of the myelination program in the peripheral nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 14661-14668.
- **Chao, M.V., Hempstead, B.L.** (1995). p75 and Trk: a two-receptor system. *J. Neurosci.* 18: 321-326.
- **Chen, R.H., Sarnecki, C., Blenis, J.** (1992). Nuclear localization and regulation of ERK-and Rsk-encoded protein kinases. *Mol. Cell. Biol.* 12: 915-927.
- **Chen, X., Garelick, M.G., Wang, H., Li, V., Athos, J., Storm, D.R.** (2005). PI3 kinase signalling is required for retrieval and extinction of contextual memory. *Nature neurosci.* 8(7): 925-931.
- **Cheng, A., Wang, S., Yang, D., Xiao, R., Mattson, M.P.** (2003). Calmodulin mediates brain-derived neurotrophic factor cell survival signalling upstream of Akt kinase in embryonic neocortical neurons. *J. Biol. Chem.* 278: 7591-7599.

- **Cheung, W.Y.** (1980). Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science* 207: 19-27.
- **Chichara, K., Arimura, A., Schally, A.** (1979). Effect of intraventricular injection of dopamine, norepinephrine, acetylcholine, and serotonin on immunoreactive somatostatin release into rat hypophyseal portal blood. *Endocrinology* 104: 1656-1662.
- **Chomczynski, P.** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.
- **Chrivia, J.C., Kwok, R.P., Lamb, N., Hagiwara, M., Montminy, M.R., Goodman, R.H.** (1993). Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* 365: 855-859.
- **Ciba, T., Sainio, Y., Goto, Y., Kadowaki, S., Taminato, T., Abe, H., Kato, Y., Matsukura, S., Nozawa, M., Imura, H.** (1978). Somatostatin release from isolated perfused rat stomach. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 82: 731-737.
- **Cohen-Cory, S., Escandon, E., Fraser, S.E.** (1996). The cellular patterns of BDNF and trkB expression suggest multiple roles for BDNF during *Xenopus* visual system development. *Dev. Biol.* 179: 102-115.
- **Comb, M., Burnberg, M.C., Seascholtz, A., Herbert, E., Goodman, H.M.** (1986). A cyclic-AMP and phorbol ester-inducible DNA element. *Nature* 323: 353-356.
- **Cordon-Cardo, C., Tapley, P., Jing, S., Nandury, V., O'Rourke, E., Lamballe, F., Kovary, K., Klein, R., Jones, K., Reichardt, I., Barbacid, M.** (1991). The Trk tyrosine protein kinase mediates the mitogenic properties of nerve growth factor and neurotrophin-3. *Cell* 66: 173-183.

- **Crews, C.M., Erikson, R.L.** (1993). Extracellular signalling and reversible protein phosphorylation. What to Mek of it all. *Cell* 74: 215-217.
- **Croll, S.D., Chesnutt, C.R., Greene, N.A., Lindsay, R.M., Wiegand, S.J.** (1999). Peptide immunoreactivity in aged rat cortex and hippocampus as a function of memory and BDNF infusion. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 64(3): 625-635.
- **Cruzalegui, F.H., Means, A.R.** (1993). Biochemical characterization of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-protein kinase type IV expressed in insect cells. *J. Biol. Chem.* 268: 26171-26178.
- **Dash, P.K., Karl, K.A., Colicos, M.A., Prywes, R., Kandel, E.R.** (1991). cAMP response element-binding protein is activated by Ca²⁺/calmodulin as well as cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5061-5065.
- **Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., Greenberg, M.E.** (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91: 231-241.
- **Datta, S.R., Brunet, A., Greenberg, M.E.** (1999). Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.*, 13: 2905-2927.
- **Davies, A., Thoenen, H., Barde, Y.** (1986). Different factors from the central nervous system and periphery regulate the survival of sensory neurons. *Nature* 319: 497-499.
- **Davis, R.J.** (1993). The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* 268: 14553-14556.
- **Davis, K.L., Mohs, R.C., Marin, D.B., Purohit, D.P., Perl, D.P., Lantz, M.** (1999). Neuropeptide abnormalities in patients with early Alzheimer's disease. *Arch. Gen. Psychiatry* 56, 981-987.

- **De los Frailes, M.T., Cacicedo, L., Lorenzo, M.J., Fernández, G., Sánchez-Franco, F.** (1988). Thyroid hormone action on biosynthesis of somatostatin by fetal rat brain cells in culture. *Endocrinology* 123: 898-904.
- **De los Frailes, M.T., Cacicedo, L., Lorenzo, M.J., Sánchez-Franco, F.** (1989). Divergent effects of acute depolarization on somatostatin release and protein synthesis in cultured fetal and neonatal rat brain cells. *J. Neurochem.* 52: 1333-1339.
- **De los Frailes, M.T., Sánchez-Franco, F., Lorenzo, M.J., Tolón, R., Cacicedo, L.** (1991). Endogenous vasoactive intestinal peptide (VIP) regulates somatostatin secretion by cultured fetal rat cerebral cortical and hypothalamic cells. *Regulatory peptides* 34: 261-274.
- **De los Frailes, M.T., Cacicedo, L., Fernández, G., Tolón R.M., Lorenzo, M.J., Aguado, F., Sánchez-Franco, F.** (1992). Role of locally produced growth hormone-releasing factor in somatostatin regulation by fetal rat brain cells in culture. *Neuroendocrinology* 55: 221-229.
- **Deisseroth, K., Bito, H., Tsien, R.W.** (1996). Signalling from synapse to nucleus: postsynaptic CREB phosphorylation during multiple forms of synaptic plasticity. *Neuron* 16: 89-101.
- **Deisseroth, K., Heist, E.K., Tsien, R.W.** (1998). Translocation of calmodulin to the nucleus supports CREB phosphorylation in hippocampal neurons. *Nature* 392: 198-202.
- **Deisseroth, K., Tsien, R.W.** (2002). Dynamic multiphosphorylation passwords for activity-dependent gene expression. *Neuron* 34: 179-182.
- **Delfs, J., Robbins, R., Connolly, J.L., Dichter, M., Reichlin, S.** (1980). Somatostatin production by rat cerebral neurons in dissociated cells in culture. *Nature* 283: 676-677.

- **Dobbing, J.** (1976). Malnutrition et développement du cerveau. La recherche 64: 139-145.
- **Dolmetsch, R. E., Pajvani, U., Fife, K., Spotts, J.M., Greenberg, M.E.** (2001). Signalling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway. Science 294: 333-339.
- **Drewes, G., Lichtenberg-Kraag, B., Döring, F., Mandelkow, E.M., Biernat, J., Goris, J., Dorée, M., Mandelkow, E.** (1992). Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms Tau protein into an Alzheimer-like state. EMBO J. 11: 2131-2138.
- **Dwarki, V.J., Montminy, M., Verma, I.M.** (1990). Both the basic region and the "leucine zipper" domain of the cyclic AMP response element binding (CREB) protein are essential for transcriptional activation. EMBO J. 9: 225-232.
- **Egea, J., Espinet, C., Soler, R.M., Dolcet, X., Yuste, V.J., Encinas, M., Iglesias, M., Rocamora, N., Comella, J.X.** (2001). Neuronal survival induced by neurotrophins requires calmodulin. J. Cell. Biol. 154: 585-597.
- **Ely, C.M., Oddie, K.M., Litz, J.S., Rossomando, A.J., Kanner, S.B., Sturgill, T.W., Parsons, S.J.** (1990). A 42-KD tyrosine kinase substrate linked to chromaffin cell secretion exhibits an associated MAP kinase activity and is highly related to a 42-KD mitogen-stimulated protein in fibroblasts. J. Cell. Biol. 110: 731-742.
- **Enslin, H., Sun, P., Brickey, D., Soderling, S.H., Klamo, E., Soderling, T.R.** (1994). Characterization of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase IV. Role in transcriptional regulation. J. Biol. Chem. 269: 15520-15527.

- **Ernfors, P., Wetmore, C., Olson, L., Persson, H.** (1990). Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron* 5: 511-526.
- **Farnsworth, C.L., Freshney, N.W., Rosen, L.B., Ghosh, A., Greenberg, M.E., Feig, L.A.** (1995). Calcium activation of Ras mediated by neuronal exchange factor Ras-GRF. *Nature* 376: 524-527.
- **Fernández, M., Sánchez-Franco, F., Palacios, N., Sánchez, I., Cacicedo, L.** (2005). IGF-I and vasoactive intestinal peptide (VIP) regulate cAMP-response element-binding protein (CREB)-dependent transcription via the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in pituitary cells: requirement of Rap1. *J. Mol. Endocrinol.* 34: 699-712.
- **Ferreiro, D., Sheldon, R., Messing, R.** (1994). Somatostatin enhances nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *Dev. Brain. Res.* 80: 13-18.
- **Finkbeiner, S., Tavazoie, S.F., Maloratsky, A., Jacobs, K.M., Greenberg, M.E.** (1997) CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin response. *Neuron* 19: 1031-1047.
- **Finkbeiner, S.** (2000). CREB couples neurotrophin signal to survival messages. *Neuron* 25: 11-14.
- **Forssmann, W.G., Burnweit, C., Shehab, T., Triepol, J.** (1979). Somatostatin immunoreactive cell bodies and fibers in the medulla oblongata and spinalis. *J. Histochem. Cytochem.* 27: 1391-1393.
- **Frangakis, M.V., Chatila, T., Wood, E.R., Sahyoun, N.** (1991). Expression of a neuronal Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase, CaM kinase-Gr, in rat thymus. *J. Biol. Chem.* 266: 17592-17596.
- **Frank, D.A., Greenberg, M.E.** (1994). CREB: a mediator of long-term memory from molluscs to mammals. *Cell* 79: 5-8.

- **Friedman, W.J., Greene LI. A.** (1999). Neurotrophin signalling via Trks and p75. *Exp. Cell. Res.* 253, 131-142.
- **Funckes, C.L., Minth, C.D., Deschenes, R., Magazin, M., Tavianini, M.A., Sheets, M., Collier, K., Weith, H.L., Aron, D.C., Roos, B.A., Dixon, J.E.** (1983). Cloning and characterization of a mRNA-encoding rat pre-prosomatostatin. *J. Biol. Chem.* 259: 8781-8787.
- **Gallo, G., Ernst, A.F., McLoon, S.C., Letourneau, P.C.** (2002). Transient PKA activity is required for initiation but not maintenance of BDNF-mediated protection from nitric oxide-induced growth-cone collapse. *J. Neurosci.* 22: 5016-5023.
- **Ghosh, A., Carnahan, J., Greenberg, M.** (1994). Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science* 263: 1618-1623.
- **Ghosh, A., Greenberg M.E.** (1995). Calcium signalling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science* 268: 239-247.
- **Ginty, D., Glowacka, D., Bader, D.S., Kidaka, H., Wagner, J.A.** (1991). Induction of immediate early genes by Ca²⁺ influx requires cAMP-dependent protein kinase in PC12 cells. *J. Biol. Chem* 266: 17454-17458.
- **Ginty, D.D., Kornhauser, J.M., Thompson, M.A., Bading, H., Mayo, K.E., Takahashi, J.S., Greenberg, M.E.** (1993). Regulation of CREB phosphorylation in the suprachiasmatic nucleus by light and a circadian clock. *Science* 260: 238-241.
- **Ginty, D.D., Bonni A., Greenberg M.E.** (1994). Nerve growth factor activates a Ras-dependent protein kinase that stimulates c-fos transcription via phosphorylation of CREB. *Cell* 77: 713-725.

- **Ginty, D.D.** (1997). Calcium Regulation of Gene Expression: Isn't that spatial? *Neuron* 18: 183-186.
- **Girod, C., Dubois, M.P., Durand, N.** (1980). Immunocytochemical evidence for the presence of somatostatin-like immunoreactivity in scattered cells of the duct system of the submandibular glands in the monkey, *Macaca irus*. *Histochemistry* 69: 137-143.
- **Givalois, L., Naert, G., Tapia-Arancibia, L.** (2006). Involvement of brain-derived neurotrophic factor in the regulation of hypothalamic somatostatin in vivo. *J. Endocrinol.* 188: 425-433.
- **Goldman, P.S., Tran, V.K., Goodman, R.H.**(1997). The multifunctional role of the co-activator CBP in transcriptional regulation. *Recent Prog. Horm. Res.* 52: 103-119.
- **González, G.A., Montminy, M.R.** (1989a). Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* 59: 675-680.
- **González, G.A., Yamamoto, K.K., Fisher W.H., Karr, D., Menzel, P., Biggs, W.H., Vale, W., Montminy, M.R.** (1989b). A cluster of phosphorylation sites on the cAMP-regulated nuclear factor CREB predicted by its sequence. *Nature* 337, 749-752.
- **Goodman, R.H., Jacobs, W., Chin, W.W., Lund, P.K., Dee, P.C., Habener, J.F.** (1980). Nucleotide sequence of a cloned structural gene coding for a precursor of pancreatic somatostatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 5869-5873.
- **Goodman, R.H., Aron, D.C., Roos, B.A.** (1983). Rat pre-proSomatostatin: structure and processing by microsomal membranes. *J. Biol. Chem.* 258: 5570-5573.

- **Goodman, R.H., Montminy, M.R., Malcolm, J.L., Habener, J.** (1985). Biosynthesis of the rat pre-prosomatostatin. In. Somatostatin. Patel Y.C., Tannenbaum, G.S. (eds). Plenum Press NY: 31-47.
- **Goodman R.H.** (1990). Regulation of neuropeptide gene expression. *Annu. Rev. Neurosci.* 13: 111-27.
- **Greenberg, M.E., Greene, L.A., Ziff, E.B.** (1985). Nerve growth factor and epidermal growth factor induce rapid transient changes in protooncogene transcription in PC12 cells. *J Biol. Chem.* 260: 14101-14110.
- **Greenberg, M.E., Ziff, E.B., Greene, L.A.** (1986). Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. *Science* 234: 80-83.
- **Grewal, S.S., Randal, D.Y., Stork, P.J.S.** (1999). Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons. *Curr. Op. Neurobiol.* 9: 544-553.
- **Grewal, S.S., Horgan, A.M., Randall, D.Y., Withers, G.S., Banker, G.A., Stork, P.J.S.** (2000a). Neuronal calcium activates a Rap1 and B-Raf signalling pathway via the cyclic adenosine monophosphate dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 275: 3722-3728.
- **Grewal, S.S., Fass, D.M., Yao, H., Ellig, C.L., Goodman, R.H., Stork, P.J.S.** (2000b). Calcium and cAMP signals differentially regulate cAMP-responsive element-binding protein function via a Rap1-extracellular signal-regulated kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 275: 733-744.
- **Grosse, G., Djalali, S., Deng, D.R., Hältje, M., Hinz, B., Schwartzkopff, K., Cygon, M., Rothe, T., Stroh, T., Hellweg, R., Ahnert-Hilger, G., Hörtnag, H.** (2005). Area-specific effects of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) genetic ablation on various neuronal subtypes of the mouse brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 156(2): 111-126.

- **Hagiwara, M., Alberts, A., Brindle, P., Meinkoth, J., Feramisco, J., Deng, T., Karin, M., Shenolikar, S., Montminy, M.** (1992). Transcriptional attenuation following cAMP induction requires PP-1 mediated dephosphorylation of CREB. *Cell* 70: 105-113.
- **Hagiwara, M., Brindle, P., Harotunian, A., Armstrong, R., Rivier, J., Vale, W., Tsien, R., Montminy, M.R.** (1993). Coupling of hormonal stimulation and transcription via cyclic AMP-responsive factor CREB is rare limited by nuclear entry of protein kinase A. *Mol. Cell. Biol.* 13: 4852-4859.
- **Haisenleder, D.J., Burger, L.L., Aylor, K.W., Dalkin, A.C., Marshall, J.C.** (2003). Gonadotropin-releasing hormone stimulation of gonadotropin subunit transcription: evidence for the involvement of calcium/calmodulin-dependent kinase II (Ca/CaMKII) activation in rat pituitaries. *Endocrinology* 144 (7): 2768-2774.
- **Hansen T.O., Rehfeld J.F., Nielsen F.C.** (1999). Mitogenic activated protein kinase and protein kinase A signalling pathways stimulate cholecystokinin transcription via activation of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein. *Mol. Endocrinol.* 13: 466-475.
- **Hanson, P.I., Schulman, H.** (1992). Neuronal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 559-601.
- **Hardingham, G.E., Chawla, S., Cruzalegui, F.H., Bading, H.** (1999). Control of recruitment and transcription-activating function of CBP determines gene regulation by NMDA receptors and L-type calcium channels. *Neuron* 22: 789-798.
- **Harmar, A.J., Pierotti, A., Lightman, S.L.** (1987). Somatostatin. En: *Neuroendocrinology*. Lightman S(ed), Blackwell Scientific Publications, Oxford: 389-408.

- **Harrison.** (1994). Principios de medicina interna. 13^o ed. Interamericana-McGraw Hill: 2188-2190.
- **Hayashi, M., Yamashita, A., Shimizu, K.** (1997). Somatostatin and brain-derived neurotrophic factor mRNA expression in the primate brain: decreased levels of mRNAs during aging. *Brain Res.* 749(2): 283-289.
- **Hetman, M., Kanning, K., Cavanaugh, J.E., Xia, Z.** (1999). Neuroprotection by brain-derived neurotrophic factor is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 274: 22569-22580.
- **Hirooka, Y., Hollander, C., Suzuki, S., Ferdinand, P., Juan, S.** (1978). Somatostatin inhibits releasing of thyrotropin releasing factor from organ cultures of rat hypothalamus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 4509-4513.
- **Ho, N., Liauw, J.A., Blaeser, F., Wei, F., Hanissian, S., Muglia, L.M., Wozniak, D.F., Nardi, A., Arvin, K.L., Holtzman, D.M.** (2000). Impaired synaptic plasticity and cAMP response element-binding protein activation in Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase type IV/Gr-deficient mice. *J. Neurosci.* 20: 6459-6472.
- **Hofer, M., Pagliusi, S.R., Hohn, A., Leibrock, J., Bard, Y.A.** (1990). Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J.* 9: 2459-2464.
- **Holgado-Madruga, M., Moscatello, D.K., Emlet, D.R., Dieterich, R., Wong, A.J.** (1997). Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 12419-12424.
- **Hu, S.C., Chrivia, J., Ghosh, A.** (1999). Regulation of CBP-mediated transcription by neuronal calcium signalling. *Neuron* 22: 799-808.

- **Hyman, C., Hofer, M., Barde, Y., Juhasz, M., Yancopoulos, G., Squinto, S., Lindsay, R.** (1991). BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature* 350: 230-232.
- **Ibáñez, C., Liag, L., Murria-Rust, J., Persson, H.** (1993). An extended surface of binding to trk tyrosine kinase receptors in NGF and BDNF allows the engineering of a multifunctional pan-neurotrophin. *EMBO J.* 12: 2281-2293.
- **Impey, S., Wayman, G., Wu, Z., Storm, D.R.** (1994). Type I adenylyl cyclase functions as a coincidence detector for control of cyclic AMP response element-mediated transcription: synergistic regulation of transcription by Ca^{2+} and isoproterenol. *Mol. Cell. Biol.* 14: 8272-8281.
- **Impey, S., Obrietan, K., Wong, S., Poser, S., Yano, S., Wayman, G., Deloulme, J.C., Chan, G., Storm, D.** (1998a). Cross talk between ERK and PKA is required for Ca^{2+} stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation. *Neuron* 21: 869-883.
- **Impey, S., Smith, D.M., Obrietan, K., Donahue, R., Wade, C., Storm, D.R.** (1998b). Stimulation of cAMP response element (CRE)-mediated transcription during contextual learning. *Nature Neurosci.* 1: 595-601.
- **Impey, S., Fong, A.L., Wang, Y., Cardinaux, J-R., Fass, D.M., Obrietan, K., Wayman, G.A., Storm, D.R., Soderling, T.R., Goodman, R.H.** (2002). Phosphorylation of CBP mediates transcriptional activation by neural activity and CaM Kinase IV. *Neuron* 34: 235-244.
- **Iuvone, P.M., Gan, J., Avendano, G.** (1991). K^{+} -evoked depolarization stimulates cyclic AMP accumulation in photoreceptor-enriched retinal cells cultures: role of calcium influx through dihydropyridine-sensitive calcium channels. *J. Neurochem.* 87: 615-621.
- **Iversen, L., Ivepen, S., Bloom, F., Douglas, C., Brown, M., Vale, W.** (1978). Calcium-dependent release of somatostatin and neurotensin from rat brain in vitro. *Nature* 273: 161-163.

- **Jensen, K.F., Ohmstede, C.A., Fisher, R.S., Sahyoun, N.** (1991). Nuclear and axonal localization of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase type Gr in rat cerebellar cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2850-2853.
- **Johansson, O., Hokfelt, T., Elde, R.P.** (1984). Immunohistochemical distribution of somatostatin-like immunoreactivity in the central nervous system of the adult rat. *Neuroscience* 13: 265-359.
- **Jones, D.A., Glod, J., Wilson-Shaw, D., Hahn, W.E., Sikela, J.M.** (1991). cDNA sequence and differential expression of the mouse Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV gene. *FEBS Lett.* 289: 105-109.
- **Kandel, E.S., Hay, N.** (1999). The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp. Cell. Res.* 253: 210-229.
- **Katz, D.M., He, H., White, M.** (1992). Transient expression of somatostatin peptide is a widespread feature of developing sensory and sympathetic neurons in the embryonic rat. *J. Neurobiol.* 23: 855-870.
- **Kawasaki, H., Springett, G.M., Mochizuki, N., Toki, S., Nakaya, M., Matsuda, M., Housman, D.E., Graybiel, A.M.** (1998). A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* 282: 2275-2279.
- **Kennedy, M.B.** (1989). Regulation of neuronal function by calcium. *Trends Neurosci.* 12: 417-420.
- **Kimberly, A.C., McCool, J., Anwer, M.S., Webster, C.R.L.** (2004). Activation of cAMP-guanine exchange factor confers PKA-independent protection from hepatocyte apoptosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 287: 334-343.
- **Knüsel, B., Winslow, J.W., Rosenthal, A., Burton, L.E., Seid, D.P., Nikolics, K., Hefti, F.** (1991). Promotion of central cholinergic and

dopaminergic neuron differentiation by brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 961-965.

- **Konturek, S.J., Tasler, J., Obtulowicz, W., Coy, D.H., Schally, A.V.** (1976). Effect of growth hormone-release inhibiting hormone on hormones stimulating exocrine pancreatic secretion. *J. Clin. Invest.* 59: 1-6.
- **Korhonen, J.M., Said, F.A., Wong, A.J., Kaplan, D.R.** (1999). Gab1 mediates neurite outgrowth, DNA synthesis, and survival in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 274: 37307-37314.
- **Korker, D., Ruth, W., Chideckel, E., Palmer, J., Goodner, C.J., Ensinnck, J., Gale, C.G.** (1974). Somatostatin: Hypothalamic inhibitor of the endocrine pancreas. *Science* 184: 482-485.
- **Kornhauser, J.M., Cowan, C.W., Shaywitz, A.J., Dolmetsch, R.E., Griffith, E.C., Hu, L.S., Haddad, C., Xia, Z., and Greenberg, M.E.** (2002). CREB transcriptional activity in neurons is regulated by multiple, calcium-specific phosphorylation events. *Neuron* 34: 221- 233.
- **Korte, M.** (1995). Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain- derived neurotrophic factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 8856-8860.
- **Kowall, N., Beal, M.** (1988). Cortical somatostatin, neuropeptide Y and NADPH diesterase neurons: manual anatomy and alterations in Alzheimer's disease. *Annu. Neurol.* 23: 105-114.
- **Krisch, B.** (1978). Hypothalamic and extrahypothalamic distribution of somatostatin-immunoreactive elements in the rat brain. *Cell Tissue Res.* 195: 255-258.
- **Krulich, L., Dhariwal, A., McCann, S.** (1968). Stimulatory and inhibitory effects of hypothalamic extracts on growth hormone release from rat pituitary in vitro. *Endocrinology* 83: 783-790.

- **Kungel, M., Friauf, E.** (1995). Somatostatin and leu-enkephalin in the rat auditory brainstem during fetal and postnatal development. *Anat. Embryol.* 191: 425-443.
- **Kungel, M., Dersti, P., Heike-Jana, R., Friauf, E.** (1997). Influence of the neuropeptide somatostatin on the development of dendritic morphology: a cysteamine-depletion study in the rat auditory brainstem. *Dev. Brain Res.* 101: 107-114.
- **Kwok, R.P.S, Lundblad, J.R., Chrivia, J.C., Richards, J.P., Bachinger, H.P., Brennan, R.G., Roberts, S.G.E., Green, M.R., Goodman, R.H.** (1994). Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* 370: 223-226.
- **Kyriakis, J.M., Zhang, X.F., Barnerjee, P., Brautigam, D.L., Rapp, U., Avruch, J.** (1992). Raf-1 activates MAP kinase kinase. *Nature* 358: 417-421.
- **Laemmli, U.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- **Lee, S., Havlicek, K., Panera, A., Freisen, M.G.** (1978). High potassium-induced release of somatostatin from the cortical preparation of rat brain. *Experientia* 35: 351-354.
- **Lee, W., Lin, C., Carrant, T.** (1988). Activation of the transforming potential of the human fos proto-oncogene requires message stabilization and results in increased amounts of partially modified fos protein. *Mol. Cell. Biol.* 8: 5521-5527.
- **Lee, A., Wong, S.T., Gallagher, D., Li, B., Storm, D.R., Scheuer, T., Catterall, W.A.** (1999). Ca^{2+} /calmodulin binds to and modulates P/Q-type calcium channels. *Nature* 399: 155-159.

- **Leibrock, J., Lottspeich, F., Hohn, A., Hofer, M., Hengerer, B., Masiakowski, P., Thoenen, H., Barde, Y.** (1989). Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 341: 149-152.
- **Lindsay, R.M., Thoenen, H., Barde, Y.A.** (1985). Placode and neural crest-derived sensory neurons are responsive at early developmental stages to brain-derived neurotrophic factor. *Dev. Biol.* 112: 319-328.
- **Loudes, C., Petit, F., Kordon, C., Faivre-Bauman, A.** (2000). Brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin-3 enhances differentiation of somatostatin neurons in hypothalamic cultures. *Neuroendocrinology.* 72: 144-153.
- **Lu, B., Yokoyama, M., Dreyfus, Ch.F., Black, I.** (1991). Depolarizing stimuli regulate nerve growth factor gene expression in cultured hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 6289-6292.
- **Lu, Q., Soria, J.P., Wood, J.G.** (1993). p44^{mpk} MAP kinase induces Alzheimer type alterations in Tau function and in primary hippocampal neurons. *J. Neurosci. Res.* 35: 439-444.
- **Magazin, M., Minth, C.D., Funckes, C.L., Deschenes, R., Taviani, M.A., Dixon, J.E.** (1982). Sequence of a cDNA encoding pancreatic preprosomatostatin-22. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 5152-5156.
- **Maisonpierre, P.C., Belluscio, L., Friedman, R.E., Furth, M.E., Lindsay, R.M., Yancopoulos, G.D.** (1990). NT3, BDNF and NGF in the developing rat nervous system. Parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron* 5: 501-509.
- **Mamounas, L.A. Blue, M.E., Siuciak, J.A., Altar, C.A.** (1995). Brain-derived neurotrophic factor promotes the survival and sprouting of serotonergic axons in rat brain. *J. Neurosci.* 15: 7929-7939.
- **Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, R.** (1982). Extraction, purification and analysis of mRNA from Eukaryotic cells. *En, Molecular cloning, a*

laboratory manual. Maniatis, T., Fitch, E.F., Sambrook, R. (eds). Cold Spring Harbor, New York: 187-210.

- **Mao, Z., Bonni, A., Xia, F., Nadal-Vicens, M., Greenberg, M.E.** (1999). Neuronal activity-dependent cell survival mediated by transcription factor MEF2. *Science* 286: 785-790.
- **Marley, P.D., Thomson, K.A.** (1996) The Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II inhibitors KN62 and KN93, and their inactive analogues KN04 and KN92, inhibit nicotinic activation of tyrosine hydroxylase in bovine chromaffin cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 221: 15-18.
- **Marshall, C.J.** (1994). MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4: 82-89.
- **Mato, M.E., Puig, J., Webb, S.M.** (1996). Efecto de la somatostatina sobre la proliferación celular y apoptosis en células GH3. Comunicación al Congreso Nacional de Endocrinología y Nutrición. Barcelona
- **Marty, S., Onténiente, B.** (1999). BDNF and NT-4 differentiate two pathways in the modulation of neuropeptide protein levels in postnatal hippocampal interneurons. *Eur. J. Neurosci.* 11(5): 1647-1656.
- **Matsuoka, N., Yamazaki, M., Yamaguchi, I.** (1995). Changes in brain somatostatin in memory-deficient rats: comparison with cholinergic markers. *Neuroscience* 66: 617-626.
- **Matthews, R.P., Guthrie, C.R., Wailes, L.M., Zhao, X., Means, A.R., McKnight, G.S.** (1994). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase types II and IV differentially regulate CREB-dependent gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 14: 6107-6116.
- **Mayr, B., Montminy, M.** (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 599-609.

- **Means, A.R., Cruzalegui, F., LeMagueresse, B., Needleman, D.S., Slaughter, G.R., Ono, T.** (1991). A novel Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase and a male germ cell-specific calmodulin-binding protein are derived from the same gene. *Mol. Cell. Biol.* 11: 3960-3971.
- **Mizuno, K., Carnahan, J., Nawa, H.** (1994). Brain-derived neurotrophic factor promotes differentiation of striatal GABAergic neurons. *Dev. Biol.* 165: 243-256.
- **Moller, L.N., Stidsen, C.E., Hartmann, B., Holst, J.J.** (2003). Somatostatin receptors. *Acta Bioch. Bioph. Acta* 1616: 1-84.
- **Montminy, M.R., Goodman, R.H., Horovitch, S.J., Habener, J.F.** (1984). Primary structure of the gene encoding rat pre-prosomatostatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3337-3340.
- **Montminy, M.R., Sevarino, K.A., Wagner, J.A., Mandel, G., Goodman, R.H.** (1986a). Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 6682-6686.
- **Montminy, M.R., Low, M.J., Tapia-Arancibia, L., Reichlin, S., Mandel, G., Goodman, R.H.** (1986b). Cyclic AMP regulates somatostatin mRNA accumulation in primary diencephalic cultures and in transfected fibroblast cells. *J. Neurosci.* 6: 1171-1176.
- **Montminy, M.R., González, G.A., Yamamoto, K.** (1990). Regulation of cAMP-inducible genes by CREB. *Trends Neurosci.* 13: 184-188.
- **Montminy, M., Brindle, P., Arias, J., Ferreris, K., Armstrong, R.** (1996). Regulation of somatostatin gene transcription by cAMP. *Adv. Pharmacol.* 36: 1- 13.
- **Montminy M.** (1997). Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu. Rev. Biochem.* 66: 807-822.

- **Morgan, J.I., Curran, T.** (1986). Role of ion influx in the control of c-fos expression. *Nature* 322: 552-555.
- **Morgan, J.I., Curran, T.** (1991). Stimulus transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible protooncogenes fos and jun. En: Cowan, W.N., Shooter, E.M., Stevens, R.F., Thompson (Eds), *Annu. Rev. Neurosci.*, 14, Annu. Rev. Inc, Palo Alto, CA, USA: 421-451.
- **Morris, B.J., Feasey, K.J., Bruggencate, G.J., Herz, A., Höllt, V.** (1988). Electrical stimulation *in vivo* increases the expression of proenkephalin mRNA and decreases the expression of prodynorphin mRNA in rat hippocampal granule cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 3226-3230.
- **Murphy, T.H., Woorley, P.F., Baraban, J.M.** (1991). L-type voltage sensitive calcium channels mediate synaptic activation of immediate early genes. *Neuron* 7: 625-635.
- **Nairn, A.C., Hemmings, H.C., Greengard, P.** (1985). Protein kinases in the brain. *Annu. Rev. Biochem.* 54: 931-976.
- **Naus, C.C.G., Miller, F.D., Morrison, J.H., Bloom, F.E.** (1988). Immunohistochemical and *in situ* hybridization analysis of the development of the rat somatostatin-containing neocortical neuronal system. *J. Comp. Neurol.* 269: 448-463.
- **Nawa, H., Bessho, Y., Carnahan, J., Nakanishi, S., Mizuno, K.** (1993) Regulation of neuropeptide expression in cultured cerebral cortical neurons by brain-derived-neurotrophic factor. *J. Neurochem.* 60-2: 772-775.
- **Nawa, H., Pellemounter, M., Carnahan, J.** (1994). Intraventricular administration of BDNF increases neuropeptide expression in newborn rat brain. *J. Neurosci.* 14 (6): 3751-3765.

- **Naya, F.J., Olson, E.** (1999). MEF2: a transcriptional target for signalling pathways controlling skeletal muscle growth and differentiation. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 11: 683-688.
- **Nilsson, C.L., Brinkmalm, A., Minthon, L., Blennow, K., Ekman, R.** (2001). Processing of neuropeptide Y, galanin, and somatostatin in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Peptides* 22, 2105-2112.
- **Nonomura, T., Takekazu, K., Tetsushi, O., Shimoke, K., Yamada, M., Enokido, Y., Hatanaka, H.** (1996). Signaling pathways and survival effects of BDNF and NT3 on cultured cerebellar granule cells. *Dev. Brain. Res.* 97: 42-50.
- **Ohmstede, C.A., Jensen, K.F., Sahyoun, N.** (1989). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase enriched in cerebellar granule cells. Identification of a novel neuronal calmodulin-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 264: 5866-5875.
- **Oppenheim, R.W., Qing-Wei, Y., Prevet, D., Yan, Q.** (1992). BDNF rescues developing avian motoneurons from cell death. *Nature* 369: 755-757.
- **Orike, N., Middleton, G., Borthwick, E., Buchman, V., Cowen, T., Davies, A.M.** (2001). Role of PI3-Kinase, Akt and Bcl-2-related proteins in sustaining the survival of neurotrophic factor-independent adult sympathetic neurons. *J. Cell. Biol.* 154: 995-1005.
- **Palacios, N., Sánchez-Franco, F., Fernández, M., Sánchez, I., Cacicedo, L.** (2005). Intracellular events mediating insulin-like growth factor I-induced oligodendrocyte development: modulation by cyclic AMP. *J. Neurochem.* 95: 1091-1107.
- **Parker, D., Jhala, U.S., Radhakrishnan, I., Yaffe, M.B., Reyes, C., Shulman, A.I., Cantley, L.C., Wright, P.E., Montminy, M.** (1998).

- Analysis of an activator: coactivator complex reveals an essential role for secondary structure in transcriptional activation. *Mol. Cell.* 2: 353-359.
- **Patel, Y.C., Amherdt, M., Orci, L.** (1979). Somatostatin secretion from monolayer cultures of neonatal rat pancreas. *Endocrinology* 104: 676-679.
 - **Patton, G.S., Ipp, E., Dobbs, R.E., Orci, L., Vale, W., Unger, R.H.** (1977). Pancreatic immunoreactive somatostatin release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 2140-2143.
 - **Pavlovic-Surjancev, B., Cahill, A.L., Perlman, R.L.** (1992). Nicotinic agonists, phorbol esters, and growth factors activate two extracellular signal-regulated kinases, ERK1 and ERK2, in bovine chromaffin cells. *J. Neurochem.* 59: 2134-2140.
 - **Peterson, B. Z., DeMaria, C.D., Adelman, J.P., Yue, D.T.** (1999). Calmodulin is the Ca²⁺ sensor for Ca²⁺-dependent inactivation of L-Type calcium channels. *Neuron* 22: 549-558.
 - **Phillips, H.S., Hains, J.M., Laramee, G.R., Rosenthal, A., Winslow, J.W.** (1990). Widespread expression of BDNF but not NT3 by target areas of basal forebrain cholinergic neurons. *Science* 250: 290-294.
 - **Phillips, H., Hains, J., Armanini, M., Laramee, G., Johnson, S., Winslow, J.** (1991). BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease. *Neuron* 7: 695-702.
 - **Pittenger, G., Vinik, A., Heldsinger, A., Seino, S.** (1985). Regulation and actions of gastrointestinal somatostatin. En, *Somatostatin*. Patel Y.C., Tannenbaum, G.S. (eds). Plenum Press NY: 447-462.
 - **Polak, J.M., Pearse, A.G.E., Grimelius, L., Bloom, S.R., Arimura, A.** (1975) Growth hormone-release inhibiting hormone in gastrointestinal and pancreatic D-cells. *Lancet* 1: 1220-1222.

- **Pradayrol, L., Jornavall, H., Mutt, V., Ribert, A.** (1980). N-terminally extended somatostatin: the primary structure of SS-28. *FEBS Lett.* 109: 55-58.
- **Rage, F., Riteau, B., Alonso, G., Tapia-Arancibia, L.** (1999). Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 enhance somatostatin gene expression through a likely direct effect on hypothalamic somatostatin neurons. *Endocrinology* 140: 909-916.
- **Ray, L.B., Sturgill, T.W.** (1987). Rapid stimulation by insulin of a serine/threonine kinase in 3T3-L1 adipocytes that phosphorylates microtubule-associated protein 2 in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 1502-1506.
- **Redmond, L., Kashani, A.H., Ghosh, A.** (2002). Calcium regulation of dendritic growth via CaM Kinase IV and CREB-mediated transcription. *Neuron* 34: 999-1010.
- **Rehman, H., Schwede, F., Doskeland, S.O., Wittinghofer, Bos, J.L.** (2003). Ligand-mediated activation of the cAMP-responsive guanine nucleotide exchange factor Epac. *J. Biol. Chem.* 278: 38548-38556.
- **Reichlin, S.** (1983). Somatostatin. *N. Engl. J. Med.* 309: 1556-1563.
- **Robbins, R., Sutton, R.E., Reichlin, S.** (1982). Effects of neurotransmitters and cyclic AMP on somatostatin release from cultured cerebral cortical cells. *Brain Res.* 234: 377-386.
- **Robbins, R.** (1985a). Somatostatin and the cerebral cortex. En: *Somatostatin. Advances in experimental medicine and biology.* Patel Y, Tannenbaum G, (eds) Plenum Press, New York 188: 201-215.
- **Robbins, R., Landon, R.M.** (1985b). The effects of neurotensin, vasoactive intestinal polypeptide and other neuropeptides on the secretion of somatostatin from cerebral cortical cells. *Brain Res.* 332: 161-164.

- **Roberts, G., Woodhams, P., Polak, J., Crow, T.** (1984). Distribution of neuropeptides in the limbic system of the rat: the hippocampus. *Neuroscience* 11: 35-77.
- **Rodríguez-Tebar, A., Jeffrey, P., Thoenen, H., Barde, A.** (1989). The survival of chick retinal ganglion cells in response to BDNF depends on their embryonic age. *Dev. Biol.* 136: 296-303.
- **Rogers, K., Vician, L., Steinert, R., Clifton, D.** (1988). The effect of hypophysectomy and growth hormone administration on pre-prosomatostatin messenger ribonucleic acid in the periventricular nucleus of rat hypothalamus. *Endocrinology* 122: 586-591.
- **Rosen, L.B., Ginty, D.D., Weber, M.J., Greenberg, M.E.** (1994). Membrane depolarization and calcium influx stimulate MEK and MAP kinase via activation of Ras. *Neuron* 12: 1207-1221.
- **Ross, E.M., Gilman, A.G.** (1980). Biochemical properties of hormone-sensitive adenylate-cyclase. *Annu. Rev. Biochem.* 49: 533-564.
- **Sable, C.L., Filippa, N., Hemmings, B., Van Obberghen, E.** (1997). cAMP stimulates protein kinase B in a wortmannin-insensitive manner. *FEBS Lett.* 409: 253-257.
- **Saffen, D.W., Cole, A.J., Worley, D.E., Christy, B.A., Ryder, K., Baraban, J.M.** (1988). Convulsant-induced increase in transcription factor messenger RNAs in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7795-7799.
- **Sahyoun, N., McDonald, O. B., Farrell, F., Lapetina, E.G.** (1991). Phosphorylation of a Ras-related GTP-binding protein, Rap-1b, by a neuronal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase, CaM kinase Gr. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2643-2647.
- **Schally, A., Huang, W., Chang, R., Arimura, A., Reeding, T., Millar, R., Hunkapiller, M., Hood, L.** (1980). Isolation and structure of

prosomatostatin; a putative somatostatin precursor from pig hypothalami. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4489-4493.

- **Schmitt, J.M., Stork, P.J.S.** (2001). Cyclic AMP-mediated inhibition of cell growth requires the small G protein Rap1. Mol. Cell Biol. 21(11): 3671-3683.
- **Schulman, H.** (1993). The multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases. Curr. Opin. Cell. Biol. 5: 247-253.
- **Schwartz, P.M., Borghesani, P.R., Levy, R.L., Pomeroy, S.L., Segal, R.A.** (1997). Abnormal cerebellar development and foliation in BDNF ^{-/-} mice reveals a role for neurotrophins in CNS patterning. Neuron 19: 269-281.
- **Schwartz, P.T., Vallejo, M.** (1998). Differential regulation of basal and cyclic adenosine 3'5'-monophosphate-induced somatostatin gene transcription in neural cells by DNA control elements that bind homeodomain proteins. Mol. Endocrinology 12: 1280-1293.
- **Segal, R., Greenberg, M.E.** (1996). Intracellular signalling pathways activated by neurotrophic factors. Annu. Rev. Neurosc. 19: 463-489.
- **Sendtner, M., Hotmann, B., Kolbeck, R., Thoenen, H., Barde, A.** (1992). BDNF prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section. Nature 360: 757-759.
- **Sendtner, M., Holtmann, B., Hughes, R.A.** (1996). The response of motoneurons to neurotrophins. Neurochem. Res. 21 (7): 831-841.
- **Serger, R., Krebs, E.** (1995). The MAPK signalling cascade. FASEB J. 9: 726-735.
- **Shalizi, A., Lehtinen, M., Gaudillière, B., Donovan, N., Han, J., Konishi, Y., Bonni, A.** (2003). Characterization of a neurotrophin

- signalling mechanism that mediates neuron survival in a temporally specific pattern. *J. Neurosci.* 23 (19): 7326-7336.
- **Shally A.** (1988). Oncological applications of somatostatin analogues. *Cancer Res.* 48: 6977-6985.
 - **Shaywitz A.J., Greenberg M.E.** (1999). CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu. Rev. Biochem.* 68: 821-861.
 - **Shen, L.P., Rutter, W.L.** (1984). Sequence of the human somatostatin I gene. *Science* 224: 168-171.
 - **Sheng, M., McFadden, G., Greenberg, M.E.** (1990). Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. *Neuron* 4: 571-582.
 - **Sheng, M., Thompson, M.A., Greenberg, M.E.** (1991). CREB: a Ca^{2+} regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science* 252: 1427-1430.
 - **Sheridan, M.A., Kittilson, J.D., Slagter, B.J.** (2000). Structure-function relationships of the signalling system for the somatostatin peptide hormone family. *Am. Zool.* 40: 269-286.
 - **Sherr, C.J.** (1995). D-type cyclins. *Trends Biochem. Science* 20: 187-190.
 - **Shimatsu, A., Kato, Y., Matsushita, N., Katakami, H., Yamaiharu, N., Imura, H.** (1982). Effects of glucagon, neurotensin and vasoactive intestinal polypeptide on somatostatin release from perfused rat hypothalamus. *Endocrinology* 110: 2113-2117.
 - **Shiosaka, S., Takatsuki, K., Sakanaka, M., Inagaki, S., Takagi, H., Senba, E., Kawai, Y., Tohyama, M.** (1981). Ontogeny of somatostatin-

containing neuron system of the rat: immunohistochemical observations. I. Lower brainstem, *J. Comp. Neurol.* 203: 173-188.

- **Short, J.M., Wynshaw-Boris, A., Short, H.P., Hanson, R.W.** (1986). Characterization of the phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) promoter-regulatory region. Identification of cAMP and glucocorticoid regulatory domains. *J. Biol. Chem.* 261: 9721-9726.
- **Sieber-Blum, M.** (1991). Role of the neurotrophic factors BDNF and NGF in the commitment of pluripotent neural crest cells. *Neuron* 6: 949-955.
- **Sobue, K., Kanda, K., Adachi, J., Kakiuchi, S.** (1983). Calmodulin-binding proteins that interact with actin filaments in a Ca^{2+} -dependent flip-flop manner: survey in brain and secretory tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 6868-6871.
- **Soderling, T.R.** (1999). The Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase cascade. *TIBS* 24: 232-236.
- **Soderling, T.R.** (2000). CaM-kinases: modulators of synaptic plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10: 375-380.
- **Stevens, Ch.F.** (1994). CREB and memory consolidation. *Neuron* 13: 769-770.
- **Stroppolo, A., Guinea, B., Tian, C., Sommer, J., Ehrlich, M.E.** (2001). Role of phosphatidylinositide 3-kinase in brain-derived neurotrophic factor-induced DARPP-32 expression in medium size spiny neurons in vitro. *J. Neurochem.* 79: 1027-1032.
- **Struhl, K.** (1998). Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanism. *Gene Develop.* 12: 599-606.
- **Sun, P., Eslen, H., Myung, P.S., Maurer, R.A.** (1994). Differential activation of CREB by Ca^{2+} -CaM-dependent protein kinases type II and

type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity. *Gene Develop.* 8: 2527-2539.

- **Tachibana, T., Saito, S., Tomonaga, S., Takagi, T., Saito, E.S., Boswell, T., Furuse, M.** (2003). Intracerebroventricular injection of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibits feeding in chicks. *Neurosci. Lett.* 339: 203-206.
- **Takagi, H., Somogyi, J., Smith, A.** (1983). Fine structural studies on a type of somatostatin-immunoreactive neuron and its synaptic connections in the rat neostriatum. *J. Comp. Neurol.* 214: 1-16.
- **Takatsuki, K., Shiosaka, S., Sakanaka, M., Inagaki, S., Senba, E., Takagi, H., Tohyama, M.** (1981). Somatostatin in the auditory system of the rat. *Brain. Res.* 213: 211-216.
- **Takatsuki, K., Sakanaka, M., Shiosaka, S., Inagaki, S., Takagi, H., Senba, E., Hara, Y., Kawai, Y., Minagawa, H., Iida, H., Tohyama, M.** (1982). Pathways and terminal fields of the cochlearofugal somatostatin tracts of very young rats. *Dev. Brain. Res.* 3: 613-626.
- **Tao, X., Finkbeiner, S., Arnold, D.B., Shaywitz, A.J., Greenberg, M.E.** (1998). Ca^{2+} influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron* 20: 709-726.
- **Tapia-Arancibia, L., Reichlin, S.** (1984). Vasoactive intestinal polypeptide and PHI stimulate somatostatin release from rat cerebral-cortical and diencephalic cells in dispersed cell culture. *Brain Res.* 336: 62-72.
- **Tapia-Arancibia, L., Pares-Herbutí, N., Astier, H.** (1989). Calcium dependence of somatostatin (SRIF) release and cyclic AMP levels in cultured diencephalic neurons. *Neuroendocrinology* 49: 555-560.
- **Tartaglia, N., Du, J., Tyler, W.J., Neale, E., Pozzo-Miller, L., Lu, B.** (2001). Protein synthesis-dependent and -independent regulation of

- hippocampal synapses by brain-derived neurotrophic factor. *J. Biol. Chem.* 276: 37585-37593.
- **Tavianini, M.A., Hayes, T.E., Magazin, M.D., Minth, C.D., Dixon, J.B.** (1984). Isolation, characterization and DNA sequence of the rat somatostatin gene. *J. Biol. Chem.* 259: 11798-11803.
 - **Taylor, W.L., Collier, K.J., Deschenes, R.J., Weith, H.L., Dixon, J.E.** (1981). Sequence analysis of a cDNA coding for a pancreatic precursor to somatostatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 6694-6698.
 - **Thoenen, H.** (1995). Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science* 270: 593-598.
 - **Thompson, M.A., Ginty, D.D., Bonni, A., Greenberg, M.E.** (1995). L-type voltage-sensitive Ca^{2+} channel activation regulates c-fos transcription at multiple levels. *J. Biol. Chem.* 270: 4224-4435.
 - **Timmusk, T., Palm, K., Metsis, M., Reintam, T., Paalme, V., Saaimz, M., Persson, H.** (1993). Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. *Neuron* 10: 475-489.
 - **Timmusk, T., Belluardo, N., Persson, H., Metsis, M.** (1994). Developmental regulation of BDNF messenger RNAs transcribed from different promoters in the rat brain. *Neurosci.* 60: 287-291.
 - **Tokumitsu, H., Chijiwa, T., Hagiwara, M., Mizutani, A., Terasawa, M., Hidaka, H.** (1990). KN-62, 1-[N,O-Bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine, a specific inhibitor of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Biol. Chem.* 265: 4315-4320.
 - **Tolón R., Sánchez-Franco, F., De los Frailes M.T., Lorenzo M.J. and Cacicedo L.** (1994). Effect of potassium-induced depolarization on somatostatin gene expression in cultured fetal rat cerebrocortical cells. *J. Neurosci.* 14(3): 1053-1059.

- **Tolón, R., Sánchez-Franco, F., Villuendas, G., Vicente, A.B., Palacios, N., Cacicedo, L.** (2000). Potassium depolarization-induced cAMP stimulates somatostatin mRNA levels in cultured diencephalic neurons. *Brain Res.* 868: 338-46
- **Vallejo, M., Gosse, M., Beckman, W., Habener, J.F.** (1995a). Impaired cyclic AMP-dependent phosphorylation renders CREB a repressor of C/EBP-induced transcription of the somatostatin gene. *Mol. Cell. Biol.* 15: 415-424.
- **Vallejo, M., Miller, C.P., Beckman, M.W., Habener, J.F.** (1995b). Repression of somatostatin gene transcription mediated by two promoter silencer elements. *Mol. Cell. Endocrinol.* 113(1): 61-72.
- **Van Nguyen, T., Kobierski, L., Comb, M., Hyman, S.E.** (1990). The effect of depolarization on expression of the human proenkephalin gene is synergistic with cAMP and dependent upon a cAMP-inducible enhancer. *J. Neurosci.* 10: 2825-2833.
- **Van-Uden, E., Veinbergs, I., Mallory, M., Orlando, R., Masliah, E.** (1999). A novel role for receptor-associated protein in somatostatin modulation: implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience* 88: 687-700.
- **Vetter, M.L., Martin-Zanca, D., Parada, L.F., Bishop, J.M., Kaplan, D.R.** (1991). Nerve growth factor rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 by a kinase activity associated with the product of the *trk* protooncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5650-5654.
- **Villuendas, G.** (1998). Interacción de factores neurotróficos y actividad neuronal inducida por despolarización, en la regulación del gen de somatostatina en corteza cerebral embrionaria de rata. Tesis doctoral.
- **Villuendas, G., Sánchez-Franco, F., Palacios, N., Fernández, M., Cacicedo, L.** (2001). Involvement of VIP on BDNF-induced somatostatin

- gene expresión in cultured fetal rat cerebral cortical cells. *Mol. Brain Res.* 94: 59-66.
- **Vossler, M.R., Yao, H., York, R.D., Pan, M-G., Rim, C.S., Stork, P.J.S.** (1997). cAMP activates MAP Kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Neuron* 89: 73-82.
 - **Wakabayashi, I., Miyazawawa, H., Kanda, M.** (1977). Stimulation of immunoreactive somatostatin release from hypothalamic synaptosomes by high K⁺ and dopamine. *Endocrinol. Jpn.* 24: 601-606.
 - **Wang, W.Q., Zheng, J.Q.** (1998). cAMP-mediated regulation of neurotrophin-induced collapse of nerve growth cones. *J. Neurosci.* 18: 4973-4984.
 - **Watkins, W. B., Yen, S.S.C.** (1980). Somatostatin in cytotrophoblast of the immature human placenta: localization by immunoperoxidase cytochemistry. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 50: 969-971.
 - **Wayman, G.A., Tokumitsu, H., Soderling, T.R.** (1997). Inhibitory cross-talk by cAMP kinase on the calmodulin-dependent protein kinase cascade. *J. Biol. Chem.* 27: 16073-16076.
 - **Wegner, M., Cao, Z., Rosenfeld, M.G.** (1992). Calcium-regulated phosphorylation within the leucine zipper of C/EBP β . *Science* 256: 370-373.
 - **Weir, G., Bonner, S.** (1985). Pancreatic somatostatin. En, somatostatin Patel Y.C., Tannenbaum, G.S. (eds). Plenum Press NY: 403-423.
 - **West, A.E., Chen, W.G., Dalva, M.B., Dolmetsch, R.E., Kornhauser, J.M., Shaywitz, A.J., Takasu, M.A., Tao, X., Greenberg, M.E.** (2001). Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 11024-11031.

- **West, A.E., Griffith, E.C., Greenberg, M.E.** (2002). Regulation of transcription factors by neuronal activity. *Nat. Rev. Neurosci.* 3: 921-931.
- **Widmer, H.R., Knusel, B., Hefti, F.** (1992). Stimulation of phosphatidylinositol hydrolysis by brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in rat cerebral cortical neurons developing in culture. *J. Neurochem.* 59: 2113-2124.
- **Widmer, H.R., Kaplan, D.R., Rabin, S.J., Beck, K.D., Hefti, F., Knusel, B.** (1993). Rapid phosphorylation of phospholipase C- γ 1 by brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in cultures of embryonic rat cortical neurons. *J. Neurochem.* 59: 2111-2123.
- **Wright, E., Vogel, K., Davies, A.** (1992). Neurotrophic factors promote the maturation of developing sensory neurons before they become dependent of these factors for survival. *Neuron* 9: 130-150.
- **Wu, G-Y, Deisseroth, K., Tsien, R.** (2001). Activity-dependent CREB phosphorylation: Convergence of a fast, sensitive calmodulin kinase pathway and a slow, less sensitive mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (5): 2808-2813.
- **Wynshaw-Boris, A. J., Lugo, T.G., Short, J. M., Fournier, R.E., Hanson, R.W.** (1984). Identification of a cAMP regulatory region in the gene for rat cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP). Use of chimeric genes transfected into hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* 259: 12161-12169.
- **XiaoMing, Z., Xi, Z., Fang, S., Jilin, Z.** (2004). Specific changes of somatostatin mRNA expression in the frontal cortex and hippocampus of diabetic rats. *J. Anat.* 204: 221-225.
- **Xing J., Ginty D.D., Greenberg M.E.** (1996). Coupling of the Ras-MAPK pathways to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB Kinase. *Science* 273: 959-963.

- **Xing, J., Kornhauser, J.M., Xia, Z., Thiele, E.A., Greenberg, M.E.** (1998). Nerve growth factor activates extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways to stimulate CREB serine 133 phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 18: 1946-1955.
- **Yamada, M., Ohnishi, H., Sano, S., Nakatani, A., Ikeuchi, T., Hatanaka, H.** (1997). Insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2 are tyrosine phosphorylated and associated with phosphatidylinositol 3-kinase in response to brain-derived neurotrophic factor in cultured cerebral cortical neurons. *J. Biol. Chem.* 272: 30334-30339.
- **Yamamoto, K.K., González, G.H., Menzel, P., Rivier, J., Montminy, M.R.** (1988). Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. *Nature* 334, 494-498.
- **Yan, Q., Elliot, J., Snider, W.** (1992). BDNF rescues spinal motor neurons from axotomy-induced cell death. *Nature* 360: 753-755.
- **Yancopoulos, G.D., Maisonpierre, P.C., Aldrich, T.H., Belluscio, L., Boulton, T.G., Cobb, M.H., Squinto, S.P., Furth, M.E.** (1990). Neurotrophic factors, their receptors, and the signal transduction pathways they activate. *Cold. Spring Harbor Symp.* 55: 371-379.
- **Yao, R., Cooper, G.M.** (1995). Requirement for phosphatidylinositol-3-kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* 267: 2003-2006.
- **York, R.D., Yao, H., Dillon, T., Ellig, C.L., Eckert, S.P., McCleskey, E.W., Stork, P.J.S.** (1998). Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature* 392: 622-626.
- **Yu, C.F., Roshan, B., Liu, Z-X, Cantley, L.G.** (2001). ERK regulates the hepatocyte growth factor-mediated interaction of Gab1 and the phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 276: 32552-32558.

- **Yun, Y.D., Dumoulin, M., Habener, J.F.** (1990). DNA-binding and dimerization domains of adenosine 3'5'-cyclic monophosphate-responsive protein CREB reside in the carboxyl-terminal 66 amino acids. *Mol. Endocrinol.* 4: 931-939.
- **Zeytin, F.N., Delellis, R.** (1987). The neuropeptide-synthesizing rat 44-2C cell line: regulation of peptide synthesis, secretion, 3',5'-cyclic adenosine monophosphate efflux and adenylate cyclase activation. *Endocrinology* 121: 352-360.
- **Zhang, H.L., Singer, R.H., Bassell, G.J.** (1999). Neurotrophin regulation of β -Actin mRNA and protein localization within growth cones. *J. Cell Biol.* 147: 59-70.
- **Zhou, H.X.M., Li, J., Meinkoth, J., Pittman, R.N.** (2000). Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level. *J. Cell Biol.* 151: 483-494.
- **Zing, H.H., Goodman, R.H., Habener, J.F.** (1984). Developmental expression of the rat somatostatin. *Endocrinology* 115: 90-94.
- **Zippel, R., Balestrini, M., Lomazzi, M., Sturani, E.** (2000). Calcium and calmodulin are essential for Ras-GRF1-mediated activation of the Ras pathway by lisophosphatidic acid. *Exp. Cell Res.* 258: 403-408.