

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA, HISTOLOGÍA Y NEUROCIENCIA

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**REGULACIÓN DEL MANTENIMIENTO DE
LA TETRAPLOIDÍA EN CÉLULAS
GANGLIONARES DE LA RETINA DE
POLLO**

TESIS DOCTORAL

MARÍA DEL CARMEN OVEJERO BENITO

LICENCIADA EN BIOQUÍMICA

Director

DR. JOSÉ MARÍA FRADE LÓPEZ

Instituto Cajal CSIC



Dr. José María Frade López, científico Titular del Instituto Cajal (CSIC)

CERTIFICA:

Que la presente tesis doctoral, que lleva por título **Regulación del mantenimiento de la tetraploidía en células ganglionares de la retina de pollo**, que presenta Doña María del Carmen Ovejero Benito para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid ha sido realizada bajo mi dirección en el Instituto Cajal (CSIC) y que cumple todos los requisitos para su defensa pública, reuniendo a mi juicio el suficiente rigor científico para optar al grado de doctor.

Madrid, a 11 de octubre de 2013

Fdo.: Dr. José María Frade López

A mis padres

A mi hermana

A Sergio

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	i
RESUMEN	vii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. La familia de las neurotrofinas y sus receptores.....	4
1.1 Receptores Trk	5
1.2 p75 ^{NTR}	7
1.3 Interacción de las vías de señalización de Trk y p75 ^{NTR}	8
1.4 Participación de las neurotrofinas en el ciclo celular.....	9
2. Ciclo celular	9
2.1 Aspectos generales del ciclo celular.....	9
2.2 Mecanismos de regulación de la transición G1/S.....	12
2.3 Mecanismos de regulación de la transición G2/M.....	13
2.3.1 Estructura de Cdk1	13
2.3.2 Formación del complejo CC.....	16
2.3.3 Fosforilación activadora de Cdk1	17
2.3.4 Fosforilaciones inhibitorias de Cdk1	18
2.3.5 Translocación núcleo/citoplasma del complejo CC.....	19
3. Variaciones del ciclo celular y poliploidía.....	20
3.1 Poliploidía germinal.....	21
3.2 Poliploidía somática	22
3.3 Mecanismos de generación de poliploidía somática	23
3.4 Poliploidía somática en neuronas	26
4. Generación del sistema nervioso de los vertebrados.....	28
4.1 Desarrollo del ojo y la retina de los vertebrados	28

4.2 La retina como sistema modelo para análisis de procesos de desarrollo.....	30
4.3 Participación de las neurotrofinas en el desarrollo de la retina	32
4.4 Tetraploidización en la retina y neurotrofinas	33
II. OBJETIVOS	35
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
Embriones	41
Anticuerpos primarios.....	41
Anticuerpos secundarios.....	43
Plásmidos	44
ARNi.....	45
Cultivos celulares.....	45
Fibroblastos embrionarios de pollo (CEFs).....	45
NRPDs.....	45
Enriquecimiento de CGRs.....	47
PCR semicuantitativa.....	47
Inmunotinciones	48
Inmunohistoquímica (IHC)	48
Inmunocitoquímica (ICQ)	49
Inmunoprecipitación (IP).....	49
WB.....	50
Electroporación	51
Lipofección	51
Ensayo de actividad de Cdk1.....	52
ELISA “Sandwich”	53
Análisis de imagen.....	53
Citometría estática	54
Análisis de secuencia.....	54

Contaje celular	55
Análisis estadísticos.....	55
IV. RESULTADOS	57
1. TrkB se expresa en una subpoblación de CGRs en proceso de diferenciación susceptible de convertirse en neuronas tetraploides.....	59
2. Cdk1 se expresa en las CGRs en proceso de diferenciación que llevan a cabo mitosis ectópicas <i>in vivo</i>	61
3. BDNF disminuye el nivel de expresión de la proteína Cdk1 en las CGRs, pero no afecta a los niveles de ARNm específico de Cdk1	63
3.1 BDNF disminuye los niveles de proteína Cdk1 en las NRPDs	64
3.2 La disminución de niveles de Cdk1 provocada por BDNF en las NRPDs es un proceso generalizado	65
3.3 BDNF no modifica los niveles de expresión del ARNm específico de <i>CDK1</i>	66
4. BDNF disminuye la actividad específica de Cdk1 en NRPDs	66
5. Regulación post-traducciona l de Cdk1 mediante BDNF.	68
5.1 BDNF induce la fosforilación de Cdk1 en su Tyr15 provocando una inhibición de su actividad	70
5.1.1 BDNF induce la fosforilación de Cdk1 en su Tyr15.....	74
5.1.2 TrkA no está involucrada en la fosforilación de Cdk1 en su Tyr15.....	74
5.1.2 BDNF induce la fosforilación de la Tyr15 por un mecanismo independiente de Wee1	75
5.1.3 BDNF induce la fosforilación de la Tyr15 por un mecanismo dependiente de TrkB	77
6. El efecto de BDNF sobre la actividad de Cdk1 depende exclusivamente de su fosforilación en su Tyr15	77
7. p27 ^{Kip1} podría impedir rondas sucesivas de síntesis de ADN en CGRs tetraploides ...	79
7.1 p27 ^{Kip1} se expresa en CGRs <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	80
7.2 Inhibición de la expresión de p27 ^{Kip1} utilizando ARNi.....	82
7.3 La interferencia frente al ARN de p27 ^{Kip1} favorece la síntesis de ADN en neuronas de retina	83
V. DISCUSIÓN.....	87

1.	BDNF disminuye los niveles de Cdk1 pero no del ARNm específico de CDK1	90
2.	BDNF disminuye la actividad específica de Cdk1 mediante modificación post-traducciona.....	91
2.1	La fosforilación de Cdk1 en su Tyr15 inducida por BDNF es dependiente de TrkB	91
2.2	La fosforilación de Cdk1 en su Tyr15 inducida por BDNF es independiente de Wee1	92
2.3	La cooperación entre TrkB y p75 ^{NTR} es necesaria para la fosforilación de Cdk1 en su Tyr15	93
3.	Las CGRs tetraploides dependen de BDNF durante un periodo restringido.....	94
4.	p27 ^{Kip1} podría impedir rondas sucesivas de síntesis de ADN en CGRs tetraploides ...	95
5.	Posibles implicaciones de la tetraploidía neuronal en patología.....	97
VI.	CONCLUSIONES	101
VII.	BIBLIOGRAFÍA	105
VIII	ANEXO	131
1)	Artículos publicados	133
2)	Capítulos de libro publicados	133
3)	Currículum vitae	133

Figura 1. Estructura de las neurotrofinas.....	5
Figura 2. Esquema de la estructura de las neurotrofinas y sus receptores: Trk y p75 ^{NTR}	6
Figura 3. Representación de algunas de las rutas de señalización activadas por p75 ^{NTR} y Trk.....	8
Figura 4. Esquema de los distintos complejos Ciclina/Cdk que regulan el ciclo celular y sus correspondientes inhibidores.....	12
Figura 5. Comparación de secuencias de las proteínas de la familia de las Cdk.....	15
Figura 6. Estructura tridimensional de Cdk2 y Ciclina E.....	16
Figura 7. Eventos de fosforilación/defosforilación de Cdk1 que regulan la activación del complejo CC.....	17
Figura 8. Bucles de activación e inhibición de Cdk1.....	18
Figura 9. Variación del contenido de ADN a lo largo del ciclo celular.....	21
Figura 10. Esquema de las variaciones del ciclo celular que dan lugar a poliploidía.....	24
Figura 11. Desarrollo del tubo neural y del ojo de los vertebrados.....	29
Figura 12. Esquema de un neuroepitelio pseudoestratificado como la retina en desarrollo....	30
Figura 13. Esquema de las capas de la retina adulta.....	32
Figura 14. Esquema del mecanismo de tetraploidización somática en las CGRs.....	34
Figura 15. TrkB se expresa en una subpoblación de CGRs.....	59
Figura 16. TrkB se expresa en una subpoblación de CGRs que carecen de Rb.....	60
Figura 17. TrkB se expresa en una subpoblación de CGRs que presentan p75 ^{NTR}	60
Figura 18. Cdk1 se expresa preferentemente en el citoplasma de las CGRs.....	61
Figura 19. Cdk1 se expresa en células positivas para p75 ^{NTR}	62
Figura 20. Cdk1 se expresa en mitosis ectópicas.....	63
Figura 21. Cdk1 co-localiza con TrkB en CGRs.	63
Figura 22. TrkB se expresa de forma generalizada en NRPDs.....	64

Figura 23. BDNF disminuye los niveles de la proteína Cdk1 en NRPDs.....	64
Figura 24. Todas las NRPDs diferenciadas son capaces de responder al tratamiento con BDNF.....	65
Figura 25. BDNF no modifica los niveles de <i>CDK1</i>	66
Figura 26. BDNF disminuye la actividad quinasa de Cdk1 en NRPDs.....	67
Figura 27. BDNF no altera los niveles de actividad Cdk general en NRPDs.....	68
Figura 28. BDNF disminuye la actividad de Cdk1 medida como el índice mitótico.....	69
Figura 29. BDNF inhibe la muerte por apoptosis en NRPDs subsiguiente a la mitosis.....	70
Figura 30. Posible fosforilación de Cdk1 inducida por TrkB.....	71
Figura 31. Los anticuerpos anti-pCdk1 Tyr15 A y B interaccionan con las Proteínas A/G Sefarosa.....	72
Figura 32. Validación del ELISA “Sandwich” para la detección de Cdk1.....	73
Figura 33. Validación del ELISA “Sandwich” para la detección de pCdk1 Y15.....	74
Figura 34. BDNF induce la fosforilación de Cdk1 en su Tyr15 por un mecanismo independiente de TrkA.....	75
Figura 35. La fosforilación de Cdk1 en Tyr15 inducida por BDNF es independiente de Wee176	
Figura 36. MK-1775 inhibe la fosforilación de la Tyr15 mediada por Wee1 en CEFs.....	76
Figura 37. La fosforilación de la Tyr15 de Cdk1 inducida por BDNF depende de TrkB.....	77
Figura 38. El tratamiento de NRPDs transfectadas con Cdk1 Phe15 con nocodazol bloquea a las células en mitosis.....	78
Figura 39. El efecto post-traducciona l de BDNF en Cdk1 es específico de la Tyr15.....	79
Figura 40. p27 ^{Kip1} podría evitar que las neuronas tetraploides llevaran a cabo rondas de síntesis extras.....	80
Figura 41. Co-localización entre p27 ^{Kip1} y el receptor de neurotrofinas, p75 ^{NTR}	81
Figura 42. p27 ^{Kip1} se expresa en CGRs diferenciadas.....	81
Figura 43. p27 ^{Kip1} se expresa en CGRs que carecen de Rb.....	81

Figura 44. Las células que expresan TrkB co-expresan p27^{Kip1}82

Figura 45. p27^{Kip1} se expresa en NRPDs *in vitro*.....82

Figura 46. Los ARNi interferentes 1p27i y 2p27i reudcen significativamente los niveles de proteína p27^{Kip1}83

Figura 47. Pureza del cultivo de CGRs después de su enriquecimiento en un gradiente de Percoll.....84

Figura 48. La disminución de los niveles de p27^{Kip1} en un cultivo enriquecido en CGRs provoca un incremento en la incorporación de BrdU respecto al control.....85

Figura 49. La disminución de los niveles de p27^{Kip1} induce una síntesis lenta de ADN.....86

Figura 50. Modelo del bloqueo de la transición G2/M inducido por BDNF/TrkB en CGRs tetraploides.....89

ABREVIATURAS

A

ABTS	2,2'-Azino-di (3-etilbenzotiazolin-sulfonato-6) de amonio (del inglés “ 2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate (6)] diammonium salt”)
ADNc	ADN codificante
Akt/PKB	Proto-oncogén 1 de timoma viral/ Proteína quinasa B (del inglés “thymoma viral proto-oncogene 1/Protein kinase B”)
ANOVA	Análisis de la varianza (del inglés “Analysis of variance”)
APC	Complejo promotor de la anafase (del inglés “Anaphase promoting complex”)
ARNi	ARN de interferencia
ARMS/Kidins	Proteína transmembrana con dominios repetidos de anquirina/Substrato de interacción de 220 kDa de la quinasa D (del inglés “Ankyrin repeat-rich membrane-spanning protein/Kinase D-interacting Substrate of 220kDa”)
ARNm	ARN mensajero

B

BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro (del inglés “Brain-derived neurotrophic factor”)
Bex	Proteína de expresión ligada al cromosoma X (del inglés “Brain X-linked expressed protein”)
BrdU	5-Bromo-2'-desoxiuridina
BSA	Albúmina de suero bovino (del inglés “Bovine serum albumin”)

C

CAK	Complejo de activación de las quinasas Cdks (del inglés “Cdk activating kinase complex”)
CC	Cdk1/Ciclina B
CCG	Capa de células ganglionares de retina
Cdc	Ciclo de división celular (del inglés “cell división cycle”)
CDKN1B	Inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina (del inglés “Cyclin dependent kinase inhibitor 1 B”)
Cdks	Quinasas dependientes de ciclinas (del inglés “Cyclin dependent kinases”)

Cdk1 Phe15	Forma constitutivamente activa de Cdk1 cuya tirosina 15 se ha sustituido por una fenilalanina
Cdt	Factor de replicación del ADN y de licencia de replicación del ADN (del inglés “Chromatin licensing and DNA replication factor”)
CEFs	Fibroblastos embrionarios de pollo (del inglés “Chicken embryonic fibroblasts”)
CGRs	Células ganglionares de retina
Cip	Inhibidores proteicos de las Cdks (del inglés “Protein Inhibitors of Cdks /Protein Inhibitors of Kinases”)
C-MAGE	Antígeno de melanoma de pollo (del inglés “Chicken melanoma antigen”)
CKIs	Inhibidores de las quinasas dependientes de ciclinas (del inglés “Cyclin dependent kinases inhibitors”)
CRM1	Proteína del mantenimiento de la región del cromosoma 1 (del inglés “Chromosomal region maintenance protein 1”)
C-terminal	Carboxilo terminal

D

d	Densidad
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol (del inglés “4',6-diamidino-2-phenylindole”)
DMEM	Medio de cultivo eagle modificado de Dulbecco (del inglés “Dulbecco's modified eagle medium”)

E

E	Estadio de desarrollo
E2F	Factor de interacción con el promotor de E2 (del inglés “E2 promoter binding”)
EGFP	Proteína fluorescente verde potenciada (del inglés “Enhanced green fluorescence protein”)
ELISA	Ensayo inmunoenzimático (del inglés “Enzyme-linked immunosorbent assay”)
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares (del inglés “Extracellular signal-regulated kinase”)

F

FAP	Fosfatasa asociada a fas-1 (del inglés “Fas associated phosphatase”)
FCS	Suero fetal bovino (del inglés “Fetal calf serum”)
FISH	Hibridación fluorescente <i>in situ</i> (del inglés “Fluorescence in situ hybridization”)

G

G	del inglés “gap phase”
----------	------------------------

G1/S	del inglés “gap phase”/síntesis
G2/M	del inglés “gap phase”/mitosis
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (del inglés “Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase”)
Gab	Proteína de unión asociada a Grb (del inglés “Grb associated binding protein”)
Grb	Proteína ligante del receptor del factor de crecimiento (del inglés “Growth factor receptor-bound protein”)
GST	Glutation S-transferasa (del inglés “Glutathionine S-transferase”)

H

HEPES	Ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinaetanosulfónico (del inglés “4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid”)
HRP	Peroxidasa de rábano picante (del inglés “Horseradish peroxidase”)

I

ICQ	Inmunocitoquímica
Ig	Inmunoglobulina
IHQ	Inmunohistoquímica
Ink	Inhibidores de quinasa (del inglés “Inhibitors of kinase”)
INL	Capa nuclear interna (del inglés “Inner nuclear layer”)
INM	Movimiento nuclear intercinético (del inglés “Interkinetic nuclear movement”)
IP	Inmunoprecipitación

J

JNK	Quinasa de la región N-terminal jun (del inglés “Jun N-terminal kinase”)
------------	--

K

Kip	Inhibidores proteicos de las quinastas (del inglés “Protein Inhibitors of Kinases”)
KRH	Tampón fisiológico salino Krebs-Ringer-HEPES

M

MAGE	Antígeno de melanoma (del inglés “Melanoma antigen”)
MAGI-1	Guanilato quinasa con organización invertida asociada a membrana 1 (del inglés “Membrane associated guanylate kinase with inverted organization-1”)
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos (del inglés “Mitogen activated protein kinase”)

MAPKK	Proteína quinasa de la quinasa activada por mitógenos (del inglés “Mitogen activated protein kinase kinase”)
MCM	Mantenimiento de minicromosomas (del inglés “Minichromosomal maintenance”)
Myt	Factor de transformación de la mielina (del inglés “Myelin transformation factor”)

N

NADE	Ejecutor de muerte celular asociado a p75 ^{NTR} (del inglés “p75 ^{NTR} -associated cell death executor”)
NeuN	Núcleo neuronal (del inglés “Neuronal nuclei”)
NF-κB	Factor nuclear kappa B (del inglés “Nuclear factor kappa B”)
NGF	Factor de crecimiento nervioso (del inglés “Nerve growth factor”)
NRIF	Factor que interacciona con el receptor de neurotrofinas (del inglés “Neurotrophin receptor interacting factor”)
NRPDs	Neuronas de retina de pollo en proceso de diferenciación
N.S.	No significativo
NT	Neurotrofina
N-terminal	Amino terminal
NTR	Receptor de neurotrofinas (del inglés “Neurotrophin receptor”)

O

ONL	Capa nuclear externa (del inglés “Outer nuclear layer”)
ORC	Complejo de reconocimiento del origen (del inglés “Origin replication complex”)

P

PBS	Tampón fosfato salino (del inglés “Phosphate buffered saline”)
PBT	PBS/0,05% Tritón X-100
PBTw	PBS/0,1% Tween-20
pCdk1 Tyr15	Cdk1 fosforilado en su tirosina 15
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés “Polymerase chain reaction”)
PDK	Quinasa dependiente de fosfoinosítido (del inglés “Phosphoinositide-dependent kinase”)
pH3	Histona 3 fosforilada (del inglés “Phosphorylated histone 3”)
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa (del inglés “Phosphatidylinositol 3-kinase”)
PLC-γ	Fosfolipasa C-γ (del inglés “Phospholipase C-γ”)
PLO	Poli-(DL)-ornitina

preRC Complejo de prereplicación (del inglés “Prereplication complex”)

R

Rb Retinoblastoma

RFP Proteína de fluorescencia roja (del inglés “Red fluorescence protein”)

RFPi ARN de interferencia contra el gen de la luciferasa

RhoA Familia de genes homólogos a ras A (del inglés “Ras homolog gene family, member A”)

RIP-2 Proteína que interacciona con el receptor 2 (del inglés “Receptor interacting protein 2”)

S

Sall Proteína similar a sal (del inglés “Sal-like protein”)

SC Factor de las células de Schawnn (del inglés “Schawnn Cell factor”)

sem Desviación estándar de la media (del inglés “Standard deviation of the mean”)

Shc Proteína que contiene el dominio de homología 2 con Src (del inglés “Src homology 2 domain-containing”)

SOS del inglés “Son of sevenless”

T

TRAF Factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (del inglés “TNF receptor associated factor”)

Trk Quinasa del receptor de tropomiosina (del inglés “Tropomyosin receptor kinase”)

V-W

v Cuerpo vítreo

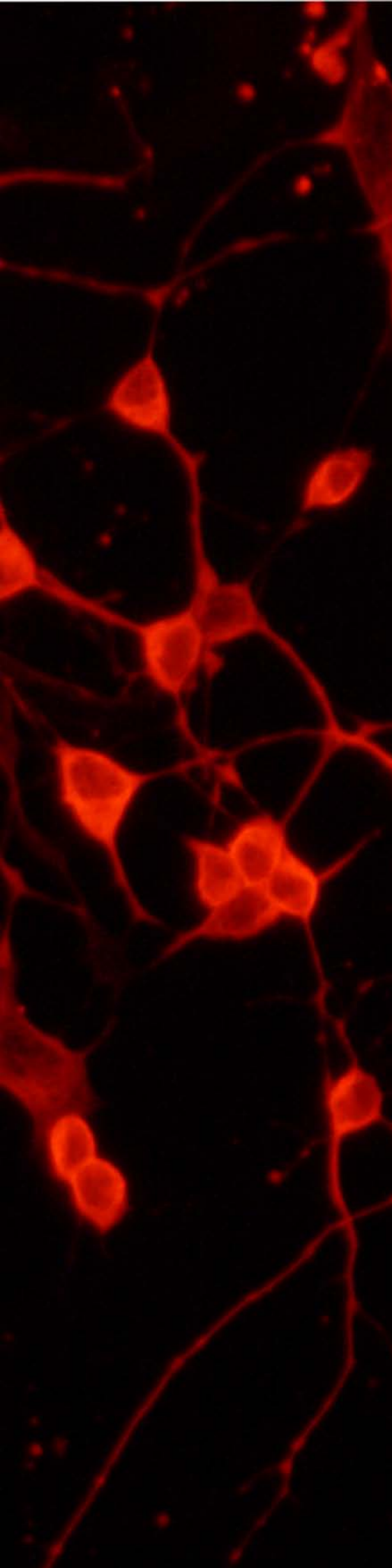
WB Inmunoblot (del inglés “Western blot”)

RESUMEN

Según la visión clásica de la neurociencia, la reactivación del ciclo celular en neuronas conduce a la muerte celular por apoptosis. Sin embargo, publicaciones previas de nuestro laboratorio han demostrado que un elevado número de células ganglionares de la retina de pollo (CGRs) en proceso de migración a la capa de células ganglionares (CCG) prospectiva pueden reactivar el ciclo celular y, en presencia de BDNF (del inglés “Brain-derived neurotrophic factor”), permanecer como neuronas tetraploides. Estas neuronas se caracterizan por expresar el factor de transcripción E2F1 (del inglés “E2 promoter binding”) y carecer de su represor, la proteína del retinoblastoma (Rb). En ausencia de BDNF, las CGRs tetraploides sufren la transición G2/M (del inglés “gap phase”/mitosis), lo que provoca su muerte por apoptosis poco tiempo después. El mecanismo molecular empleado por BDNF para prevenir la transición G2/M y mantener la tetraploidía en estas neuronas es desconocido. Por lo tanto, uno de los objetivos de esta tesis es dilucidar dicho mecanismo. En primer lugar demostramos que TrkB (del inglés “Tropomyosin receptor kinase”), el receptor neurotrófico de BDNF, se expresa en una población CGRs que carecen de Rb y expresan p75^{NTR} (del inglés “p75 neurotrophin receptor”) *in vivo*. Empleando un sistema que recapitula la diferenciación de las CGRs *in vitro*, demostramos que el tratamiento con BDNF a concentraciones específicas de TrkB, es capaz de disminuir los niveles de la proteína Cdk1, pero no los de su ARN mensajero (ARNm). También demostramos que BDNF disminuye los niveles de actividad endógena y exógena de Cdk1 (del inglés “Cyclin dependent kinase”), promoviendo la fosforilación inhibitoria en su Tyr15. Dicha fosforilación está mediada por TrkB, ya que se puede revertir con el tratamiento con K252a, un inhibidor de tirosín quinasas que se usa tradicionalmente para bloquear la actividad de las neurotrofinas a través de sus receptores de la familia Trk. Sin embargo, demostramos que esta fosforilación es independiente de Wee1, la quinasa responsable de la fosforilación de la Tyr15 en células proliferantes, puesto que este efecto permanece después del uso del inhibidor selectivo de dicha quinasa (MK-1775). También demostramos que el efecto de inhibición de la actividad de Cdk1 está mediado por la fosforilación de su Tyr15, ya que BDNF no puede bloquear la actividad de la forma mutante Cdk1 Phe15 (una forma constitutivamente activa de Cdk1, en la que su Tyr15

se ha sustituido por una Phe) cuando se sobreexpresa en cultivos neurogénicos de retina. Por todo esto, proponemos que la inhibición de la expresión y de la actividad de Cdk1 ocurre a través de un mecanismo dependiente de BDNF, que contribuye al mantenimiento de las neuronas tetraploides en un estado similar a G2.

Por otra parte, las neuronas tetraploides sólo llevan a cabo una ronda extra de síntesis de ADN, a diferencia de otras células poliploides del organismo, que pueden llevar a cabo múltiples rondas de síntesis de ADN en ausencia de mitosis. Por lo tanto, nos preguntamos cuáles son los mecanismos responsables de bloquear rondas sucesivas de síntesis de ADN en estas neuronas. Un candidato a la regulación de este proceso es el inhibidor de ciclo celular p27^{Kip1} (del inglés “Protein Inhibitor of Kinase”). Observamos que p27^{Kip1} se expresa en CGRs susceptibles de convertirse en tetraploides, conocidas por su expresión del marcador de diferenciación p75^{NTR} y por carecer del represor de la transición G1/S (del inglés “gap phase”/Síntesis), Rb. Llevando a cabo estudios de pérdida de función de p27^{Kip1} mediante ARN de interferencia (ARNi) en CGRs diferenciadas, observamos un incremento de la incorporación de BrdU (5-Bromo-2'-desoxiuridina) con respecto al interferente control. La bajada de los niveles de p27^{Kip1} se correlaciona con un aumento de la cantidad de ADN en dichas células, pero no se corresponde con un aumento del porcentaje de mitosis, indicando una síntesis lenta de ADN. En conclusión, estos datos sugieren la participación de p27^{Kip1} en el mantenimiento del estado diploide y tetraploide, impidiendo que se produzcan rondas sucesivas de endorreduplicación.



I. INTRODUCCIÓN

El trabajo previo de nuestro laboratorio ha demostrado que distintas poblaciones de neuronas de proyección duplican su ADN dando lugar a neuronas tetraploides somáticas (López-Sánchez y Frade, 2013; Morillo *et al.*, 2010). Dichas neuronas, entre las que se encuentran las CGRs de pollo y las neuronas piramidales de la capa V/VI de la corteza de ratón, se generan durante el desarrollo y permanecen activas funcionalmente durante el resto de la vida adulta (López-Sánchez y Frade, 2013; Morillo *et al.*, 2010), participando en la diversidad de tipos neuronales existente en el sistema nervioso de los vertebrados. La generación de neuronas tetraploides requiere la coordinación de tres procesos: la reactivación del ciclo celular en una neurona postmitótica inmadura, la inhibición de la transición G2/M en dicha neurona y la inhibición de fases sucesivas de síntesis de ADN (endorreduplicación) que pudieran dar lugar a neuronas poliploides. La reactivación del ciclo celular en neuronas postmitóticas inmaduras depende de la activación de p75^{NTR} mediante NGF (del inglés “Nerve Growth Factor”) (Morillo *et al.*, 2010) a través de un mecanismo que requiere la fosforilación del factor de transcripción E2F4 por p38^{MAPK} (del inglés “Mitogen activated protein kinase”) (Morillo *et al.*, 2012). Se sabe que BDNF es necesario para que se produzca el bloqueo de la transición G2/M en las neuronas tetraploides ya que en ausencia de dicho factor dichas células mueren por apoptosis (Morillo *et al.*, 2010). Sin embargo, el mecanismo por el cual BDNF bloquea dicha transición es desconocido. También se desconoce el mecanismo responsable de impedir que se produzcan rondas sucesivas de síntesis de ADN en las neuronas tetraploides. Este trabajo se ha centrado en resolver estas dos últimas cuestiones. A lo largo de esta introducción se describirán en primer lugar las neurotrofinas, como agentes activos en este proceso; posteriormente se incidirá sobre el ciclo celular canónico y las modificaciones del mismo que dan lugar a las células poliploides. Por último, se describirán diversos conceptos sobre el desarrollo del sistema nervioso y, en concreto, la retina, como tejido en el que se desarrolla el presente trabajo.

1. La familia de las neurotrofinas y sus receptores

Las neurotrofinas son una familia de factores de crecimiento que, en el pollo, está constituida por tres miembros: NGF (Cohen *et al.*, 1954; Cohen y Levi-Montalcini, 1956; Levi-Montalcini y Hamburger, 1951), BDNF (Barde *et al.*, 1982) y la neurotrofina NT-3 (del inglés “Neurotrophin-3”) (Hohn *et al.*, 1990; Jones y Reichardt, 1990; Maisonpierre *et al.*, 1990) (Figura 1). Otros miembros que componen esta familia son: NT-4/5, presente en mamíferos (Berkemeier *et al.*, 1991; Hallböök *et al.*, 1991; Ip *et al.*, 1992); NT-6, presente en el teleosteo *Xiphophorus maculatus* (Götz *et al.*, 1994), y NT-7, presente en el pez cebra (*Danio rerio*) (Lai *et al.*, 1998; Nilsson *et al.*, 1998). Las neurotrofinas están involucradas en un amplio rango de procesos dentro y fuera del sistema nervioso que incluyen la apoptosis, la supervivencia celular, la diferenciación neuronal, la plasticidad sináptica, el tráfico y la fusión de membranas, la mielinización, el crecimiento axonal y dendrítico, el comportamiento y la memoria. La alteración en sus niveles o en sus vías de señalización conlleva situaciones patológicas tales como el dolor, la agresión y la depresión (Arévalo y Wu, 2006; Chao, 2003; Huang y Reichardt, 2003; Park y Poo, 2013; Skaper, 2012).

La transducción de la señal iniciada por las neurotrofinas es tremendamente compleja, dado que cada una de ellas puede unirse a dos tipos de receptores transmembrana que activan múltiples cascadas de señalización (Arévalo y Wu, 2006; Chao, 2003; Skaper, 2012). Dichos receptores son: p75^{NTR} el miembro fundador de la familia del factor de necrosis tumoral (Chao *et al.*, 1986; Radeke *et al.*, 1987) y la familia Trk, compuesta por: TrkA (Martin-Zanca *et al.*, 1986), TrkB (Klein *et al.*, 1989) y TrkC (Lamballe *et al.*, 1991). Todas las neurotrofinas se pueden unir al receptor p75^{NTR} (Rodríguez-Tébar *et al.*, 1990; 1992). En cambio, NGF se une específicamente a TrkA; BDNF, a TrkB, y NT-3, preferentemente a TrkC, aunque también se puede unir a TrkA y a TrkB (Kaplan *et al.*, 1991; Klein *et al.*, 1991; 1992; Lamballe *et al.*, 1991; Skaper, 2012).

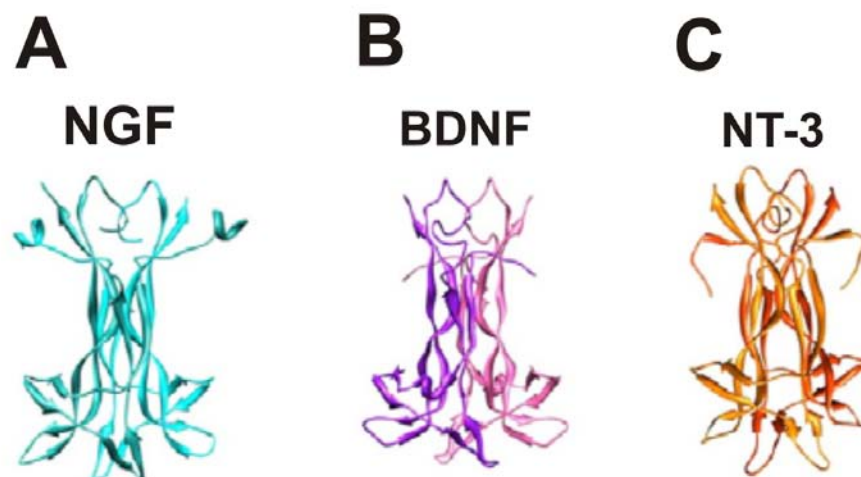


Figura 1. Estructura de las neurotrofinas (A) NGF, (B) BDNF y (C) NT-3. Como se puede observar, existe una gran similitud entre los distintos miembros de la familia de las neurotrofinas. Figura adaptada de Allen *et al.* (2013).

Las neurotrofinas se sintetizan en el retículo endoplasmático y están codificadas por un único exón como un precursor pre-pro-neurotrofina que se transforma en pro-neurotrofina cuando se libera el péptido señal. Las pro-neurotrofinas tienen función biológica ya que se pueden unir con alta afinidad a p75^{NTR} asociado al correceptor sortilina (Lee *et al.*, 2001; Nykjaer *et al.*, 2004), que reconoce de manera específica el dominio pro, lo que conduce a la muerte celular por apoptosis (Nykjaer *et al.*, 2004; Teng *et al.*, 2010). Los precursores de las neurotrofinas se pueden procesar intracelularmente mediante furina o proconvertasas (Seidah *et al.*, 1996), o en el interior de las vesículas de secreción (Dieni *et al.*, 2012). Las neurotrofinas en su forma madura actúan como homodímeros no covalentes (Skaper, 2012; Wiesmann *et al.*, 1999) (Figura 1).

1.1 Receptores Trk

Los receptores Trk son proteínas monoméricas cuya región extracelular está constituida por tres dominios ricos en Leu*, rodeados de dos dominios ricos en Cys; dos dominios de tipo Ig (Inmunoglobulina); una región transmembrana, y un dominio tirosín quinasa en el extremo C-terminal (carboxilo terminal) (Figura 2) (Arévalo y Wu, 2006; Holden *et al.*, 1997; Schneider y Schweiger, 1991). La unión de las neurotrofinas a los receptores Trk tiene lugar a través de los dominios tipo Ig, que también se

* A lo largo del texto se empleará el código de tres letras para los aminoácidos, salvo en las figuras, en las que se empleará el código de una letra. 5

encargan de evitar la dimerización espontánea del receptor en ausencia de neurotrofinas (Arévalo *et al.*, 2000; Pérez *et al.*, 1995).

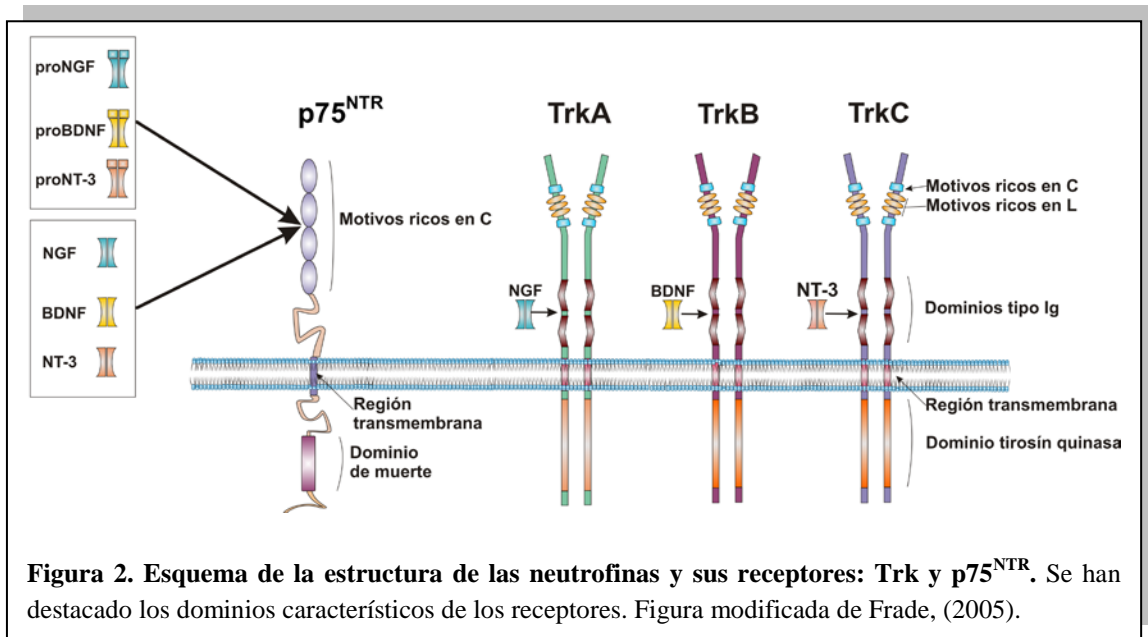


Figura 2. Esquema de la estructura de las neurotrofinas y sus receptores: Trk y p75^{NTR}. Se han destacado los dominios característicos de los receptores. Figura modificada de Frade, (2005).

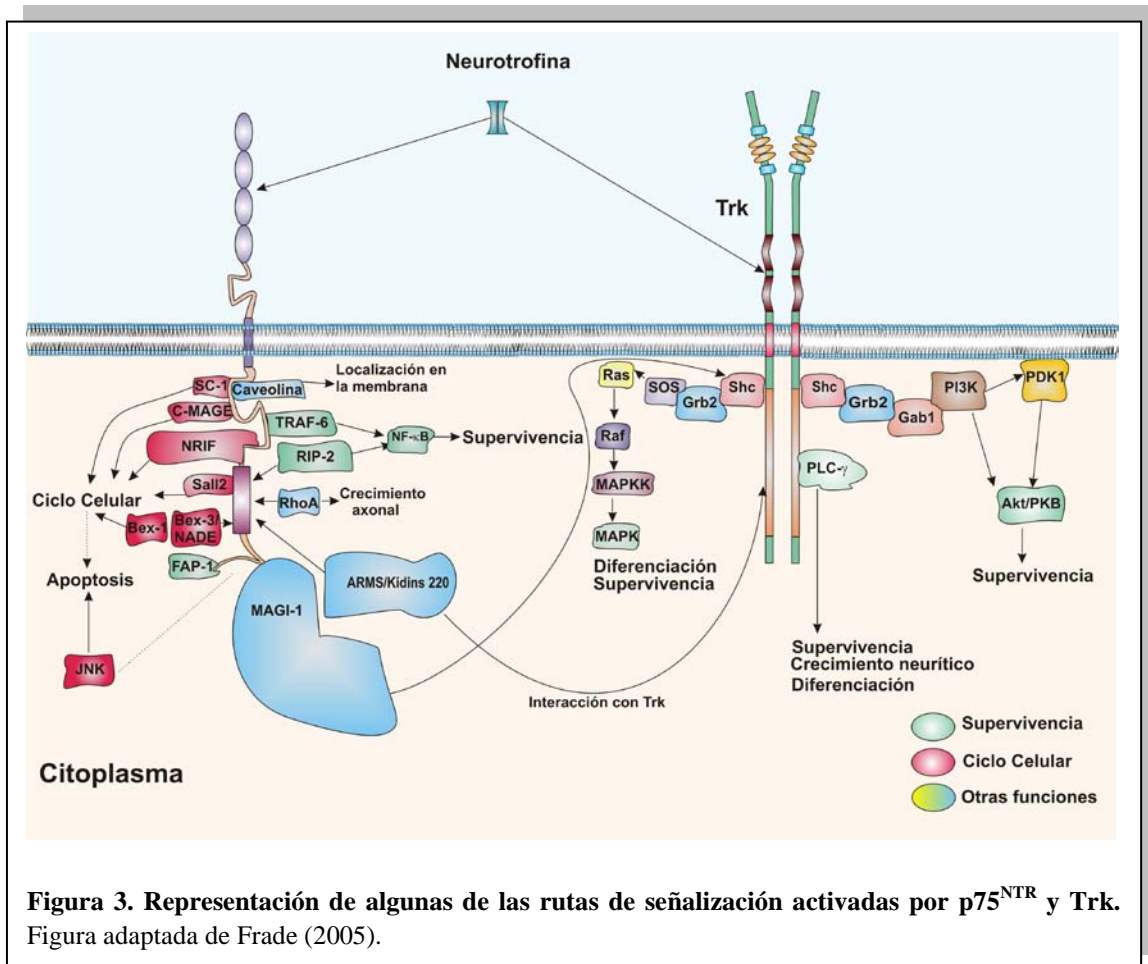
Cuando los homodímeros de neurotrofinas se unen al dominio Ig de los receptores Trk, se induce la dimerización y activación del dominio quinasa mediante su transfosforilación. Las fosfo-Tyr del receptor activado y sus aminoácidos circundantes forman un dominio que recluta distintas proteínas adaptadoras, frecuentemente con el dominio Shc (del inglés “Src homology 2 domain-containing”), que a su vez reclutan a otras proteínas adaptadoras como Grb2 (del inglés “Grb associated binding protein”) y SOS (del inglés “Son of sevenless”), iniciando diversas cascadas de señalización (Arévalo *et al.*, 2000; Arévalo y Wu, 2006; Huang y Reichardt, 2003; Skaper, 2012). La activación de los receptores Trk promueve la señalización a través de tres rutas diferentes: PLC- γ (del inglés “Phospholipase C- γ ”), Akt /PKB (del inglés “Thymoma viral proto-oncogene 1/Protein kinase B”) y MAPK (Figura 3). La interacción de PLC- γ con el receptor Trk activado inicia una ruta que activa la expresión de genes, la supervivencia neuronal, el crecimiento neurítico y la plasticidad neuronal. La ruta PI3K (del inglés “Phosphatidylinositol 3-kinase”)/Akt/PKB participa en la supervivencia neuronal, mientras que la ruta Shc-Ras/Raf/MAPKK (del inglés “Mitogen activated protein kinase kinase”) /MAPK está relacionada con la supervivencia, la diferenciación y el crecimiento de las neuritas (Figura 3) (Arévalo y Wu, 2006; Chao, 2003; Reichardt, 2006; Skaper, 2012). La endocitosis y la transferencia de los receptores Trk a los

diferentes compartimentos de la membrana donde se encuentran las proteínas adaptadoras modula la eficacia y la duración de las rutas de señalización. (Huang y Reichardt, 2003; Skaper, 2012; Yu *et al.*, 2011).

1.2 p75^{NTR}

p75^{NTR} es el miembro fundador de la familia del factor de necrosis tumoral cuya estructura se basa en una cadena sencilla transmembrana con un dominio de muerte tipo II en la zona intracelular (Figura 2) (Arévalo y Wu, 2006; Chao *et al.*, 1986; Radeke *et al.*, 1987). p75^{NTR} puede inducir la muerte celular de manera independiente de los receptores Trk (Frade *et al.*, 1996c). p75^{NTR} activa las rutas de NF- κ B (del inglés “Nuclear factor kappa B”) (Carter *et al.*, 1996), de JNK (del inglés “Jun N-terminal kinase”) (Bamji *et al.*, 1998; Casaccia-Bonofil *et al.*, 1996) y regula la actividad de Rho A (del inglés “Ras homolog gene family, member A”) (Yamashita *et al.*, 1999) (Figura 3). Gran parte de las respuestas inducidas por p75^{NTR} están reguladas por proteínas que interactúan con su dominio intracelular iniciando vías de señalización que promueven la apoptosis, la supervivencia, el crecimiento neurítico y la parada del ciclo celular (Figura 3) (Arévalo y Wu, 2006; Chao, 2003; Gentry *et al.*, 2004; Roux y Barker, 2002; Schecterson y Bothwell, 2010; Schor, 2005) (Figura 3). Algunos ejemplos de proteínas que interactúan con p75^{NTR} son: TRAF-6 (del inglés “TNF receptor associated factor”), RIP-2 (del inglés “Receptor interacting protein”) y FAP-1 (del inglés “Fas associated phosphatase”), que están asociadas con la activación de NF- κ B y la supervivencia (Irie *et al.*, 1999; Khursigara *et al.*, 1999; 2001); SC-1 (del inglés “Schawnn Cell factor”), Bex-1 (del inglés “Brain X-linked expressed protein”), Bex-3/NADE (del inglés “p75^{NTR}-associated cell death executor”), C-MAGE (del inglés “Chicken melanoma antigen”), NRIF (del inglés “Neurotrophin receptor interacting factor”) y Sall2 (del inglés “Sal-like protein”), que están asociados con la regulación del ciclo celular y la apoptosis (Casademunt *et al.*, 1999; Chittka *et al.*, 2004; Chittka y Chao, 1999; López-Sánchez *et al.*, 2007b; Mukai *et al.*, 2000; Pincheira *et al.*, 2009; Verbeke *et al.*, 2010; Vilar *et al.*, 2006); ARMS/Kidins220 (del inglés “Ankyrin repeat-rich membrane-spanning protein/Kinase D-interacting Substrate of 220kDa”), que se encarga de mediar la interacción entre receptores Trk y p75^{NTR} (Chang *et al.*, 2004; Iglesias *et al.*, 2000); Caveolina, que se encarga de promover la localización en la membrana y que puede participar en el control de la señalización neurotrófica

(Bilderback *et al.*, 1997; 1999); MAGI-1 (del inglés “Membrane associated guanylate kinase with inverted organization”), que actúa como proteína de andamiaje (Ito *et al.*, 2013), y RhoA, que está implicada en el crecimiento axonal (Yamashita *et al.*, 1999) (Figura 3).



1.3 Interacción de las vías de señalización de Trk y p75^{NTR}

Las vías de señalización de Trk y de p75^{NTR} pueden actuar de forma independiente, pero también pueden estar interactuando. La función del receptor Trk está modulada por p75^{NTR} a varios niveles: promueve la unión de ligandos, aumenta su especificidad por una neurotrofina concreta, favorece la accesibilidad de neurotrofinas al facilitar el crecimiento axonal o la innervación de la célula diana y promueve la endocitosis y el transporte retrógrado a compartimentos de membrana donde la unión de neurotrofinas con receptores Trk puede iniciar una cascada de señalización (Skaper, 2012). p75^{NTR} y Trk pueden interactuar formando complejos de alta afinidad (Arévalo *et al.*, 2000; Chao, 2003; Dechant *et al.*, 1993; Esposito *et al.*, 2001; Mahadeo *et al.*,

1994; Schröpel *et al.*, 1995). Esta interacción puede estar mediada por la proteína ARMS/Kidins220, que tiene capacidad para interactuar simultáneamente con receptores Trk y p75^{NTR}, activando ambas vías de señalización (Chang *et al.*, 2004). p75^{NTR} se encuentra en forma dimérica en ausencia de NGF (Barker, 2007). Dado que p75^{NTR} presenta una interfase de unión con TrkA y que ambas proteínas se unen a NGF en distintas orientaciones, NGF se uniría rápidamente a p75^{NTR}, induciendo un cambio conformacional que facilitaría la unión de NGF a TrkA (Barker, 2007).

1.4 Participación de las neurotrofinas en el ciclo celular

Cada vez hay más evidencias que demuestran la conexión entre las neurotrofinas y el control del ciclo celular, dentro y fuera del sistema nervioso (López-Sánchez y Frade, 2002). Por ejemplo: NGF induce la activación de la fase de síntesis en neuroblastos de retina *in vitro* (Frade, 2000) e *in vivo* (Morillo *et al.*, 2010) así como de figuras mitóticas (Frade, 2000). En cambio, BDNF inhibe la expresión de Ciclina B2 y las figuras mitóticas inducidas por NGF (Frade, 2000). p75^{NTR} también se detecta en ciclo de la zona subventricular de las ratas adultas (Giuliani *et al.*, 2004). p75^{NTR} activa a distintos miembros de la familia de las MAPK que pueden regular el ciclo celular (Ambrosino y Nebreda, 2001; Zhang y Liu, 2002), entre ellos JNK, p38^{MAPK} y ERK (del inglés “Extracellular signal-regulated kinase”) (Casaccia-Bonnet *et al.*, 1996; Costantini *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2007; Susen *et al.*, 1999). p75^{NTR} interactúa a través de su dominio intracelular con otras proteínas involucradas en el control del ciclo celular, tales como algunos miembros de la familia MAGE, y los factores de transcripción NRIF, SC-1 y Bex-1 (Casademunt *et al.*, 1999; Chittka *et al.*, 2004; Chittka y Chao, 1999; López-Sánchez *et al.*, 2007b, Vilar *et al.*, 2006) (Figura 3). Dada la importancia de la reactivación del ciclo celular para esta tesis, a continuación se realizará una descripción detallada del mismo.

2. Ciclo celular

2.1 Aspectos generales del ciclo celular

Una capacidad inherente a toda célula es la de dividirse y proliferar. En las células eucariotas, la división se lleva a cabo mediante mitosis seguida de un proceso de interfase (Figura 4). La mitosis consta de cinco fases: la Profase (en la que se produce la

condensación de la cromatina, la desaparición del nucleolo y de la membrana nuclear y la formación del huso mitótico), la Metafase (en la que se produce el alineamiento de los cromosomas en el ecuador de la célula, asociados al huso mitótico), la Anafase (en la que se produce la separación de las cromátidas hacia los extremos del huso mitótico), la Telofase (en la que se produce la descondensación de los cromosomas, la generación de la membrana nuclear y la formación de dos núcleos hijos) y la Citocinesis (en la que tiene lugar la división del citoplasma dando lugar a dos células hijas idénticas a la célula inicial). A su vez, la interfase consta de distintas fases: G1 (del inglés “gap phase”), la primera fase de crecimiento, en la que comienzan a expresarse proteínas responsables de la división celular; la fase de síntesis (S), en la que ocurre la duplicación del ADN, y la segunda fase de crecimiento (G2) en la que se sintetizan las proteínas responsables de la mitosis. Las células también se pueden encontrar en estado quiescente (G0) cuando han salido del ciclo celular, como ocurre con células diferenciadas (Figura 4) (Gopinathan *et al.*, 2011; Williams y Stoeber, 2012; Yasutis y Kozminki, 2013).

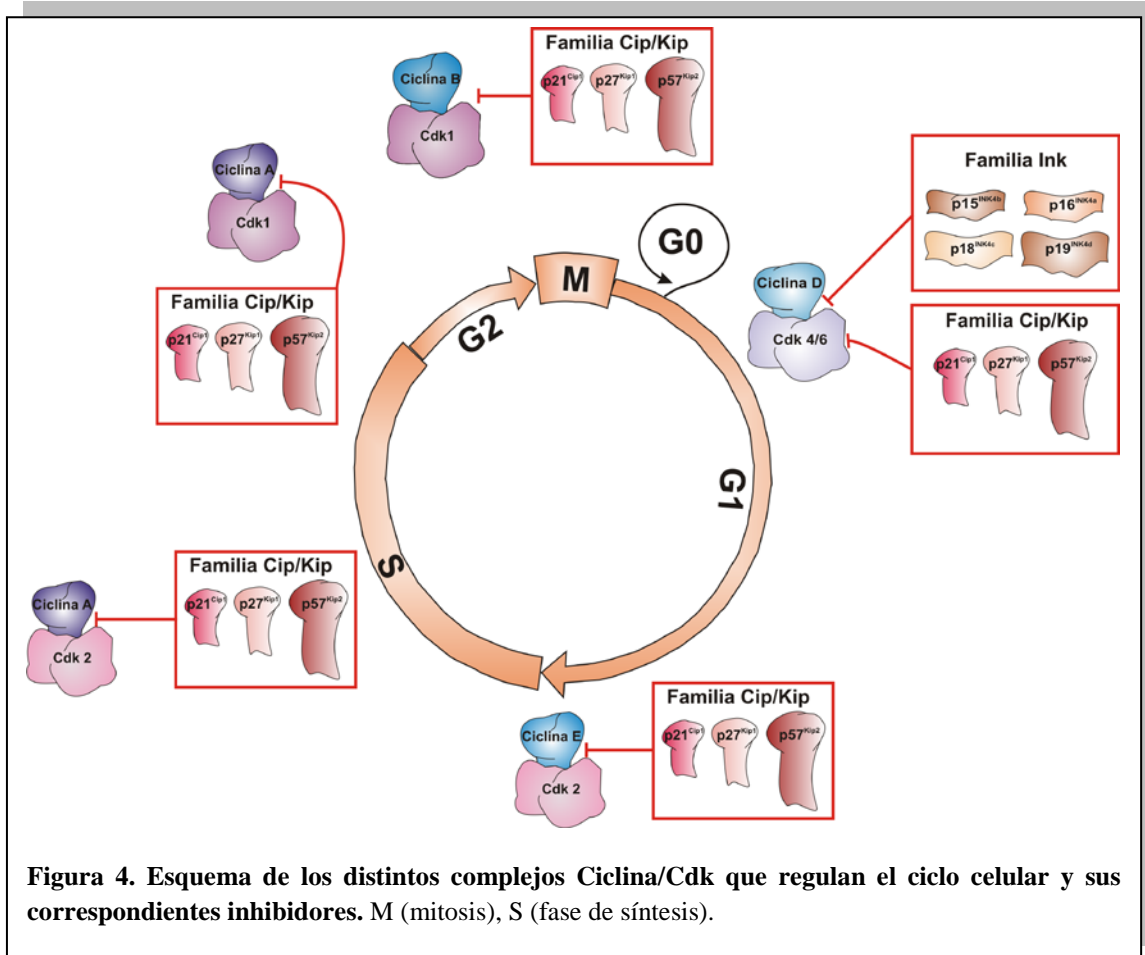
La activación prematura de alguna de las fases del ciclo puede dar lugar a la muerte celular por apoptosis o a proliferación aberrante (Malumbres y Barbacid, 2009; Santamaría y Ortega, 2006; Stark y Taylor, 2006; Vermeulen *et al.*, 2003a; 2003b). Por ello, el ciclo celular está estrictamente regulado a distintos niveles. Un ejemplo de dicha regulación son los llamados puntos de control en los cuales se detiene la progresión del ciclo hasta que se haya completado correctamente la fase anterior, permitiendo que se produzca la corrección de errores o induciendo apoptosis si los errores que se ha producido son irreparables. Existen diversos puntos de control distribuidos a lo largo de todo el ciclo celular, especialmente en las transiciones entre las diversas fases (Fisher, 2012; Nigg, 2001; Yasutis y Kozminki, 2013). Durante G1 tienen lugar dos puntos de control: uno en el comienzo de la fase, en el que se comprueba la accesibilidad de factores de crecimiento responsables de la supresión de la señal de quiescencia, y otro en la fase G1 tardía, en el que se comprueba que existen suficientes nutrientes y que la célula haya alcanzado el tamaño adecuado para llevar a cabo la duplicación del ADN (Foster *et al.*, 2010). Después de completar la fase de síntesis, se confirma que el ADN se ha duplicado de manera correcta antes de progresar a G2. Antes de pasar a la mitosis, se realiza un control de daño de ADN. En estos dos últimos casos, se activa p53 si se ha producido un daño en el ADN, lo que permite la detención del ciclo hasta que se produce la reparación de este daño o la inducción de apoptosis si el daño es irreparable.

Otros controles se encargan de monitorizar la correcta posición del huso mitótico, la separación de los cromosomas y la salida del ciclo celular (Fisher, 2012; Nigg, 2001; Yasutis y Kozminki, 2013).

La transición entre estas fases está determinada por unas moléculas denominadas Ciclinas cuya expresión varía a lo largo del ciclo celular (Figura 4). Las Ciclinas se asocian con quinasas específicas, denominadas Cdks. La Ciclina D se sintetiza al comienzo de G1 y se une y activa a Cdk4 y Cdk6 cuando la célula abandona el estado quiescente. Durante este periodo, la célula se prepara para la duplicación del ADN. Esta unión es crucial para la entrada en G1 ya que el incremento de la actividad de Cdk4/6 inicia la hiperfosforilación de Rb, que se encuentran normalmente asociado a E2F1. Dicha hiperfosforilación conlleva la liberación del factor de transcripción E2F1 y la disociación de las histonas deacetilasas, lo que permite la síntesis de las proteínas necesarias para la duplicación del ADN, entre ellas, Ciclina E y Ciclina A. La progresión de G1 a S está regulada por la asociación de Ciclina E a Cdk2, que a su vez fosforila al Rb en sitios adicionales (Sherr y Roberts, 1999). El complejo Ciclina A/Cdk2 dirige la fase de síntesis. Durante la fase de síntesis tardía, el complejo Ciclina A/Cdk1 se encarga de activar los orígenes de replicación tardíos y, durante el final de la fase G2, este complejo inicia la condensación de los cromosomas (Gong y Ferrell, 2010; Katsuno *et al.*, 2009; Merrick y Fisher, 2012). La transición G2/M está regulada por la formación del complejo CC (Cdk1/Ciclina B) (Figura 4) (Fisher, 2012; Gopinathan *et al.*, 2011; Harashima *et al.*, 2013; Hochegger *et al.*, 2008; Malumbres y Barbacid, 2009; Merrick y Fisher, 2010; Santamaría y Ortega, 2006; Vermeulen *et al.*, 2003b; Yasutis y Kozminki, 2013).

Además de la regulación de las transiciones G1/S y G2/M por las Cdks y las Ciclinas, existe un nivel de regulación superior: los inhibidores de las Cdks (Figura 4) (Lees, 1995). Existen dos familias de CKIs (del inglés “Cyclin dependent inhibitors”): Ink4 (del inglés “Inhibitors of kinase”) y Cip/Kip (del inglés “Protein Inhibitors of Cdks/Protein Inhibitors of Kinases”). La familia Ink4 está constituida por: p16^{Ink4a}, p15^{Ink4b}, p18^{Ink4c} y p19^{Ink4d}. Estos inhibidores mantienen el estado quiescente al actuar como inhibidores alostéricos específicos de Cdk4/6, impidiendo que se asocie a la Ciclina D y regulando específicamente la transición G1/S (Cánepa *et al.*, 2007; Santamaría y Ortega, 2006). Por su parte, la familia de Cip/Kip (p21^{Cip1}, p27^{Kip1} y

p57^{Kip2}) inactiva preferentemente los complejos Cdk/Ciclina responsables de G1, pero también pueden modular la actividad de todas las quinasas dependientes de Ciclina (Figura 4) (Besson *et al.*, 2008; Sherr y Roberts, 1999).



2.2 Mecanismos de regulación de la transición G1/S

Para que se produzca la replicación del ADN, la actividad Cdk/Ciclina debe disminuir. Tal actividad disminuye cuando se produce la destrucción de las Ciclinas de G2 durante la Metafase tardía mediante el APC (del inglés “Anaphase promoting complex”), cuya actividad permanece durante la G1 temprana (Edgard y Orr-Weaver, 2001; Symeonidou *et al.*, 2012). La reducción de la actividad Cdk durante la fase G1 temprana permite la asociación de los distintos componentes que forman el preRC (del inglés “Prereplication complex”): ORC (del inglés “Origin replication complex”), Cdc6 (del inglés “Cell division cycle”) y Cdt1 (del inglés “Chromatin licensing and DNA

replication factor”), que permiten la asociación de las seis subunidades de helicasa MCM (del inglés “Minichromosomal maintenance”) a la cromatina en el origen de replicación, por tanto, permitiendo que se produzca una nueva ronda de replicación. Durante la fase de síntesis, MCM y Cdc6 se separan del ADN y su habilidad para unirse de nuevo al ADN se inhibe durante las fases S y G2 debido a los elevados niveles de actividad de Cdk1 y Cdk2. Sólo cuando su actividad disminuye después de la transición M/G1 se puede volver a iniciar la fase de síntesis (Donaldson y Blow, 1999; Symeonidou *et al.*, 2012). Existen mecanismos complementarios al descrito anteriormente para evitar que se produzca la re-replicación del ADN, como los inhibidores del ciclo celular p27^{Kip1} y p57^{Kip2}. A su vez, la proteína Geminina secuestra a Cdt1, impidiendo que se produzca la licencia de replicación. La Geminina se degrada mediante APC durante la Anafase, facilitando también la entrada en la fase de síntesis (Edgard y Orr-Weaver, 2001; Symeonidou *et al.*, 2012; Ullah *et al.*, 2009b).

2.3 Mecanismos de regulación de la transición G2/M

La transición G2/M está sometida a distintos niveles de regulación, que implican una sucesión de eventos tales como la formación del heterodímero Cdk1/Ciclina B1 (complejo CC); la fosforilación y defosforilación de las subunidades de dicho complejo; la regulación de la localización subcelular de cada proteína y sus reguladores, y la ausencia o inactivación de inhibidores de ciclo celular (Johnson y Kornbluth, 2012; Stark y Taylor, 2006). Dado que la regulación de la transición G2/M es un proceso crucial en la presente tesis, le dedicaremos una atención mayor que la prestada a la transición G1/S.

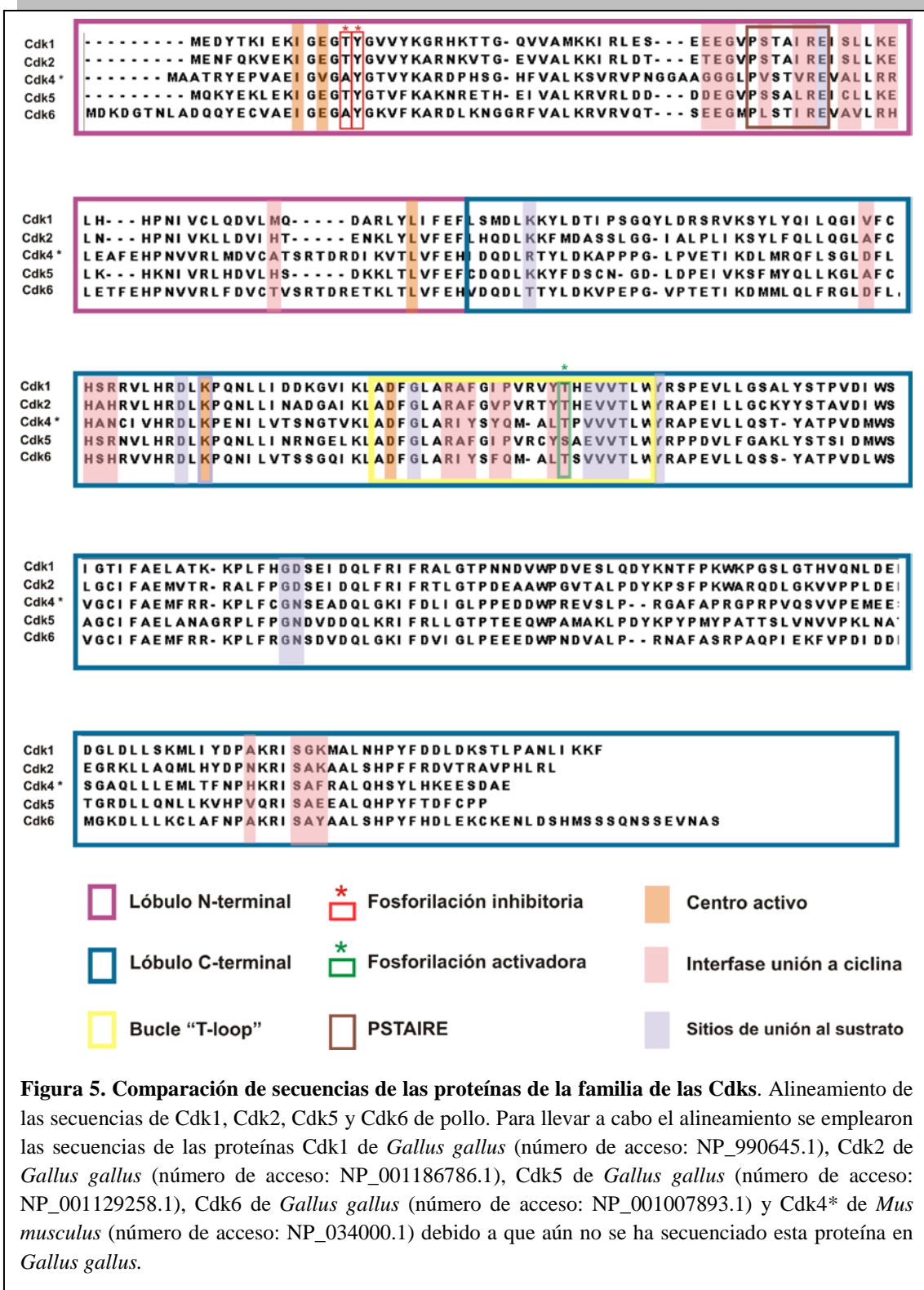
2.3.1 Estructura de Cdk1

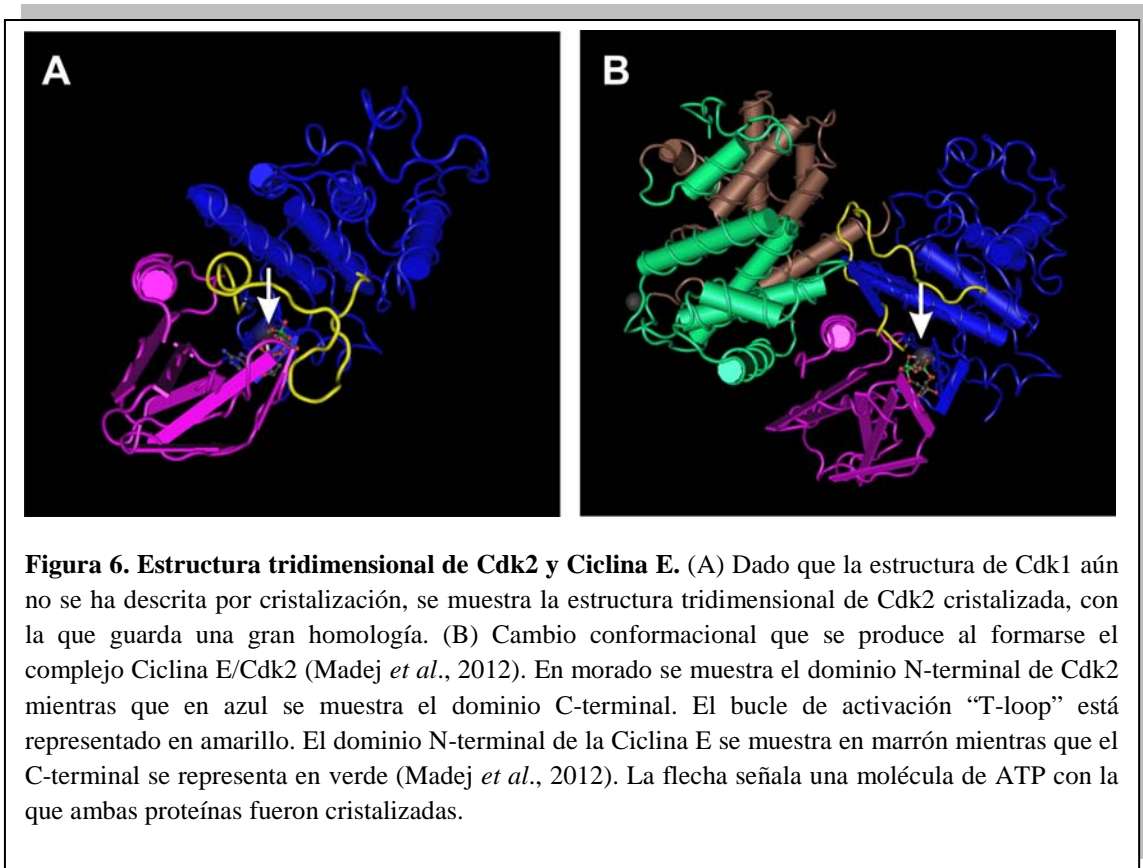
El análisis de la estructura de Cdk1 es clave para comprender los mecanismos moleculares que regulan su función. Las proteínas de la familia Cdk guardan una gran homología a nivel de estructura primaria y secundaria, como se puede ver en la Figura 5, que muestra un alineamiento de las secuencias de Cdk1, Cdk2, Cdk4, Cdk5 y Cdk6. A pesar de que la estructura de la proteína Cdk1 aún no se ha caracterizado mediante cristalización, se han llevado a cabo estudios de modelización en los que su estructura se compara con la del resto de Cdks previamente cristalizadas, demostrando que existe una gran homología a nivel de estructura secundaria (Zhang *et al.*, 2011b). El modelo de

la estructura tridimensional de Cdk1 es muy similar a la estructura de la proteína Cdk2 cristalizada (Madej *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2011b). De hecho, la proteína Cdk1 guarda un 64% de homología con Cdk2. Por ello se ha empleado la estructura de Cdk2 para mostrar la estructura tridimensional de los dominios clave de Cdk1 (Figura 6).

Las Cdks están organizadas en dos regiones: un dominio pequeño situado en la zona amino terminal (N- terminal), en el que se encuentra la región reguladora de la actividad (Figura 5, recuadro morado y Figura 6, dominio morado) y una región C-terminal, donde se localiza el centro activo de la enzima (Figura 5, recuadro azul; Figura 6, dominio azul). El sitio de unión a ATP se sitúa en el surco entre estos dos dominios, que contiene residuos catalíticos conservados en las distintas Cdks (ver flecha blanca en Figura 6). El centro activo está constituido por los aminoácidos Ile10, Glu12, Leu83, Lys130 y Asp146 (Figura 5, rectángulos naranjas) (Zhang *et al.*, 2011b). Los sitios de fosforilación inhibitoria (la Thr14 y la Tyr15) (Figura 5, recuadros y asteriscos rojos) están situados en la hélice en la que se une el ATP. La fosforilación de dichos residuos dificulta la orientación del ATP inhibiendo por tanto su activación (Krek y Nigg, 1989).

La familia CDK muestra dos características propias: i) la hélice PSTAIRE (Figura 5, recuadro marrón) situada en la región N-terminal de la proteína, que interacciona directamente con la Ciclina y provoca una reorganización de los residuos que interaccionan con el ATP y (ii) un bucle flexible (el bucle de activación o “T-loop”) (Figura 5, recuadro amarillo y Figura 6, bucle amarillo) que comienza en el lóbulo C-terminal que bloquea la entrada del sustrato al centro activo. En el bucle de activación se sitúa la Thr160, cuya fosforilación juega un papel clave en la activación de Cdk1 (Figura 5, recuadro y asterisco verdes) (Zhang *et al.*, 2011b). Cabe destacar la gran homología existente en las regiones características de la familia Cdk, como son las interfases de unión al sustrato (Figura 5, rectángulos lila) y de unión a Ciclina (Figura 5, rectángulos rosas) (De Bondt *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 2011b).





2.3.2 Formación del complejo CC

La interacción entre Cdk1 y Ciclina B se produce a través de una región de 150 aminoácidos de esta última denominada “cyclin box” (Petri *et al.*, 2007), aunque esta interacción también está regulada por otras regiones de la zona C-terminal de la Ciclina B (Kobayashi *et al.*, 1992; Lees y Harlow, 1993). Durante la fase G2, Cdk1 se encuentra en forma monomérica e hipofosforilada mientras se va acumulando la Ciclina B. Cuando ambas alcanzan la concentración adecuada tiene lugar su interacción (Kobayashi *et al.*, 1992). La interacción entre ambas proteínas causa un cambio conformacional en Cdk1 que permite la adecuada orientación de la molécula de ATP y del “T-loop” para que se aleje del sitio activo donde bloquea la unión al substrato (Figura 6), así como la exposición de la Thr160, de la Thr14 y de la Tyr15, para ser fosforiladas (De Bondt *et al.*, 1993; Draetta, 1993; Marcote *et al.*, 1993). La fosforilación de dichos residuos juega un papel clave en la regulación de la actividad de Cdk1.

2.3.3 Fosforilación activadora de Cdk1

La unión de Cdk1 a Ciclina B es un requisito necesario pero no suficiente para que se produzca la activación del complejo enzimático. Este complejo alcanza su máxima actividad cuando se produce la fosforilación de la Thr160, situada en el “T-loop”, mediante el complejo trimérico CAK (del inglés “Cdk activating kinase complex”) (Fesquet *et al.*, 1993; Fisher y Morgan, 1994; Poon *et al.*, 1993; Solomon *et al.*, 1992). La fosforilación de Cdk1 en su Thr160 estabiliza la unión a Ciclina B (Larochelle *et al.*, 2007). La Thr160 mantiene una interacción electrostática con los residuos Arg127, Tyr151, y Thr47. Cuando el complejo CAK fosforila a Cdk1 en la Thr160 se altera dicha interacción electrostática, lo que provoca un cambio conformacional que permite el correcto posicionamiento de los aminoácidos del centro activo implicados en la unión del ATP y la retirada del “T-loop” del centro activo, permitiendo así la entrada de sustratos al mismo (Figuras 5-6) (De Bondt *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 2011b).

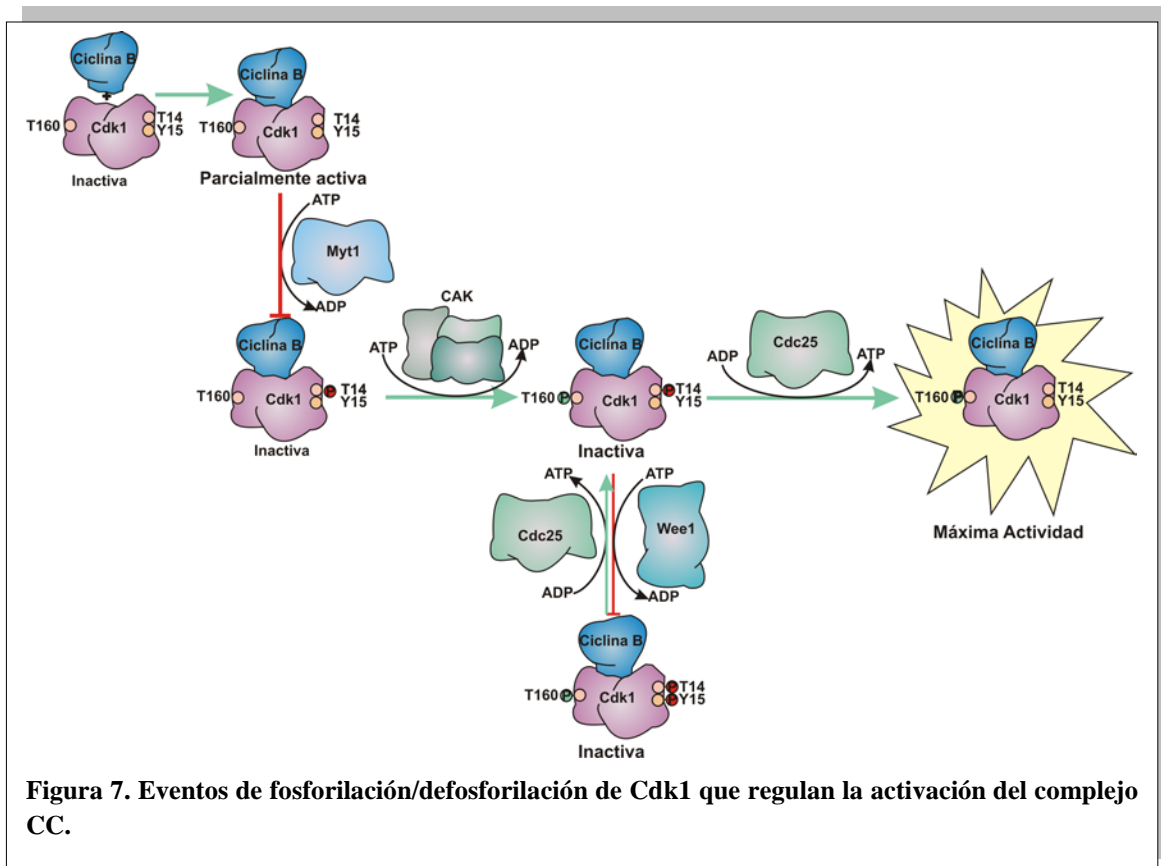


Figura 7. Eventos de fosforilación/defosforilación de Cdk1 que regulan la activación del complejo CC.

2.3.4 Fosforilaciones inhibitorias de Cdk1

La actividad de Cdk1 también está modulada mediante la fosforilación inhibitoria de los residuos Thr14 y Tyr15. Estas fosforilaciones son eventos transitorios cuya función es mantener estos complejos inactivos hasta que se complete la duplicación del ADN (Meijer *et al.*, 1991) y se supere el umbral de concentración del complejo CC necesario para que se produzca la transición G2/M (Solomon *et al.*, 1992).

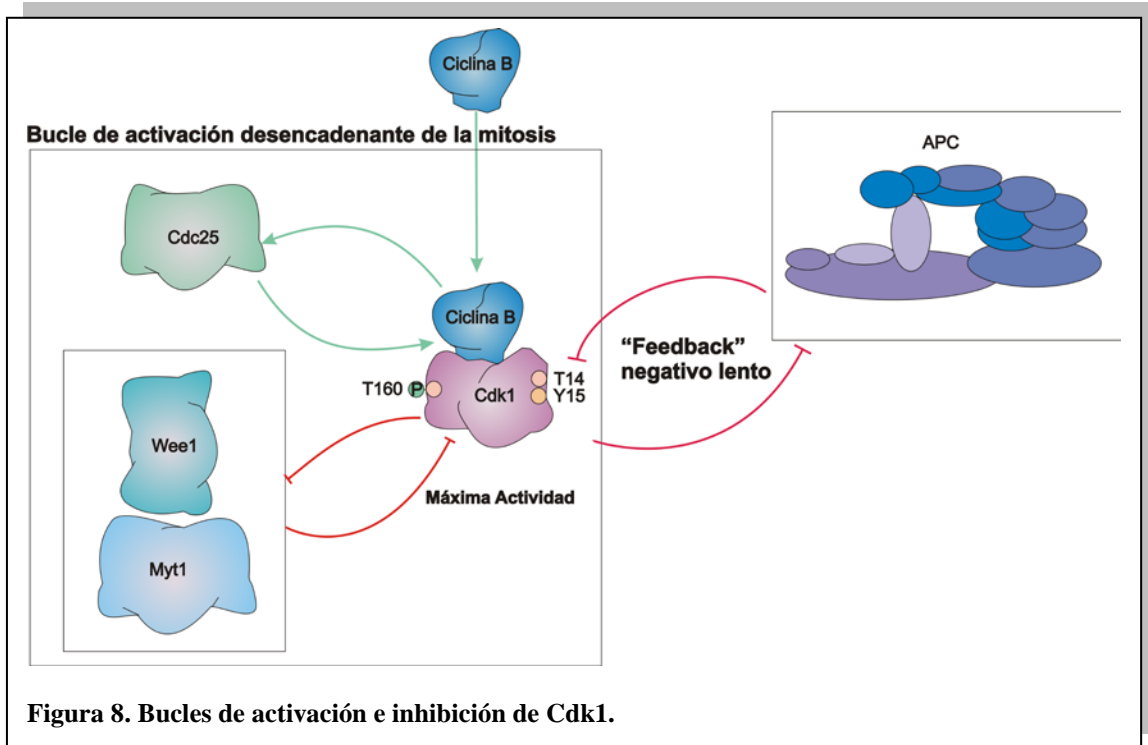


Figura 8. Bucles de activación e inhibición de Cdk1.

La fosforilación de Cdk1 en la Tyr15 está mediada por la proteína Wee1 (Gould y Nurse, 1989; Meijer *et al.*, 1991; Parker *et al.*, 1991), mientras que la fosforilación en la Thr14 está regulada por Myt1 (del inglés "Myelin transformation factor") (Liu *et al.*, 1997) (Figura 7). La activación del complejo CC se completa cuando se produce la defosforilación de la Thr14 y la Tyr15 mediante la fosfatasa Cdc25 (Boutros *et al.*, 2006; Draetta y Eckstein, 1997). El complejo CC activado puede fosforilar a su vez a Cdc25, aumentando su actividad y fosforilar e inhibir a Myt1 y Wee1 promoviendo un bucle de activación que desencadena la mitosis (Perry y Kornbluth, 2007). A su vez, el complejo CC está sometido a un "feedback" negativo lento mediante el complejo APC, que fomenta su inactivación una vez completada la mitosis (Figura 8) (Min y Lindon, 2012; Pines, 2011). También es necesario que no estén presentes o que estén inactivos

los CKIs (Lees, 1995). Finalmente, la salida de mitosis requiere la degradación proteolítica de la Ciclina B mediante ubiquitinación (Murray *et al.*, 1989; Pines, 2006; Potapova *et al.*, 2006).

2.3.5 Translocación núcleo/citoplasma del complejo CC

A diferencia de los otros complejos Cdk/Ciclina, cuya localización es constitutivamente nuclear, la localización subcelular del complejo CC es crucial para el correcto funcionamiento de la mitosis debido a que desempeña diversas funciones, tanto en el citoplasma como en el núcleo. Algunos eventos citoplasmáticos en los que participa el complejo CC son: la reestructuración del citoesqueleto (Yamashiro *et al.*, 1991), la formación del huso mitótico (Murray y Kirschner, 1989), la inhibición de la fusión de los endosomas (Thomas *et al.*, 1992; Tuomikoski *et al.*, 1989), la nucleación de los centrosomas (Verde *et al.*, 1992) y la activación del proteasoma para la degradación de las Ciclinas en Metafase (Luca *et al.*, 1991). En el núcleo, el complejo CC está involucrado en procesos tales como la ruptura de la envoltura nuclear (Peter *et al.*, 1990) y la condensación de los cromosomas (Santos *et al.*, 2012b; Ubersax *et al.*, 2003).

La coordinación de estos procesos se consigue mediante la regulación de la localización del complejo CC entre el núcleo y el citoplasma. Durante G2, el complejo CC se localiza preferentemente en el citoplasma debido a la unión de la Ciclina B con la exportina CRM1 (del inglés “Chromosomal region maintenance protein”) a través de su señal de retención citoplásmica (Pines y Hunter, 1994), lo que contrarresta su localización constitutiva en el núcleo mediada por la importina β (Hagting *et al.*, 1998; Moore *et al.*, 1999; Takizawa *et al.*, 1999; Toyoshima *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998). La activación del complejo CC ocurre en primer lugar en el citoplasma (Heald *et al.*, 1993), concretamente en los centrosomas (Jackman *et al.*, 2003). En la profase tardía se produce la translocación rápida del complejo CC al núcleo. Tanto la translocación al núcleo del complejo CC, como el aumento de sus niveles de forma sigmoidea precipitan la entrada en mitosis (Borgne *et al.*, 1999; De Souza *et al.*, 2000; Gallant y Nigg, 1992; Gavet y Pines, 2010; Pines y Hunter, 1991; Toyoshima-Morimoto *et al.*, 2001). La acumulación de dicho complejo en el núcleo se consigue mediante la fosforilación del sitio de unión a CRM1 de Ciclina B mediante Cdk1 o la PLK1 (del inglés “Polo like

kinase-1”), impidiendo que se produzca su unión a dicha exportina y, por tanto, su salida al citoplasma (Toyoshima-Morimoto *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 1998).

A su vez, las proteínas reguladoras del complejo CC se encuentran distribuidas en los distintos compartimentos subcelulares, lo que contribuye a la regulación estricta de la transición G2/M: Wee1 se localiza tanto en el núcleo (Gould y Nurse, 1989; Meijer *et al.*, 1991; Parker *et al.*, 1991) como en el citoplasma (Baldin y Ducommun, 1995), mientras que Myt1 se localiza preferentemente en el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi (Liu *et al.*, 1997). A su vez, existen tres variantes de Cdc25 en mamíferos cuya localización subcelular varía: Cdc25A, que se transloca continuamente del citoplasma al núcleo; Cdc25B, localizada en el citoplasma y encargada de activar a Cdk1 antes de que se inactive el sistema de exportación nuclear y Cdc25C, que se expresa en el núcleo (Boutros *et al.*, 2006; Draetta y Eckstein, 1997). La coordinación de los distintos eventos de fosforilación/defosforilación que regulan la actividad del complejo CC, con su correcta localización subcelular garantiza el funcionamiento adecuado del ciclo celular.

3. Variaciones del ciclo celular y poliploidía

La ploidía se define como el número de series completas de cromosomas que una célula posee. Gran parte de las células somáticas que componen el cuerpo de un individuo son diploides, mientras que las células de la línea germinal son haploides. La ploidía se expresa mediante el valor N, que se define como el número de cromosomas de una célula haploide. La cantidad de ADN de una célula se expresa empleando el valor C, que se define como el contenido en valor absoluto de ADN de un gameto haploide. Por lo tanto, durante el ciclo celular canónico, el contenido de ADN en G1 es de 2C, mientras que en G2 es de 4C en tanto que el valor de ploidía permanece siempre como 2N (Figura 9). Aunque durante el ciclo celular canónico una célula se divide en dos células hijas con idéntico contenido de ADN, existen variaciones del ciclo celular que pueden dar lugar a células poliploides, es decir, células cuyo contenido de ADN es superior a 2C (Edgar y Orr-Weaver, 2001; Nordman y Orr-Weaver, 2012; Ullah *et al.*, 2009b).

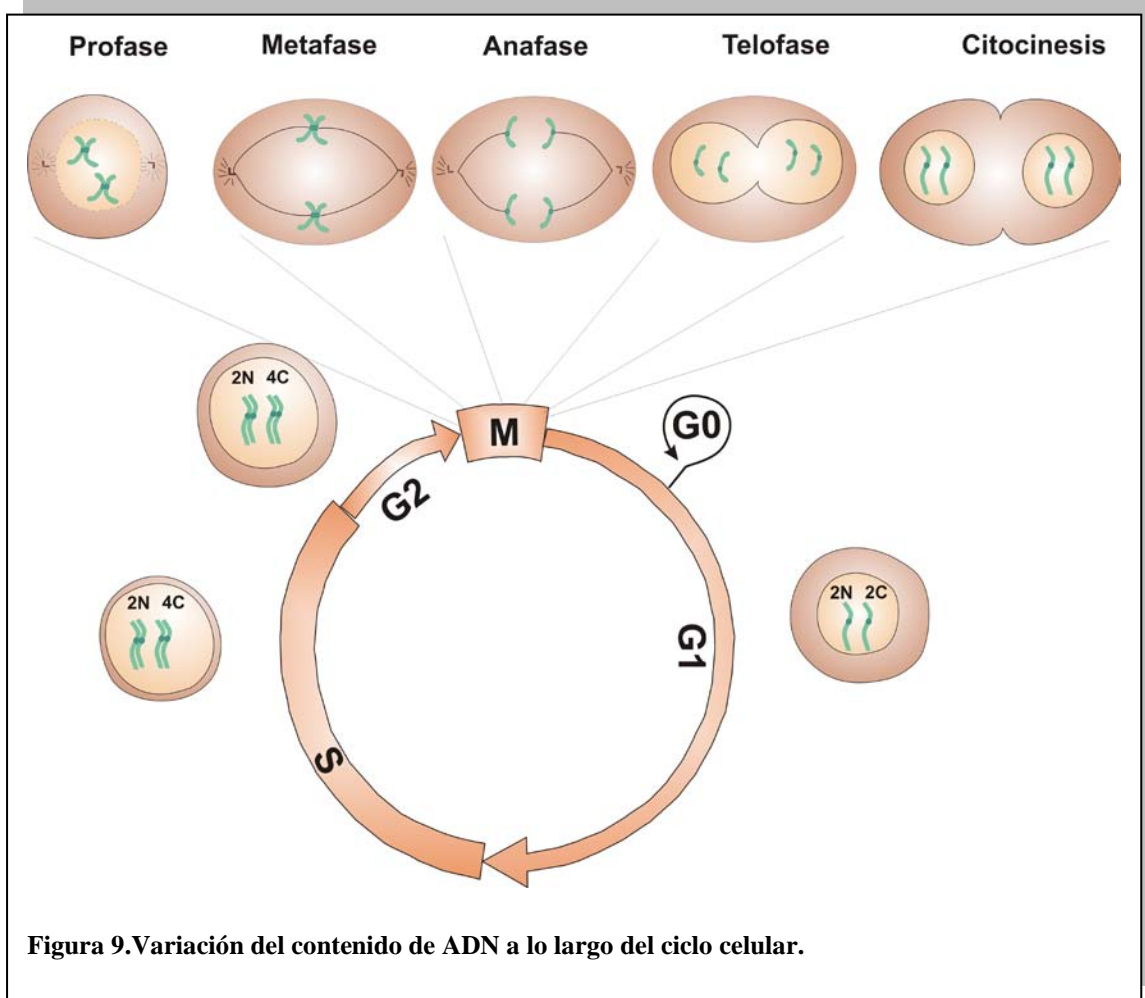


Figura 9. Variación del contenido de ADN a lo largo del ciclo celular.

A pesar de que la poliploidía se ha asociado tradicionalmente con condiciones aberrantes o patológicas, está ampliamente extendida en todo el reino animal y vegetal. Este fenómeno puede afectar a una subpoblación celular o un tejido concreto (poliploidía somática). Cuando afecta a todas las células de un individuo y se transmite de generación en generación se denomina poliploidía germinal (Edgar y Orr-Weaver, 2001; Fox y Duronio, 2013; Nordman y Orr-Weaver, 2012; Ullah *et al.*, 2009a; 2009b). En todos los casos la poliploidía se asocia con un aumento del tamaño celular (Edgar y Orr-Weaver, 2001; Saucedo y Edgar, 2002; Sugimoto-Shirasu y Roberts, 2003; Ullah *et al.*, 2009b).

3.1 Poliploidía germinal

La poliploidía germinal se genera cuando se producen meiosis catastrófica, originando gametos con más de un set de cromosomas (Comai, 2005). Es una estrategia ampliamente utilizada por las plantas, fundamentalmente las Angiospermas, para aumentar su tamaño (Madlung y Wendel, 2013; Sugimoto-Shirasu y Roberts, 2003). De

hecho, la selección de especies poliploides se ha empleado frecuentemente en agronomía para mejorar la producción y la resistencia de especies comestibles como la avena, el tomate y el maíz (Benzion *et al.*, 1987; Evans, 1987).

Asimismo, se han descrito numerosos ejemplos de especies animales que pueden presentar poliploidía germinal como algunos protozoos (*Tetrahymena*) (Li *et al.*, 2006); una amplia variedad de peces (Leggatt e Iwama, 2003) y diversos anfibios, como *Salamandra salamandra* y *Xenopus laevis* (Szaro y Tompkins, 1987; Vernon y Butsch, 1957). Al igual que en agronomía, también se han descrito diversos métodos para generar poliploidía germinal (Bungenberg de Jong, 1957), que se han empleado en los peces con el objetivo de mejorar su producción para el consumo humano (Leggatt e Iwama, 2003).

Se pensaba que la poliploidía germinal era un hecho poco probable en mamíferos, ya que dificultaría el mecanismo de compensación que inactiva uno de los cromosomas X en las hembras y cualquier descompensación en el número de cromosomas podría ocasionar defectos en el desarrollo (Goto y Monk 1998). Los numerosos estudios destinados a generar embriones tetraploides de ratón han dado como resultado blastocistos quiméricos diploides/tetraploides de los cuales sólo son viables el 6% (Kawaguchi *et al.*, 2009; Snow, 1975; 1976). Sin embargo, se han descrito dos especies de rata que presentan tetraploidía germinal de forma natural: *Tympanoctomys barrerae* y *Pipanacoctomys aureus* (Gallardo *et al.*, 1999).

Tal como hemos visto, la poliploidía no tiene por qué ser deletérea para los organismos. De hecho, se ha planteado que la poliploidía germinal puede tratarse de una estrategia de evolución de las especies debido a que genera un aumento de la plasticidad y de la diversidad génica que favorecerían el potencial adaptativo de los individuos poliploides y una mayor resistencia a mutaciones que pueden originar tumores (Comai, 2005; Otto, 2007; Pennisi, 2001).

3.2 Poliploidía somática

La poliploidía somática puede afectar a una subpoblación celular concreta o a determinados tejidos como ocurre en gasterópodos (*Aplysia californica*) (Lasek y Dower, 1971), nematodos (Flemming *et al.*, 2000) y artrópodos (*Drosophila melanogaster*) (Urata *et al.*, 1995). En los mamíferos existen determinados tejidos con

elevada proporción de células poliploides como los trofoblastos gigantes de la placenta (Edgard y Orr-Weaver, 2001; Ullah *et al.*, 2008; 2009b); los hepatocitos (Duncan, 2013; Gentric *et al.*, 2012; Gupta, 2000); los cardiomiocitos (Engel *et al.*, 2006), los megacariocitos (Vitrat *et al.*, 1998), los queratinocitos (Zanet *et al.*, 2010) y las células del músculo liso vascular (Nagata *et al.*, 2005). Se han descrito casos en los que puede inducirse la poliploidía en respuesta al ambiente, como sucede en el gasterópodo *Limax valentianis*, cuyas neuronas endorreduplican en presencia de nutrientes (Yamagishi *et al.*, 2011).

Las ventajas de la poliploidía somática son: una mejor respuesta al estrés metabólico, una mayor resistencia a las mutaciones deletéreas que pueden dar lugar al cáncer y una menor sensibilidad a los estímulos apoptóticos (Biesterfeld *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2012; Edgar y Orr-Weaver, 2001; Ullah *et al.*, 2009a; 2009b).

3.3 Mecanismos de generación de poliploidía somática

La poliploidía somática se origina a través de diferentes mecanismos ampliamente regulados que se describen a continuación (Figura 10).

3.3.1 Fusión celular

La fusión celular es un proceso por el cual se fusionan las membranas celulares dando lugar a células multinucleadas (Plasmodios). A diferencia del resto de los mecanismos para generar poliploidía que se van a describir en este epígrafe, es independiente del ciclo celular. Este proceso tiene lugar en el desarrollo de los mioblastos y es necesario para la formación de fibras musculares en el proceso de regeneración muscular (Dimchev *et al.*, 2013; Schiel *et al.*, 2011; Vaz *et al.*, 2012). También tiene lugar en osteoclastos (Vignery, 2000) (Figura 10).

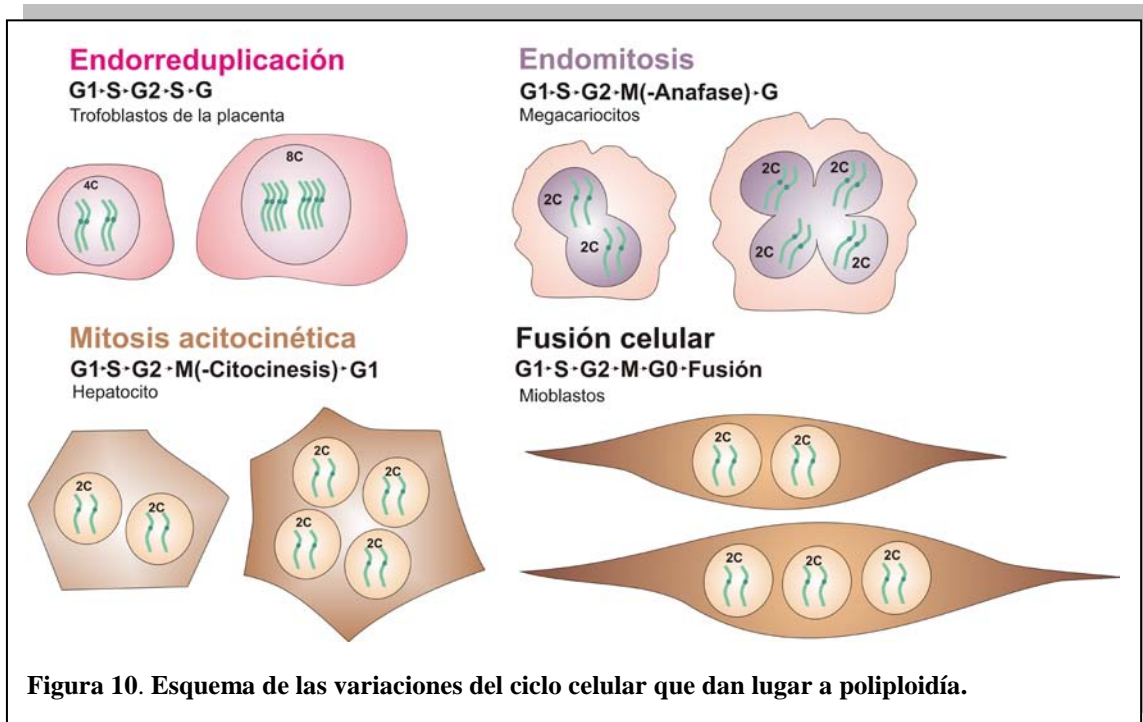


Figura 10. Esquema de las variaciones del ciclo celular que dan lugar a poliploidía.

3.3.2 Mitosis acitocinética

La mitosis acitocinética consiste en la repetición de fases de síntesis y mitosis en ausencia de citocinesis, dando lugar a células multinucleadas (Sincitios). Un ejemplo claro de este fenómeno son los hepatocitos, que se vuelven poliploides como mecanismo de defensa a la toxicidad. En humanos, el 50% de los hepatocitos son poliploides (Duncan, 2013; Gentric *et al.*, 2012; Gupta, 2000). La mitosis acitocinética también tiene lugar en los cardiomiocitos (Engel *et al.*, 2006) (Figura 10).

3.3.3 Endomitosis

La definición original de endomitosis consiste en la reactivación del ciclo celular y su bloqueo antes de completar la mitosis, dando lugar a núcleos multilobulados. Existen distintas variantes de este fenómeno: la endomitosis “clásica”, en la que se produce el bloqueo en profase; la endomitosis-A, en la cual se produce la anafase y la C-mitosis en la cual se produce el bloqueo en Metafase, una vez condensados los cromosomas (Nagata *et al.*, 2005; Ullah *et al.*, 2009a). Este fenómeno es aprovechado por los megacariocitos, que necesitan un soma mayor para dar lugar a un gran número de plaquetas (Vitrat *et al.*, 1998). Las rondas de endomitosis dan lugar a núcleos multilobulados con un contenido total de ADN de 32C pero donde cada lóbulo tiene un

genoma diploide (Ullah *et al.*, 2009b). Este fenómeno también ocurre durante el desarrollo de las células del músculo liso vascular (Nagata *et al.*, 2005) (Figura 10).

3.3.4 Endorreduplicación

La endorreduplicación o endorreplicación consiste en la realización de rondas sucesivas de síntesis de ADN y fases G en ausencia de mitosis, lo que se traduce en el aumento de la cantidad de ADN, originándose células con núcleos gigantes (Edgar y Orr-Weaver, 2001; Nordman y Orr-Weaver, 2012; Ullah *et al.*, 2009a; 2009b). El tamaño de una célula suele ser proporcional al contenido de ADN nuclear, por lo que la endoreduplicación es una estrategia ampliamente empleada en células que requieren un mayor tamaño o una mayor actividad metabólica (Edgard y Orr-Weaver, 2001; Sugimoto-Shirasu y Roberts, 2003). Este mecanismo tiene lugar en los trofoblastos gigantes de la placenta (Ullah *et al.*, 2008) (Figura 10).

3.3.4.1 Mecanismos de endoreduplicación

El mecanismo de re-replicación asociado a la endorreduplicación no se conoce con exactitud. Sin embargo, se sabe que depende de la disminución de los niveles o actividad de Cdk/Ciclina después de completarse cada fase de síntesis, de las oscilaciones de los niveles de Ciclina E y Geminina, y de la localización de los complejos MCM (Edgar y Orr-Weaver, 2001; Fox y Duronio, 2013; Normand y Orr-Weaver, 2012; Ullah *et al.*, 2009). La existencia de fases G de los endociclos sugiere que la actividad Cdk debe bloquearse para que se produzca la unión del complejo preRC, al igual que sucede en el ciclo celular canónico (Edgard y Orr-Weaver, 2001; Fox y Duronio, 2013). Por ejemplo, si se inhibe la Cdk1 en las células madre de los trofoblastos de placenta mediante el inhibidor de Cdk1 RO3306, se induce la endorreduplicación de los mismos y la expresión de genes de trofoblastos gigantes de placenta ya que están programadas genéticamente para endorreduplicar. Si se bloquea la actividad Cdk1 en células madre derivadas de la masa celular interna de la placenta también se produce una endorreduplicación ectópica que desencadena la apoptosis de dichas células (Ullah *et al.*, 2008; 2009a).

3.4 Poliploidía somática en neuronas

La existencia de poliploidía somática en neuronas funcionales de vertebrados inferiores es un fenómeno ampliamente extendido, como es el caso de las neuronas tetraploides de la especie *Xenopus laevis* (Szaro y Tompkins, 1987). Cabe destacar que las neuronas gigantes del gasterópodo *Aplysia californica* pueden alcanzar una cantidad de ADN comprendida entre 20.000 a 200.000C (Lasek y Dower, 1971). Innumerables registros electrofisiológicos han demostrado que dichas neuronas son plenamente funcionales (Smith *et al.*, 1982).

A pesar de que la existencia de neuronas poliploides en vertebrados inferiores es un fenómeno conocido y aceptado, la poliploidía somática en neuronas de mamíferos siempre ha sido motivo de controversia. La visión clásica de la neurociencia indicaba que las neuronas eran células postmitóticas, con un contenido de ADN de 2C en su núcleo (Swift, 1953). Sin embargo, en 1968 Lowell W. Lapham sugirió que la mayoría de las células de Purkinje son tetraploides, desafiando esta visión (Lapham, 1968). A partir de este artículo surgió un debate sobre la existencia de neuronas con contenido doble de ADN en el sistema nervioso (Herman y Lapham 1968; 1969; Museridze *et al.*, 1975). Debido a la ausencia de un método fiable para la cuantificación del ADN en esa época, se consideró imposible llegar a una conclusión sobre el tema (Swartz y Bhatnagar, 1981).

El desarrollo de nuevas técnicas de análisis del contenido de ADN nuclear, tales como FISH (del inglés “Fluorescence in situ hybridization”), citometría de flujo, citometría estática y PCR (del inglés “Polymerase chain reaction”) cuantitativa han permitido confirmar la existencia de neuronas tetraploides en distintas regiones del sistema nervioso central (López-Sánchez *et al.*, 2011; López-Sánchez y Frade, 2013). Se conoce que la reactivación del ciclo celular en neuronas diferenciadas puede ocasionar la muerte directa por apoptosis (Vermeulen *et al.*, 2003a), pero se ha demostrado que, en algunos casos, este proceso se regula de forma que pueden sobrevivir como neuronas tetraploides (Morillo *et al.*, 2010) y llegar a la fase adulta (López-Sánchez y Frade, 2013). Se ha descrito que el 10% de las neuronas corticales tienen una cantidad de ADN superior a 2C en humanos de las cuales un 2% son tetraploides (Mosch *et al.*, 2007). En el ratón, se ha demostrado la existencia de

neuronas tetraploides en la retina (Morillo *et al.*, 2010) y en el córtex (López-Sánchez y Frade, 2013). Asimismo, en el pollo se ha confirmado la existencia de neuronas tetraploides a lo largo sistema nervioso: en la retina (Morillo *et al.*, 2010), en el techo óptico, en los ganglios de la raíz dorsal, en el cerebelo, en el telencéfalo y en la médula espinal (López-Sánchez *et al.*, 2011). Recientemente se ha demostrado que las neuronas tetraploides del ratón expresan genes de respuesta al ambiente como Egr-1 (del inglés “Early growth response”) y fos (del inglés “FBJ murine Osteosarcoma oncogene”), lo que indica que son funcionalmente activas (López-Sánchez y Frade, 2013). En conclusión, la tetraploidía somática neuronal es un proceso regulado que se origina en el desarrollo y que se mantiene a lo largo de la vida adulta en distintas regiones del sistema nervioso central (López-Sánchez *et al.*, 2011; López Sánchez y Frade, 2013; Morillo *et al.*, 2010).

La tetraploidía somática en el sistema nervioso está asociada a neuronas de proyección de largo alcance (López-Sánchez *et al.*, 2011; López-Sánchez y Frade, 2013; Morillo *et al.*, 2010). De este modo, se ha demostrado que un elevado porcentaje de las neuronas tetraploides somáticas (60-85%) del córtex cerebral expresan CTIP2 (del inglés “CtBP-interacting protein”) (López-Sánchez y Frade, 2013), un factor de transcripción específico para las neuronas de proyección de largo alcance (Arlotta *et al.*, 2005). Por su parte, las CGRs tetraploides de retina innervan la lámina F del córtex del techo óptico (Morillo *et al.*, 2010), una capa profunda de dicho tejido. Además, se ha demostrado que las neuronas tetraploides tienen árboles dendríticos y somas de mayor tamaño (Morillo *et al.*, 2010) lo que sugiere que la tetraploidía somática podría participar en un programa de desarrollo para generar diversidad morfológica y funcional en neuronas de proyección del sistema nervioso (Morillo *et al.*, 2010). Por otra parte, el tamaño de las neuronas tetraploides es superior al de las células diploides (Morillo *et al.*, 2010), por lo que otra posibilidad es que las neuronas se hagan tetraploides con el objetivo de alcanzar el tamaño necesario para realizar una función concreta, al igual que ocurre en otros tipos celulares (Edgar y Orr-Weaver 2001; Ullah *et al.*, 2009; Umen, 2005).

En el caso concreto de la retina, se sabe que las células de mayor tamaño participan en el reconocimiento del movimiento y las pequeñas son responsables de la agudeza visual. Las neuronas tetraploides, al tener somas y árboles dendríticos mayores

(Morillo *et al.*, 2010), se asemejan a las células parasol en el primate (Jacoby *et al.*, 1996) y a las células α -Y del gato (Crook *et al.*, 2008) que se caracterizan por procesar el movimiento y por su patrón de distribución específico. Por tanto, el control de la proporción de células grandes y pequeñas en la retina podría ser necesario para el correcto funcionamiento de la misma. En la zona central de la retina el un índice de apoptosis es mayor (Frade *et al.*, 1997), lo que se puede asociar a la eliminación de neuronas tetraploides (Morillo *et al.*, 2010). Esto sugiere que la apoptosis temprana de la retina podría servir para disminuir el porcentaje de células tetraploides en la retina central.

4. Generación del sistema nervioso de los vertebrados

El sistema nervioso de los vertebrados surge a partir del plegamiento de la placa neural cuyos bordes aumentan su tamaño y ascienden dando lugar a los pliegues neurales entre los que genera el surco neural (Figuras 11A-B). Los pliegues neurales se fusionan originando el tubo neural (Figuras 11C-D). Esta estructura es la precursora del cerebro, la médula espinal y los derivados de la cresta neural (Gilbert, 2005; Latasa *et al.*, 2009). La región anterior del tubo se dilata para generar tres regiones diferenciadas: prosencéfalo o cerebro anterior, mesencéfalo o cerebro medio y rombencéfalo o cerebro posterior. El prosencéfalo se divide en telencéfalo y diencéfalo; el mesencéfalo no sufre ninguna división posterior y el rombencéfalo da lugar al metencéfalo y mielencéfalo (Gilbert, 2005).

4.1 Desarrollo del ojo y la retina de los vertebrados

El ojo de los vertebrados se origina por la evaginación de las paredes laterales del prosencéfalo secundario (Rubenstein *et al.*, 1998) que dan lugar a las vesículas ópticas (Figura 11F). El contacto entre la vesícula óptica en expansión y la superficie del ectodermo en la región de la placoda de la lente promueve inducciones cruzadas entre ambos tejidos. La vesícula óptica se invagina para formar la copa óptica, que a su vez contacta con el ectodermo (la placoda de la lente). La copa óptica contiene dos capas del neuroepitelio: la capa exterior dará lugar al epitelio pigmentario y la capa interior, a la retina neural (Figuras 11F-G). Por su parte, la lente se separa del ectodermo que, a su vez, dará lugar a la córnea (Figura 11G). La retina neural está formada

inicialmente por células neuroepiteliales con una elevada capacidad proliferativa cuya división asincrónica genera un neuroepitelio pseudoestratificado (Figura 12) (Frade *et al.*, 1999; Gilbert, 2005; Lamb *et al.*, 2007).

Una característica de los precursores en este epitelio es que están sometidos al INM (del inglés “Interkinetic nuclear movement”) (Baye y Link, 2008; Frade, 2002; Sauer, 1935). Este fenómeno se basa en que los precursores, unidos a la membrana basal y entre sí en la zona apical del neuroepitelio mediante uniones estrechas, modifican la posición de sus núcleos adoptando a lo largo del eje apico-basal en función de la fase del ciclo en la que se encuentren. De esta forma, el núcleo se encuentra en fase G1 cuando descienden desde la zona apical y lleva a cabo la fase de síntesis en la

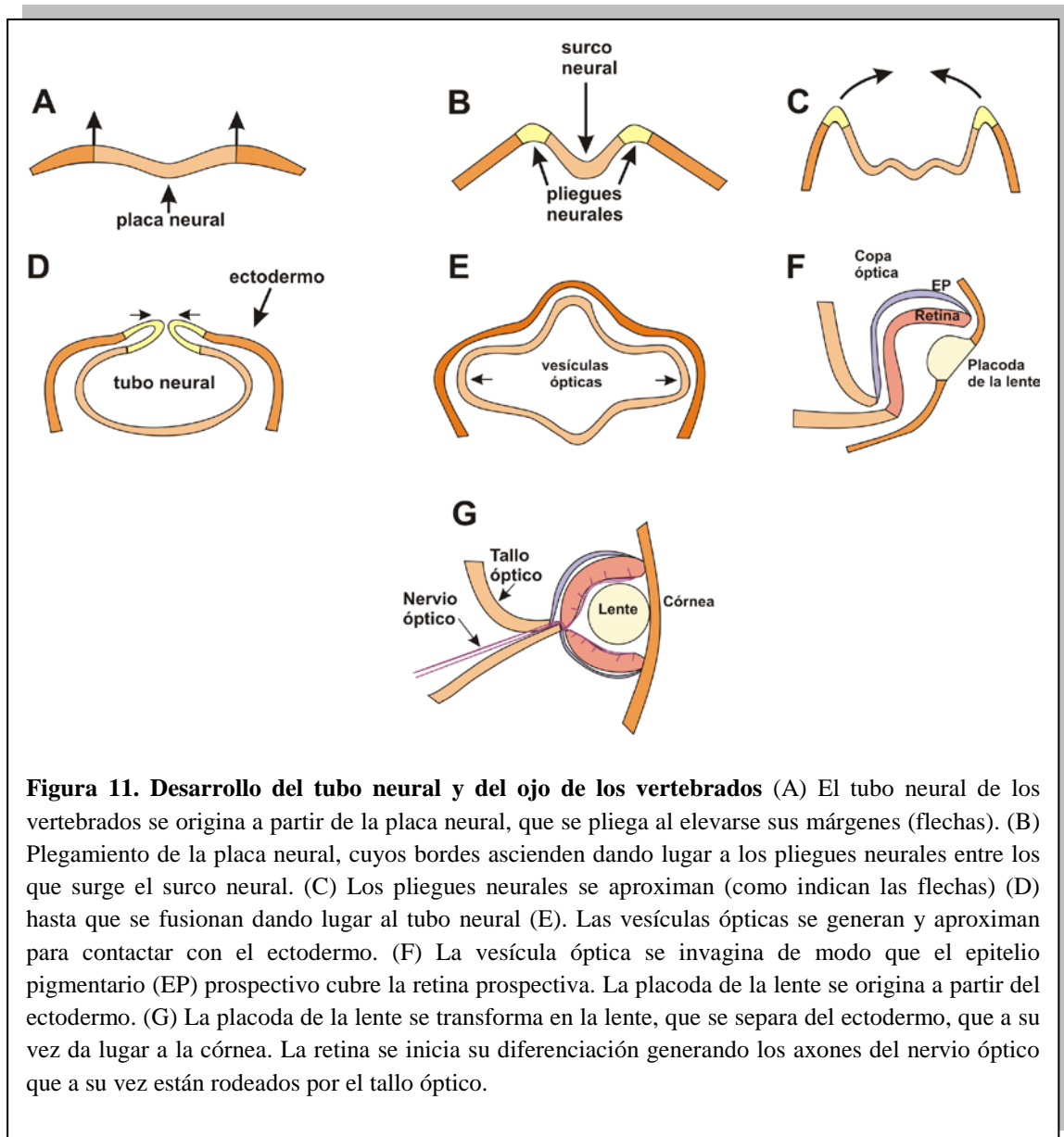


Figura 11. Desarrollo del tubo neural y del ojo de los vertebrados (A) El tubo neural de los vertebrados se origina a partir de la placa neural, que se pliega al elevarse sus márgenes (flechas). (B) Plegamiento de la placa neural, cuyos bordes ascienden dando lugar a los pliegues neurales entre los que surge el surco neural. (C) Los pliegues neurales se aproximan (como indican las flechas) (D) hasta que se fusionan dando lugar al tubo neural (E). Las vesículas ópticas se generan y aproximan para contactar con el ectodermo. (F) La vesícula óptica se invagina de modo que el epitelio pigmentario (EP) prospectivo cubre la retina prospectiva. La placoda de la lente se origina a partir del ectodermo. (G) La placoda de la lente se transforma en la lente, que se separa del ectodermo, que a su vez da lugar a la córnea. La retina se inicia su diferenciación generando los axones del nervio óptico que a su vez están rodeados por el tallo óptico.

región basal. A medida que asciende de nuevo a la zona apical, entra en fase G2 y lleva a cabo la mitosis en la zona apical (Baye y Link, 2008; Frade, 2002; Sauer, 1935). Una vez allí, la célula puede diferenciarse como neurona, empezando a expresar genes proneurales (Latasa *et al.*, 2009), o continuar en ciclo (Götz y Huttner, 2005; Murciano *et al.*, 2002) (Figura 12).

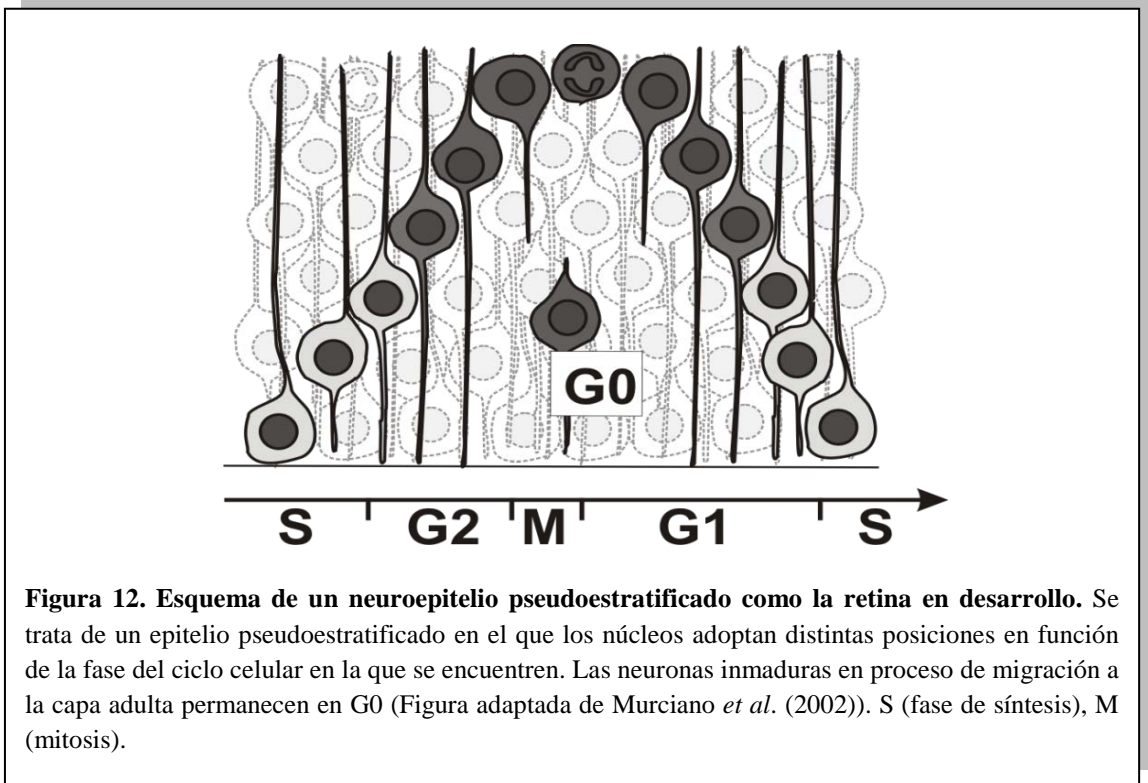


Figura 12. Esquema de un neuroepitelio pseudoestratificado como la retina en desarrollo. Se trata de un epitelio pseudoestratificado en el que los núcleos adoptan distintas posiciones en función de la fase del ciclo celular en la que se encuentren. Las neuronas inmaduras en proceso de migración a la capa adulta permanecen en G0 (Figura adaptada de Murciano *et al.* (2002)). S (fase de síntesis), M (mitosis).

4.2 La retina como sistema modelo para análisis de procesos de desarrollo

La retina adulta está organizada en tres capas nucleares: la ONL (del inglés “Outer nuclear layer”), constituida por los cuerpos celulares de los conos y los bastones; la INL (del inglés “Inner nuclear layer”), por los cuerpos celulares de las células horizontales, bipolares, amacrinas y la glía de Müller, y la CCG. Además, contiene dos capas plexiformes: la capa plexiforme externa, que contiene fibras procedentes de los conos y bastones y de las células bipolares, así como de las fibras de las células horizontales, y la capa plexiforme interna, que contiene las conexiones establecidas entre las células bipolares y las CGRs así como fibras procedentes de las células amacrinas (Dyer y Cepko, 2001b) (Figura 13). Además, la retina está rodeada por el epitelio pigmentario, una capa de células hexagonales que envuelve la retina. En la

retina de pollo, la salida de ciclo de los precursores ocurre a partir de E2 (estadio de desarrollo) en el área dorso-temporal de la retina próxima al nervio óptico y se extiende progresivamente hasta la periferia, finalizando en E12 (Prada *et al.*, 1991). La salida del ciclo de los precursores y su diferenciación a los distintos tipos celulares tiene lugar de forma gradual en un orden establecido en la retina de los vertebrados. Las primeras células en diferenciarse son las CGRs y los conos, seguidas de las amacrinas y las células horizontales, los bastones, las células bipolares y, por último, la glía de Müller (Dyer y Cepko, 2001b; Prada *et al.*, 1991). El orden en el que los precursores salen del ciclo se mantiene a lo largo de todas las áreas de la retina (Prada *et al.*, 1991).

La retina de pollo es un modelo ideal para el análisis del desarrollo del sistema nervioso debido a su rápido desarrollo y al elevado número de células que lo componen, lo que permite llevar a cabo experimentos en cultivos primarios sin recurrir a líneas celulares, algo que sería inviable en el caso del ratón ya que el número de células de su retina es muy inferior. Además, la retina del pollo es un tejido que carece de vasos sanguíneos por lo que los cultivos de retina carecen de contaminación de tejidos no neurales. Por último, la retina está aislada del resto del sistema nervioso, lo que facilita su disección (Prada *et al.*, 1991).

Como sistema *in vitro* hemos empleado cultivos de retina de pollo E6 en condiciones neurogénicas dando lugar NRPDs (Neuronas de retina de pollo en proceso de diferenciación) (Frade *et al.*, 1996a; 1996b; Frade, 2000; Morillo *et al.*, 2010; 2012). Dichas células pueden reproducir las condiciones de diferenciación de las CGRs *in vivo*. De hecho, durante su diferenciación *in vitro*, estas células expresan marcadores de CGRs y E2F1, mientras que sólo una subpoblación expresa Rb, tal como ocurre *in vivo*. (Frade, 2000; Morillo *et al.*, 2010; 2012). Además, las NRPDs pueden reactivar el ciclo celular en presencia de NGF vía p75^{NTR} (Frade, 2000; Morillo *et al.*, 2010) induciendo mitosis seguida de apoptosis, que puede ser bloqueada por BDNF (Frade, 2000).

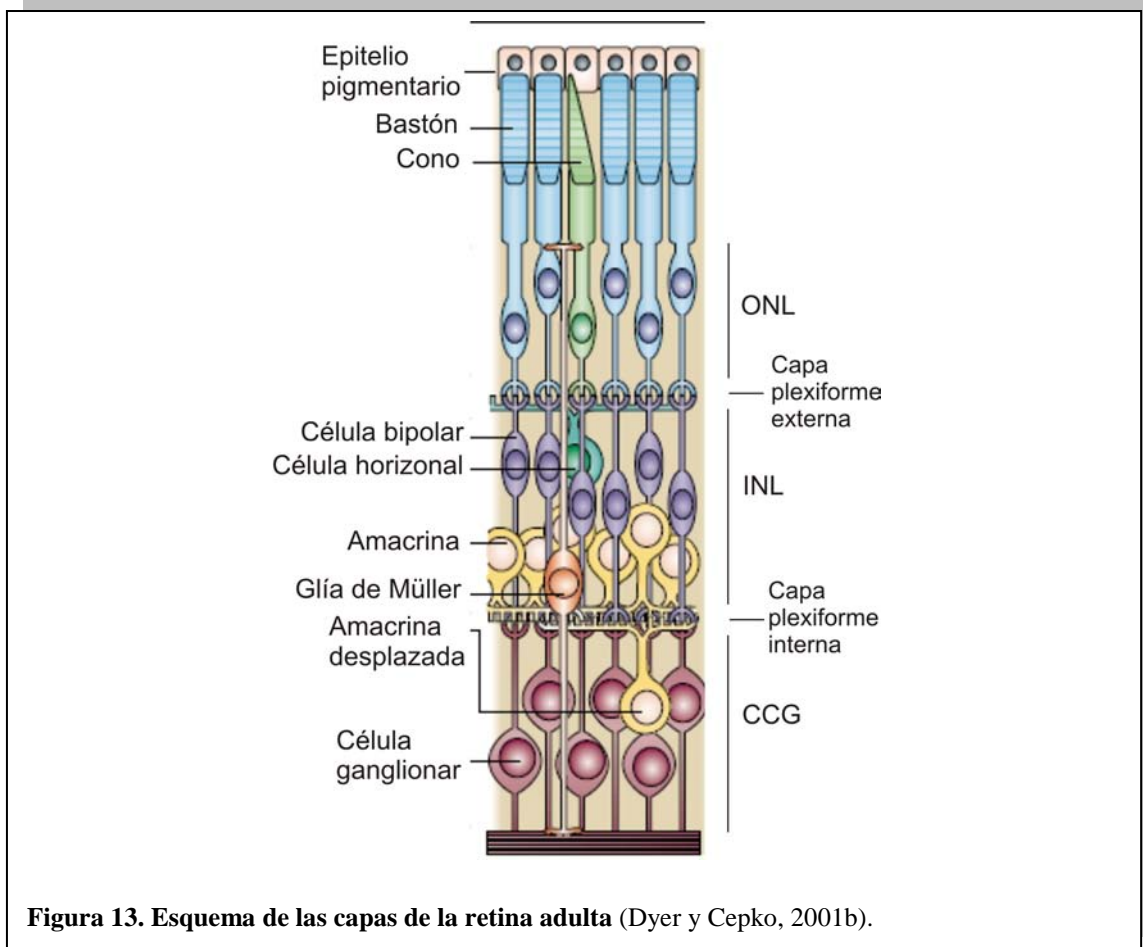


Figura 13. Esquema de las capas de la retina adulta (Dyer y Cepko, 2001b).

4.3 Participación de las neurotrofinas en el desarrollo de la retina

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso natural, que ocurre de manera controlada y que cumple funciones cruciales para el desarrollo embrionario, como la remodelación tisular o la eliminación de poblaciones transitorias en el embrión. En el desarrollo de la retina se pueden diferenciar tres etapas en las que ocurre este proceso. La muerte celular temprana tiene lugar durante los HH 16-18 (Estadio de Hamburger-Hamilton) (E2.5-4.5) y su función probable es generar espacio para alojar a los axones de las CGRs cuando acaben de diferenciarse (Frade *et al.*, 1999). La segunda etapa tiene lugar durante E5-7, que coincide con la diferenciación de las CGRs, controlando el número de dichas neuronas. La muerte de las CGRs indiferenciadas está inducida por la unión de NGF a $p75^{\text{NTR}}$, ocurre fundamentalmente en la zona central de la retina y se puede rescatar en presencia de BDNF (Frade *et al.*, 1996c; 1997). BDNF también es capaz de inhibir la apoptosis promovida por NGF *in vitro* (Frade, 2000). La

tercera etapa de muerte sucede durante E12-16, obteniendo su valor máximo en E14, en el que mueren el 20% de las CGRs. Esta fase representa la muerte asociada con la invasión del tejido diana en ausencia dependiente de soporte trófico (Frade *et al.*, 1999; Hughes y McLoon, 1979; Rager y Rager, 1978; Rodríguez-Tebar *et al.*, 1989).

Las neurotrofinas y sus receptores son cruciales para el desarrollo del sistema nervioso (Hallböök *et al.*, 1995) y de la retina (Hallböök *et al.*, 1996; von Bartheld, 1998). En el caso de la retina, TrkB se expresa en este tejido en estadios tempranos de diferenciación, desde E4 (Frade *et al.*, 1999). Su ligando, BDNF, es secretado por el epitelio pigmentario, desde donde difunde al resto de la retina, en la que lleva a cabo su función (Frade *et al.*, 1999). NT-3 también es secretado por el epitelio participando en la diferenciación retiniana (Bovolenta *et al.*, 1996). A su vez, NGF y proNGF se expresan en la retina y los macrófagos en estadios tempranos (Frade y Barde, 1998; Nykjaer *et al.*, 2004). TrkA no se expresa en CGRs inmaduras, sino que lo hace en una etapa más tardía de su diferenciación, cuando las CGRs están ya laminadas (González-Hoyuela *et al.*, 2001). La mayoría de las CGRs en proceso de diferenciación expresan altos niveles de p75^{NTR} por lo que este receptor puede emplearse como marcador de diferenciación de las CGRs nacientes (Frade y Barde 1999; López-Sánchez *et al.*, 2011; Morillo *et al.*, 2010). La expresión de p75^{NTR} disminuye posteriormente a la llegada de la terminal axonal a su tejido diana (Yan *et al.*, 1988).

4.4 Tetraploidización en la retina y neurotrofinas

En la retina, un porcentaje de CGRs indiferenciadas adquieren condición tetraploide a medida que migran a lo largo neuroepitelio pseudoestratificado hacia la membrana basal. En la zona apical incorporan BrdU, convirtiéndose en tetraploides por duplicación del ADN. Este efecto está inducido por p75^{NTR} ya que el empleo de anticuerpos bloqueantes contra p75^{NTR} o NGF inhibe este proceso (Morillo *et al.*, 2010). Durante su génesis, las neuronas tetraploides se caracterizan por expresar E2F1 y E2F4 en ausencia de Rb (Morillo *et al.*, 2010; 2012). El mecanismo empleado por p75^{NTR} para inducir la re-entrada en ciclo depende de su capacidad para inducir la fosforilación del factor de transcripción E2F4 mediante p38^{MAPK} (Morillo *et al.*, 2012). En ausencia de BDNF, las CGRs en proceso de diferenciación incrementan la expresión de Ciclina B2 y llevan a cabo la transición G2/M, muriendo por apoptosis (Frade, 2000; Frade *et al.*, 1996c; 1997; Morillo *et al.*, 2010). De hecho, BDNF previene la síntesis de Ciclina

B (Frade, 2000) (Figura 14). Sin embargo, el mecanismo empleado por BDNF para bloquear la transición G2/M es desconocido. En la zona central de la retina se observa una mayor proporción de muerte por apoptosis (Frade *et al.*, 1997). La transición G2/M está estrictamente regulada en estas células probablemente para eliminar subpoblaciones específicas durante el desarrollo (Frade *et al.*, 1997), tal como se ha indicado al final del apartado 3.4.

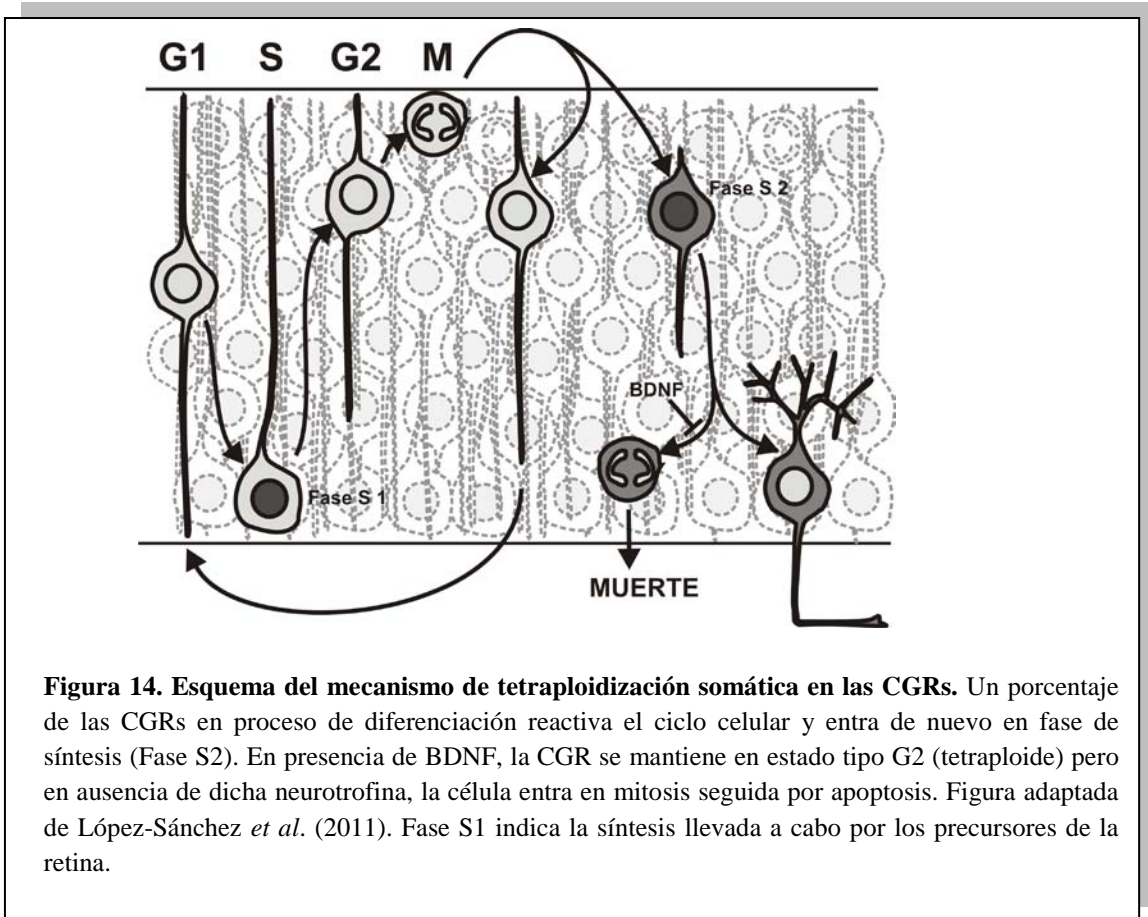
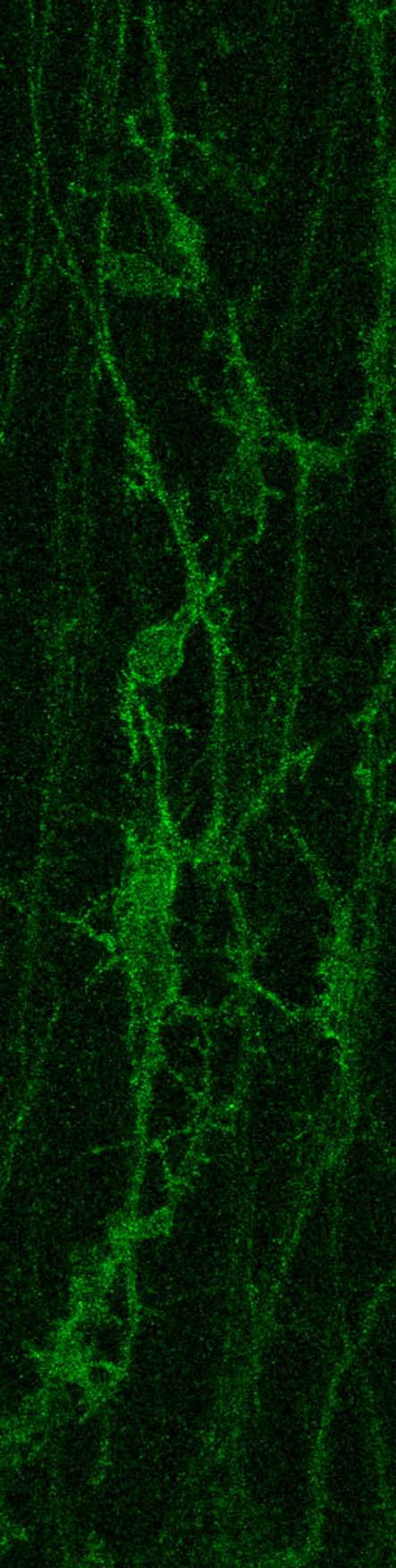


Figura 14. Esquema del mecanismo de tetraploidización somática en las CGRs. Un porcentaje de las CGRs en proceso de diferenciación reactiva el ciclo celular y entra de nuevo en fase de síntesis (Fase S2). En presencia de BDNF, la CGR se mantiene en estado tipo G2 (tetraploide) pero en ausencia de dicha neurotrofina, la célula entra en mitosis seguida por apoptosis. Figura adaptada de López-Sánchez *et al.* (2011). Fase S1 indica la síntesis llevada a cabo por los precursores de la retina.



II. OBJETIVOS

El proceso de tetraploidización de las CGRs supone, en primer lugar, la reactivación del ciclo celular en neuronas en proceso de diferenciación y su migración a la región basal del neuroepitelio. Estas CGRs tetraploides necesitan la presencia de BDNF ya que de lo contrario mueren por apoptosis. Se sabe que este proceso está controlado por BDNF, que regula a la Ciclina B, pero se desconoce si también puede regular a Cdk1.

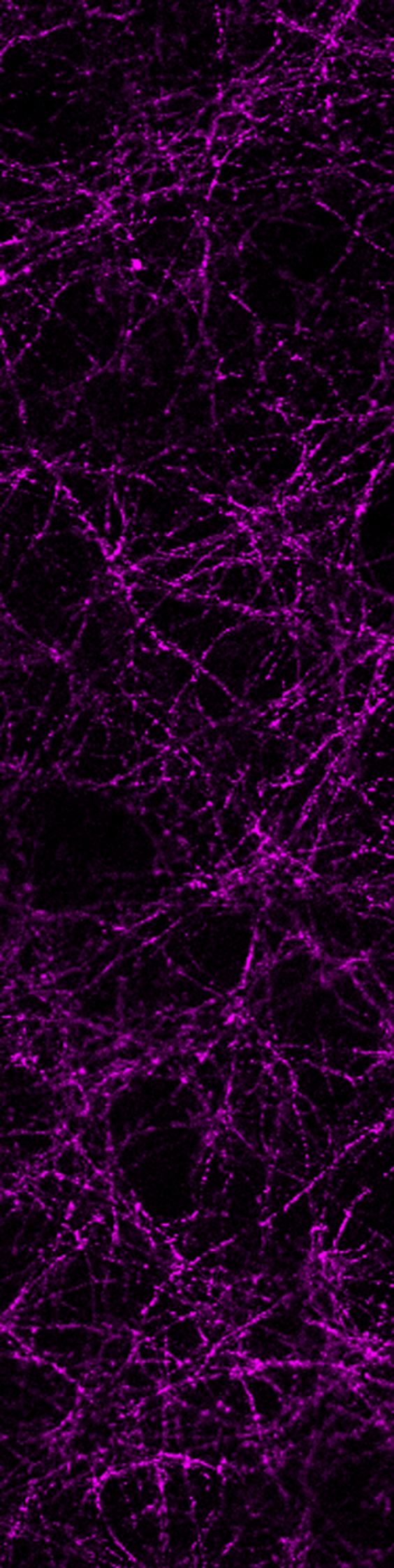
Por otro lado, las neuronas que adquieren condición tetraploide se mantienen en tal estado impidiéndose nuevas rondas de endorreducción. Normalmente, este mecanismo genera células con elevados valores de ADN nuclear, pudiendo alcanzar valores de ADN de 200.000 C, como en el caso de la *Aplysia californica* (Lasek y Dower, 1971). La pregunta que surge es por qué en las CGRs tetraploides el proceso de endorreducción se detiene cuando estas neuronas tienen un contenido de ADN 4C (Morillo *et al.*, 2010). El mecanismo que lo regula es también desconocido.

Como objetivos globales pretendemos:

1. Dilucidar si la regulación de Cdk1 participa en el mecanismo que mantiene a las neuronas tetraploides en un estado similar a G2.
2. Determinar el mecanismo por el cual las CGRs tetraploides sólo llevan a cabo una ronda de endorreducción.

Para ello, los objetivos concretos son:

1. Determinar el patrón de expresión de TrkB en la retina del embrión de pollo.
2. Verificar si Cdk1 se expresa en las CGRs.
3. Analizar si BDNF modifica la expresión de Cdk1.
4. Verificar si BDNF afecta a la actividad de Cdk1.
5. Analizar el mecanismo o mecanismos responsables de regular la actividad de Cdk1.
6. Determinar el patrón de expresión de p27^{Kip1} en la retina del embrión de pollo.
7. Verificar si p27^{Kip1} está implicado en impedir que las CGRs tetraploides lleven a cabo rondas sucesivas de endorreducción.



III. MATERIALES Y MÉTODOS

Embriones

Se emplearon embriones de pollo de la raza “White-Leghorn” de estadio de desarrollo E5-9, de acuerdo con la clasificación establecida por Hamburger y Hamilton (1951). Los huevos fecundados procedían de la Granja Santa Isabel (Córdoba) y se incubaron a 38,5° C en una atmósfera saturada de humedad.

Anticuerpos primarios

Los anticuerpos empleados se describen en la Tabla 1. En el párrafo siguiente se aporta información adicional de los mismos.

El anticuerpo anti-Cdk1 A reconoce la secuencia de aminoácidos: Leu-Gly-Thr-Pro-Asn-Asn-Glu-Val, localizada en las posiciones 220-227 de la región C-terminal de la proteína Cdk1 de *Xenopus laevis* (número de acceso: NP_001080554) (Nebreda *et al.*, 1995). Esta secuencia es específica de Cdk1 (Poon *et al.*, 1995) y está conservada funcionalmente en la proteína Cdk1 del pollo (Leu-Gly-Thr-Pro-Asn-Asn-Asp-Val; número de acceso: NP_990645). El anticuerpo anti-Cdk1 B reconoce la secuencia incluida entre los aminoácidos 224-230 de la proteína Cdk1 de origen humano (Asn-Asn-Glu-Val-Trp-Pro-Glu; número de acceso: NP_001777), región funcionalmente conservada en la secuencia de Cdk1 del pollo (Asn-Asn-Asp-Val-Trp-Pro-Asp; número de acceso: NP_990645). El anticuerpo anti-Cdk1 C es específico de los aminoácidos 2-30 de la proteína Cdk1 humana (Glu-Asp-Tyr-Thr-Lys-Ile-Glu-Lys-Ile-Gly-Glu-Gly-Thr-Tyr-Gly-Val-Val-Tyr-Lys-Gly-Arg-His-Lys-Thr-Thr-Gly-Gln-Val-Val-Ala; número de acceso: NP_001777). Esta región está totalmente conservada en la proteína Cdk1 del pollo (número de acceso: NP_990645). El anticuerpo anti-Cdk1 D reconoce el dominio PSTAIRE, presente tanto en Cdk1 como en Cdk2. El anticuerpo anti-pCdk1 Tyr15 A reconoce la Tyr15 fosforilada de Cdk1 (pCdk1 Tyr15) del pez cebra, del pollo, del ratón y del humano. El anticuerpo anti-pCdk1 Tyr15 B también reconoce la Tyr15 fosforilada de Cdk1. El anticuerpo anti-Rb A reconoce un epítipo contenido entre los aminoácidos 332-344 de la proteína Rb humana (número de acceso: NP_000312), totalmente conservada en Rb de pollo. El anticuerpo anti-Rb B reconoce un epítipo situado en la región circundante a la Ser780 de la proteína humana, una región

ampliamente conservada en el pollo. El anticuerpo anti-p75 A [9650], que reconoce la región extracelular de p75^{NTR}, fue cedido por el Dr. Moses V. Chao (Universidad de Nueva York). El anticuerpo anti-p75 B fue cedido por el Dr. Alfredo Rodríguez Tébar (CABIMER). El anticuerpo anti-TrkB, que reconoce la región extracelular de TrkB, fue cedido por el Dr. Louis Reichardt (Universidad de California). El anticuerpo anti-G4, que reconoce predominantemente CGRs, fue cedido por el Dr. Enrique de la Rosa (Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC). El anticuerpo anti-Tubulina β III se empleó para reconocer las CGRs en estadios tempranos de diferenciación (Watanabe *et al.*, 1991).

Nombre	Antígeno	Origen	Tipo	Dilución- Concentración	Proveedor	Número de Catálogo
Anti-Cdk1 A	Cdk1	Ratón	Monoclonal	ELISA: 4 µg/ml IHQ: 1/100 IP: 3,75 µg/ml	Abcam	Ab18
Anti-Cdk1 B	Cdk1	Ratón	Monoclonal	ICQ: 1/1.000 IHQ: 1/2.000	Santa Cruz	sc-54
Anti-Cdk1 C	Cdk1	Ratón	Monoclonal	IHQ: 1/100 WB: 1/10.000	Santa Cruz	sc-8395
Anti-Cdk1 D	Cdk1	Conejo	Policlonal	ELISA: 1/300	Santa Cruz	sc-53
Anti-pCdk1 Tyr15 A	pCdk1- Tyr15	Conejo	Policlonal	ELISA: 1,5 µg/ml IHQ: 1/100 WB: 1/2.000	Anaspec	54332
Anti-pCdk1 Tyr15 B	pCdk1- Tyr15	Conejo	Policlonal	WB: 1/5.000	Abnova	PAB12614
Anti-pH3	pH3	Conejo	Policlonal	ICQ: 1/1.000 IHQ: 1/1.000	Upstate Biotechnology	06-570
Anti-Rb A	Rb	Ratón	Monoclonal	IHQ: 1/400	BD Biosciences Pharmingen	554316
Anti-Rb B	Rb	Conejo	Policlonal	IHQ: 1/50	Abcam	Ab39690
Anti-pRb (Ser780)	pRb (Ser780)	Ratón	Monoclonal	Ensayo de actividad: 1/1.000	Cell Signalling	9307

Nombre	Antígeno	Origen	Tipo	Dilución- Concentración	Proveedor	Número de Catálogo
Anti-BrdU	BrdU	Ratón	Monoclonal	ICQ: 1/4.000	Developmental Studies Hybridoma Bank	G3G4
Anti-p27	p27 ^{Kip1}	Ratón	Monoclonal	ICQ: 1/100 IHC: 1/200	BD Transduction Laboratories	610241
Anti-p75 A	p75 ^{NTR}	Conejo	Policlonal	IHC: 1/1.000	Cedido por el Dr. Moses V Chao	-
Anti-p75 B	p75 ^{NTR}	Ratón	Policlonal	IHC: 1/500	Cedido por el Dr. Alfredo Rodríguez- Tebar	
Anti-TrkB	TrkB	Conejo	Policlonal	IHC: 1/2.000	Cedido por el Dr. Louis Reichardt	-
Anti-β actina	β actina	Ratón	Monoclonal	WB: 1/20.000	Sigma	A5316
Anti-G4	G4	Conejo	Policlonal	IHC: 1/1.000 ICQ: 1/500	Cedido por el Dr. Enrique de la Rosa	-
Anti-NeuN	NeuN	Conejo	Policlonal	ICQ: 1/1.000	Abcam	ab18207
Anti-Tubulina βIII	Tubulina βIII	Ratón	Monoclonal	ICQ: 1/1.000 IHC: 1/2.000	Millipore/ Chemicon	MAB5564
Anti-GFP	GFP	Conejo	Policlonal	ICQ: 1/1.000	Life Technologies	A6455

Tabla 1: Listado de anticuerpos primarios utilizados.

Anticuerpos secundarios

Se emplearon los anticuerpos descritos en la Tabla 2.

Nombre	Origen	Antígeno	Dilución	Proveedor	Número Catálogo
Anti-IgG de ratón acoplada a Alexa 488	Cabra	IgG de ratón	IHQ: 1/1.000	Life Technologies	A11029
Anti-IgG de ratón acoplada a Alexa 594	Cabra	IgG de ratón	IHQ: 1/1.000	Life Technologies	A11032
Anti-IgG de ratón acoplada a HRP	Cabra	IgG de ratón	WB: 1/500.000	Bio-Rad	170-6516
Anti-IgG de conejo acoplada a cianina 2	Cabra	IgG de conejo	IHQ: 1/1.000	Jackson Inmuno Research	115-225-003
Anti-IgG de conejo acoplada a Alexa 594	Cabra	IgG de conejo	IHQ: 1/1.000	Life Technologies	A11037
Anti-IgG de conejo acoplada a Alexa 647	Cabra	IgG de conejo	IHQ: 1/1.000	Life Technologies	A21245
Anti-IgG de conejo acoplada a HRP A	Cabra	IgG de conejo	WB: 1/1.600.000	Jackson Inmuno Research	111-065-144
Anti-IgG de conejo acoplada a HRP B	Cabra	IgG de conejo	WB: 1/100.000	BioRad	172-1019

Tabla 2: Listado de anticuerpos primarios utilizados.

Plásmidos

Los plásmidos de expresión de Cdk1 y de Ciclina B1 fueron proporcionados por el Dr. Gavin Brook (Universidad de Reading, UK) y han sido descritos por Bicknell *et al.* (2004). El vector que expresa una forma constitutivamente activa de Cdk1 fue cedido por la Dra. Ruth J. Muschel (Universidad de Oxford, UK). Este plásmido expresa una proteína Cdk1 donde la Tyr15 ha sido sustituida por una Phe (Cdk1 Phe15) y la proteína mutante está fusionada con EGFP (del inglés “Enhanced green fluorescence protein”) (Fletcher *et al.*, 2002). El vector pIRES2-EGFP (Clontech) se utilizó como control negativo.

ARNi

Se generaron dos construcciones de ARNi que reconocen regiones diferentes del gen *CDKN1B* basados en el protocolo de interferencia descrito por Das *et al.* (2006). El interferente 1p27i se generó frente a la secuencia comprendida entre los pares de bases 93 y 112 (GCCATGGAGGATTACACGAA, número de acceso: NM_204256.2). El interferente 2p27i se generó frente a la secuencia comprendida entre los pares de bases 1043 y 1062 (GAGGAGGTTTCAGAAGACT). Una vez generados los ARNi, se clonaron en el vector pRFPRNAiC (Das *et al.*, 2006). Como control negativo se empleó el vector pRFPRNAi luciferasa (RFPi) (Das *et al.*, 2006). Todos los plásmidos co-expresan la proteína RFP (del inglés “Red fluorescence protein”).

Cultivos celulares

Fibroblastos embrionarios de pollo (CEFs)

Se emplearon embriones de pollo de estadio E9 decapitados, y posteriormente eviscerados. El tejido restante se disgregó mecánicamente y se tripsinizó durante 30 min a 37° C con una disolución de tripsina (Worthington) preparada en PBS (del inglés “Phosphate buffered saline”) al 0,25%. La tripsina se inactivó con FCS (del inglés “Fetal calf serum”) (Life Technologies) al 10%. El tejido se disgregó mecánicamente y se centrifugó a 300×g durante 10 min. Las células disgregadas se cultivaron en DMEM (del inglés “Dulbecco's modified eagle medium”)/10% FCS (Life Technologies) con 25 U/ml de penicilina y 25 µg/ml de estreptomina (Life Technologies). Los experimentos se llevaron a cabo en placas P100 (BD Falcon) cuando los CEFs alcanzaron un 25-30% de confluencia.

NRPDs

Como modelo *in vitro* se empleó un protocolo de diferenciación de precursores neuronales aislados de la retina de embriones de pollo E6 (Frade y Rodríguez-Tébar, 2000). Los embriones se decapitaron, las retinas se disecaron, se separaron del epitelio pigmentario y se trataron con 0,5 mg/ml de Tripsina, preparada en PBS conteniendo 3 mg/ml de BSA (del inglés “Bovine serum albumin”) (Sigma), durante 5 min a 37° C. La reacción se detuvo con inhibidor de Tripsina (Sigma) a 1 mg/ml, y el tejido se disgregó

mecánicamente pasándolo 5 veces a través de una pipeta Pasteur cuyo borde había sido pulido al fuego. Las células disociadas se resuspendieron en medio DMEM/F12 (Life Technologies) con suplemento N2 (0,1 mg/ml de Transferrina en PBS, (Sigma); 16 µg/ml de Putrescina en PBS (Sigma); 5 µg/ml de Insulina (Sigma) en PBS con un 0,4% de HCl (Merck); 60 ng/ml de Progesterona (Sigma) en etanol al 70% (Merck); 52 ng/ml de Selenito sódico (Sigma) en PBS), y 50 ng/ml de Gentamicina (Sigma), y se cultivaron en placas P35 (5×10^5 células/placa) o P100 ($8-10 \times 10^6$ células/placa), (BD Falcon) cubiertas con 500 µg/ml de PLO (Poli-(DL)-ornitina) (Sigma) y de 10 µg/ml laminina-1 (Life Technologies). En algunos casos, las células disociadas se cultivaron sobre portaobjetos circulares de 10 mm cubiertos con PLO y laminina-1, tal como se describe anteriormente, en placas de 4 pocillos (Greiner Bio-One, Alemania) a una densidad de 10.000-100.000 células/cm². Los cultivos se mantuvieron durante 18-20 h a 37° C en una atmósfera húmeda saturante con un 5% de CO₂. Estos precursores neuronales se diferencian en presencia de laminina-1 e insulina (Frade *et al.*, 1996a; 1996b) cuando se cultivan en DMEM/F12 N2. El tratamiento de las células con NGF exógeno (100 ng/ml) induce la re-entrada en ciclo celular y la muerte por apoptosis de las neuronas inmaduras mediante p75^{NTR} (Allington *et al.*, 2001; Frade, 2000).

Los cultivos se sometieron a una serie de tratamientos, tal como se describe a continuación. En algunos casos, los cultivos se trataron con NGF recombinante (Sigma/Alomone Labs) durante el tiempo de cultivo. El NGF se empleó a una concentración de 1 ng/ml, cuando se requirió que su efecto estuviese mediado específicamente por TrkA (Kaplan *et al.*, 1991) o a 100 ng/ml como concentración saturante para p75^{NTR} (Frade, 2000). El BDNF (Alomone Labs) fue empleado a 2 ng/ml, una concentración específica de TrkB (Rodríguez-Tébar y Barde, 1988) durante todo el tiempo del cultivo o, alternativamente, durante 30 min. Los inhibidores K252a (Alomone Labs) y MK-1775 (Axon MedChem) se emplearon a una concentración de 200 nM y de 300 nM, respectivamente. En ambos casos, se añadieron al medio de cultivo 10 min antes del tratamiento con BDNF (30 min). El nocodazol (Sigma) se empleó a una concentración de 0,4 µg/ml y el tratamiento duró 17 h. Tanto K252a, como MK-1775 y Nocodazol se disolvieron en dimetilsulfóxido, que también se empleó como vehículo en los experimentos control.

Enriquecimiento de CGRs

El enriquecimiento de CGRs se llevó a cabo mediante una adaptación del protocolo descrito por De Curtis *et al.* (1991). Se disecaron 30 retinas de embrión de pollo E7 y se trataron durante 5 min con 0,5 mg/ml Tripsina en PBS conteniendo 3 mg/ml de BSA. La reacción se detuvo añadiendo 1 mg/ml de inhibidor de tripsina y disgregando mecánicamente con una pipeta Pasteur cuya punta había sido pulida al fuego. La suspensión celular se diluyó con DMEM/F12 N2 hasta alcanzar 6,60 ml. Posteriormente, se generó un gradiente de Percoll (Sigma) en tubos de 15 ml (Falcon BD) depositando 1,12 ml de DMEM/F12 N2 mezclados con 1,70 ml de Percoll (densidad [d]=1,09) en el tubo seguidos de 1,80 ml de la suspensión celular en DMEM/F12 N2 mezclados con 1,44 ml de Percoll (d=1,06). Después se añadieron 2,40 ml de la suspensión celular mezclados con 0,52 ml de Percoll (d=1,04) seguidos de 2,40 ml de suspensión celular mezclada con 0,28 ml de Percoll (d=1,02). Finalmente, se depositaron 2,70 ml de DMEM/F12 N2. A continuación, se centrifugó la suspensión a 351×g. durante 30 min a 4° C. Como consecuencia de la centrifugación se generaron dos bandas. La superior, enriquecida en CGRs, se aisló y las células contenidas en ella se lavaron con DMEM/F12 N2. Después de ser centrifugadas a 300×g durante 1 min, se resuspendieron en dicho medio. Las células se sembraron en placas de 4 pocillos, previamente recubiertas con PLO y laminina-1 tal como se describe previamente (20.000-200.000 células por cubreobjetos).

PCR semicuantitativa

Las NRPDs se cultivaron en presencia o ausencia de BDNF durante 4 h (500.000 células/placa P35). Su ARNm se extrajo y se purificó empleando el kit comercial “QuickPrep Micro mRNA purification kit” (GE Healthcare). Este ARNm se empleó para sintetizar ADN codificante (ADNc) empleando el kit “First-Strand cDNA synthesis kit” (GE Healthcare). Dicho ADNc se amplificó utilizando el protocolo estándar de PCR: un programa de desnaturalización a 95° C durante 30 s seguido de una fase de anillamiento a 60° C durante 30 s y de una fase de extensión de 1 min a 72° C. Los cebadores empleados para la amplificación de *CDK1* se corresponden con la secuencia comprendida entre los pares de bases 93 y 112 (GCCATGGAGGATTACACGAA, número de acceso: NM_205314) y con la secuencia

complementaria a la comprendida entre los pares de bases 540 y 559 (ATTCCAAAGGCTCGAGCCAA). Los cebadores empleados para la amplificación de *GAPDH* (del inglés “Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase”) de pollo son: TGCTGGCATTGCACTGAATG, comprendida entre los pares de bases 944-963 y CAGTTTCTATCAGCCTCTCC, complementaria a la secuencia comprendida entre los pares de bases 1.219-1.238 (número de acceso: K01458). *CDKI* se amplificó durante 31-40 ciclos mientras que *GAPDH* se amplificó durante 22-31 ciclos. En estas condiciones, la amplificación fue lineal. En paralelo se llevaron a cabo controles negativos en los que no se incluyó la transcriptasa reversa, que no dieron lugar a ningún producto de amplificación.

Inmunotinciones

Inmunohistoquímica (IHC)

Los embriones se fijaron durante 8 h a 4° C en paraformadehído (Merck) al 4%, se crioprotegieron con sacarosa (Merck) al 30% durante toda la noche a 4° C y se congelaron en “Tissue Tek O.C.T.” (Sakura). Posteriormente, se realizaron secciones en un criostato Leica 1950 (12 µm), y se recogieron en portaobjetos recubiertos de TESPA (Sigma). Las criosecciones se permeabilizaron y bloquearon durante 30 min a temperatura ambiente en PBT (PBS con un 0,05% de Tritón [Sigma]) conteniendo un 10% de FCS. Se incubaron durante 12 h a 4° C con el anticuerpo primario correspondiente en PBT con un 1% de FCS. Posteriormente, se lavaron 5 veces con PBT y un 1% de FCS y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios correspondientes en PBT con un 1% de FCS. Se lavaron 5 veces más en condiciones idénticas a las anteriores y se tiñeron con Bisbencimida (Sigma a 1 µg/ml). Se montaron los portas con PBS-glicerol (1:1). Las preparaciones fueron analizadas en un sistema de microscopía confocal láser (Leica TS SP5). En paralelo se llevaron a cabo controles negativos en los que se emplearon los anticuerpos secundarios en ausencia del anticuerpo primario, en los que no se observó marcaje específico.

Inmunocitoquímica (ICQ)

Las células, cultivadas sobre cristales de 1 cm², se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 min. A continuación se siguió un protocolo de tinción similar al reseñado en el apartado anterior. Para el marcaje de G4, las células fueron teñidas sin fijar para sólo detectar aquéllas CGRs que se encontrasen en procesos tardíos de diferenciación. Para ello, las células fueron cultivadas sobre portaobjetos circulares, se lavaron 4 veces con tampón KRH (Tampón fisiológico salino Krebs-Ringer-HEPES) (compuesto por: 125 mM NaCl (Merck); 4,8 mM KCl (Merck); 1,3 mM CaCl₂•2H₂O (Merck); 1,2 mM MgSO₄•7H₂O (Merck); 1,2 mM KH₂PO₄ (Merck); 5,6 mM Glucosa (Merck) y 25 mM HEPES (del inglés “4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid”) (Sigma) a pH 7,3) previamente atemperado a 37° C. Las células se incubaron con el anticuerpo anti-G4 (a una dilución 1/400 en tampón KRH) durante 20 min. Posteriormente, se lavaron 4 veces con tampón KRH y se incubaron con el anticuerpo anti-IgG de conejo acoplada a cianina 2 (a una dilución 1/1.000 en tampón KRH). A continuación, las células se fijaron durante 15 min con 4% de paraformaldehído en PBS, y se llevó a cabo un doble marcaje empleando un protocolo similar al reseñado en el apartado de IHQ. En el caso de la lipofección de los cultivos, los núcleos se tiñeron con DAPI (del inglés “4',6-diamidino-2-phenylindole”) (Sigma) para facilitar la cuantificación del ADN.

Inmunoprecipitación (IP)

Los cultivos de NRPDs (8-10×10⁶ células por placa P100) se lavaron con PBS frío y se lisaron incubando durante 30 min en hielo con 600-700 µl de tampón de extracción (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% Tritón X-100), un 10% de inhibidor de proteasas (“complete mini EDTA free protease inhibitor cocktail”, Roche) y, en algunos casos, un 1% de inhibidor de fosfatasas (“phosphatase inhibitor cocktail 2”, Sigma). Los extractos se recogieron con un “rubber policeman” y se tomaron alícuotas de 20 µl para analizar la cantidad de proteína mediante WB (del inglés “Western blot”) (“Input”). Los extractos celulares se centrifugaron a 13.000×g durante 10 min y el sobrenadante se incubó con 10-12,5 µl de volumen efectivo de resina de afinidad durante 1 h en un agitador orbital. Las resinas de afinidad empleadas fueron las siguientes: Proteína A Sefarosa (GE Healthcare), Proteína A Agarosa (Invitrogen) y

Proteína G Sefarosa (GE Healthcare). A continuación, se centrifugó durante 1 min a máxima velocidad en una minifuga. El sobrenadante fue incubado con el anticuerpo correspondiente durante toda la noche a 4° C y se incubó de nuevo durante 1 h con 10 µl de volumen efectivo de resina de afinidad, que posteriormente se lavó 5 veces con tampón de lisis. Los extractos inmunoprecipitados se utilizaron para llevar a cabo el ensayo de actividad de Cdk1 o para WB (descritos en los siguientes apartados). En el caso del WB, las proteínas inmunoprecipitadas se separaron del tampón de lisis mediante centrifugación a máxima velocidad durante 1 min, se mezclaron con 12 µl de tampón Laemli 2X y se hirvieron durante 5 min. Posteriormente se centrifugaron a máxima velocidad durante 1 min previamente a su carga en el gel de acrilamida. En paralelo, se realizó un control en el que se inmunoprecipitó sólo tampón de lisis.

WB

Para la realización de WB se emplearon protocolos estándar. Los cultivos de NRPDs (5×10^5 células/placas P35) se incubaron durante 20 h y posteriormente se lavaron con PBS frío. Los extractos celulares se obtuvieron incubando los cultivos con 150 µl de tampón de lisis (50 mM Tris HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% Tritón X-100) conteniendo un 10% de inhibidor de proteasas y, en algunos casos, un 1% de inhibidor de fosfatasa durante 30 min en hielo. Los extractos se recogieron con un “rubber policeman”, se pasaron 10 veces a través de una aguja hipodérmica 22 G y se hirvieron con tampón Laemli 2X durante 5 min. Los extractos se resolvieron gracias a geles de acrilamida (“30% Acrylamide/Bis solution, 37-5:1”, Bio-Rad) al 12%. A continuación, los geles se transfirieron mediante un sistema húmedo (Bio-Rad) a membranas “immun-blot-PVDF” (Bio-Rad). Las membranas se bloquearon con un 2% de “blocking reagent” (GE Healthcare) en PBTw (PBS/0,1% Tween-20 [Sigma]) a temperatura ambiente durante 2 h y, posteriormente, se incubaron durante toda la noche a 4° C con el anticuerpo correspondiente diluido en leche desnatada en polvo al 5% en PBTw (Sigma). Las membranas se lavaron 4 veces en agitación con PBTw durante 15 min, se incubaron con el anticuerpo secundario disuelto en leche desnatada en polvo al 5% en PBTw a temperatura ambiente durante 1 h. Las membranas se lavaron 4 veces con PBTw y se revelaron mediante una incubación con ECL (del inglés “Enzymatic chemiluminescence”) durante 5 min (“ECL Advance GST WB Detection Kit” GE Healthcare). En el caso del WB de Cdk1, las membranas se sometieron a un “stripping”

para llevar a cabo un control de carga empleando los niveles de β -actina. Una vez reveladas, las membranas se lavaron 3 veces durante 30 min con PBTw y se incubaron durante 30 min a 50° C con una disolución compuesta por: 2 mM de 2- β mercaptoetanol, 2% de SDS (Dodecilsulfato sódico), y 62,5 mM Tris-HCl pH 6,7. A continuación, se lavaron 4 veces durante 15 min con PBTw y se sometieron de nuevo a un WB.

Electroporación

Se emplearon retinas de embriones de pollo E6 cortadas en pequeños fragmentos de 1 mm³ de promedio. Dichos fragmentos se depositaron en portaobjetos de cristal de 10 mm² y se cubrieron con 4 μ l de PBS conteniendo el plásmido correspondiente en PBS a 1 μ g/ μ l. La electroporación se llevó a cabo con el electroporador “TSS20 Ovodyne Electroporator”, (INTRACEL) empleando 4 pulsos de 50 ms (25V) con una frecuencia de 500 ms. Los explantes electroporados se incubaron en suspensión en DMEM/F12 N2 durante 4 h, tras las cuales se disociaron y cultivaron como se explicó anteriormente. Posteriormente, se sometieron a una IHQ con anti-GFP para intensificar las células que expresaban EGFP.

Lipofección

Las células cultivadas en cubreobjetos circulares se transfirieron a placas de 24 pocillos (Falcon BD), se lavaron con DMEM/F12 N2 sin gentamicina y incubaron en dicho medio. Por cada tratamiento se emplearon 3 μ g de los plásmidos de interés diluidos en 50 μ l de Optimem (Life Technologies). En paralelo, se incubaron 2 μ l de Lipofectamina 2000 (Sigma) con 50 μ l de Optimem durante 5 min. Transcurrido este tiempo, se mezcló la Lipofectamina 2000 con los plásmidos de interés y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente. Se añadieron 100 μ l de esta mezcla a cada uno de los pocillos y se incubaron a 37° C. Las CGRs lipofectadas se trataron con 0,5 μ g/ml de BrdU (Roche). Transcurridas 4-6 h, se cambió el medio por DMEM/F12 N2 completo y BrdU a la misma concentración. A las 24 h de la lipofección, se llevó a cabo una ICQ o, en el caso de la tinción con G4, una ICQ *in vivo* para seguida de una ICQ en tejido fijado.

Ensayo de actividad de Cdk1

Para medir la actividad de Cdk1 en extractos celulares de NRPDs, se empleó un protocolo basado en el ensayo enzimático descrito por Poon *et al.* (1995), que consiste en la IP de Cdk1 previamente a la realización del ensayo quinasas. Cdk1 fue inmunoprecipitada con el anticuerpo anti-Cdk1 A y la cuantificación de la actividad Cdk1 se realizó usando el kit “HTScan CDK1/CycB Kinase Assay Kit” (Cell Signaling Technology). En paralelo, se cuantificó la actividad Cdk total usando extractos celulares sin inmunoprecipitar. El método de cuantificación del kit mencionado se basa en la fosforilación de un péptido biotinilado de Rb (Ser780) susceptible de ser fosforilado por Cdk2, Cdk4 y Cdk6 (Suzuki *et al.*, 2002). En ambos casos, se tomaron 25 µl del inmunoprecipitado o del extracto original después de concentrarlo 4 veces mediante filtros “Amicon Ultra 3K centrifugal” (Millipore). A continuación, se mezclaron con 25 µl del “kinase assay buffer” (“HTScan CDK1/CycB Kinase Assay Kit”) y se incubaron a 30° C con 25 µl “2x ATP substrate cocktail”, que contiene el péptido biotinilado mencionado anteriormente. La reacción se detuvo con 50µl de 50 mM EDTA pH 8.0 y las muestras se centrifugaron a 16.000×g durante 10 min. Los sobrenadantes se diluyeron en agua (1:3) y los triplicados (25 µl de cada uno) se incubaron durante 2 h en placas “Reacti-Bind Streptavidin Coated 96-Well Plates” (Pierce). Los pocillos se lavaron 3 veces con PBTw y se incubaron con anti-pRb (Ser780) en PBTw con 1% de BSA overnight a 4° C. A continuación, los pocillos se lavaron 3 veces con PBTw y se incubaron con el anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a HRP A (del inglés “Horseradish peroxidase”) diluido 1/5.000 en PBTw-1% BSA durante 2 h a temperatura ambiente. Por último, los pocillos se lavaron 3 veces con PBTw y se incubaron con ABTS (del inglés “ 2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate (6)] diammonium salt”) (Roche) durante 15-30 min a temperatura ambiente. Se midió la intensidad de la señal empleando el espectrofotómetro Thermo Labsystems Multiskan Ascent Photometric (Labsystems Multiskan Ascent) a una longitud de onda de 405 nm. La actividad de Cdk1 de cada condición experimental se normalizó a los niveles de Cdk1 medidos mediante WB de alícuotas de las muestras antes de inmunoprecipitar (“Input”).

ELISA “Sandwich”

Para la realización del ELISA (del inglés “Enzyme-linked immunosorbent assay”) “Sandwich”, los cultivos de NRPDs ($6,5 \times 10^6$ células/placa P100) se incubaron durante 30 min en hielo con 600 μ l de tampón hipotónico (20 mM Tris-HCl pH 7,4; 10 mM NaCl), las células se lisaron con un “rubber policeman” y se extrajeron empleando un homogeneizador tipo “potter” (Afora). Los lisados se centrifugaron a $16.000 \times g$ durante 10 min. Las placas de ELISA “BD 351177 Falcon Clear Polystyrene 96 Well Plate with Low-Evaporation Lid, 320 microliter Volume, U Bottom Shape” (BD Falcon) se trataron con 4 μ g/ml de anticuerpo anti-Cdk1 A en PBS a 4° C durante toda la noche. Se lavaron los pocillos con PBS y se bloquearon con 250 μ l de PBS con un 3% de BSA durante 3 h a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron 2 veces con PBS y se incubaron durante al menos 4 h a temperatura ambiente con 50 μ l de extracto celular. Posteriormente, los pocillos se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo anti-pCdk1 Tyr15 A (1,5 μ g/ml) o con una dilución 1/300 del anticuerpo anti-Cdk1 D en 50 μ l de PBS/3% BSA a 4° C durante toda la noche. A continuación, los pocillos se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron durante 2 h con 50 μ l del anticuerpo anti-IgG de conejo acoplada a HRP A a una dilución 1/5.000 en PBS/3% BSA. Después de lavar 4 veces con PBS, los pocillos se incubaron con 100 μ l de ABTS y su intensidad se cuantificó mediante un espectrofotómetro “Thermo Labsystems Multiskan Ascent Photometric plate reader” a una longitud de onda de 405 nm. El empleo del anticuerpo anti-Cdk1 A para el recubrimiento de las placas confiere especificidad para Cdk1 a este ensayo. Los valores de pCdk1 Tyr15 obtenidos usando el anticuerpo anti-pCdk1 Tyr15 A fueron normalizados con respecto a los valores totales obtenidos con el anticuerpo anti-Cdk1 D.

Análisis de imagen

La intensidad de las bandas de ADN correspondiente a las PCR cuantitativas se cuantificó substrayendo el background. El ratio *CDK1/GAPDH* se calculó empleando 4 experimentos independientes. En paralelo, se llevaron a cabo controles negativos en los que no se incluyó la enzima transcriptasa reversa, que no dieron lugar a ningún producto de amplificación.

Los niveles de proteína obtenidos en los análisis por WB y el ratio Cdk1/ β actina se calcularon empleando 4 experimentos independientes.

Los niveles de p27^{Kip1} se cuantificaron en imágenes obtenidas por microscopía confocal (planos ecuatoriales) a partir de células transfectadas con ARNi control (RFPi) o 1p27i y 2p27i. En todos los casos se cuantificaron los niveles de un mínimo de 200 células electroporadas.

En todos los casos, las cuantificaciones fueron realizadas usando el software ImageJ (NIH).

Citometría estática

La cuantificación de los niveles de DAPI incorporados en las células lipofectadas con vectores de interferencia se llevó a cabo empleando imágenes obtenidas con un microscopio Nikon Eclipse E80i. El contenido de ADN relativo de dichas células se determinó mediante los valores de la integral de la fluorescencia de DAPI obtenidos mediante el programa ImageJ. Los valores de integral de la fluorescencia se normalizaron al valor medio de la integral de la fluorescencia del ARNi control (RFPi). Se emplearon al menos 88 células de cada tratamiento y los datos se analizaron mediante el test no paramétrico “prueba de los rangos con signo de Wilcoxon” después de ordenar de menor a mayor un número idéntico de datos (80-100) para cada tratamiento (n=2).

Análisis de secuencia

La comparación entre las secuencias de las proteínas de la familia Cdk se llevó a cabo empleando el programa MegAlign (Lasergene DNASTar). Las secuencias se alinearon utilizando el Método Clustal W. Para llevar a cabo el alineamiento se usaron las secuencias de las proteínas Cdk1 de *Gallus gallus* (número de acceso: NP_990645.1), Cdk2 de *Gallus gallus* (número de acceso: NP_001186786.1), Cdk5 de *Gallus gallus* (número de acceso: NP_001129258.1), Cdk6 de *Gallus gallus* (número de acceso: NP_001007893.1) y Cdk4 de *Mus musculus* (número de acceso: NP_034000.1) debido a que no se ha secuenciado esta proteína en *Gallus gallus*.

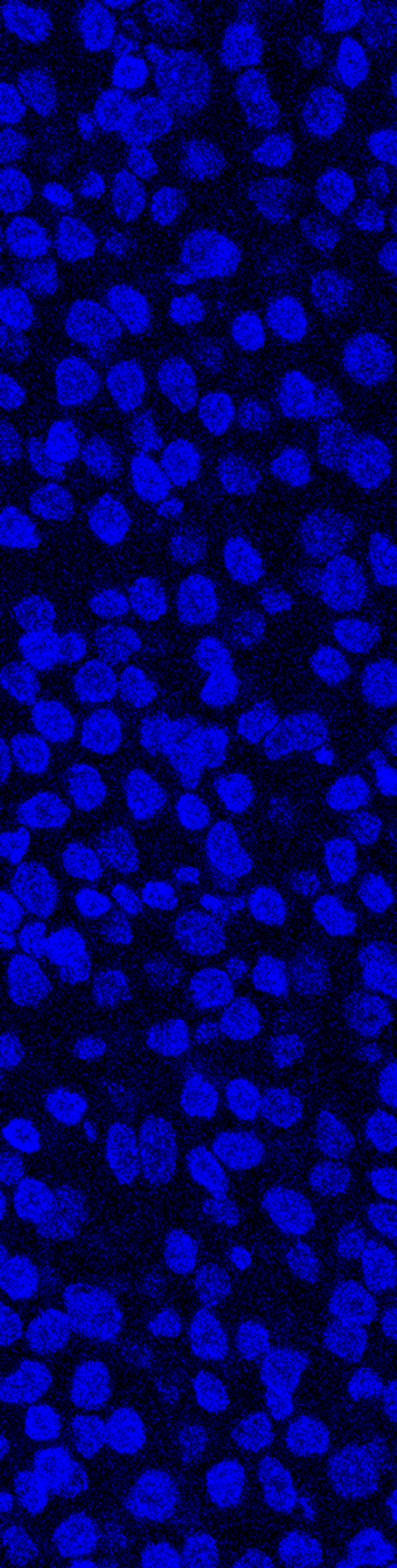
Para el análisis de la estructura terciaria de las proteínas se empleó el programa Cn3D 4.3 (NCBI).

Contaje celular

Las células se contaron empleando un microscopio Nikon Eclipse E80i con un objetivo 40 × con contraste de fase e iluminación epifluorescente. Se analizó un promedio de 100 a 400 células por cada punto experimental. Los núcleos mitóticos se identificaron morfológicamente (figuras mitóticas) mediante la tinción del ADN con 1 µg/ml de bisbencimida o con la tinción de la Histona H3 fosforilada usando un anti-pH3 (del inglés “Phosphorylated histone 3”) 1/1.000. Los niveles de apoptosis se cuantificaron usando criterios morfológicos, tras la tinción del núcleo con Bisb, como el porcentaje de células con núcleo picnótico. El resultado se muestra como la media ± sem (del inglés “Standard deviation of the mean”) de al menos 5 experimentos independientes.

Análisis estadísticos

Los datos cuantitativos se representaron como la media ± sem. Las diferencias estadísticas se analizaron mediante ANOVA, la prueba *t* de Student o la prueba de rangos de signo de Wilcoxon, según se indica en cada caso.



IV. RESULTADOS

1. *TrkB se expresa en una subpoblación de CGRs en proceso de diferenciación susceptible de convertirse en neuronas tetraploides.*

Para determinar el patrón de expresión de TrkB en la retina del embrión de pollo durante el periodo de tetraploidización de las CGRs (Morillo *et al.*, 2010), se fijaron embriones de pollo E5-6 y se realizaron criosecciones dorso-ventrales conteniendo la retina central, sobre las que se llevaron a cabo inmunotinciones con el anticuerpo anti-TrkB. Este análisis demostró que TrkB se expresa en una población de neuronas de la retina central que expresan Tubulina β III, un marcador de CGRs en este estadio de desarrollo (Watanabe *et al.*, 1991). Dichas neuronas están localizadas en la zona basal, próxima al cuerpo vítreo, donde reside la CCG prospectiva (Figura 15). Como cabría esperar, las células que expresan TrkB carecen de Rb, como las CGRs que reactivan el ciclo y se hacen tetraploides (Morillo *et al.*, 2010). Cuando llevamos a cabo dobles marcajes con los anticuerpos anti-TrkB y anti-Rb A, observamos que la mayoría de las CGRs que expresan TrkB carecen de expresión de Rb (69/86 n=2 embriones) y que, aquéllas positivas para Rb, expresan niveles muy bajos en comparación con los precursores (ver punta de flecha amarilla en la Figura 16). Las CGRs que expresan TrkB están situadas en la CCG prospectiva, localizada en el neuroepitelio basal de la retina, o próximas a ésta, mostrando un patrón similar al de las mitosis ectópicas en las células CGRs (Morillo *et al.*, 2010). Este hecho concuerda con la función observada de

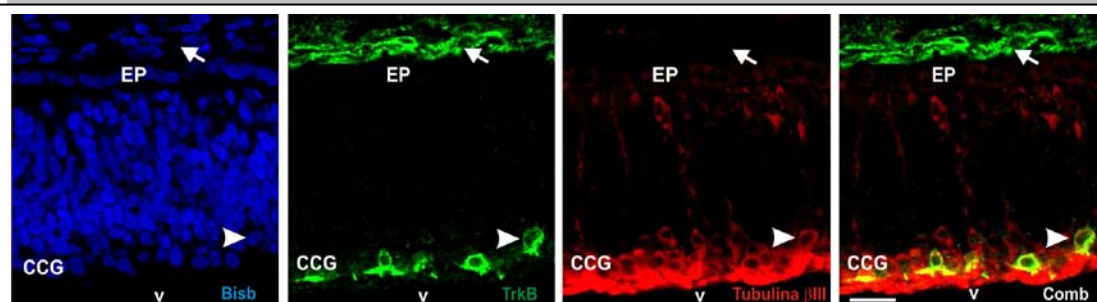


Figura 15. TrkB se expresa en una subpoblación de CGRs. Doble marcaje de secciones de retina de embrión de pollo E6 con los anticuerpos anti-TrkB (verde) y anti-Tubulina β III (rojo). Los núcleos se tiñeron con bisbencimida (Bisb, azul). La punta de flecha muestra un ejemplo de una CGR (positiva para Tubulina β III) que expresa TrkB. La flecha señala una célula TrkB positiva en el mesénquima. CCG: capa de células ganglionares; EP: epitelio pigmentario; v: cuerpo vítreo; Comb: Combinado de imágenes. Barra: 20 μ m.

BDNF en la prevención de la transición G2/M en las CGRs nacientes que reactivan el ciclo, que tiene lugar en la CCG (Morillo *et al.*, 2010).

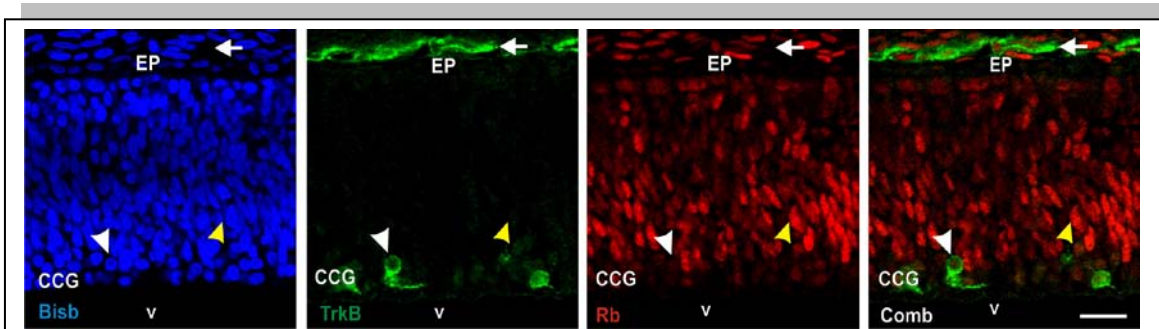


Figura 16. TrkB se expresa en una subpoblación de CGRs que carecen de Rb. Doble marcaje de secciones de retina de embrión de pollo E6 con los anticuerpos anti-TrkB (verde) y anti-Rb A (rojo). Las células que expresan TrkB no expresan Rb, al igual que sucede con las CGRs que se convierten en tetraploides. La punta de flecha blanca muestra un ejemplo de una célula que expresa TrkB pero expresa niveles de Rb prácticamente despreciables en comparación con los precursores (como indica la punta de flecha amarilla). La flecha señala una célula TrkB positiva en el mesénquima. Los núcleos se tiñeron con bisbencimida (Bisb, azul). CCG: capa de células ganglionares; EP: epitelio pigmentario; v: cuerpo vítreo; Comb: Combinado de imágenes. Barra: 20 μ m.

$p75^{NTR}$ es un marcador de diferenciación de las CGRs nacientes (Frade y Barde 1999; López-Sánchez *et al.*, 2011; Morillo *et al.*, 2010). Este receptor está presente en todas las CGRs en proceso de diferenciación y se ha demostrado que induce reactivación de ciclo en las CGRs que carecen de Rb (Morillo *et al.*, 2010). Por ello, llevamos a cabo inmunotinciones contra $p75^{NTR}$ para determinar si las CGRs que expresan TrkB son susceptibles de convertirse en tetraploides. Observamos que todas las células TrkB positivas expresan $p75^{NTR}$ (104/104 células analizadas, n=2). (Figura

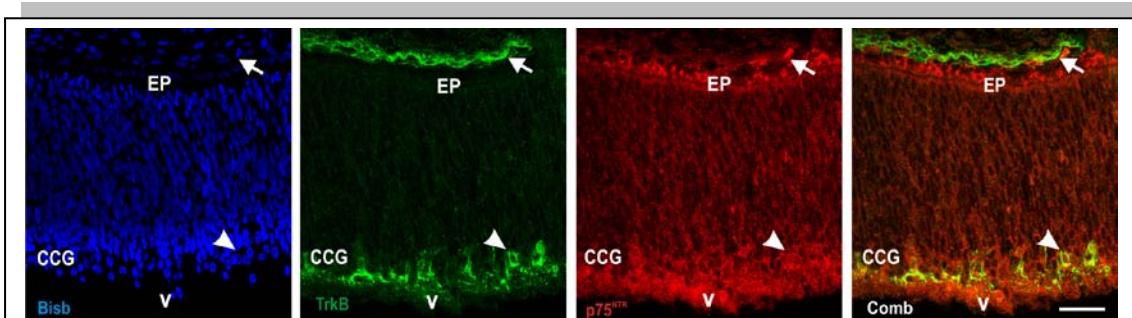
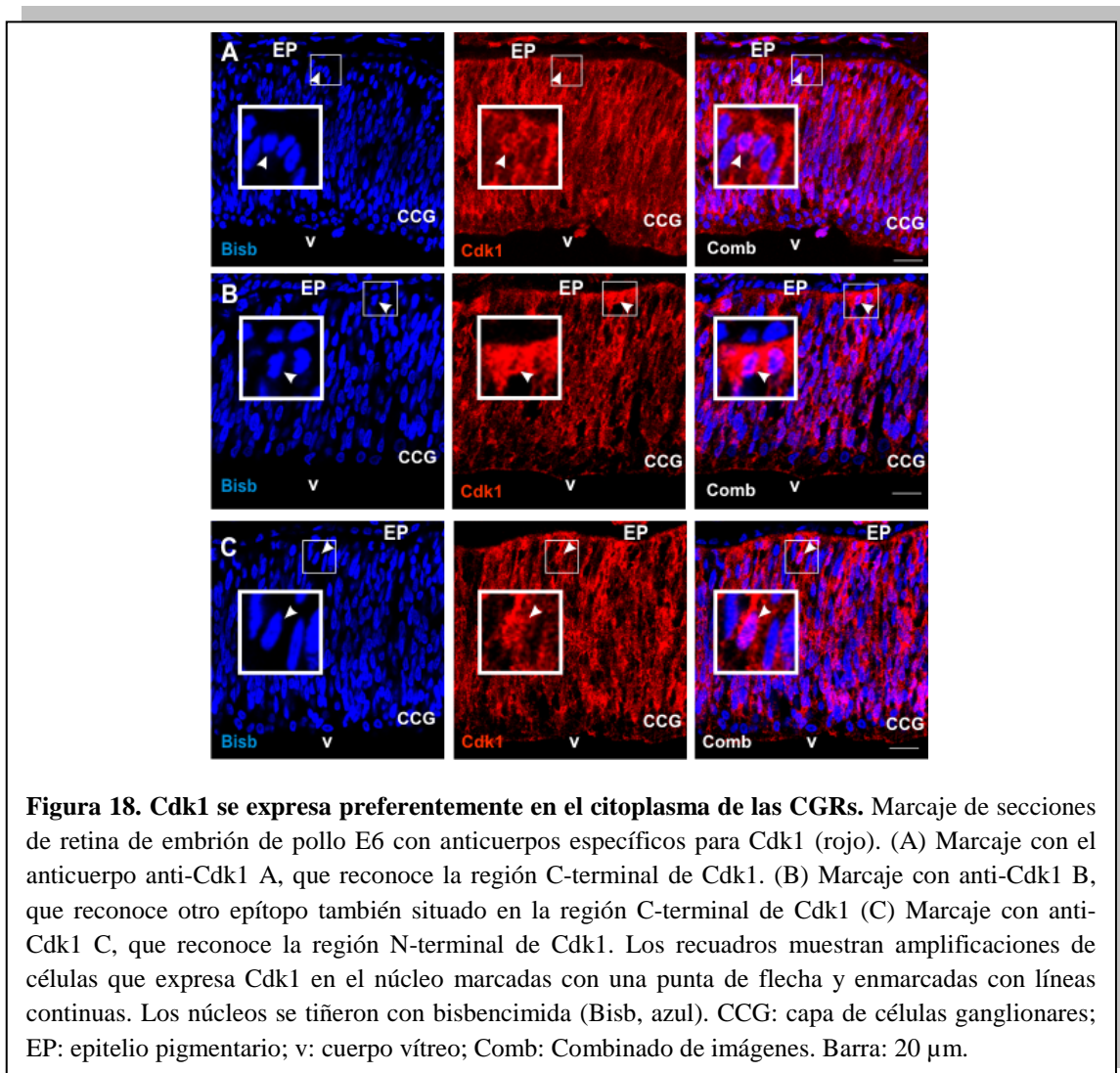


Figura 17. TrkB se expresa en una subpoblación de CGRs que presentan $p75^{NTR}$. Doble marcaje de secciones de retina de embrión de pollo E6 con los anticuerpos anti-TrkB (verde) y anti- $p75^B$ (rojo). La punta de flecha blanca muestra un ejemplo de una célula doble positiva para TrkB y $p75^{NTR}$. La flecha señala una célula TrkB positiva en el mesénquima. Los núcleos se tiñeron con bisbencimida (Bisb, azul). CCG: capa de células ganglionares; EP: epitelio pigmentario; v: cuerpo vítreo; Comb: Combinado de imágenes. Barra: 20 μ m.

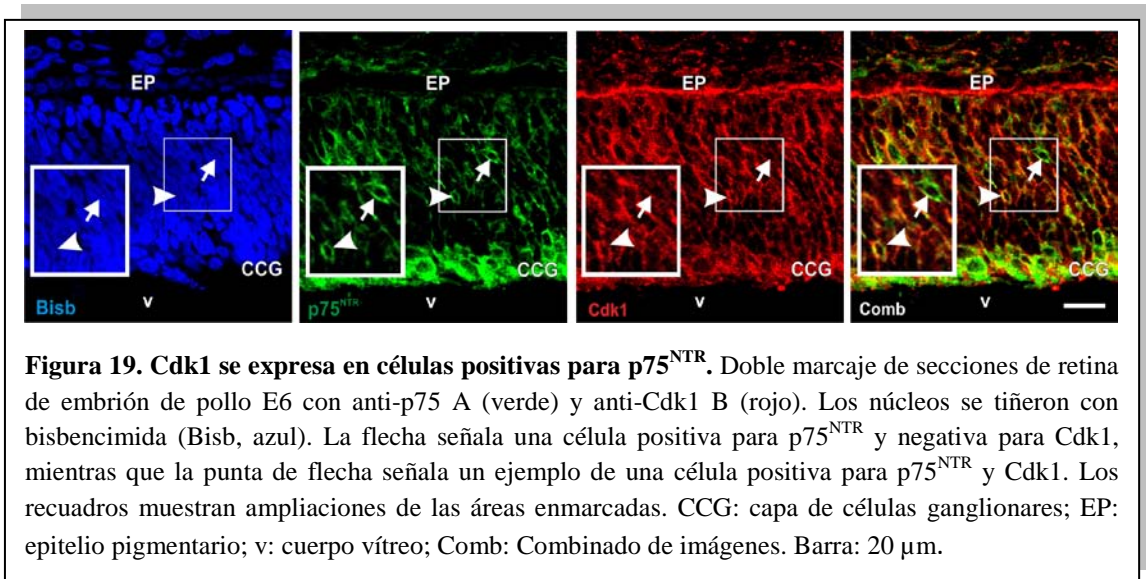
17). Por tanto, podemos concluir que las células TrkB positivas expresan p75^{NTR} y carecen de niveles apreciables de Rb, lo que indica que forman parte de una subpoblación de CGRs en proceso de tetraploidización.

2. *Cdk1 se expresa en las CGRs en proceso de diferenciación que llevan a cabo mitosis ectópicas in vivo.*

Dado que BDNF bloquea la transición G2/M en las células que han reactivado el ciclo (Morillo *et al.*, 2010), partimos de la hipótesis de que BDNF estaba causando este efecto a través de la Cdk responsable de dicha transición, Cdk1. Para confirmar dicha hipótesis comenzamos analizando el patrón de expresión de Cdk1 en la retina mediante anticuerpos que reconocen distintas regiones de la misma, incluyendo anti-Cdk1 A y B (Figuras 18A, B) que reconocen epítomos localizados en su región C-terminal y anti-



Cdk1 C, que reconoce una secuencia localizada en su región N-terminal (Figura 18C). El patrón de expresión de Cdk1 que hemos obtenido con los distintos anticuerpos es equivalente (Figuras 18A-C). Como cabría esperar, la localización de Cdk1 es preferentemente citoplásmica, ya que el complejo CC se localiza en el citoplasma durante G2 y migra al núcleo durante la Profase (Borgne *et al.*, 1999; De Souza *et al.*, 2000; Toyoshima-Morimoto *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998). En concordancia con este hecho, también observamos que Cdk1 se expresa en el núcleo de una pequeña parte de las células localizadas en la zona apical del neuroepitelio, donde se lleva a cabo la mitosis (Figuras 18A-C) (Baye y Link, 2008; Frade, 2002; Sauer, 1935).



Para confirmar que las CGRs en proceso de diferenciación expresan Cdk1, realizamos dobles tinciones con p75^{NTR}, como marcador temprano de CGRs en proceso de diferenciación. Observamos que Cdk1 co-localiza con p75^{NTR} en un $10.82 \pm 2.64\%$ (n=4) de las células que expresan p75^{NTR} (Figura 19), un porcentaje similar al de células que reactivan el ciclo y se hacen tetraploides (Morillo *et al.*, 2010). Como cabría esperar, Cdk1 está presente tanto en las mitosis apicales (específicas de precursores), como demostramos con el marcador de mitosis pH3, como en las mitosis ectópicas localizadas en la región basal del neuroepitelio (Figura 20). Estas últimas tienen lugar en CGRs tetraploides que han entrado en mitosis (Morillo *et al.*, 2010). También observamos que todas las células que expresan TrkB también expresan Cdk1 (98/98 células analizadas n=2 embriones) (Figura 21). Este hecho concuerda con la hipótesis de que BDNF está bloqueando la transición G2/M por efecto de Cdk1.

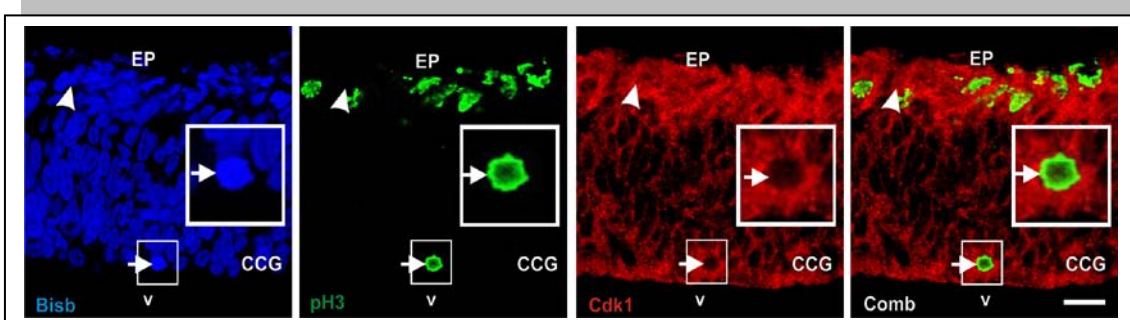


Figura 20. Cdk1 se expresa en mitosis ectópicas. Doble marcaje de las secciones de retina de embrión de pollo E6 con los anticuerpos anti-pH3 (verde) y anti-Cdk1 B (rojo). Los núcleos se tiñeron con bisbencimida (Bisb, azul). La flecha señala un ejemplo de mitosis ectópica que expresa Cdk1. Los recuadros muestran ampliaciones de las áreas enmarcadas. CCG: capa de células ganglionares; EP: epitelio pigmentario; v: cuerpo vítreo; Comb: Combinado de imágenes. Barra: 20 μ m.

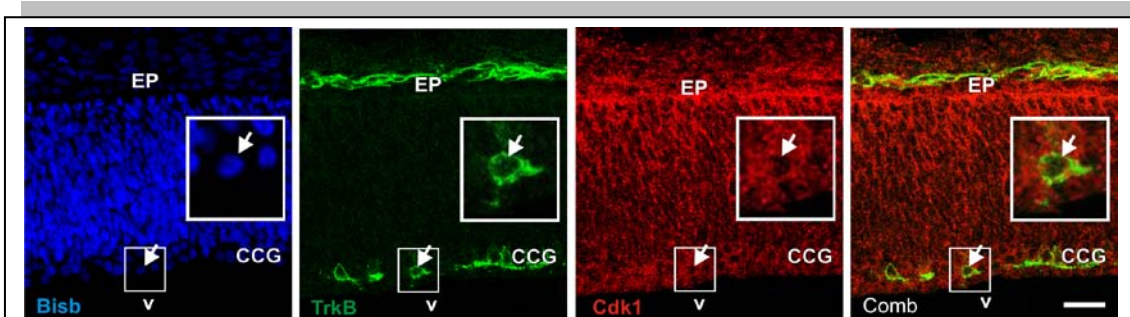


Figura 21. Cdk1 co-localiza con TrkB en CGRs. Doble marcaje de secciones de retina de embrión de pollo E6 con los anticuerpos anti-TrkB (verde) y anti-Cdk1 B (rojo). La flecha señala una CGR que expresa Cdk1. Los núcleos se tiñeron con bisbencimida (Bisb, azul). Los recuadros muestran ampliaciones de las áreas enmarcadas. CCG: capa de células ganglionares; EP: epitelio pigmentario; v: cuerpo vítreo; Comb: Combinado de imágenes. Barra: 40 μ m.

3. BDNF disminuye el nivel de expresión de la proteína Cdk1 en las CGRs, pero no afecta a los niveles de ARNm específico de Cdk1

Para determinar si el bloqueo de la transición G2/M inducido por BDNF en neuronas tetraploides (Morillo *et al.*, 2010) se debe a un descenso en los niveles de Cdk1, llevamos a cabo cultivos de retina de embrión de pollo E6 en condiciones neurogénicas, dando lugar a NRPDs. En estas condiciones se recapitula el proceso de diferenciación de CGRs *in vivo* (ver Introducción). No obstante, a pesar del gran parecido del sistema *in vitro* con la situación *in vivo*, la disociación de precursores causa

la expresión TrkB en todos ellos (Figura 22) facilitando los análisis de señalización dependientes de TrkB.

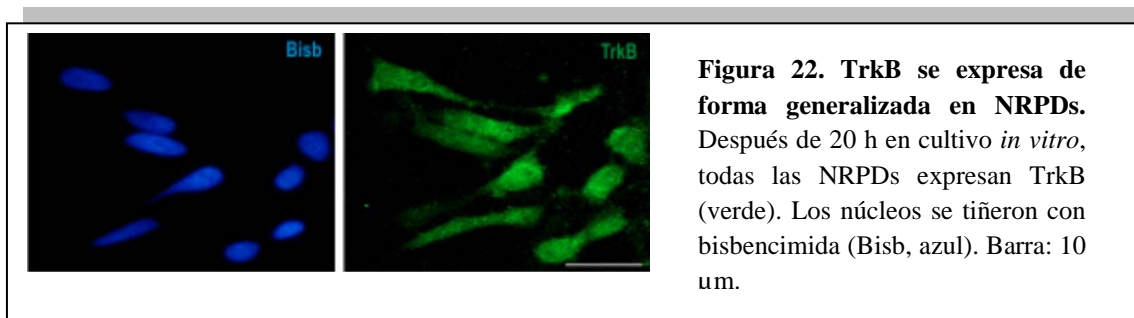


Figura 22. TrkB se expresa de forma generalizada en NRPDs. Después de 20 h en cultivo *in vitro*, todas las NRPDs expresan TrkB (verde). Los núcleos se tiñeron con bisbencimida (Bisb, azul). Barra: 10 μ m.

3.1 BDNF disminuye los niveles de proteína Cdk1 en las NRPDs

Para analizar si BDNF puede inhibir la expresión de la proteína Cdk1, las NRPDs se cultivaron durante 20 h en presencia de NGF (100 ng/ml) y/o BDNF (2 ng/ml) y sus extractos se analizaron mediante WB con el anticuerpo anti-Cdk1 C. La presencia de NGF (100 ng/ml) facilita la reactivación del ciclo celular (Frade, 2000). Este análisis demostró que BDNF provoca la disminución de los niveles de proteína Cdk1 en las NRPDs (Figuras 23A, B), reduciendo en un 40% los niveles de dicha

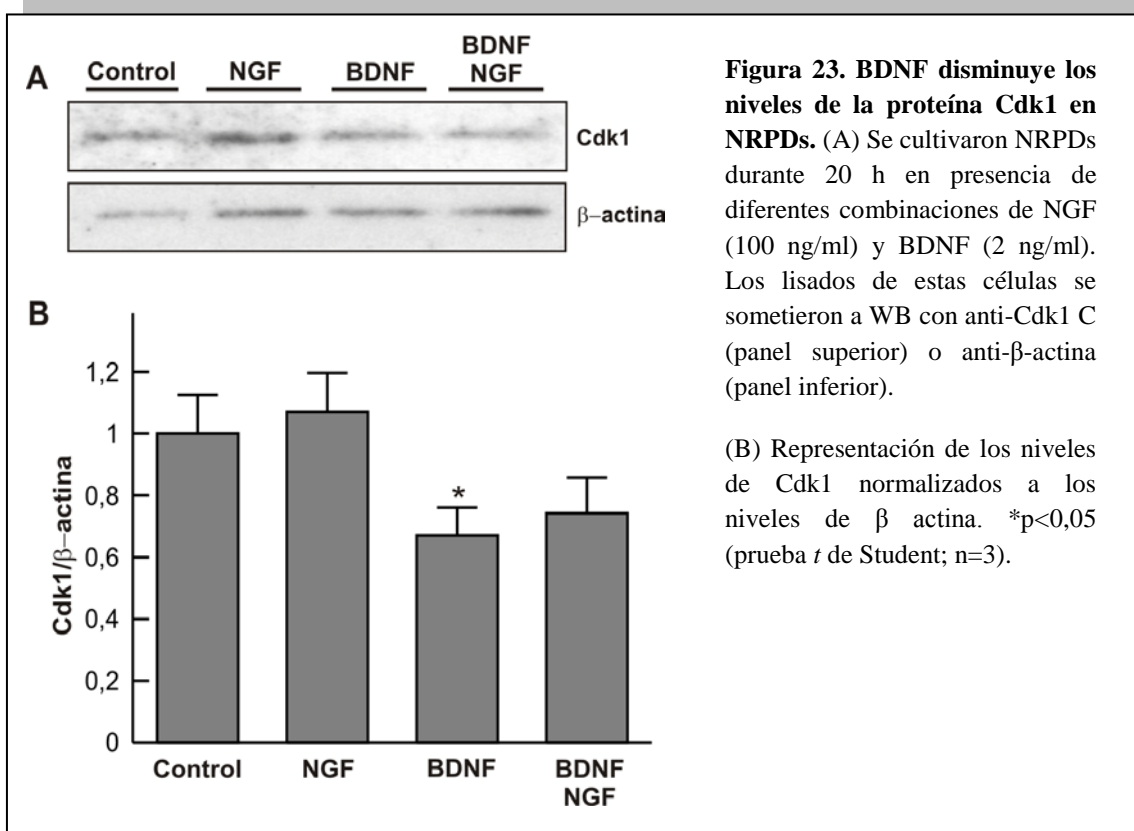


Figura 23. BDNF disminuye los niveles de la proteína Cdk1 en NRPDs. (A) Se cultivaron NRPDs durante 20 h en presencia de diferentes combinaciones de NGF (100 ng/ml) y BDNF (2 ng/ml). Los lisados de estas células se sometieron a WB con anti-Cdk1 C (panel superior) o anti- β -actina (panel inferior).

(B) Representación de los niveles de Cdk1 normalizados a los niveles de β actina. * $p < 0,05$ (prueba *t* de Student; $n=3$).

proteína respecto al control. La reducción parcial de Cdk1 en respuesta a BDNF sugiere que la parada de la transición G2/M inducida por esta neurotrofina en las NRPDs (Frade, 2000) debe utilizar también mecanismos complementarios.

3.2 La disminución de niveles de Cdk1 provocada por BDNF en las NRPDs es un proceso generalizado

Dado que BDNF disminuye los niveles de proteína Cdk1 en un 40%, este descenso podría explicarse debido a una bajada parcial generalizada de dicha proteína en todas las NRPDs o, alternativamente, a una inhibición total en una determinada población de NRPDs. Para verificar cuál de estas dos posibilidades es la correcta se llevó a cabo un análisis por ICQ con el anticuerpo anti-Cdk1 B en NRPDs tratadas con BDNF (2 ng/ml) o vehículo. Este estudio demostró que todas las células en cultivo son capaces de responder a BDNF, disminuyendo por igual sus niveles de Cdk1 después de ser tratadas con BDNF durante 20 h (Figura 24).

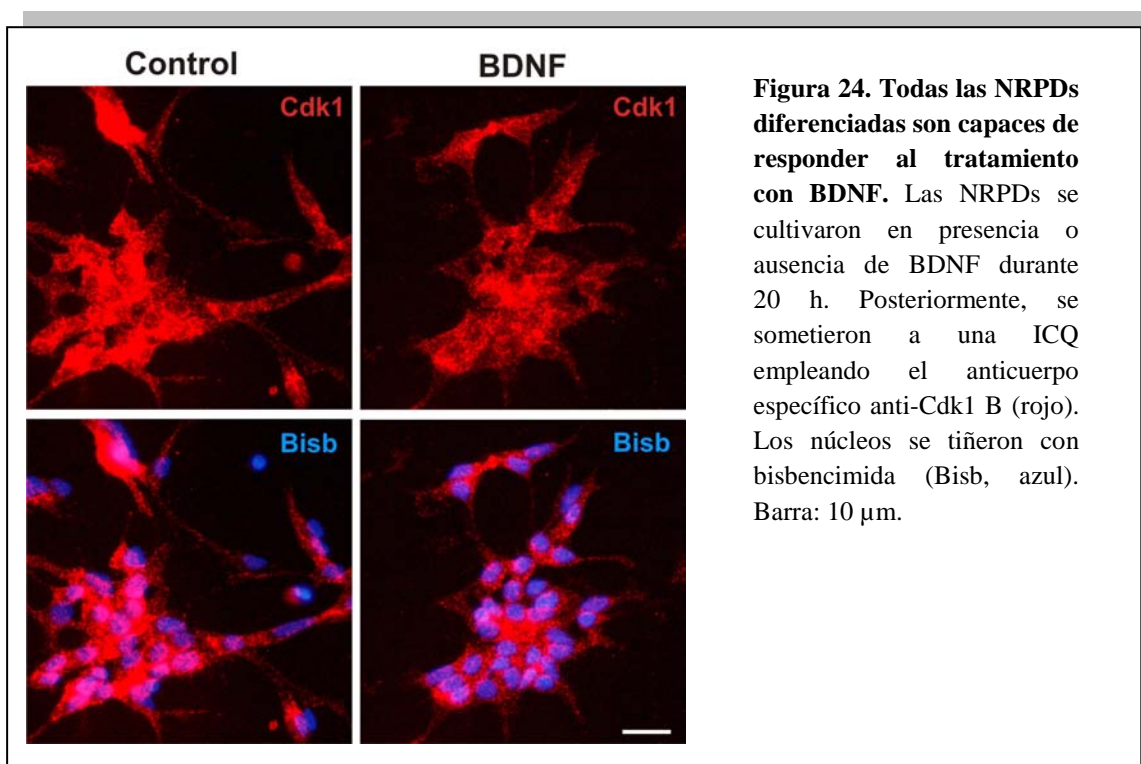
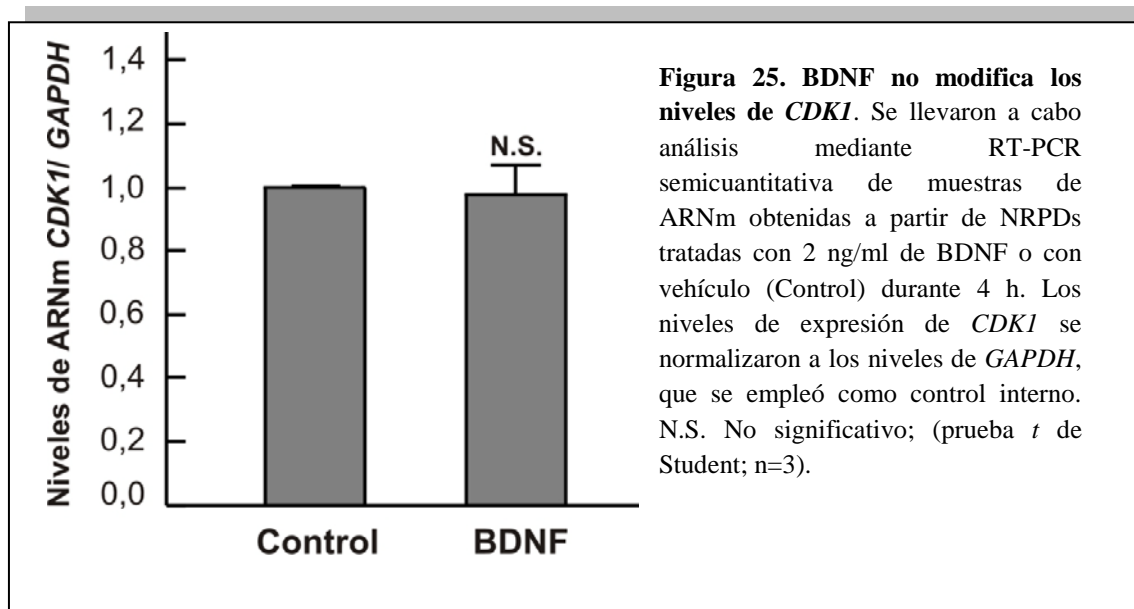


Figura 24. Todas las NRPDs diferenciadas son capaces de responder al tratamiento con BDNF. Las NRPDs se cultivaron en presencia o ausencia de BDNF durante 20 h. Posteriormente, se sometieron a una ICQ empleando el anticuerpo específico anti-Cdk1 B (rojo). Los núcleos se tiñeron con bisbencimida (Bisb, azul). Barra: 10 μ m.

3.3 BDNF no modifica los niveles de expresión del ARNm específico de *CDK1*

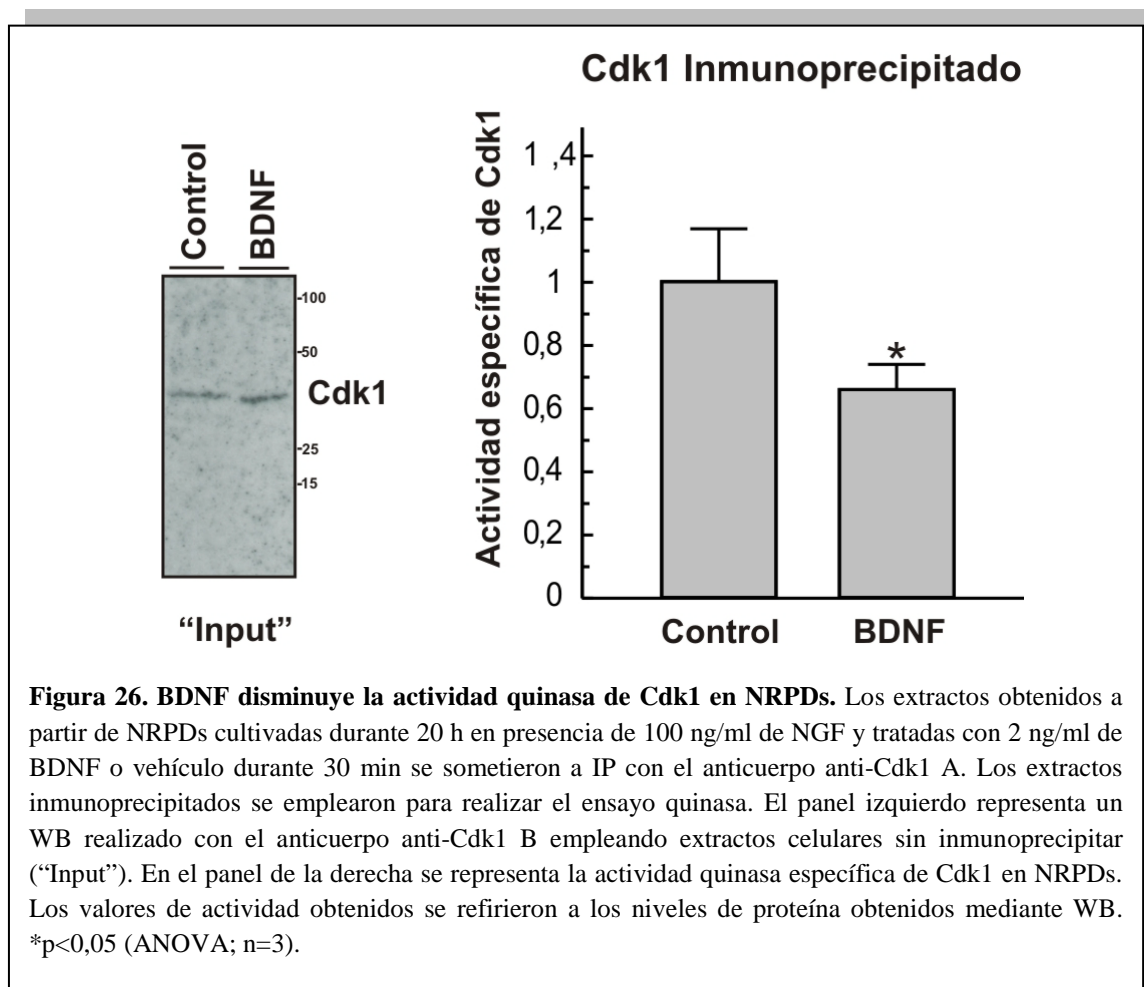
Dado que hemos observado que BDNF disminuye los niveles de proteína Cdk1, nos planteamos si esta disminución se puede justificar por una disminución en los niveles de su ARNm. Con este fin, realizamos una extracción de ARNm a partir de NRPDs cultivadas durante 4 h, que empleamos para sintetizar ADNc. Este ADNc se amplificó con cebadores específicos para *CDK1*. Analizando los niveles de expresión de *CDK1* en presencia o ausencia de BDNF (2 ng/ml) (Figura 25), observamos que los niveles de ARNm no se ven afectados por la presencia de BDNF, referidos a los niveles de *GAPDH*. Por lo tanto, podemos concluir que BDNF no modifica los niveles de ARNm de *CDK1*.



4. BDNF disminuye la actividad específica de *Cdk1* en NRPDs

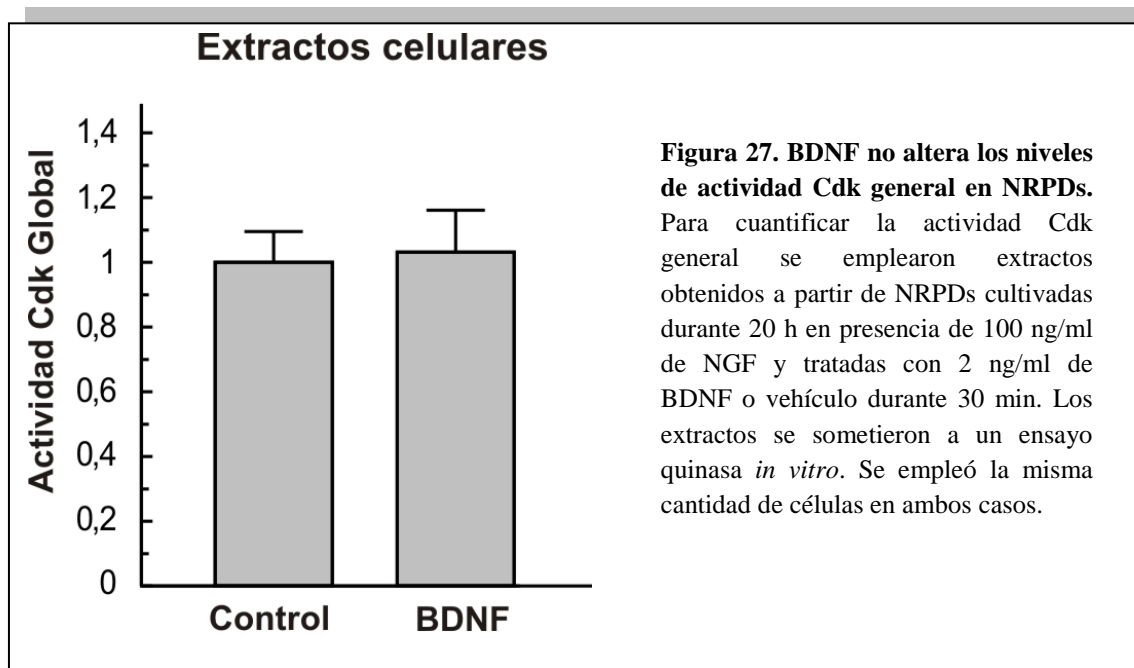
La disminución del 40% en los niveles de proteína Cdk1, inducida por BDNF, no explica *per se* la parada en G2/M. Por tanto, es probable que existan otros mecanismos adicionales que actúen sobre la actividad específica de Cdk1. Para verificar si BDNF es capaz de disminuir la función de Cdk1, se llevó a cabo un ensayo de actividad en extractos de NRPDs cultivadas durante 20 h en presencia de NGF (100 ng/ml) y tratadas durante 30 min con BDNF (2 ng/ml) o vehículo. Para tal efecto

recurrimos a un ensayo quinasa basado en la capacidad de Cdk1, Cdk2 y Cdk4 para fosforilar *in vitro* una secuencia peptídica de Rb (Suzuki *et al.*, 2002). Para dotar de especificidad a dicho ensayo, inmunoprecipitamos Cdk1 con un anticuerpo específico de dicha quinasa (anti-Cdk1 A). La actividad quinasa se normalizó a los niveles de proteína Cdk1 presentes en alícuotas del extracto sin inmunoprecipitar (Figura 26, panel de la izquierda).



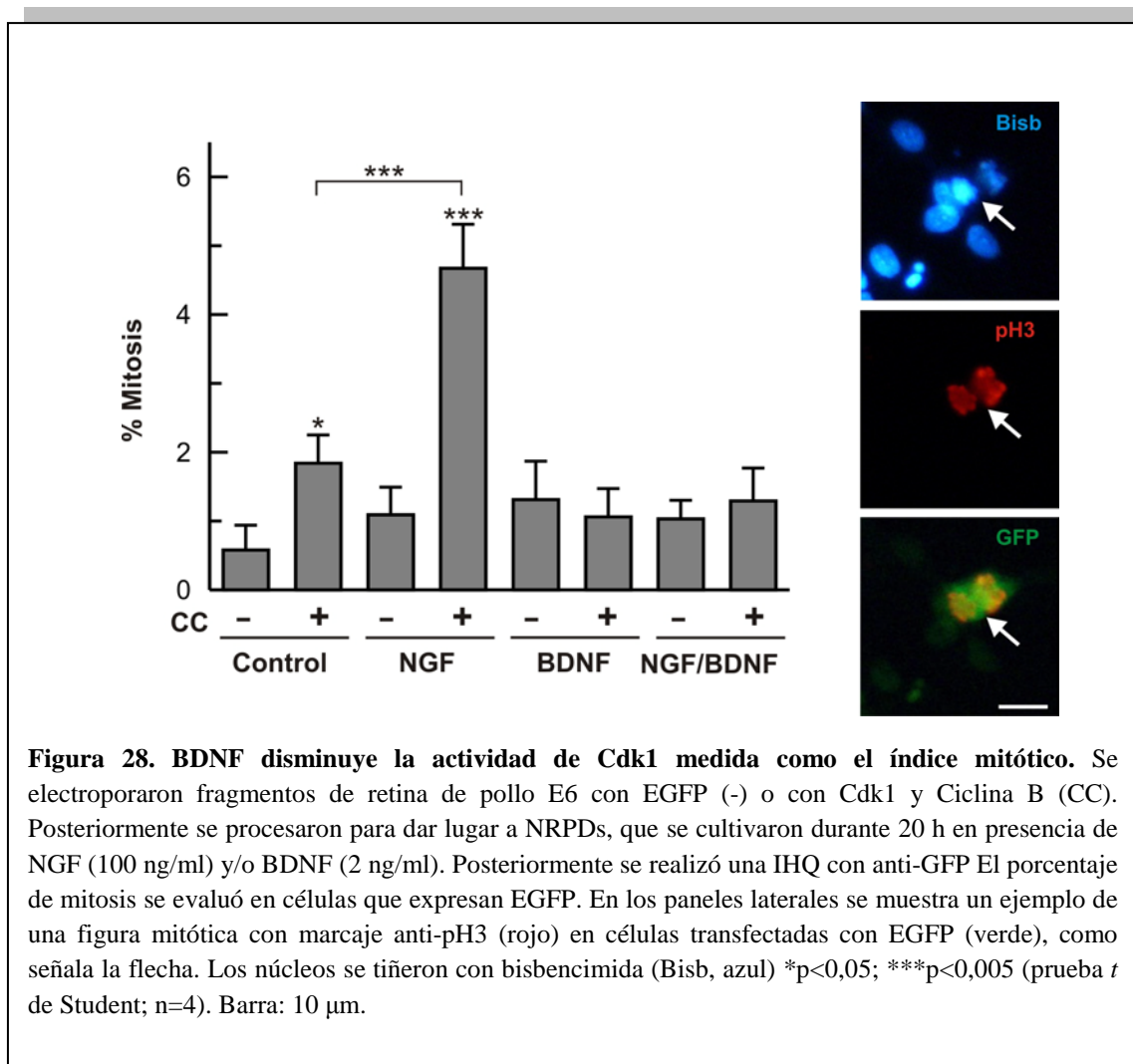
Este análisis demostró que el tratamiento de las células con BDNF a concentraciones específicas para activar a TrkB (2 ng/ml) produce una disminución significativa de la actividad de Cdk1 (Figura 26, panel de la derecha). Sin embargo, cuando se emplearon los extractos originales conteniendo Cdk1, Cdk2 y Cdk4 directamente para el ensayo de ELISA, observamos que la presencia de BDNF en el medio de cultivo no producía diferencias significativas en la actividad Cdk general (Figura 27). Este hecho demuestra que el efecto de BDNF es específico de Cdk1. En

conclusión, estos resultados confirman que BDNF no sólo afecta a los niveles de expresión de Cdk1 en las NRPDs, sino que también altera su actividad en estas células.



5. Regulación post-traducciona l de Cdk1 mediante BDNF.

La disminución de la actividad de Cdk1 en NRPDs podría deberse a la disminución de expresión de Ciclina B2 cuando estas células son tratadas con BDNF (Frade, 2000). Sin embargo, no se puede descartar que la modificación post-traducciona l de Cdk1 esté involucrada también en la reducción de la actividad de Cdk1. Para demostrar esta hipótesis, se electroporaron fragmentos de retina de embrión de pollo E6 con vectores de expresión pIRES-EGFP que contenían Cdk1 y Ciclina B1. Las células se cultivaron durante 20 h en presencia de BDNF (2 ng/ml) y NGF (100 ng/ml). Dado que se conoce que la activación de Cdk1 ectópica en células que expresan Ciclina B1 causa un aumento del porcentaje de células en mitosis (Norbury *et al.*, 1991), decidimos emplear el índice mitótico como medida indirecta de la actividad Cdk1. Este análisis demostró que NGF favorece la presencia de figuras mitóticas en las células transfectadas (Figura 28) mientras que el tratamiento con BDNF evita este efecto.



Este resultado concuerda con datos previamente publicados en los que se demuestra que BDNF previene la mitosis en las NRPDs y su subsecuente muerte por apoptosis (Frade, 2000; Morillo *et al.*, 2010). De hecho, el tratamiento con BDNF (2 ng/ml) es capaz de inhibir la apoptosis dependiente de re-entrada en ciclo celular en estas células (Figura 29). En conjunto, estos resultados indican que BDNF puede modificar la actividad de Cdk1 independientemente de su capacidad para la modificar la expresión de Cdk1 y de Ciclina B1, ya que esta neurotrofina puede inducir la parada en la transición G2/M y prevenir muerte celular en NRPDs que expresan el complejo CC de manera exógena.

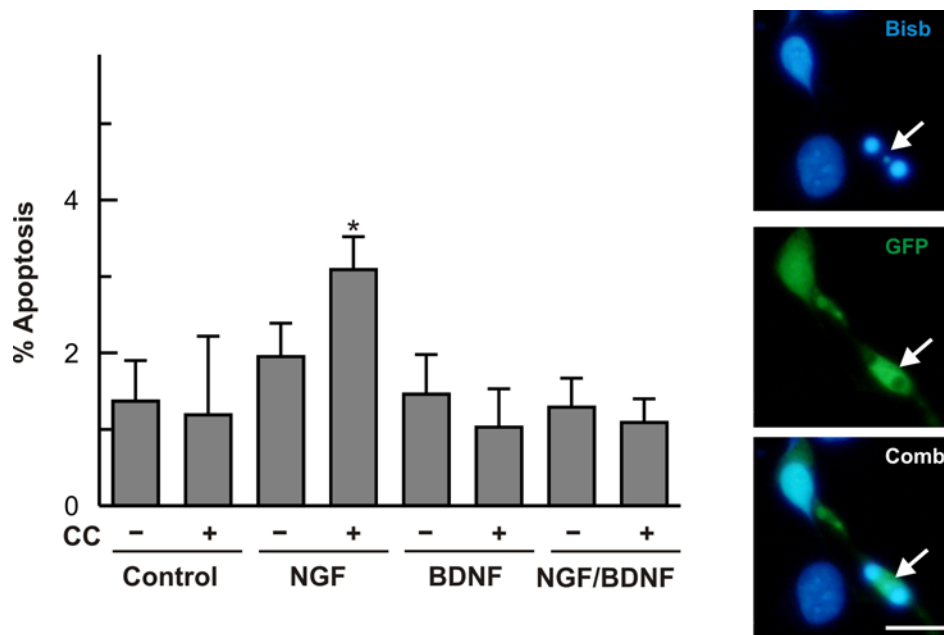


Figura 29. BDNF inhibe la muerte por apoptosis en NRPDs subsiguiente a la mitosis. Se electroporaron fragmentos de retina de pollo E6 con EGFP (-) o con Cdk1/Ciclina B (CC). Posteriormente, se procesaron para dar lugar a NRPDs, que se cultivaron durante 20 h en presencia de NGF (100 ng/ml) y/o BDNF (2 ng/ml). Posteriormente, se realizó una IHQ con anti-GFP. El porcentaje de núcleos picnóticos se evaluó en células que expresan GFP. En los paneles laterales se muestra un ejemplo de un núcleo picnótico en células transfectadas con GFP, como señala la flecha. Los núcleos se tiñeron con bisbencimida (Bisb, azul). Comb: Combinado de imágenes. * $p < 0,05$ (prueba t de Student; $n=4$). Barra: 10 μm .

5.1 BDNF induce la fosforilación de Cdk1 en su Tyr15 provocando una inhibición de su actividad

Para descifrar el mecanismo por el cual BDNF disminuye la actividad de Cdk1 en NRPDs tratadas con NGF, nos basamos en un estudio previo que demostraba que la activación de TrkB por BDNF induce la fosforilación de Cdk5 en su Tyr15 (Cheung *et al.*, 2007). A pesar de que Cdk5 no participa directamente en el ciclo celular, interviene en otros procesos que incluyen la migración neuronal, la apoptosis, el transporte en membranas de señalización dopaminérgica y la regulación de la estructura del sistema nervioso central y del citoesqueleto (Kawauchi *et al.*, 2013; Nebreda, 2006; Zhang *et al.*, 2007). La región N-terminal de Cdk5 está conservada con la de Cdk1, de modo que la Tyr15 se mantiene en ambas quinasas (Figura 5) (Zhang *et al.*, 2011b). No obstante, la fosforilación de la Tyr15 en Cdk5 es activadora, mientras que la fosforilación del

residuo equivalente en Cdk1 es inhibitoria, previniendo la transición G2/M (Norbury *et al.*, 1991). Por lo tanto, postulamos que BDNF a través de TrkB, podría inducir la fosforilación de la Tyr15 de Cdk1, inhibiendo su actividad y causando la parada de la transición G2/M en las NRPDs tratadas con NGF (Figura 30).

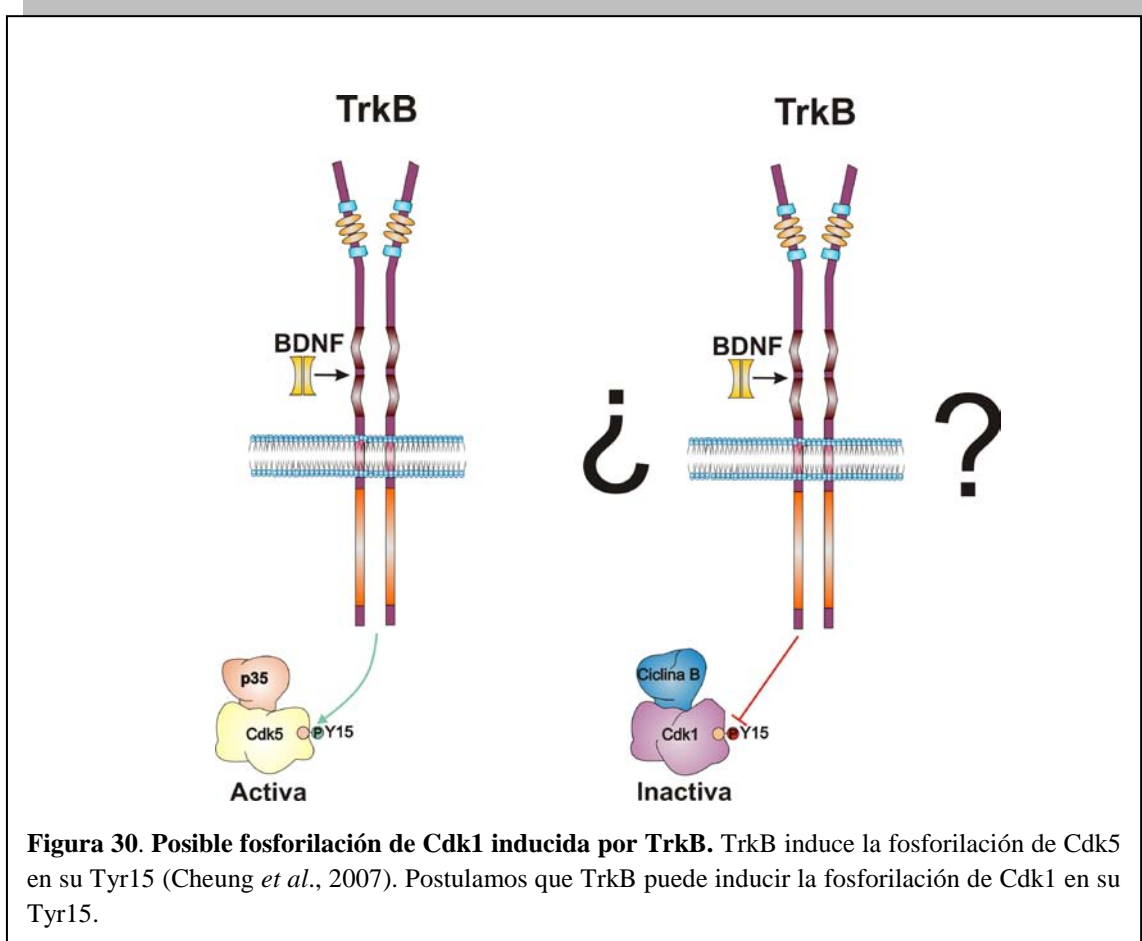


Figura 30. Posible fosforilación de Cdk1 inducida por TrkB. TrkB induce la fosforilación de Cdk5 en su Tyr15 (Cheung *et al.*, 2007). Postulamos que TrkB puede inducir la fosforilación de Cdk1 en su Tyr15.

Para verificar esta hipótesis no pudimos realizar WB empleando los anticuerpos anti-pCdk1 Tyr15 dado que la Tyr15 se encuentra en la región reguladora de Cdk1, cuya secuencia está conservada en Cdk2, lo que impide detectar específicamente a pCdk1 Tyr15 (Figura 5) (Zhang *et al.*, 2011b). Por ello, decidimos llevar a cabo experimentos de IP usando extractos de NRPDs tratados con NGF (100 ng/ml) y BDNF (2 ng/ml) o vehículo, empleando un anticuerpo que reconoce de manera específica a Cdk1 (anti-Cdk1 A), seguido de WB con anti-pCdk1 Tyr15 A. Al realizar una IP control con tampón de lisis, las resinas de afinidad de distintas casas comerciales [Proteína A Sefarosa (GE Healthcare), Proteína A Agarosa (Invitrogen), Proteína G Sefarosa (GE Healthcare)] (Figura 31, carriles 2, 3 y 4 respectivamente) presentaban

todas ellas impurezas que podían ser reconocidas por el anticuerpo anti-pCdk1 Tyr15 A, dando lugar a bandas contaminantes en el WB. El empleo de un anticuerpo anti-pCdk1 Tyr15 alternativo (anti-pCdk1 Tyr15 B) (Figura 31C) o de un anticuerpo secundario de una casa comercial diferente (Figura 31D) no promovió la desaparición de las bandas contaminantes. Por esta razón, decidimos utilizar un método alternativo a la IP para detectar pCdk1 Y15.

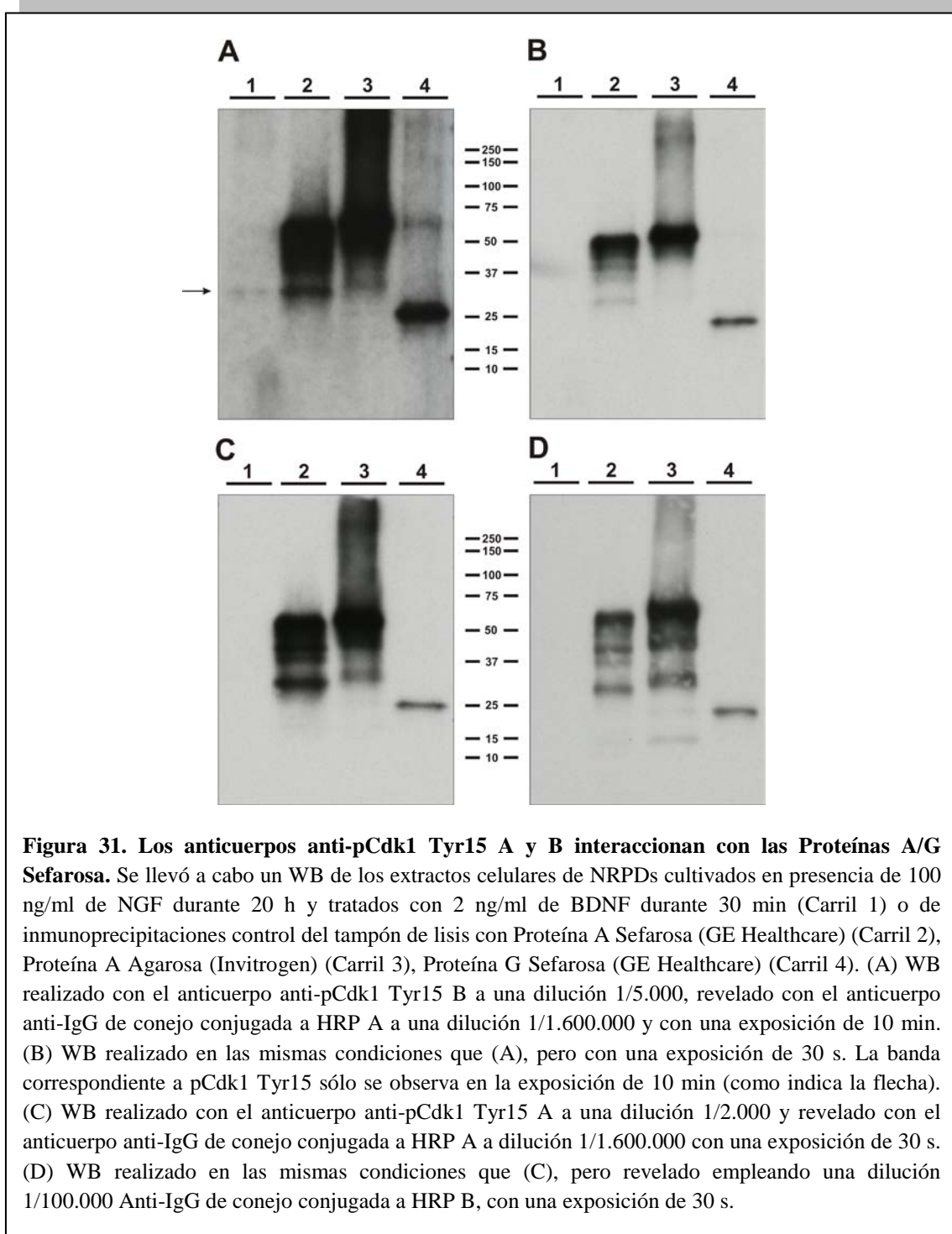
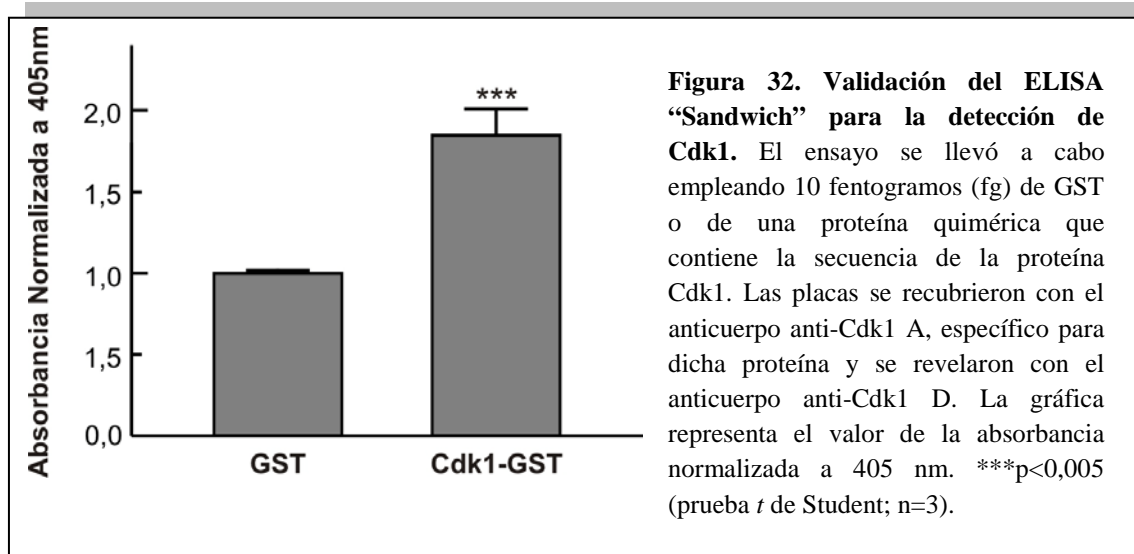


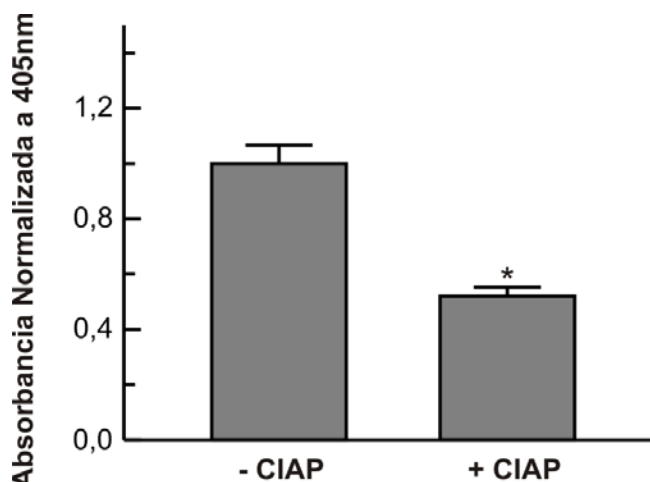
Figura 31. Los anticuerpos anti-pCdk1 Tyr15 A y B interaccionan con las Proteínas A/G Sefarosa. Se llevó a cabo un WB de los extractos celulares de NRPDs cultivados en presencia de 100 ng/ml de NGF durante 20 h y tratados con 2 ng/ml de BDNF durante 30 min (Carril 1) o de inmunoprecipitaciones control del tampón de lisis con Proteína A Sefarosa (GE Healthcare) (Carril 2), Proteína A Agarosa (Invitrogen) (Carril 3), Proteína G Sefarosa (GE Healthcare) (Carril 4). (A) WB realizado con el anticuerpo anti-pCdk1 Tyr15 B a una dilución 1/5.000, revelado con el anticuerpo anti-IgG de conejo conjugada a HRP A a una dilución 1/1.600.000 y con una exposición de 10 min. (B) WB realizado en las mismas condiciones que (A), pero con una exposición de 30 s. La banda correspondiente a pCdk1 Tyr15 sólo se observa en la exposición de 10 min (como indica la flecha). (C) WB realizado con el anticuerpo anti-pCdk1 Tyr15 A a una dilución 1/2.000 y revelado con el anticuerpo anti-IgG de conejo conjugada a HRP A a dilución 1/1.600.000 con una exposición de 30 s. (D) WB realizado en las mismas condiciones que (C), pero revelado empleando una dilución 1/100.000 Anti-IgG de conejo conjugada a HRP B, con una exposición de 30 s.

Debido a los problemas descritos anteriormente, decidimos emplear un ensayo ELISA “Sandwich” específico de Cdk1 para confirmar si se produce fosforilación de Cdk1 en su Tyr15 en respuesta a BDNF. Se confirió especificidad para Cdk1 a dicho ensayo al adsorber al plástico de los pocillos de la placa el anticuerpo anti-Cdk1 A, que reconoce específicamente la región C-terminal de Cdk1. A su vez, la Tyr15 fue detectada con el anticuerpo anti-pCdk1 Tyr15 A. Como control para normalizar los niveles de Cdk1 unidos a anti-Cdk1 A, se empleó el anti-Cdk1 D, que reconoce el dominio PSTAIRE de dicha proteína. Los ensayos ELISA “Sandwich” se llevaron a cabo empleando extractos celulares derivados de NRPDs cultivadas durante 20 h en presencia de NGF a 100 ng/ml o 1 ng/ml y con un tratamiento de BDNF durante 30 min previamente a la lisis. Este ensayo puede detectar específicamente una proteína quimérica Cdk1-GST, comparada con el péptido GST (del inglés “Glutathionine S-transferase”) (Santos *et al.*, 2012a) como control negativo (Figura 32).



El ensayo también puede detectar específicamente Cdk1 fosforilado en la Tyr15 ya que la señal se redujo significativamente cuando los extractos de NRPDs tratados con NGF (100 ng/ml) y BDNF (2 ng/ml) fueron incubados con fosfatasa alcalina (Figura 33).

Figura 33. Validación del ELISA “Sandwich” para la detección de pCdk1 Y15. El ensayo se llevó a cabo empleando extractos de NRPDs cultivadas durante 20 h en presencia de 100 ng/ml de NGF y tratados durante 30 min con 2 ng/ml de BDNF, incubados en presencia o ausencia de fosfatasa alcalina (CIAP, del inglés “Calf intestinal alkaline phosphatase”). Las placas se recubrieron con el anticuerpo anti-Cdk1 A, específico para dicha proteína y el ELISA fue revelado empleando el anticuerpo anti-pCdk1 Tyr15 A. La gráfica representa el valor de la absorbancia normalizada a 405 nm. * $p < 0,05$ (prueba *t* de Student; $n=3$).



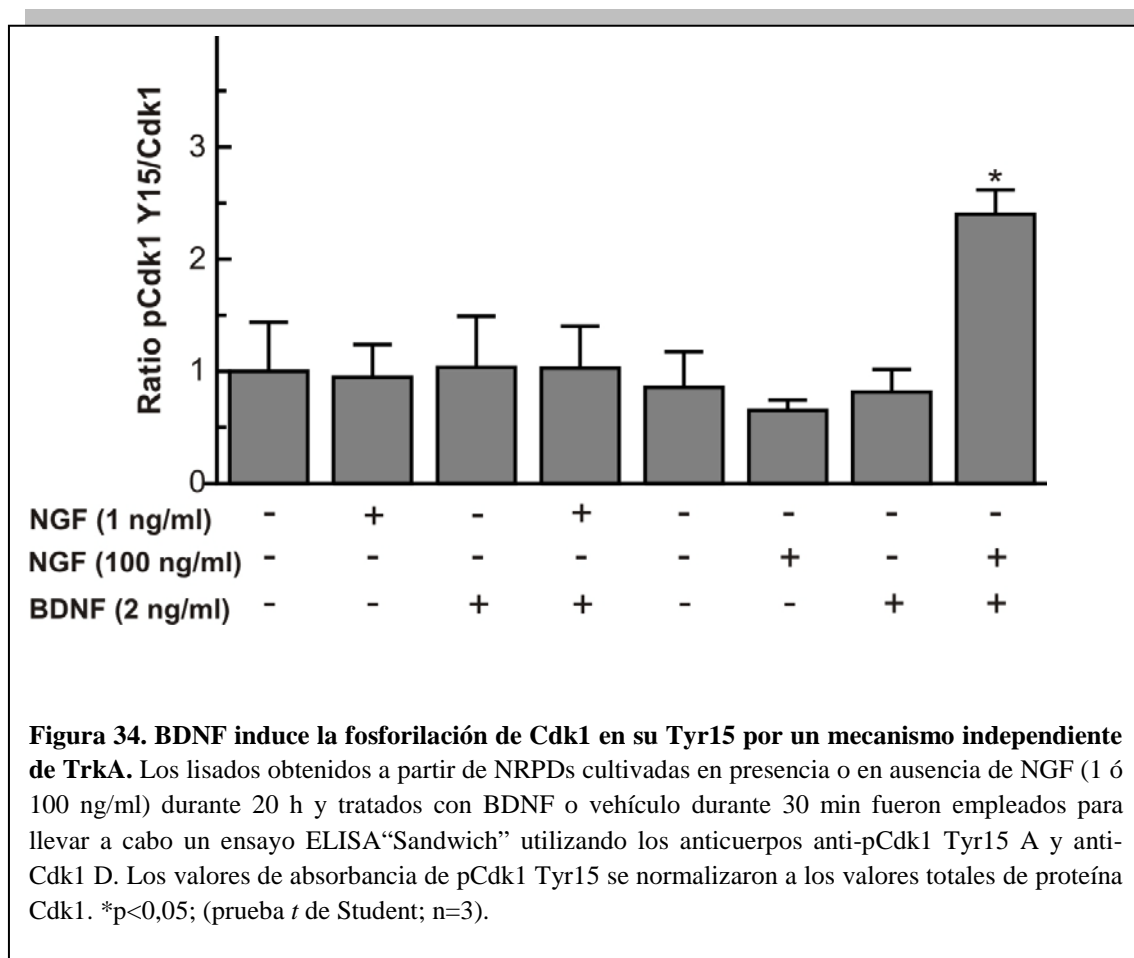
5.1.1 BDNF induce la fosforilación de Cdk1 en su Tyr15

El ensayo de ELISA demostró que los niveles de pCdk1 Tyr15 aumentan significativamente en cultivos de NRPDs tratadas con NGF (100 ng/ml) y BDNF (2 ng/ml) (Figura 34), explicando la capacidad de BDNF para bloquear la transición de G2/M en las NRPDs tratadas con NGF. Dicha fosforilación requiere la participación de BDNF y NGF ya que no tiene lugar en el tratamiento con BDNF (Figura 34).

5.1.2 TrkA no está involucrada en la fosforilación de Cdk1 en su Tyr15

Dado que la fosforilación de Cdk1 en su Tyr15 requiere la participación tanto de NGF como de BDNF, quisimos dilucidar si TrkA está involucrado en este proceso. Aunque NGF puede inducir señalización a través de TrkA a 1 ng/ml (Kaplan *et al.*, 1991), esta concentración es inferior a la necesaria para provocar la re-entrada en ciclo dependiente de $p75^{\text{NTR}}$ en NRPDs (Frade, 2000). Cabe destacar que el tratamiento con NGF a 1 ng/ml y con BDNF no provoca la fosforilación de la Tyr15 (Figura 34). Por

tanto, este hecho sugiere que la fosforilación de la Tyr15 de Cdk1 requiere la reactivación del ciclo celular a través de p75^{NTR}.



5.1.2 BDNF induce la fosforilación de la Tyr15 por un mecanismo independiente de Wee1

En las células proliferantes, la quinasa Wee1 es la responsable de la fosforilación de la Tyr15 de Cdk1 durante G2 (Parker y Piwnicka-Worms, 1992). Para determinar si dicha proteína está involucrada en la fosforilación de la Tyr15 inducida por BDNF, empleamos el inhibidor MK-1775 selectivo para Wee1 (Hirai *et al.*, 2009). Este análisis demostró que la fosforilación de Cdk1 en NRPDs es independiente de Wee1 ya que el tratamiento con MK-1775 fue incapaz de bloquear significativamente dicha fosforilación (Figura 35). En cambio, el tratamiento de CEFs con MK-1775 indujo un claro descenso en los niveles de pCdk1 Tyr15 (80% respecto al control) (Figura 36). Estos resultados demuestran que la inhibición de Wee1 impide la fosforilación de la

Tyr15 de Cdk1 en células proliferantes, pero es incapaz de bloquear la fosforilación de la Tyr15 en NRPDs mantenidas con NGF al ser tratadas con BDNF.

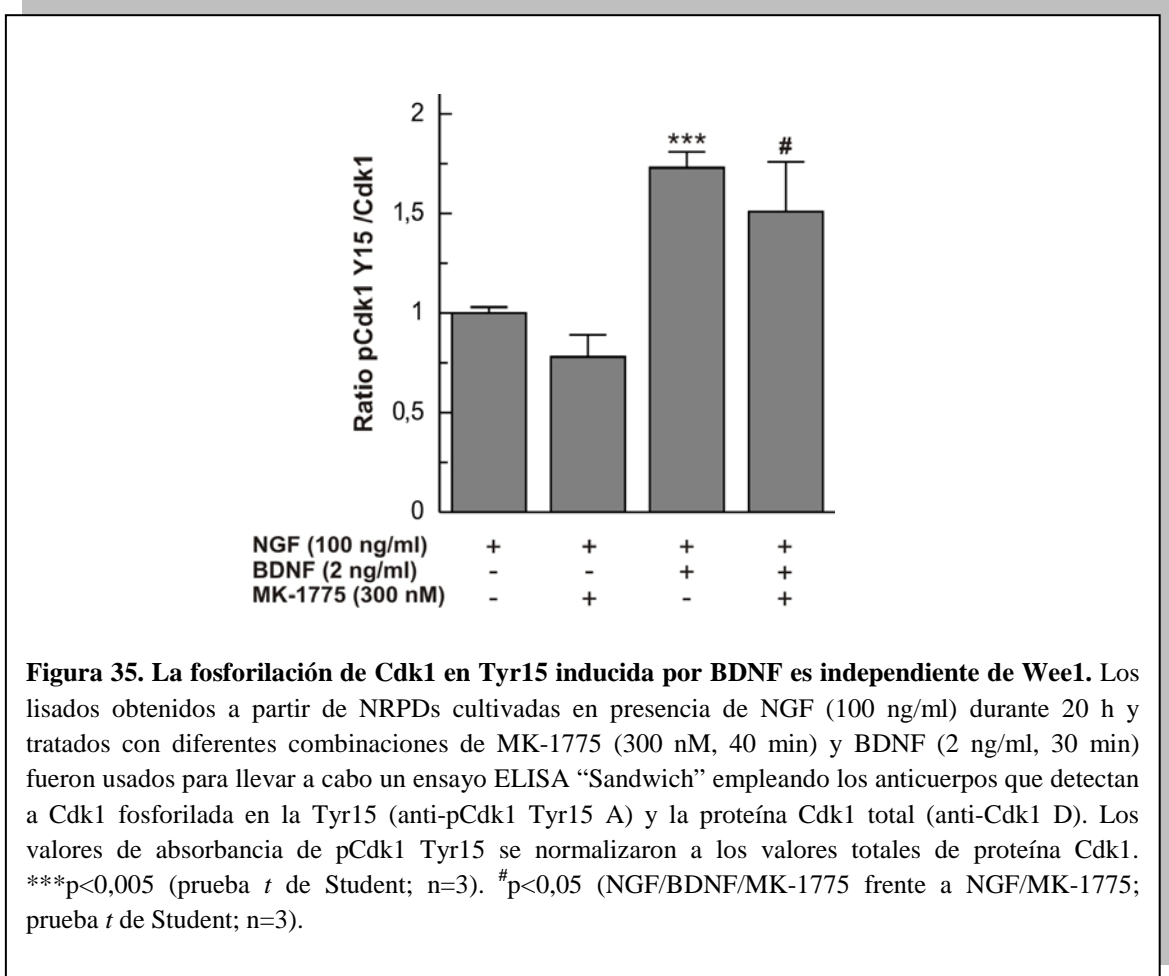


Figura 35. La fosforilación de Cdk1 en Tyr15 inducida por BDNF es independiente de Wee1. Los lisados obtenidos a partir de NRPDs cultivadas en presencia de NGF (100 ng/ml) durante 20 h y tratados con diferentes combinaciones de MK-1775 (300 nM, 40 min) y BDNF (2 ng/ml, 30 min) fueron usados para llevar a cabo un ensayo ELISA “Sandwich” empleando los anticuerpos que detectan a Cdk1 fosforilada en la Tyr15 (anti-pCdk1 Tyr15 A) y la proteína Cdk1 total (anti-Cdk1 D). Los valores de absorbancia de pCdk1 Tyr15 se normalizaron a los valores totales de proteína Cdk1. ^{***}p<0,005 (prueba *t* de Student; n=3). [#]p<0,05 (NGF/BDNF/MK-1775 frente a NGF/MK-1775; prueba *t* de Student; n=3).

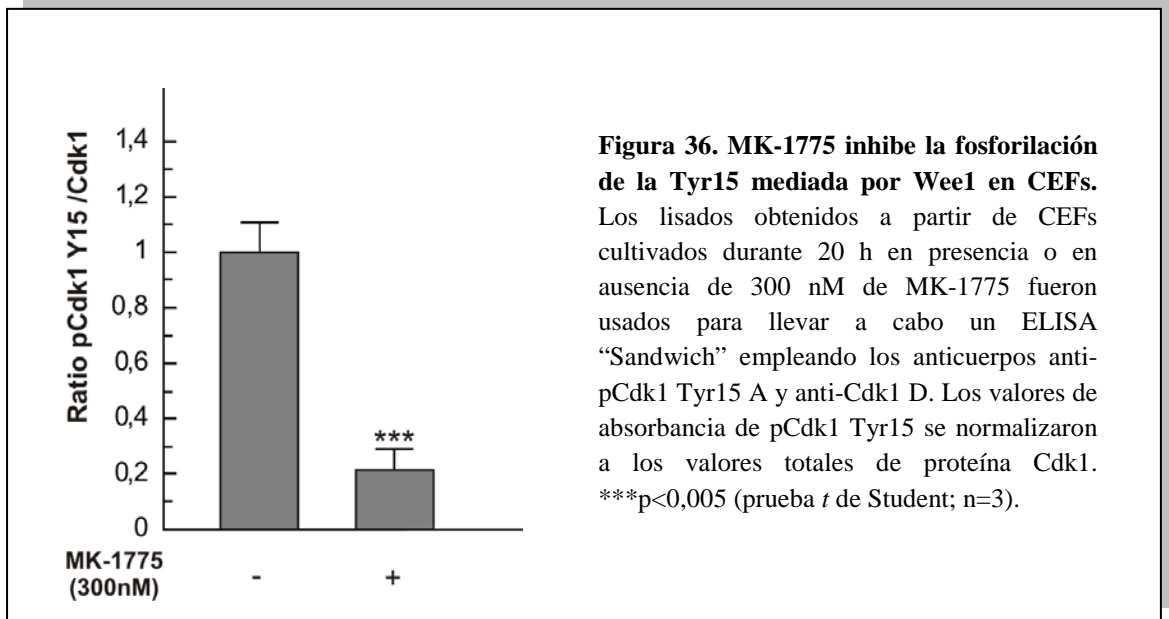
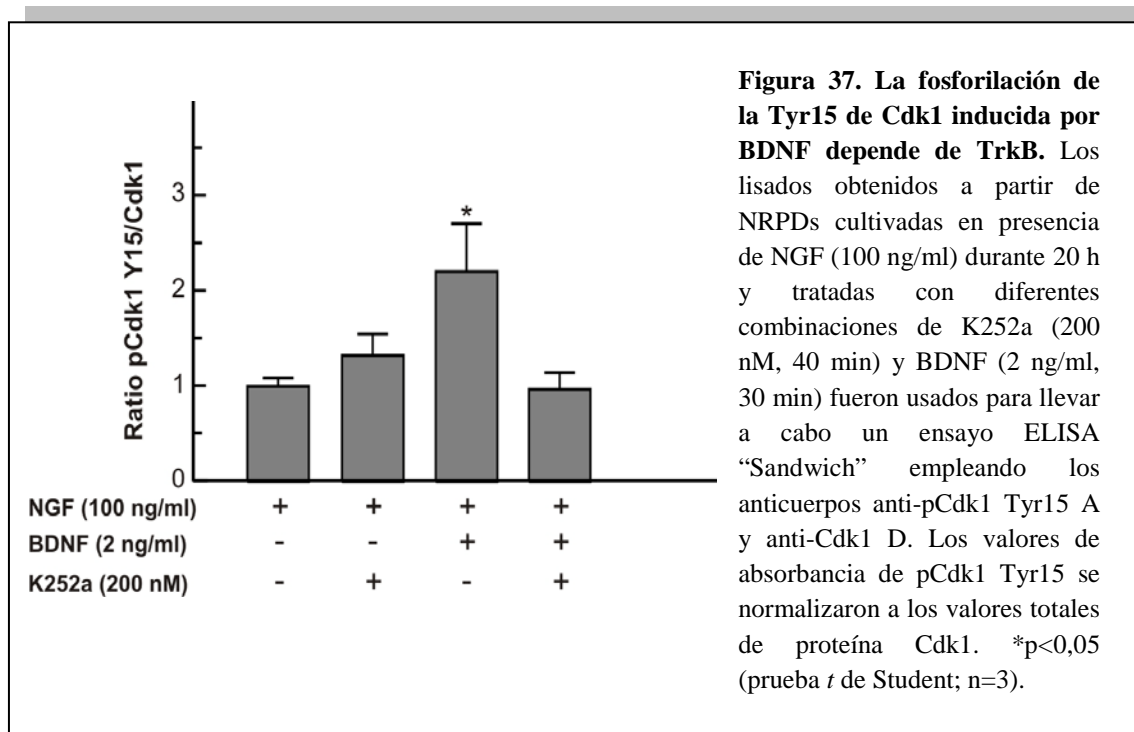


Figura 36. MK-1775 inhibe la fosforilación de la Tyr15 mediada por Wee1 en CEFs. Los lisados obtenidos a partir de CEFs cultivados durante 20 h en presencia o en ausencia de 300 nM de MK-1775 fueron usados para llevar a cabo un ELISA “Sandwich” empleando los anticuerpos anti-pCdk1 Tyr15 A y anti-Cdk1 D. Los valores de absorbancia de pCdk1 Tyr15 se normalizaron a los valores totales de proteína Cdk1. ^{***}p<0,005 (prueba *t* de Student; n=3).

5.1.3 BDNF induce la fosforilación de la Tyr15 por un mecanismo dependiente de TrkB

Para comprobar si la fosforilación de Cdk1 está regulada específicamente por TrkB, tratamos los cultivos de NRPDs con K252a, un inhibidor de proteínas quinasas usado habitualmente para demostrar la participación de receptores Trk en experimentos donde las células son tratadas con neurotrofinas (Tapley *et al.*, 1992). El tratamiento con K252a en cultivos de NRPDs mantenidas en presencia de NGF (100 ng/ml) y BDNF (2 ng/ml) bloqueó la fosforilación en la Tyr15 de Cdk1 (Figura 37) indicando la participación de TrkB en dicha fosforilación.



6. El efecto de BDNF sobre la actividad de Cdk1 depende exclusivamente de su fosforilación en su Tyr15

Para demostrar que el mecanismo empleado por BDNF para bloquear la transición G2/M es dependiente de la fosforilación de Cdk1 en la Tyr15, llevamos a cabo electroporaciones con Ciclina B1 y Cdk1 Phe15, una forma mutante de Cdk1 constitutivamente activa (Fletcher *et al.*, 2002) en fragmentos de retina. Las células de retina electroporadas se disociaron y se cultivaron durante 20 h en condiciones

neurogénicas para generar NRPDs y se trataron con NGF (100 ng/ml) y/o BDNF (2 ng/ml). Estos experimentos se llevaron a cabo en condiciones similares a las mostradas en la Figura 28 de modo que se midió la actividad de Cdk1 por el porcentaje de mitosis. El porcentaje de mitosis detectado era muy pequeño (< 1%) sugiriendo que la presencia de la forma de Cdk1 constitutivamente activa podría acelerar el proceso mitótico. Este hecho se confirmó tratando las NRPDs durante 17 h con nocodazol (0,4 μ g/ml), un inhibidor de la polimerización de tubulina usado para bloquear las células proliferantes en mitosis (Figura 38). Este tratamiento provocó un aumento en el porcentaje de mitosis hasta un ~10%, confirmando que la sobreexpresión de Cdk1 Phe15 acelera la re-entrada en mitosis. La presencia de la mutación Phe15 anula el efecto inhibitor de BDNF sobre la prevención de la apoptosis dependiente del complejo CC (Figura 39), ya que la transfección con la forma mutada provoca apoptosis que no puede ser rescatada por BDNF. En conclusión, BDNF inhibe la actividad de Cdk1 de manera exclusiva mediante su fosforilación en la Tyr15, contribuyendo al bloqueo de la transición G2/M.

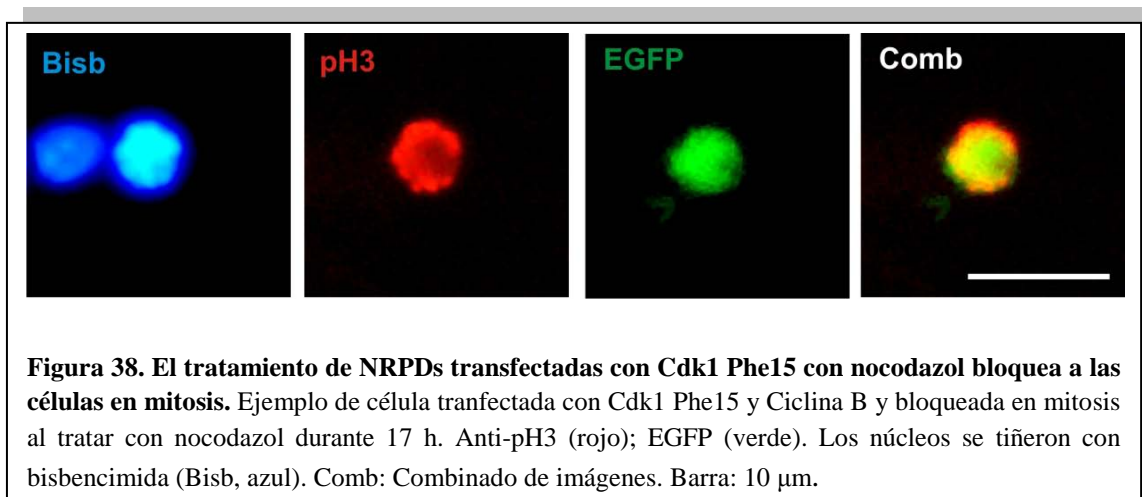


Figura 38. El tratamiento de NRPDs transfectadas con Cdk1 Phe15 con nocodazol bloquea a las células en mitosis. Ejemplo de célula transfectada con Cdk1 Phe15 y Ciclina B y bloqueada en mitosis al tratar con nocodazol durante 17 h. Anti-pH3 (rojo); EGFP (verde). Los núcleos se tiñeron con bisbencimida (Bisb, azul). Comb: Combinado de imágenes. Barra: 10 μ m.

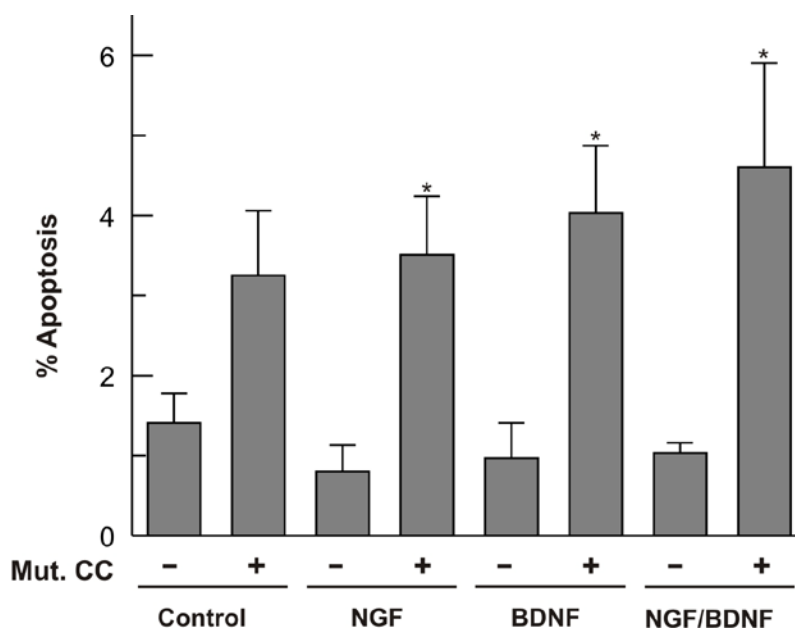


Figura 39. El efecto post-traduccionnal de BDNF en Cdk1 es específico de la Tyr15. Se electroporaron fragmentos de retina de pollo E6 con EGFP (-) o con Cdk1 Phe15 y Ciclina B1 (Mut. CC) (+). Posteriormente se procesaron para dar lugar a NRPDs, que se cultivaron durante 20 h en presencia de NGF (100 ng/ml) y/o BDNF (2 ng/ml). El porcentaje de núcleos picnóticos se evaluó en las células que expresaban EGFP. * $p < 0,05$ (prueba t de Student; $n=4$).

7. $p27^{Kip1}$ podría impedir rondas sucesivas de síntesis de ADN en CGRs tetraploides

Una vez caracterizado el mecanismo que mantiene a las neuronas tetraploides en un estado similar a G2, surge la cuestión de por qué las neuronas tetraploides sólo llevan a cabo una ronda de endorreproducción, manteniéndose con niveles de ADN de 4C. Esto sugiere la existencia de un mecanismo que bloquee nuevas rondas de síntesis de ADN en estas neuronas (Figura 40). Posibles candidatos a este proceso son los CKIs. Uno de los candidatos que hemos barajado como posible regulador de la tetraploidía es el inhibidor $p27^{Kip1}$, cuya expresión se localiza en CGRs diferenciadas en la retina del pollo en desarrollo (Portugal y Ventura, 2009) (Figura 40).

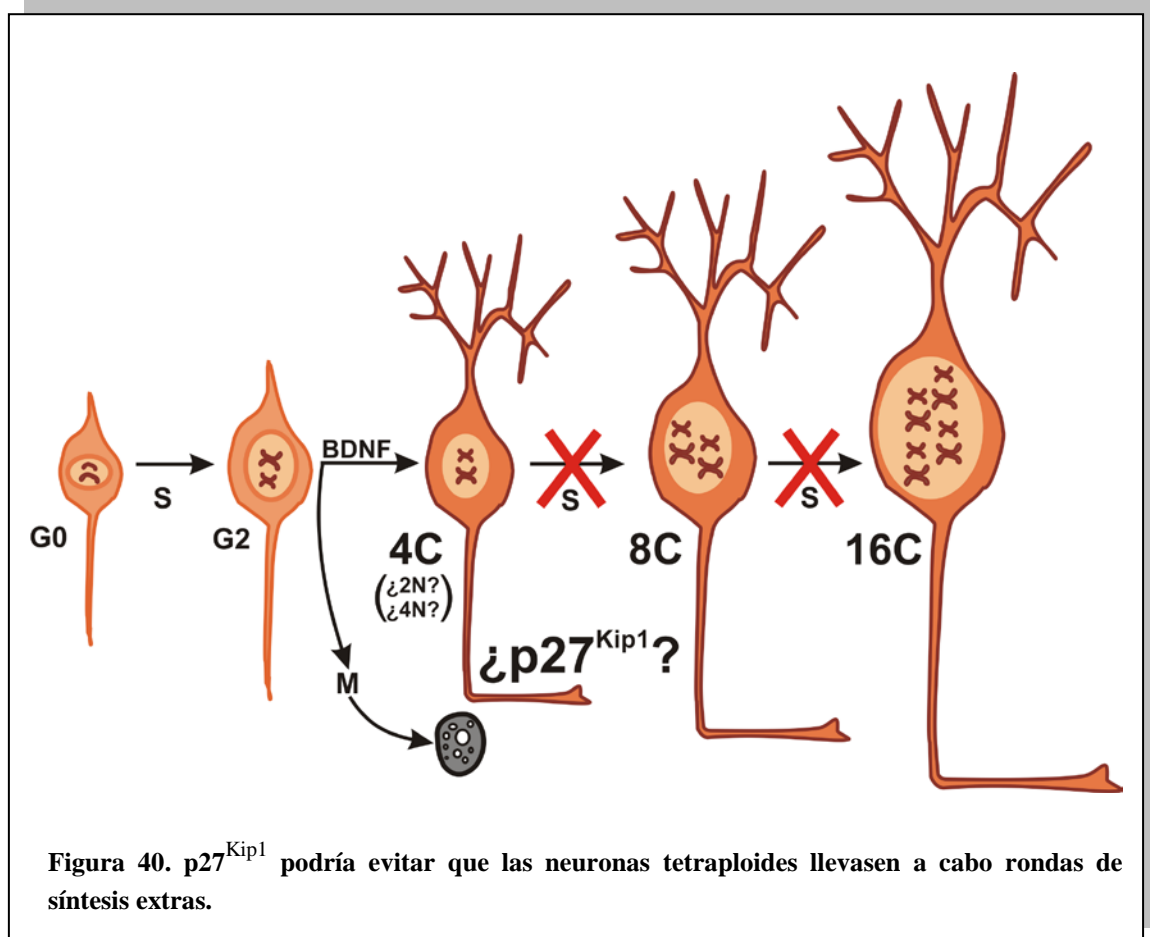
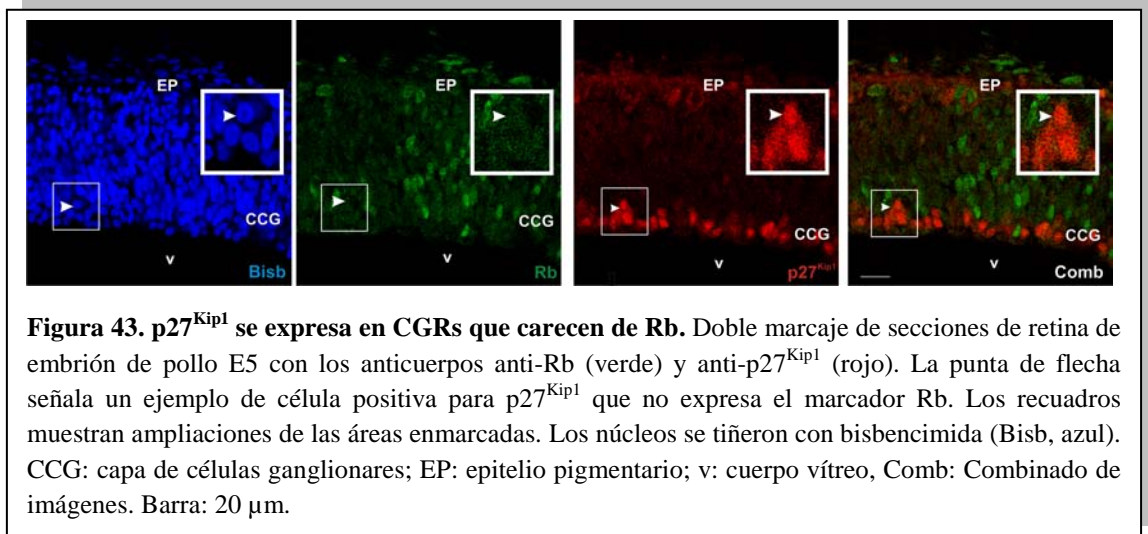
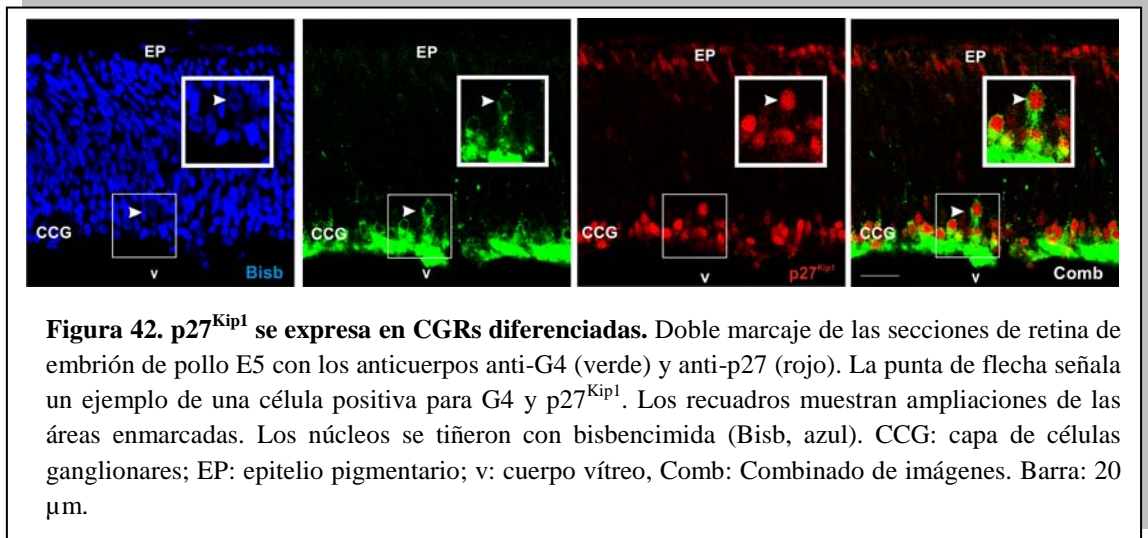
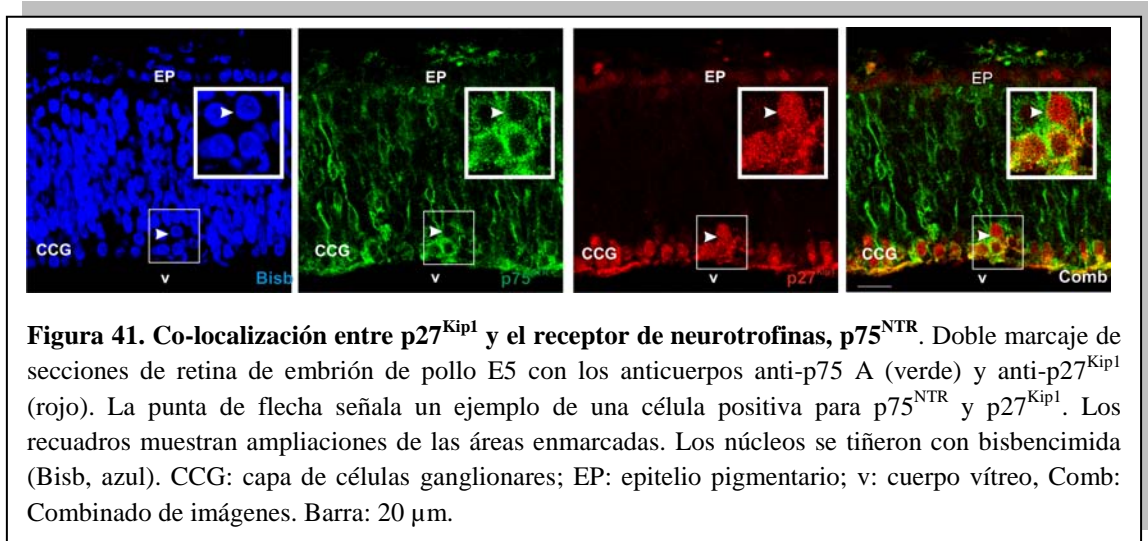


Figura 40. p27^{Kip1} podría evitar que las neuronas tetraploides lleven a cabo rondas de síntesis extras.

7.1 p27^{Kip1} se expresa en CGRs *in vivo* e *in vitro*

Para determinar la posible participación de p27^{Kip1} en el bloqueo de rondas adicionales de síntesis en neuronas tetraploides, en primer lugar caracterizamos la expresión de p27^{Kip1} en la retina de embrión de pollo E5-6. Este análisis demostró que p27^{Kip1} se co-exprime con el marcador de diferenciación p75^{NTR} en la región basal de la retina [99,4±0,6 % (n=2) de las células p27^{Kip1}-positivas expresan p75^{NTR}] (Figura 41), lo cual sugiere que p27^{Kip1} se expresa al final de la migración de las células ganglionares en proceso de diferenciación. También observamos que p27^{Kip1} co-localiza con G4, un marcador principalmente de CGRs en proceso de diferenciación (Figura 42) (Rathjen *et al.*, 1987). Como cabría esperar, el 100% de las células positivas para p27^{Kip1} son bien neuronas diferenciadas o se encuentran en proceso de diferenciación, descendiendo por el neuroepitelio hasta alcanzar la CCG. Las CGRs laminadas con p27^{Kip1} carecen de Rb (Figura 43), una característica de las CGRs s que

reactivan el ciclo y se convierten en tetraploides (Morillo *et al.*, 2010). Asimismo, todas las células TrkB-positivas expresan $p27^{Kip1}$ (Figura 44).



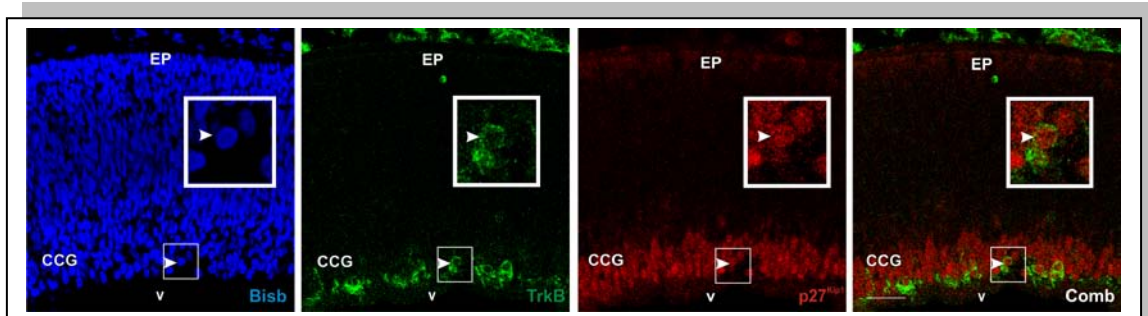


Figura 44. Las células que expresan TrkB co-expresan p27^{Kip1}. Doble marcaje de las secciones de retina de embrión de pollo E5 con los anticuerpos anti-TrkB (verde) y anti-p27^{Kip1} (rojo). La punta de flecha señala un ejemplo de una célula positiva p27^{Kip1} que expresa TrkB. Los núcleos se tiñeron con bisbencimida (Bisb, azul). Las cajas indican ampliaciones de las áreas enmarcadas por líneas discontinuas. CCG: capa de células ganglionares; EP: epitelio pigmentario; v: cuerpo vítreo, Comb: Combinado de imágenes. Barra: 20 μ m.

Al llevar a cabo un análisis por ICQ usando el anticuerpo anti-p27 en cultivos de NRPDs confirmamos que estas neuronas expresan p27^{Kip1}, co-localizándose con marcadores de estadios avanzados de diferenciación como G4 (Figura 45). Todo ello hace de p27^{Kip1} un candidato a la inhibición de la endorreduplicación.

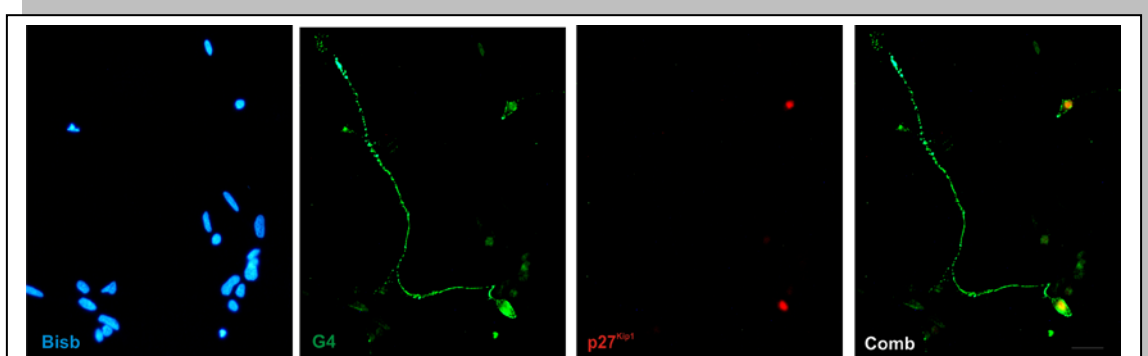
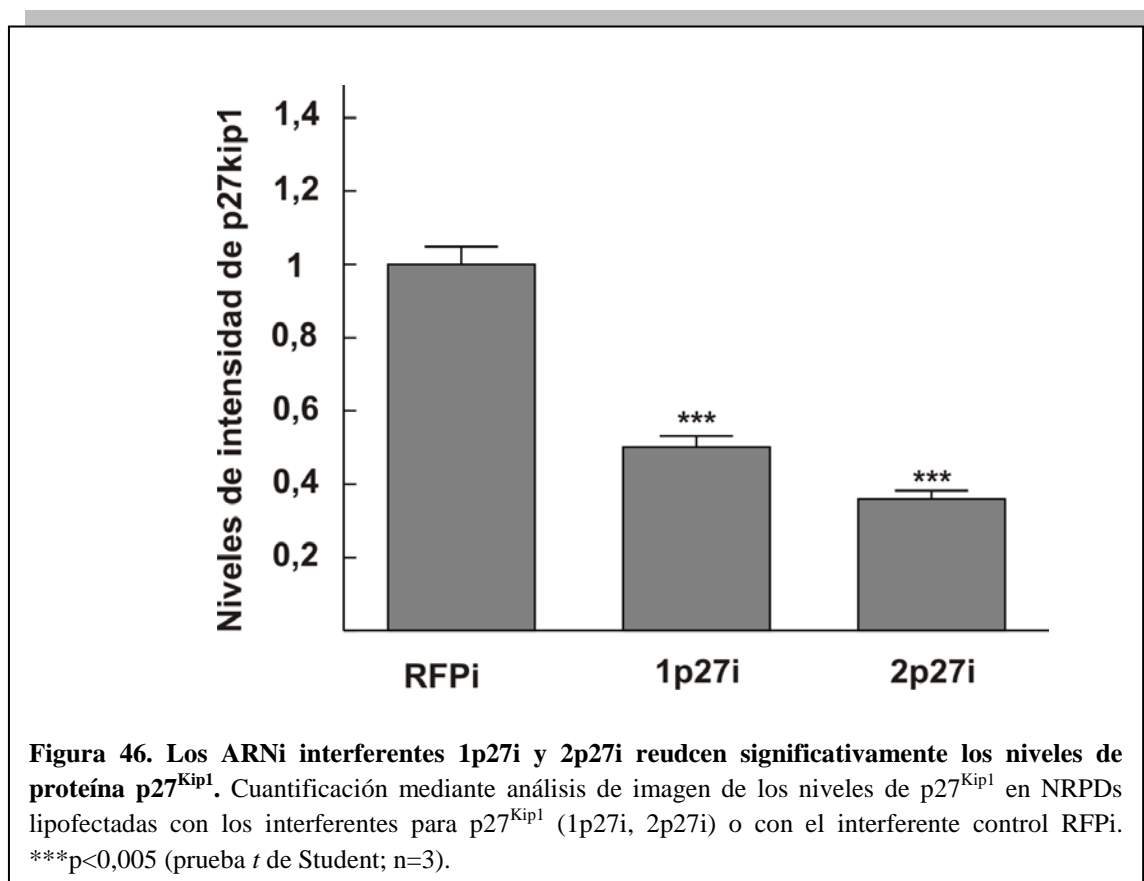


Figura 45. p27^{Kip1} se expresa en NRPDs *in vitro*. Doble marcaje con anti-G4 (verde) y anti-p27^{Kip1} (rojo) de una CGR diferenciada. La morfología de la célula que expresa un mayor nivel de G4 se corresponde con la de una célula ganglionar diferenciada. Los núcleos se tiñeron con bisbencimida (Bisb, azul). Comb: Combinado de imágenes. Barra: 20 μ m.

7.2 Inhibición de la expresión de p27^{Kip1} utilizando ARNi

Para determinar si p27^{Kip1} está involucrada en impedir que las neuronas tetraploides lleven a cabo rondas sucesivas de endorreduplicación, diseñamos vectores

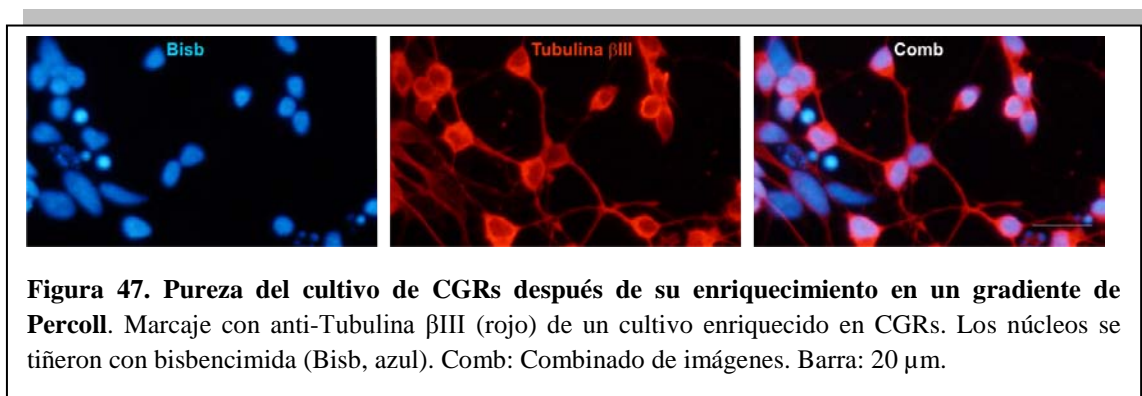
ARNi específicos de p27^{Kip1} utilizando el sistema de interferencia descrito por Das *et al.* (2006). Diseñamos dos interferentes independientes para secuencias diana situadas en la región 5' (1p27i), y 3' (2p27i). Como control empleamos un vector que expresa un interferente de la proteína luciferasa (RFPi) (Das *et al.*, 2006). En primer lugar, verificamos la eficacia de los ARNi transfectando fragmentos de retina que posteriormente fueron procesados para dar lugar a NRPDs. Transcurridas 20 h, las NRPDs se sometieron a ICQ de G4 y p27^{Kip1}. Los niveles de p27^{Kip1} se cuantificaron en CGRs que expresaban el marcador G4 mediante análisis de imagen. Se observa que ambos interferentes son capaces de disminuir los niveles de p27^{Kip1} un 50% (1p27i) y un 67% (2p27i) (Figura 46).



7.3 La interferencia frente al ARN de p27^{Kip1} favorece la síntesis de ADN en neuronas de retina

Una vez que se confirmó la eficacia de los interferentes para p27^{Kip1}, nos planteamos si la disminución de los niveles de dicha proteína puede favorecer la

incorporación de BrdU en CGRs diferenciadas. Dado que la eficiencia de electroporación en CGRs diferenciadas es extremadamente baja ($< 0,1\%$), decidimos enriquecer los cultivos en CGRs utilizando el procedimiento descrito por De Curtis *et al.* (1991), basado en la separación de CGRs procedentes de retina de pollo E7 en un gradiente de Percoll. Dichas neuronas se aislaron y se cultivaron en condiciones neurogénicas. La Figura 47 muestra un ejemplo de cultivo de CGRs teñidas con Tubulina β III después de su purificación en gradientes de Percoll. En la retina, las CGRs expresan elevados niveles de este marcador (Watanabe *et al.*, 1991). Transcurridas 24 h desde su cultivo, se lipofectaron con los vectores de interferencia descritos anteriormente para p27^{Kip1} y se trataron con BrdU (0,5 μ g/ml) durante 20 h. Los cultivos se realizaron en ausencia de NGF para evitar que la reactivación de ciclo celular y la inducción de síntesis de ADN provocada por esta neurotrofina (Morillo *et al.*, 2012) interfiera con los resultados. Debido a la alta densidad de los cultivos, necesaria para llevar a cabo la lipofección, no se pudo utilizar G4 como marcador debido a que su expresión mayoritaria en fibras incapacitaba la identificación de las CGRs. Por ello, decidimos emplear el marcador neuronal NeuN (del inglés “Neuronal nuclei”) dada su localización nuclear. Este análisis nos permitió demostrar que se produce un incremento significativo de la incorporación de BrdU en NRPDs diferenciadas cuando se emplean interferentes para p27^{Kip1} con respecto al interferente control (Figura 48).



De acuerdo con nuestra hipótesis, la disminución de los niveles de p27^{Kip1} provoca un incremento en la síntesis de ADN, lo que sugiere que las CGRs se convierten en poliploides mediante endoreduplicación. De hecho, no se observó ninguna mitosis en las células lipofectadas con los interferentes 1p27i (n=266), 2p27i

(n=188) ni con el interferente control RFPi (n=188). Para confirmar esta hipótesis, analizamos los niveles de ADN de las células transfectadas con los ARNi para p27^{Kip1} mediante citometría estática. Observamos que las neuronas transfectadas con los interferentes 1p27i y 2p27i tienen un mayor contenido de ADN que las transfectadas con el interferente control tanto las diploides como las tetraploides. En todos los casos observamos que existen diferencias significativas entre los niveles de ADN de las CGRs lipofectadas con los interferentes para p27 (tanto 1p27i como 2p27i) respecto al interferente control (RFPi) [experimento 1: RFPi vs. 1p27i p<0,001; RFPi vs. 2p27i p<0,005; experimento 2: RFPi vs. 1p27i p<0,001; RFPi vs. 2p27i p<0,001; prueba de los rangos con signo de Wilcoxon]. En la Figura 49 se muestra un ejemplo representativo de la distribución de la frecuencia de los niveles de ADN en CGRs lipofectadas con el plásmido 1p27i y con el plásmido control. En conclusión, estos resultados sugieren que p27^{Kip1} puede estar involucrado en el bloqueo de rondas sucesivas de endorreduplicación en todas las CGRs, incluyendo las neuronas tetraploides.

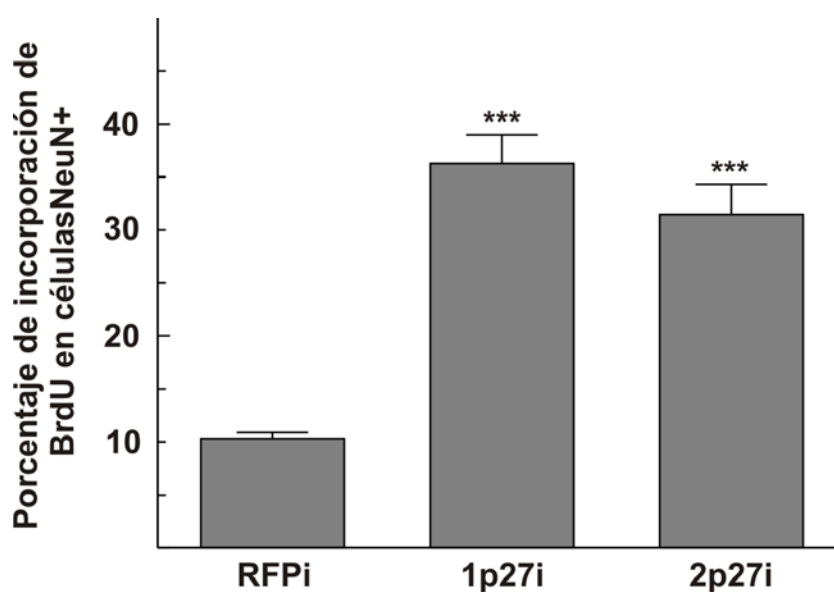


Figura 48. La disminución de los niveles de p27^{Kip1} en un cultivo enriquecido en CGRs provoca un incremento en la incorporación de BrdU respecto al control. ***p<0,005 (prueba t de Student; n=3).

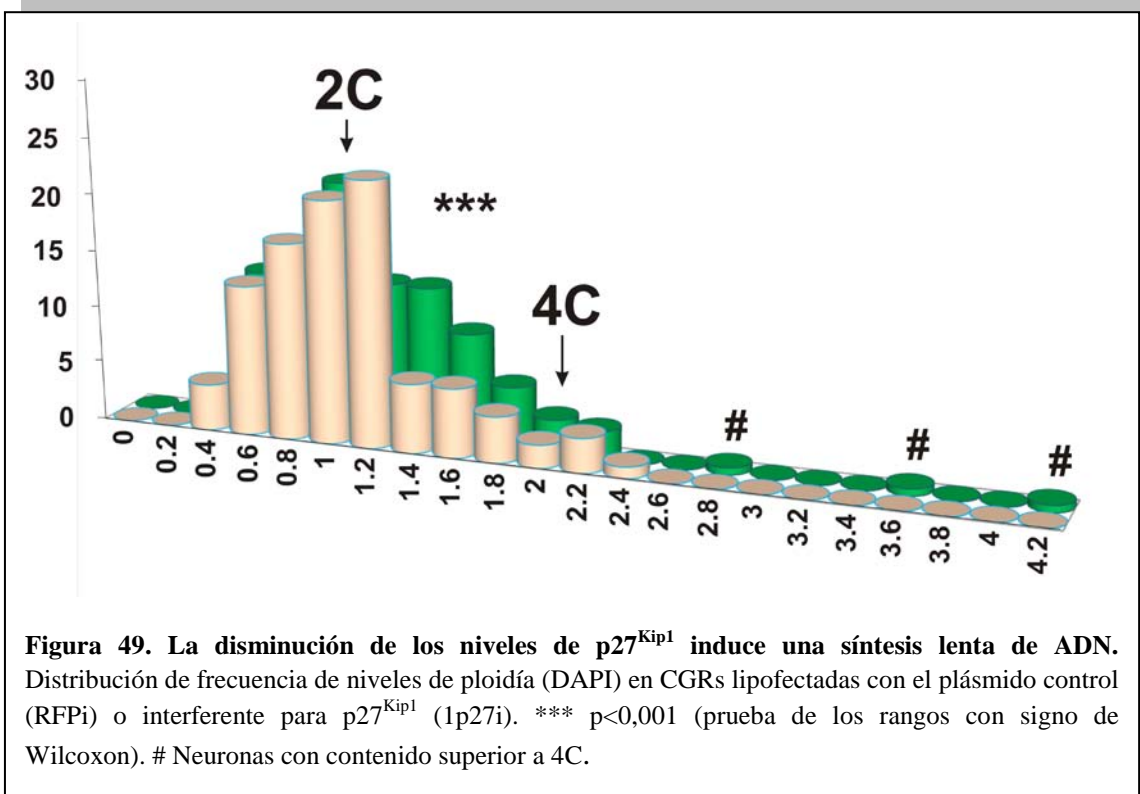
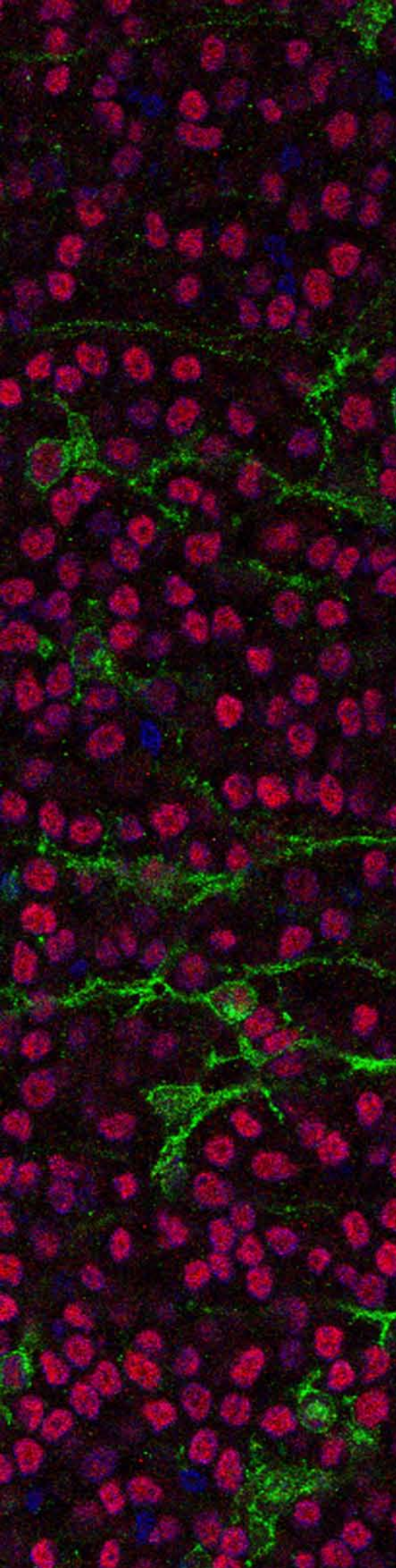
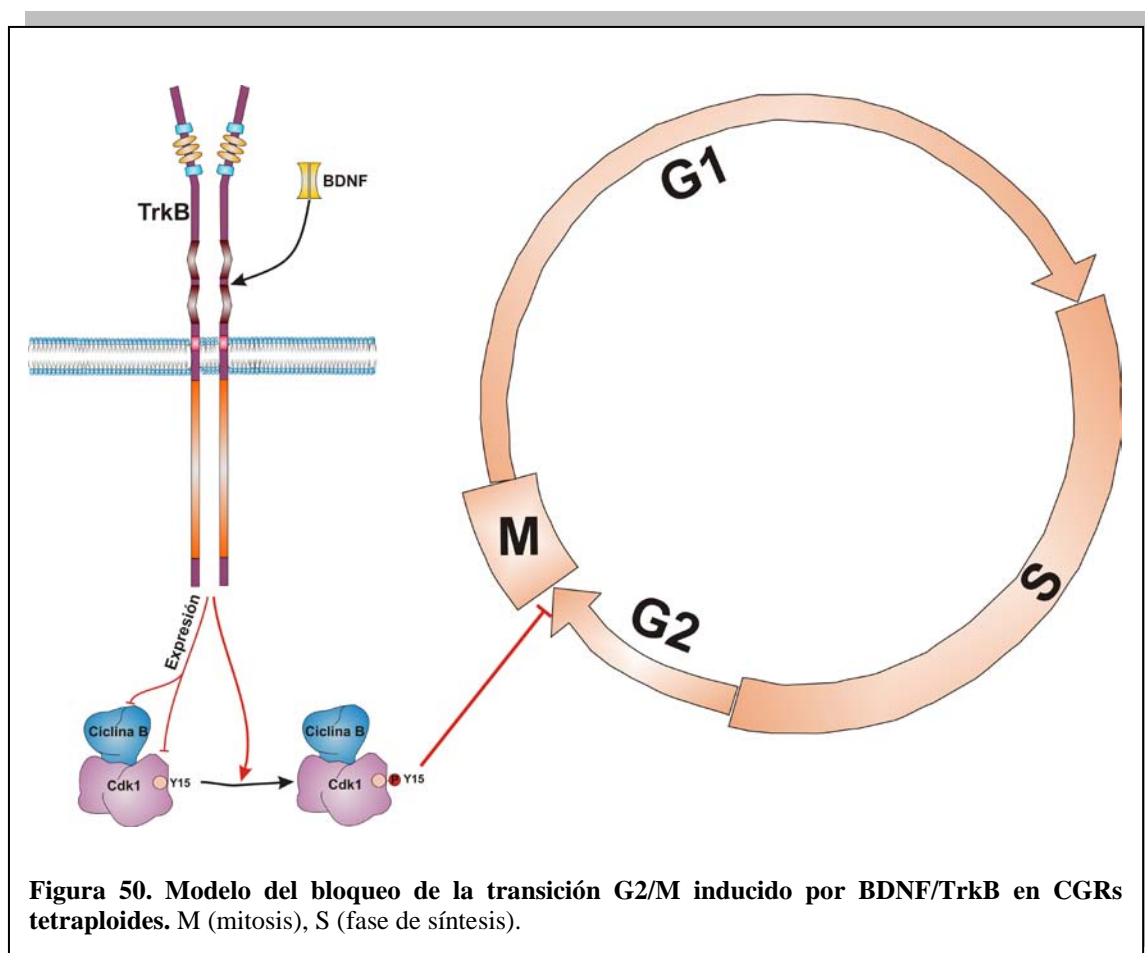


Figura 49. La disminución de los niveles de p27^{Kip1} induce una síntesis lenta de ADN. Distribución de frecuencia de niveles de ploidía (DAPI) en CGRs lipofectadas con el plásmido control (RFPi) o interferente para p27^{Kip1} (1p27i). *** p<0,001 (prueba de los rangos con signo de Wilcoxon). # Neuronas con contenido superior a 4C.



V.DISCUSIÓN

En base a los resultados descritos anteriormente, hemos podido demostrar que el bloqueo de la transición G2/M inducido por BDNF en neuronas tetraploides está regulado por dos mecanismos complementarios: 1) la disminución de los niveles de Cdk1 (Figura 23) y de Ciclina B1 (Frade, 2000), y 2) la modificación post-traducciona de Cdk1 (pCdk1 Tyr15), lo que se traduce en la inhibición de su actividad (Figura 50). Estos mecanismos participan en el bloqueo del ciclo en G2/M necesarios para la tetraploidización de las CGRs. Además, hemos podido determinar que p27^{Kip1} se expresa en las CGRs diferenciadas y parece ser necesario para prevenir rondas sucesivas de endoreduplicación.



Como cabría esperar, Cdk1 se encuentra presente en las mitosis ectópicas, que tienen lugar en la membrana basal de la retina. Se ha demostrado previamente que las mitosis ectópicas tienen lugar en las CGRs en proceso de diferenciación que duplican su

ADN y que no son capaces de evitar la mitosis, muriendo por apoptosis poco tiempo después (Morillo *et al.*, 2010). Esto sugiere que el mecanismo clásico de transición G2/M está activo en dichas neuronas. Esta observación concuerda con una publicación previa que demuestra que las CGRs postmitóticas de codorniz expresan Cdk1 antes de que se complete su diferenciación (Espanel *et al.*, 1997). La localización preferentemente citoplásmica de Cdk1 observada en el neuroepitelio, concuerda con la localización esperada, debido a que Cdk1 se localiza preferentemente en este compartimento celular hasta que se produce su migración al núcleo en los momentos previos a la profase (De Souza *et al.*, 2000; Hagting *et al.*, 1998; Moore *et al.*, 1999; Takizawa *et al.*, 1999; Toyoshima *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998). En este sentido, Cdk1 se expresa en el núcleo de células neuroepiteliales en la región apical de la retina.

La mayor parte de los experimentos se llevaron a cabo utilizando células de retina de embrión E6-7 cultivadas en condiciones neurogénicas (Frade *et al.*, 1996a; 1996b) tratadas con NGF para inducir la re-entrada en ciclo celular (Frade, 2000; Morillo *et al.*, 2010; 2012). En estos cultivos, TrkB se expresa en todas las NRPDs. Este hecho ha facilitado la realización de los estudios *in vitro*. Se desconoce el motivo por el cual todas las células expresan TrkB. Es posible que el efecto de la disociación sea el que cause un incremento en la expresión de dicho receptor.

1. BDNF disminuye los niveles de Cdk1 pero no del ARNm específico de CDK1

Hemos observado que el tratamiento de NRPDs con BDNF reduce los niveles de la proteína Cdk1 en estas células, pero no afecta a los niveles de ARNm, lo que sugiere que la expresión de Cdk1 está regulada por un mecanismo post-traducciona. Aunque se ha demostrado que la expresión de Cdk1 disminuye a medida que se diferencia la retina (Espanel *et al.*, 1997), el efecto de BDNF en la expresión de Cdk1 es específico ya que esta neurotrofina no puede inducir la diferenciación neuronal en precursores de retina (De la Rosa *et al.*, 1994). Observamos que la disminución de los niveles de Cdk1 afecta sólo a un 40% de la proteína. Sin embargo, esta disminución no se debe a la respuesta selectiva a BDNF de una determinada subpoblación, sino que afecta a todas las NRPDs. Además, hemos demostrado que el mecanismo empleado por BDNF para disminuir los niveles de Cdk1 es independiente de su fosforilación en la Tyr15, ya que dicha

fosforilación se produce sólo cuando las NRPDs se tratan con NGF y BDNF, mientras que la disminución de los niveles de Cdk1 ocurre en respuesta a BDNF independientemente de la presencia o no de NGF. Esto indica que la fosforilación de la Tyr15 no provoca un aumento en la degradación de Cdk1. Un argumento adicional para descartar la participación de la fosforilación de la Tyr15 en el reciclaje de Cdk1 es el hecho de que dicha fosforilación es necesaria para mantener bloqueada la actividad quinasa sin alterar sus niveles (Norbury *et al.*, 1991).

2. BDNF disminuye la actividad específica de Cdk1 mediante modificación post-traduccional

En segundo lugar, hemos demostrado mediante un ensayo de actividad quinasa que BDNF también reduce la actividad específica de Cdk1 en extractos de NRPDs tratadas con dicha neurotrofina, pero no afecta a la actividad general de las Cdks. Dicha reducción de la actividad específica no se puede justificar únicamente por la reducción de los niveles de Ciclina B2 en presencia de BDNF en NRPDs tratadas con NGF (Frade, 2000) ya que BDNF también es capaz de disminuir la actividad de Cdk1 en NRPDs en las que se ha sobreexpresado Cdk1 y Ciclina B1. La regulación de la expresión y de la actividad que BDNF ejerce sobre Cdk1 en neuronas tetraploides guarda semejanza con el efecto de NGF sobre Cdk1 observado en células PC12 durante la diferenciación de dichas células mediada por NGF (Buchkovich y Ziff, 1994). Este efecto se acelera en células que sobreexpresan TrkA (Buchkovich y Ziff, 1994).

2.1 La fosforilación de Cdk1 en su Tyr15 inducida por BDNF es dependiente de TrkB

Es altamente probable que BDNF actúe a través del receptor TrkB en las NRPDs ya que varios hechos apuntan a esta conclusión. Por un lado, se ha observado que concentraciones de BDNF específicas de TrkB (2 ng/ml) (Rodríguez-Tebar y Barde, 1988) son capaces de bloquear la transición G2/M en las NRPDs tratadas con NGF. Además, el tratamiento con K252a, un inhibidor de tirosín quinasa comúnmente utilizado para bloquear la activación de los receptores Trk mediante neurotrofinas (Almeida *et al.*, 2005; Berg *et al.*, 1992; Knüsel y Hefti, 1992) impide que se produzca la fosforilación Cdk1 en su Tyr15 inducida por BDNF en NRPDs. Es altamente

probable que el mecanismo de bloqueo de la transición G2/M inducido por BDNF esté conservado *in vivo* debido a que BDNF se expresa en el epitelio pigmentario y neuroretina durante el periodo de diferenciación de las CGRs (Frade *et al.*, 1997). Asimismo, observamos mediante IHQ que la población de neuronas que expresa TrkB carece de Rb, al igual que las CGRs en proceso de diferenciación que reactivan el ciclo y se hacen tetraploides en respuesta a NGF endógeno (Morillo *et al.*, 2010).

2.2 La fosforilación de Cdk1 en su Tyr15 inducida por BDNF es independiente de Wee1

Se sabe que la fosforilación de Cdk1 en su Tyr15 es inhibitoria ya que dicha Tyr se encuentra incluida en el motivo (Gly-X-Gly-X-X-Gly), implicado en la unión del ATP. Por tanto, la fosforilación de Cdk1 en su Tyr15 impide su interacción con el ATP inhibiendo su actividad quinasa (Krek y Nigg, 1991). El mecanismo empleado por BDNF para inhibir la actividad de Cdk1 depende de dicha fosforilación. De hecho, la sobreexpresión de una forma constitutivamente activa de Cdk1 (Cdk1 Phe15) (Fletcher *et al.*, 2002) desencadena la transición G2/M seguida de apoptosis, que no puede ser rescatada por BDNF. En las células proliferantes Wee1, fosforila a Cdk1 en su Tyr15 (Parker *et al.*, 1992), inhibiendo su actividad catalítica (Norbury *et al.*, 1991). Wee1 también se expresa en neuronas en proceso de diferenciación, participando en su diferenciación inicial previa a la polarización neuronal (Müller *et al.*, 2010), así como en neuronas adultas (Tomashevski *et al.*, 2001). Dada la expresión de Wee1 en neuronas en proceso de diferenciación, se empleó un inhibidor específico de Wee1 (MK-1775), a concentraciones en las que previamente se ha demostrado que bloquea la actividad de Wee1 (Hirai *et al.*, 2009). Dicho inhibidor no bloqueó la fosforilación de la Tyr15 inducida por BDNF en NRPDs mientras que disminuyó drásticamente los niveles de pCdk1 Tyr15 en un control realizado con CEFs proliferantes. Estos resultados demuestran que Wee1 no está involucrado en la cascada de señalización iniciada por TrkB para bloquear la transición G2/M en neuronas tetraploides.

Es posible que TrkB fosforile a Cdk1 en su Tyr15 directamente a través de su dominio catalítico al igual que ocurre con Cdk5 (Cheung *et al.*, 2007). A pesar de que Cdk1 y Cdk5 llevan a cabo funciones diferentes y su secuencia de aminoácidos es distinta, guardan homología a nivel de su estructura terciaria y el dominio N-terminal,

donde se sitúan los aminoácidos responsables de la regulación de su actividad (Thr14 y Tyr15), está conservado (Figura 5) (Kawauchi *et al.*, 2013). Por lo tanto, no se puede descartar que a nivel estructural la interacción directa entre TrkB y Cdk1 sea factible, al igual que ocurre con TrkB y Cdk5 (Cheung *et al.*, 2007) ya sea directamente en la membrana celular o mediante vesículas de internalización que faciliten el acceso de TrkB a Cdk1. Otra posibilidad es que el responsable de la fosforilación de Cdk1 sea otra proteína que actúe en la cascada de señalización de TrkB. En este caso, cabe destacar que ERK, miembro de la cascada de señalización de TrkB (Arévalo y Wu, 2006; Chao, 2003; Reichardt, 2006), puede fosforilar a Cdk1 en la Tyr15 (Ray *et al.*, 2006).

2.3 La cooperación entre TrkB y p75^{NTR} es necesaria para la fosforilación de Cdk1 en su Tyr15

Como se ha descrito en la introducción, la señalización de las distintas neurotrofinas es altamente compleja debido a la existencia de distintos receptores y a la gran diversidad de vías de señalización que se pueden activar por los mismos, que a su vez pueden estar interconectadas (Arévalo y Wu, 2006; Skaper, 2012). En este sentido, la señal dependiente de receptores Trk se puede modular por la activación de p75^{NTR} con ligandos heterólogos. La unión de BDNF a p75^{NTR} puede modular las señales activadas por NGF/TrkA y por NT-3/TrkC (Ivanisevic *et al.*, 2003; Kimpinski *et al.*, 1999; MacPhee y Barker, 1997). En nuestro caso, observamos una situación similar ya que el efecto dependiente de TrkB sobre la fosforilación de Cdk1 en su Tyr15 requiere la activación de p75^{NTR}. Hasta el momento se desconoce el mecanismo empleado por p75^{NTR} para facilitar la fosforilación de la Tyr15 de Cdk1. Sin embargo, la conexión entre las señales entre p75^{NTR} y TrkB podría estar facilitada por su co-localización en las balsas lipídicas (Suzuki *et al.*, 2004).

2.4 TrkA no participa en la fosforilación de Cdk1 en su Tyr15 inducida por BDNF

Durante todo el estudio se han utilizado concentraciones saturantes de NGF (100 ng/ml) para p75^{NTR}, lo que sugiere que el efecto de reactivación de ciclo y muerte por apoptosis *in vivo* se debe a la interacción de proNGF endógeno con p75^{NTR}. En este sentido, Jansen *et al.* (2007) han demostrado la participación de sortilina en la apoptosis

asociada a la neurogénesis, obteniendo un resultado similar que en $p75^{NTR^{-/-}}$ y $NGF^{-/-}$ (Frade y Barde, 1999). Además, el uso de un anticuerpo bloqueante de $p75^{NTR}$ inhibió el efecto de NGF sobre la reactivación del ciclo y la apoptosis en cultivos de NRPDs (Frade, 2000). En cualquier caso, hemos descartado la participación de TrkA en la señalización de NGF debido a que el tratamiento de las NRPDs con una concentración subóptima de NGF para la activación de $p75^{NTR}$ (1 ng/ml) (Kaplan *et al.*, 1991) no facilita la fosforilación de Cdk1 en su Tyr15 tras en el tratamiento con BDNF. Este hecho concuerda con la expresión de TrkA solamente en CGRs diferenciadas situadas en la CCG (González-Hoyuela *et al.*, 2001) mientras que la re-entrada en ciclo de las CGRs tetraploides ocurre cuando estas neuronas se encuentran en proceso de diferenciación, descendiendo hacia la región basal del neuroepitelio (Morillo *et al.*, 2010).

3. Las CGRs tetraploides dependen de BDNF durante un periodo restringido

La expresión de Cdk1 disminuye durante E8 en la retina de la codorniz (Espanel *et al.*, 1997), un estadio equivalente a E10-11 en el embrión del pollo (Padgett e Ivey, 1960). En este estadio, la generación de CGRs ha finalizado (Prada *et al.*, 1991) y el análisis de los sitios de unión a [125I] BDNF a células de retina embrionaria demuestra que el número de receptores de alta afinidad de BDNF han disminuido drásticamente (Frade *et al.*, 1997). La reducción de los receptores de BDNF indica que el mecanismo descrito en este estudio para la inhibición de Cdk1 dependiente de BDNF, necesario para la supervivencia de las células tetraploides, está restringido a una ventana temporal que coincide con el periodo de diferenciación de las CGRs. Este hecho concuerda con la dependencia de BDNF observada en las CGRs cultivadas *in vitro* durante una ventana temporal de 5 días (Rodríguez-Tébar *et al.*, 1989). A partir de este periodo, las CGRs tetraploides pueden sobrevivir en ausencia de BDNF lo que indica que se mantienen en un estado similar al quiescente, por lo que deben existir mecanismos complementarios que se encarguen de mantener a las neuronas con un contenido de ADN de 4C. Además, los efectos de esta neurotrofina en la retina podrían no estar restringidos a su papel en el mantenimiento de las CGRs tetraploides como neuronas de proyección (Morillo *et al.*, 2010) cuyos axones de mayor tamaño proyectan a capas más profundas del tecto óptico. La participación de BDNF podría ser crucial a distintos niveles en las neuronas

tetraploides: favoreciendo el bloqueo de la transición G2/M (Morillo *et al.*, 2010), promoviendo la diferenciación neuronal a través de Cdk5 (Cheung *et al.*, 2007) y promoviendo la maduración del axón (Shelly *et al.*, 2007).

El bloqueo de la transición G2/M con agentes farmacológicos en neuronas tetraploides inhibe la muerte por apoptosis (Frade, 2000; Frade *et al.*, 1997; Morillo *et al.*, 2010). En este sentido, hemos observado que la sobreexpresión de Ciclina B y Cdk1 constitutivamente activo en NRPDs induce mitosis seguida por apoptosis. Este resultado concuerda con los ensayos de pulso y caza descritos por Morillo *et al.* (2010) en los que el pico de neuronas tetraploides en apoptosis tiene lugar tres horas después del pico de dichas neuronas en mitosis. Estas observaciones indican que Cdk1 puede provocar apoptosis en estas neuronas posteriormente a la inducción de mitosis ectópicas. Se han descrito distintos mecanismos por los que Cdk1 provoca apoptosis: la acumulación de FOXO1 (del inglés “forkhead box, sub-group O”) (Yuan *et al.*, 2008); induciendo la fosforilación y activación del gen pro-apoptótico Bad (del inglés “Bcl-associated death promoter”) (Konishi *et al.*, 2002) y fomentando la fosforilación e inactivación del gen antiapoptótico Bcl2 (del inglés “B cell leukemia/lymphoma 2”) (Furukawa *et al.*, 2000). Alternativamente, la apoptosis puede derivar de mecanismos desconocidos provocados por la mitosis en una célula postmitótica.

4. *p27^{Kip1} podría impedir rondas sucesivas de síntesis de ADN en CGRs tetraploides*

Se ha descubierto recientemente que algunas subpoblaciones neuronales de los vertebrados superiores son susceptibles de duplicar su ADN dando lugar a neuronas tetraploides (López-Sánchez y Frade, 2013; López-Sánchez *et al.*, 2011; Morillo *et al.*, 2010). Este hecho contrasta con la observación de que muchos invertebrados y algunos vertebrados inferiores muestran neuronas gigantes con alto contenido de ploidía (Lasek y Dower, 1971; Urata *et al.*, 1995; Yamagishi *et al.*, 2011). Surge, por tanto, la cuestión de cuál es el mecanismo responsable de que sólo se produzca una ronda extra de síntesis en los vertebrados superiores analizados (López-Sánchez *et al.*, 2011; López-Sánchez y Frade, 2013; Morillo *et al.*, 2010). Los resultados que hemos obtenido sugieren que *p27^{Kip1}*, un CKI conocido por su capacidad de inhibir a Cdk2 bloqueando la transición G1/S (Besson *et al.*, 2008; Foster *et al.*, 2010; Sherr y Roberts, 1999), está involucrado

en este proceso. Además, se ha observado que $p27^{Kip1}$ puede modular el proceso de endoreduplicación en el *Solanum lycopersicum* (Bisbis *et al.*, 2006).

Hemos demostrado que en la retina embrionaria de embrión de pollo E6 $p27^{Kip1}$ se detecta en las CGRs en proceso de diferenciación, incluidas aquéllas que están migrando a lo largo del neuroepitelio. En estadios más avanzados, como E12, se observa expresión de $p27^{Kip1}$ en células ganglionares, horizontales y amacrinas (Portugal y Ventura, 2009). Las células que expresan TrkB co-expresan $p27^{Kip1}$ y $p75^{NTR}$ y carecen de Rb, características de las CGRs susceptibles de convertirse en tetraploides (Morillo *et al.*, 2010). La reducción de los niveles de $p27^{Kip1}$ mediante ARNi provoca un aumento en la incorporación de BrdU en neuronas de retina enriquecidas en CGRs, pero ninguna de las neuronas transfectadas con los interferentes lleva a cabo mitosis. La observación de un mayor contenido de ADN en dichas neuronas sugiere una síntesis lenta de ADN, que no se ha completado a las 24 h del análisis. Este hecho se podría explicar debido a la posible participación de otros inhibidores de ciclo celular, que podrían refrenar la entrada en síntesis de las células con bajos niveles de $p27^{Kip1}$. De hecho, las CGRs expresan también otros CKIs como $p57^{Kip2}$ (datos sin publicar). Este efecto es reminiscente de lo que ocurre en la retina de ratones adultos deficientes para $p27^{Kip1}$, en los que se produce un aumento de CGRs que muestran incorporación de BrdU (Cunningham *et al.*, 2002; Levine *et al.*, 2000; Nakayama *et al.*, 1996) que se potencia en ratones deficientes para $p27^{Kip1}$ y para $p19^{INK4d}$ (Cunningham *et al.*, 2002). Dado que hemos observado que $p27^{Kip1}$ se expresa en todas las CGRs, no podemos descartar que prevenga la endoreduplicación tanto en las 2C como en las 4C. De hecho, los resultados obtenidos con los ARNi para $p27^{Kip1}$ demuestran un incremento del contenido de ADN en todas las CGRs.

Los ratones $p27^{Kip1-/-}$ muestran rasgos de hiperplasia en diferentes órganos, incluida la retina. Sin embargo, las distintas poblaciones de la retina tienen la misma proporción de células (Fero *et al.*, 1996; Nakayama *et al.*, 1996). En cambio, se observa un mayor nivel de apoptosis, lo que sugiere una mayor compensación por las rondas extras de división (Dyer y Cepko, 2001a). Asimismo, se ha observado que los axones del nervio óptico de los ratones $p27^{Kip1-/-}$ tienen un tamaño muy superior al de los ratones control (Lopez-Sanchez *et al.*, 2007a), lo que concordaría con neuronas que han sufrido endoreduplicación, formando axones de mayor tamaño y de somas mayores

(Morillo *et al.*, 2010). Asimismo, p27^{Kip1} es capaz de inhibir a MCM7 necesaria para la licencia de duplicación del ADN (Nallamshetty *et al.*, 2005), una observación que abunda aún más en su posible papel regulador de la endoreduplicación en CGRs. Aunque p27^{Kip1} ha sido involucrado en la diferenciación neuronal promoviendo la expresión de *Neurog2* (Kawauchi *et al.*, 2013), este hecho no descarta la participación de p27^{Kip1} en la regulación de la endoreduplicación. De hecho, este CKI es una proteína pleiotrópica al participar también en la migración neuronal (Kawauchi *et al.*, 2006; Nguyen *et al.*, 2006).

5. Posibles implicaciones de la tetraploidía neuronal en patología

La re-entrada en ciclo de neuronas diferenciadas es un proceso común a distintas patologías cerebrales, tanto en daño agudo como en procesos neurodegenerativos (Wang *et al.*, 2009). Se han encontrado marcadores que implican al ciclo celular en diversas enfermedades como: Alzheimer (Arendt, 2012; Arendt *et al.*, 2010; Mosch *et al.*, 2007), isquemia/hipoxia (Burns *et al.*, 2007; Love, 2003; Wen *et al.*, 2004), enfermedad de Parkinson (Höglinger *et al.*, 2007; Jordan-Sciutto *et al.*, 2003); Ataxia Telangiectasia (Yang y Herrup, 2005); encefalitis inducida por virus, en la que se encuentran células gigantes multinucleadas (Jordan-Sciutto *et al.*, 2002); enfermedad de Huntington (Akashiba *et al.*, 2008; Fernandez-Fernandez *et al.*, 2011; Pelegrí *et al.*, 2008); esclerosis lateral amiotrófica (Nguyen *et al.*, 2003; Ranganathan *et al.*, 2001; Ranganathan y Bowser, 2003) y diversas taupatías (Stone *et al.*, 2011). También se ha encontrado expresión de proteínas del ciclo celular en otras enfermedades neurológicas como Síndrome de Down, enfermedad de Pick's, Parálisis Supranuclear Progresiva (Camin *et al.*, 2006). Se han llegado a proponer reguladores de ciclo celular como posibles estrategia terapéuticas para infarto cerebral (Osuga *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002), excitotoxicidad (Verdaguer *et al.*, 2004) enfermedad de Alzheimer (Woods *et al.*, 2007) y trauma (Di Giovanni *et al.*, 2005). La inhibición de las CDKs mediante roscovitina y flavopiridol tiene efectos neuroprotectores en cultivos celulares (Verdaguer *et al.*, 2004). El estrés oxidativo es otro elemento común a las enfermedades neurodegenerativas y neurológicas (Woods *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2007) que puede provocar la reactivación del ciclo celular (Klein *et al.*, 2002).

En el caso de las enfermedades en las que se produce un daño cerebral agudo tales como excitotoxicidad por ácido kaínico y trauma, la reactivación del ciclo celular se detiene en la transición G1/S, dando lugar a la apoptosis (Byrnes *et al.*, 2007; Kuan *et al.*, 2004). En otros casos las neuronas sufren transición G1/S (Höglinger *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2003), observándose que aquellas que duplican su ADN no sufren mitosis y permanecen durante mucho tiempo con doble contenido de ADN antes de morir finalmente por apoptosis (Herrup, 2010; Herrup y Yang, 2007; Ogawa *et al.*, 2003b). Esta situación tiene lugar por ejemplo en neuronas sometidas a isquemia/hipoxia (Burns *et al.*, 2007; Byrnes *et al.*, 2007), que incorporan BrdU y permanecen vivas durante días antes de sufrir apoptosis. De una manera muy elegante, Burns *et al.* (2007) demostraron que la inmensa mayoría de células positivas para NeuN que incorporaban BrdU no habían pasado por estadios inmaduros, indicando que no habían surgido por neurogénesis adulta (Burns *et al.*, 2007). Se han encontrado otros ejemplos de reactivación del ciclo celular y poliploidización en la enfermedad de Alzheimer (Arendt *et al.*, 2010; Mosch *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2001) y en enfermedad de Parkinson (Höglinger *et al.*, 2007). Estas observaciones contrastan con el concepto ampliamente extendido de que la re-entrada en ciclo de las neuronas supone su muerte rápida por apoptosis (Yang *et al.*, 2003). Sin embargo, de ser así, no se podría justificar el desarrollo lento y progresivo de las enfermedades neurodegenerativas. A pesar del esfuerzo realizado por múltiples laboratorios para establecer la causa de la reactivación del ciclo celular en neuronas (Biswas *et al.*, 2005; Konishi *et al.*, 2002; Konishi y Bonni, 2003; Liu *et al.*, 2004; 2005, Morillo *et al.*, 2012), el mecanismo por el cual dichas neuronas bloqueaban la transición G2/M se desconocía hasta la fecha (Herrup, 2010). Nosotros hemos demostrado en este trabajo el mecanismo por el cual las neuronas tetraploides generadas en el desarrollo se mantienen en un estado similar a G2, que puede ser similar al que tienen lugar en las neuronas tetraploides que se generan en condiciones patológicas.

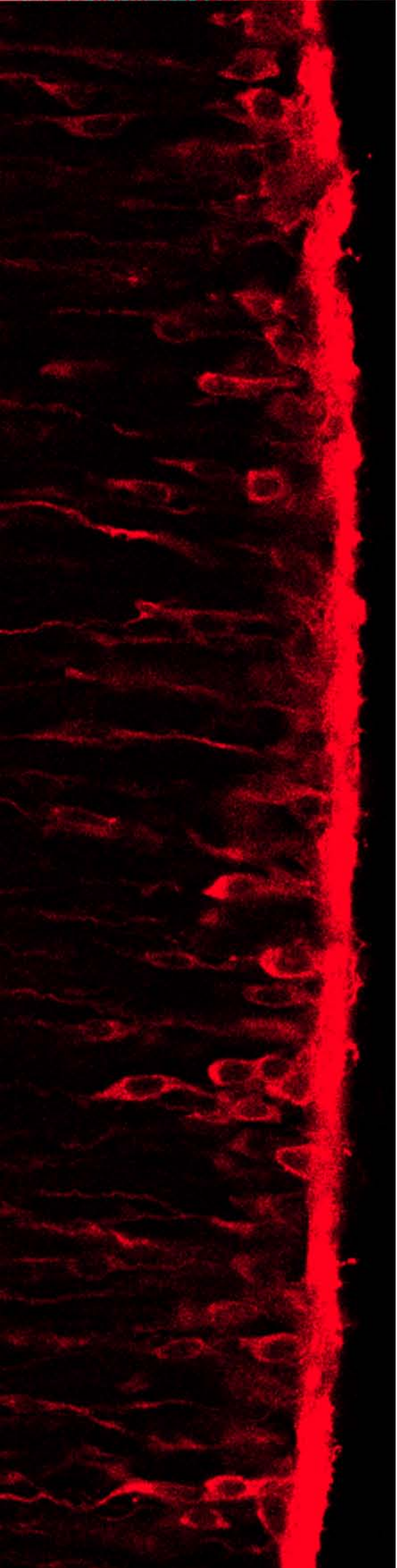
Es posible que el mecanismo por el cual las neuronas tetraploides se mantienen en un estado similar al que hemos descrito en este trabajo, sea similar al que llevan a cabo las tetraploides somáticas generadas en condiciones patológicas, evitando que mueran por apoptosis (Frade y López-Sánchez, 2010). La inactivación de Cdk1 inducida por BDNF es un evento crucial para el mantenimiento de la tetraploidía durante el desarrollo embrionario y las condiciones patológicas. De acuerdo con esta

hipótesis se ha detectado el complejo CC activo en las neuronas de la enfermedad de Alzheimer con ovillos neurofibrilares (Nagy *et al.*, 1997; Pei *et al.*, 2002; Tsujioka *et al.*, 1999; Vincent *et al.*, 1997). Además, BDNF favorece la supervivencia neuronal en muchas enfermedades neurodegenerativas (Allen *et al.*, 2013; Skaper, 2008; Zhang *et al.*, 2011a; Zuccato y Cattaneo, 2009). El descenso de TrkB y BDNF observado en estadios tardíos de esta enfermedad (Ferrer *et al.*, 1999) pueden ser la causa de la degeneración neuronal (López-Sánchez y Frade, 2013).

p75^{NTR} puede volver a expresarse en el sistema nervioso adulto en condiciones neuropatológicas como la enfermedad de Párkinson (Chen *et al.*, 2008); la enfermedad de Alzheimer (Hu *et al.*, 2002); la esclerosis lateral amiotrófica (Lowry *et al.*, 2001) y enfermedad de Huntington (Zuccato *et al.*, 2008), por lo que puede estar participando en el proceso de neurodegeneración (Dechant y Barde, 2002). Asimismo, existe una mayor presencia de proNGF en el cerebro con Alzheimer (Fahnestock *et al.*, 2001; Teng *et al.*, 2010) y en el córtex de ratas epilépticas (Volosin *et al.*, 2006). p75^{NTR} podría estar induciendo la re-entrada en ciclo celular de estas patologías generando neuronas tetraploides, con árboles dendríticos y somas mayores, generando intermedios tetraploides como una medida para escapar a la muerte celular, pero cuyos cambios estructurales podrían conllevar alteraciones en su función, en su mecanismo y en la transmisión eléctrica (Frade y López-Sánchez, 2010). Estas neuronas poliploides serían más vulnerables a la muerte celular (Arendt *et al.*, 2010).

En las enfermedades neurodegenerativas se ha demostrado la existencia de reactivación de ciclo celular en células diferenciadas y su mantenimiento como células tetraploides antes de morir por apoptosis. Se ha observado un incremento de los niveles de p27^{Kip1} en distintas enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer (Ogawa *et al.*, 2003a), Huntington (Akashiba *et al.*, 2008; Cong *et al.*, 2012), e isquemia (Pillai *et al.*, 2011).

El estudio de la contribución de la tetraploidía y la reactivación del ciclo celular al desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas es un factor a tener en cuenta a la hora de buscar nuevas estrategias y dianas terapéuticas para las mismas.



VI. CONCLUSIONES

1. TrkB se expresa en una subpoblación de CGRs en proceso de diferenciación susceptible de adquirir condición tetraploide.
2. Cdk1 se expresa en las CGRs en proceso de diferenciación susceptibles de llevar a cabo mitosis ectópicas *in vivo* y positivas para TrkB.
3. BDNF disminuye el nivel de expresión de proteína Cdk1 en las CGRs, pero no altera los niveles de su ARNm.
4. BDNF disminuye específicamente la actividad de Cdk1 mediante la fosforilación de su Tyr15.
5. La fosforilación de Cdk1 en su Tyr15 por BDNF está inducida por TrkB de manera independiente de Wee1 y requiere la activación previa de p75^{NTR} por NGF.
6. p27^{Kip1} se expresa en CGRs susceptibles de convertirse en tetraploides.
7. La disminución de los niveles de p27^{Kip1} favorece la síntesis de ADN en cultivos de retina enriquecidos en CGRs, pero no induce su entrada en mitosis, sugiriendo la participación de este CKI en el bloqueo de rondas extra de endorreduplicación en las CGRs.



VII. BIBLIOGRAFÍA

- Akashiba H., Ikegaya Y., Nishiyama N., Matsuki N.** 2008. Differential involvement of cell cycle reactivation between striatal and cortical neurons in cell death induced by 3-nitropropionic acid. *J Biol Chem.* **283**:6594-606
- Allen S.J., Watson J.J., Shoemark D.K., Barua N.U., Patel N.K.** 2013. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacol Ther.* **138**:155-75
- Allington C., Shamovsky I.L., Ross G.M., Riopelle R.J.** 2001. Zinc inhibits p75^{NTR}-mediated apoptosis in chick neural retina. *Cell Death Differ.* **8**:451-456
- Almeida R.D., Manadas B.J., Melo C.V., Gomes J.R., Mendes C.S., Grãos M.M., Carvalho R.F., Carvalho A.P., Duarte C.B.** 2005. Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways. *Cell Death Differ.* **12**:1329-43
- Ambrosino C., Nebreda A.R.** 2001. Cell cycle regulation by p38 MAP kinases. *Biol Cell.* **93**:47-5
- Arendt T.** 2012. Cell cycle activation and aneuploid neurons in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol.* **46**:125-35
- Arendt T., Brückner M.K., Mosch B., Lösche A.** 2010. Selective cell death of hyperplod neurons in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* **177**:15-20
- Arévalo J.C., Conde B., Hempstead B.L., Chao M.V., Martin-Zanca D., Perez P.** 2000. TrkA immunoglobulin-like ligand binding domains inhibit spontaneous activation of the receptor. *Mol Cell Biol.* **20**:5908-16
- Arévalo J.C., Wu S.H.** 2006. Neurotrophin signaling: many exciting surprises! *Cell Mol Life Sci.* **63**: 1523-37
- Arlotta P., Molyneaux B.J., Chen J., Inoue J., Kominami R., Macklis J.D.** 2005. Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo. *Neuron.* **45**:207-21
- Baldin V., Ducommun B.** 1995. Subcellular localisation of human wee1 kinase is regulated during the cell cycle. *J Cell Sci.* **108**:2425-32
- Bamji S.X., Majdan M., Pozniak C.D., Belliveau D.J., Aloyz R., Kohn J., Causing C.G., Miller F.D.** 1998. The p75 neurotrophin receptor mediates neuronal apoptosis and is essential for naturally occurring sympathetic neuron death. *J Cell Biol.* **140**:911-23
- Barde Y.A., Edgar D., Thoenen H.** 1982. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* **1**:549-553
- Barker P.A.** 2007. High affinity not in the vicinity? *Neuron.* **53**:1-4
- Baye L.M., Link B.A.** 2008. Nuclear Migration During Retinal Development. *Brain Res.* **1192**: 29-36

- Benzion G., Phillips R., Rines H.W.** 1987. Case Histories of Genetic Variability *in vitro*: Oats and Maize. **22**:435-446
- Berg M.M., Sternberg D.W., Parada L.F., Chao M.V.** 1992. K-252a inhibits nerve growth factor-induced trk proto-oncogene tyrosine phosphorylation and kinase activity. *J Biol Chem.* **267**: 13-16
- Berkemeier L.R., Winslow J.W., Kaplan D.R., Nikolic K., Goeddel D.V., Rosenthal A.** 1991. Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron.* **7**:857-66
- Besson A., Dowdy S.F., Roberts J.M.** 2008. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell.* **14**:159-69
- Bicknell K.A., Coxon C.H., Brooks G.** 2004. Forced expression of the cyclin B1-Cdc2 complex induces proliferation in adult rat cardiomyocytes. *Biochem J.* **382**:411-416
- Biesterfeld S., Gerres K., Fischer-Wein G., Böcking A.** 1994. Polyploidy in non-neoplastic tissues. *J Clin Pathol.* **47**:38-42
- Bilderback T.R., Gazula V.R., Lisanti M.P., Dobrowsky R.T.** 1999. Caveolin interacts with Trk A and p75(NTR) and regulates neurotrophin signaling pathways. *J Biol Chem.* **274**:257-63
- Bilderback T.R., Grigsby R.J., Dobrowsky R.T.** 1997. Association of p75(NTR) with caveolin and localization of neurotrophin-induced sphingomyelin hydrolysis to caveolae. *J Biol Chem.* **272**:10922-7
- Bisbis B., Delmas F., Joubès J., Sicard A., Hernould M., Inzé D., Mouras A., Chevalier C.** 2006. Cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors regulate the CDK-cyclin complex activities in endoreduplicating cells of developing tomato fruit. *J Biol Chem.* **281**:7374-83
- Biswas S.C., Liu D.X., Greene L.A.** 2005. Bim is a direct target of a neuronal E2F-dependent apoptotic pathway. *J. Neurosci.* **25**:8349-8358
- Borgne A., Ostvold A.C., Flament S., Meijer L.** 1999. Intra-M phase-promoting factor phosphorylation of cyclin B at the prophase/metaphase transition. *J Biol Chem.* **274**:11977-86
- Boutros R., Dozier C., Ducommun B.** 2006. The when and wheres of CDC25 phosphatases. *Curr Opin Cell Biol.* **18**:185-91
- Bovolenta P., Frade J.M., Martí E., Rodríguez-Peña M.A., Barde Y.A., Rodríguez-Tébar A.** 1996. Neurotrophin-3 antibodies disrupt the normal development of the chick retina. *J Neurosci.* **16**:4402-10
- Buchkovich, K.J., Ziff E.B.** 1994. Nerve growth factor regulates the expression and activity of p33cdk2 and p34cdc2 kinases in PC12 pheochromocytoma cells. *Mol Biol Cell* **5**:1225-1241
- Bungenberg de Jong C.M.** 1957. Polyploidy in animals. *Bibliog Genetica.* **17**:111-228
- Burns, K.A., Ayoub A.E., Breunig J.J., Adhami F., Weng W.L., Colbert M.C., Rakic P., Kuan C.Y.** 2007. Nestin-CreER mice reveal DNA synthesis by nonapoptotic neurons following cerebral ischemia hypoxia. *Cereb Cortex.* **17**:2585-2592

- Byrnes K.R., Stoica B.A., Fricke S., Di Giovanni S., Faden A.I.** 2007. Cell cycle activation contributes to post-mitotic cell death and secondary damage after spinal cord injury. *Brain*. **130**:2977-92
- Camin A., Verdaguer E., Folch J., Pallàs M.** 2006. Involvement of calpain activation in neurodegenerative processes. *CNS Drug Rev*. **12**:135-48
- Cánepa E.T., Scassa M.E., Ceruti J.M., Marazita M.C., Carcagno A.L., Sirkin P.F., Ogara M.F.** 2007. INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions. *IUBMB Life*. **59**:419-26
- Carter B.D., Kaltschmidt C., Kaltschmidt B., Offenhäuser N., Böhm-Matthaei R., Baeuerle P.A., Barde Y.A.** 1996. Selective activation of NF-kappa B by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. *Science*. **272**:542-5
- Casaccia-Bonnet P., Carter B.D., Dobrowsky R.T., Chao M.V.** 1996. Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. *Nature*. **383**:716-9
- Casademunt E., Carter B.D., Benzel I., Frade J.M., Dechant G., Barde Y.A.** 1999. The zincfinger protein NRIF interacts with the neurotrophin receptor p75(NTR) and participates in programmed cell death. *EMBO J*. **18**:6050-61
- Chang M.S., Arevalo J.C., Chao M.V.** 2004. Ternary complex with Trk, p75, and an ankyrin-rich membrane spanning protein. *J Neurosci Res*. **78**:186-92
- Chao M.V.** 2003. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nature Rev Neurosci*. **4**:299–309
- Chao M.V., Bothwell M.A., Ross A.H., Koprowski H., Lanahan A.A., Buck C.R., Sehgal A.** 1986. Gene transfer and molecular cloning of the human NGF receptor. *Science* **232**:518–521
- Chen H.Z., Ouseph M.M., Li J., Pécot T., Chokshi V., Kent L., Bae S., Byrne M., Duran C., Comstock G., Trikha P., Mair M., Senapati S., Martin C.K., Gandhi S., Wilson N., Liu B., Huang Y.W., Thompson J.C., Raman S., Singh S., Leone M., Machiraju R., Huang K., Mo X., Fernandez S., Kalaszczyńska I., Wolgemuth D.J., Sicinski P., Huang T., Jin V., Leone G.** 2012. Canonical and atypical E2Fs regulate the mammalian endocycle. *Nat Cell Biol*. **14**:1192-202
- Chen L.W., Yung K.K., Chan Y.S., Shum D.K., Bolam J.P.** 2008. The proNGF-p75NTR-sortilin signalling complex as new target for the therapeutic treatment of Parkinson's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. **7**:512-23
- Cheung Z.H., Chin W.H., Chen Y., Ng Y.P., Ip N.Y.** 2007. Cdk5 is involved in BDNF-stimulated dendritic growth in hippocampal neurons. *PLoS Biol*. **5**:e63
- Chittka A., Arevalo J.C., Rodriguez-Guzman M., Pérez P., Chao M.V., Sendtner M.** 2004. The p75NTR-interacting protein SC1 inhibits cell cycle progression by transcriptional repression of cyclin E. *J Cell Biol*. **164**:985-96

- Chittka A., Chao M.V.** 1999. Identification of a zinc finger protein whose subcellular distribution is regulated by serum and nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**:10705-10
- Cohen S., Levi-Montalcini R.** 1956. A Nerve Growth-Stimulating Factor isolated from snake venom. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **42**:571-4
- Cohen S., Levi-Montalcini R., Hamburger V.** 1954. A Nerve Growth-Stimulating Factor isolated from Sarcom as 37 and 180. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **40**:1014-8
- Comai L.** 2005. The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nat Rev Genet.* **6**:836-46
- Cong S.Y., Pepers B.A., Zhou T.T., Kerkdijk H., Roos R.A., van Ommen G.J., Dorsman J.C.** 2012. Huntingtin with an expanded polyglutamine repeat affects the Jab1-p27(Kip1) pathway. *Neurobiol Dis.* **46**:673-81
- Costantini C., Rossi F., Formaggio E., Bernardoni R., Cecconi D., Della-Bianca V.** 2005. Characterization of the signaling pathway downstream p75 neurotrophin receptor involved in beta-amyloid peptide-dependent cell death. *J Mol Neurosci.* **25**:141-56
- Crook J.D., Peterson B.B., Packer O.S., Robinson F.R., Troy J.B., Dacey D.M.** 2008. Y-cell receptive field and collicular projection of parasol ganglion cells in macaque monkey retina. *J Neurosci.* **28**:11277-91
- Cunningham J.J., Levine E.M., Zindy F., Goloubeva O., Roussel M.F., Smeyne R.J.** 2002. The cyclin-dependent kinase inhibitors p19(Ink4d) and p27(Kip1) are coexpressed in select retinal cells and act cooperatively to control cell cycle exit. *Mol Cell Neurosci.* **19**:359-374
- Das R.M., Van Hateren N.J., Howell G.R., Farrell E.R., Bangs F.K., Porteous V.C., Manning E.M., McGrew M.J., Ohyama K., Sacco M.A., Halley P.A., Sang H.M., Storey K.G., Placzek M., Tickle C., Nair V.K., Wilson S.A.** 2006. A robust system for RNA interference in the chicken using a modified microRNA operon. *Dev Biol.* **294**:554-63
- De Bondt H.L., Rosenblatt J., Jancarik J., Jones H.D., Morgan D.O., Kim S.H.** 1993. Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature.* **363**:595-602
- De Curtis I., Quaranta V., Tamura R.N., Reichardt L.F.** 1991. Laminin receptors in the retina: sequence analysis of the chick integrin alpha 6 subunit. Evidence for transcriptional and posttranslational regulation. *J Cell Biol.* **113**:405-16
- De la Rosa E.J., Arribas A., Frade J.M., Rodríguez-Tébar A.** 1994. Role of neurotrophins in the control of neural development: neurotrophin-3 promotes both neuron differentiation and survival of cultured chick retinal cells. *Neuroscience.* **58**:347-352
- De Souza C.P., Ellem K.A., Gabrielli B.G.** 2000. Centrosomal and cytoplasmic Cdc2/cyclin B1 activation precedes nuclear mitotic events. *Exp Cell Res.* **257**:11-21
- Dechant G., Barde Y.A.** 2002. The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat Neurosci.* **5**:1131-6

- Dechant G., Biffo S., Okazawa H., Kolbeck R., Pottgiesser J., Barde Y.A.** 1993. Expression and binding characteristics of the BDNF receptor chick trkB. *Development*. **119**:545-58
- Di Giovanni S., Movsesyan V., Ahmed F., Cernak I., Schinelli S., Stoica B., Faden A.I.** 2005. Cell cycle inhibition provides neuroprotection and reduces glial proliferation and scar formation after traumatic brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102**:8333-8
- Dieni S., Matsumoto T., Dekkers M., Rauskolb S., Ionescu M.S., Deogracias R., Gundelfinger E.D., Kojima M., Nestel S., Frotscher M., Barde Y.A.** 2012. BDNF and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons. *J Cell Biol*. **196**: 775–788
- Dimchev G.A., Al-Shanti N., Stewart C.E.** 2013. Phospho-tyrosine phosphatase inhibitor Bpv(Hopic) enhances C2C12 myoblast migration in vitro. Requirement of PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways. *J Muscle Res Cell Motil*. **34**:125-36
- Donaldson A.D., Blow J.J.** 1999. The regulation of replication origin activation. *Curr Opin Genet Dev*. **9**:62-8
- Draetta G.** 1993. Cdc2 activation: the interplay of cyclin binding and Thr161 phosphorylation. *Trends Cell Biol*. **3**:287-9
- Draetta G., Eckstein J.** 1997. Cdc25 protein phosphatases in cell proliferation. *Biochim Biophys Acta*. **1332**: M53-63
- Duncan A.W.** 2013. Aneuploidy, polyploidy and ploidy reversal in the liver. *Semin Cell Dev Biol*. **24**:347-56
- Dyer M.A., Cepko C.L.** 2001a. p27Kip1 and p57Kip2 regulate proliferation in distinct retinal progenitor cell populations. *J Neurosci*. **21**:4259-71
- Dyer M.A., Cepko C.L.** 2001b. Regulating proliferation during retinal development. *Nat Rev Neurosci*. **2**:333-42
- Edgar B.A., Orr-Weaver T.L.** 2001. Endoreplication cell cycles: more for less. *Cell*. **105**:297-306
- Engel F.B., Schebesta M., Keating M.T.** 2006. Anillin localization defect in cardiomyocyte binucleation. *J Mol Cell Cardiol*. **41**:601-12
- Espanel X., Kastner A., Stettler O., Tavitian B., Brun G., Gillet G.** 1997. p34(cdc2) and mitotic cyclin expression in the developing quail neuroretina. *Int J Dev Biol*. **41**:469-476
- Esposito D., Patel P., Stephens R.M., Perez P., Chao M.V., Kaplan D.R., Hempstead B.L.** 2001. The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor. *J Biol Chem*. **276**:32687-95
- Evans D. A.** 1987. Case Histories of Genetic Variability *in vitro*: tomato. **21**:419-434
- Fahnestock M., Michalski B., Xu B., Coughlin M.D.** 2001. The precursor pro-nerve growth factor is the predominant form of nerve growth factor in brain and is increased in Alzheimer's disease. *Mol Cell Neurosci*. **18**:210–220

Fernandez-Fernandez M.R., Ferrer I., Lucas J.J. 2011. Impaired ATF6 α processing, decreased Rheb and neuronal cell cycle re-entry in Huntington's disease. *Neurobiol Dis.* **41**:23-32

Fero M.L., Rivkin M., Tasch M., Porter P., Carow C.E., Firpo E., Polyak K., Tsai L.H., Broudy V., Perlmutter R.M., Kaushansky K., Roberts J.M. 1996. A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell.* **85**:733-44

Ferrer I., Marín C., Rey M.J., Ribalta T., Goutan E., Blanco R., Tolosa E., Martí E. 1999. BDNF and full-length and truncated TrkB expression in Alzheimer disease. Implications in therapeutic strategies. *J Neuropathol Exp Neurol.* **58**:729-739

Fesquet D., Labbé J.C., Derancourt J., Capony J.P., Galas S., Girard F., Lorca T., Shuttleworth J., Dorée M., Cavadore J.C. 1993. The MO15 gene encodes the catalytic subunit of a protein kinase that activates cdc2 and other cyclin-dependent kinases (CDKs) through phosphorylation of Thr161 and its homologues. *EMBO J.* **12**: 3111-21

Fisher R.P. 2012. The CDK Network: Linking Cycles of Cell Division and Gene Expression. *Genes Cancer.* **3**:731-8

Fisher R.P., Morgan D.O. 1994. A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell.* **78**:713-24

Flemming A.J., Shen Z.Z., Cunha A., Emmons S.W., Leroi A.M. 2000. Somatic polyploidization and cellular proliferation drive body size evolution in nematodes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**:5285-90

Fletcher L., Cheng Y., Muschel R.J. 2002. Abolishment of the Tyr-15 inhibitory phosphorylation site on cdc2 reduces the radiation-induced G2 delay, revealing a potential checkpoint in early mitosis. *Cancer Res.* **62**:241-250

Foster D.A., Yellen P., Xu L., Saqcena M. 2010. Regulation of G1 Cell Cycle Progression: Distinguishing the Restriction Point from a Nutrient-Sensing Cell Growth Checkpoint(s). *Genes Cancer.* **1**:1124-31

Fox D.T., Duronio R.J. 2013. Endoreplication and polyploidy: insights into development and disease. *Development.* **140**:3-12

Frade J.M. 2000. Unscheduled cell cycle re-entry induced by NGF precedes cell death in nascent retinal neurones. *J. Cell Sci.* **113**:1139-1148

Frade J.M. 2002. Interkinetic nuclear movement in the vertebrate neuroepithelium: encounters with an old acquaintance. *Prog Brain Res.* **136**:67-71

Frade J.M. 2005. Las neurotrofinas y sus receptores. *Mente y Cerebro.* **14**:10-15

Frade J.M., Barde Y.A. 1998. Microglia-derived nerve growth factor causes cell death in the developing retina. *Neuron.* **20**:35-41

- Frade J.M., Barde Y.A.** 1999. Genetic evidence for cell death mediated by nerve growth factor and the neurotrophin receptor p75 in the developing mouse retina and spinal cord. *Development*. **126**:683-690
- Frade J.M., Bovolenta P., Martínez-Morales J.R., Arribas A., Barbas J.A., Rodríguez-Tébar A.** 1997. Control of early cell death by BDNF in the chick retina. *Development* **124**:3313-3320
- Frade J.M., Bovolenta P., Rodríguez-Tébar A.** 1999. Neurotrophins and other growth factors in the generation of retinal neurons. *Microsc Res Tech*. **45**:243-51
- Frade J.M., López-Sánchez N.** 2010. A novel hypothesis for Alzheimer disease based on neuronal tetraploidy induced by p75^{NTR}. *Cell Cycle*. **9**:1934-1941
- Frade J.M., Martí E., Bovolenta P., Rodríguez-Peña M.A., Pérez-García D., Rohrer H., Edgar D., Rodríguez-Tébar A.** 1996a. Insulin-like growth factor-I stimulates neurogenesis in chick retina by regulating expression of the alpha 6 integrin subunit. *Development*. **122**:2497-2506
- Frade J.M., Martínez-Morales J.R., Rodríguez-Tébar A.** 1996b. Laminin-1 selectively stimulates neuron generation from cultured retinal neuroepithelial cells. *Exp Cell Res*. **222**:140-149
- Frade J.M., Rodríguez-Tébar A.** 2000. Neuroepithelial differentiation induced by ECM molecules. *Methods Mol Biol*. **139**:257-264
- Frade J.M., Rodríguez-Tébar A., Barde Y.A.** 1996c. Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature*. **383**:166-168
- Furukawa Y., Iwase S., Kikuchi J., Terui Y., Nakamura M., Yamada H., Kano Y., Matsuda M.** 2000. Phosphorylation of Bcl-2 protein by CDC2 kinase during G2/M phases and its role in cell cycle regulation. *J Biol Chem*. **275**:21661-7
- Gallant P., Nigg E.A.** 1992. Cyclin B2 undergoes cell cycle-dependent nuclear translocation and, when expressed as a non-destructible mutant, causes mitotic arrest in HeLa cells. *J Cell Biol*. **117**:213-24
- Gallardo M.H., Bickham J.W., Honeycutt R.L., Ojeda R.A., Köhler N.** 1999. Discovery of tetraploidy in a mammal. *Nature*. **401**:341
- Gavet O., Pines J.** 2010. Activation of cyclin B1-Cdk1 synchronizes events in the nucleus and the cytoplasm at mitosis. *J Cell Biol*. **189**:247-59
- Gentric G., Celton-Morizur S., Desdouets C.** 2012. Polyploidy and liver proliferation. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. **36**:29-34
- Gentry J.J., Barker P.A., Carter B.D.** 2004. The p75 neurotrophin receptor: multiple interactors and numerous functions. *Prog Brain Res*. **146**:25-39
- Gilbert. S.F.** 2005. *Biología del Desarrollo* 7ª Edición. **12**:419-455

- Giuliani A., D'Intino G., Paradisi M., Giardino L., Calzà L.** 2004. p75(NTR)-immunoreactivity in the subventricular zone of adult male rats: expression by cycling cells. *J Mol Histol.* **35**:749-58
- Gong D., Ferrell J.E.Jr.** The roles of cyclin A2, B1, and B2 in early and late mitotic events. *Mol Biol Cell.* 2010 **21**:3149-61
- González-Hoyuela M., Barbas J.A., Rodríguez-Tébar A.** 2001. The autoregulation of retinal ganglion cell number. *Development.* **128**:117-24
- Gopinathan L., Ratnacaram C.K., Kaldis P.** 2011. Established and novel Cdk/cyclin complexes regulating the cell cycle and development. *Results Probl Cell Differ.* **53**:365-89
- Goto T., Monk M.** 1998. Regulation of X-chromosome inactivation indevelopment in mice and humans. *Microbiol Mol Biol Rev.* **62**:362–378
- Götz M., Huttner W.B.** 2005. The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **6**:777-88
- Götz R., Köster R., Winkler C., Raulf F., Lottspeich F., Schartl M., Thoenen H.** 1994. Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature.* **372**:266-9
- Gould K.L., Nurse P.** 1989. Tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc2+ proteinkinase regulates entry into mitosis. *Nature.* **342**:39-45
- Gupta S.** 2000. Hepatic polyploidy and liver growth control. *Semin Cancer Biol.* **10**:161-71
- Hagting A., Karlsson C., Clute P., Jackman M., Pines J.** 1998. MPF localization is controlled by nuclear export. *EMBO J.* **17**:4127-38
- Hallböök F., Bäckström A., Kullander K., Ebendal T., Carri N.G.** 1996. Expression of neurotrophins and trk receptors in the avian retina. *J Comp Neurol.* **364**:664-76
- Hallböök F., Bäckström A., Kullander K., Kylberg A., Williams R., Ebendal T.** 1995. Neurotrophins and their receptors in chicken neuronal development. *Int J Dev Biol.* **39**:855-68
- Hallböök F., Ibáñez C.F., Persson H.** 1991. Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron.* **6**:845-58
- Hamburger V., Hamilton H.L.** 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol.* **88**:49-92
- Harashima H., Dissmeyer N., Schnittger A.** 2013. Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. *Trends Cell Biol.* **23**:345-451
- Heald R., McLoughlin M., McKeon F.** 1993. Human wee1 maintains mitotic timing by protecting the nucleus from cytoplasmically activated Cdc2 kinase. *Cell.* **74**:463-74
- Herman C.J., Lapham L.W.** 1968. DNA content of neurons in the cat hippocampus. *Science.* **160**:537
- Herman C.J., Lapham L.W.** 1969. Neuronal polyploidy and nuclear volumes in the cat central nervous system. *Brain Res.* **15**:35-48

- Herrup K.** 2010. The involvement of cell cycle events in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther.* **2**:13
- Herrup K., Yang Y.** 2007. Cell cycle regulation in the postmitotic neuron: oxymoron or new biology? *Nat Rev Neurosci.* **8**:368-378
- Hirai H., Iwasawa Y., Okada M., Arai T., Nishibata T., Kobayashi M., Kimura T., Kaneko N., Ohtani J., Yamanaka K., Itadani H., Takahashi-Suzuki I., Fukasawa K., Oki H., Nambu T., Jiang J., Sakai T., Arakawa H., Sakamoto T., Sagara T., Yoshizumi T., Mizuarai S., Kotani H.** 2009. Small-molecule inhibition of Wee1 kinase by MK-1775 selectively sensitizes p53-deficient tumor cells to DNA-damaging agents. *Mol Cancer Ther.* **8**: 2992-3000
- Hochegger H., Takeda S., Hunt T.** 2008. Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? *Nat Rev Mol Cell Biol.* **9**:910-6
- Höglinger G.U., Breunig J.J., Depboylu C., Rouaux C., Michel P.P., Alvarez-Fischer D., Boutillier A.L., Degregori J., Oertel W.H., Rakic P., Hirsch E.C., Hunot S.** 2007. The pRb/E2F cell-cycle pathway mediates cell death in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**:3585-90
- Hohn A., Leibrock J., Bailey K., Barde Y.A.** 1990. Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature.* **344**:339-41
- Holden P.H., Asopa V., Robertson A.G., Clarke A.R., Tyler S., Bennett G.S., Brain S.D., Wilcock G.K., Allen S.J., Smith S.K., Dawbarn D.** 1997. Immunoglobulin-like domains define the nerve growth factor binding site of the TrkA receptor. *Nat Biotechnol.* **15**:668-72
- Hu X.Y., Zhang H.Y., Qin S., Xu H., Swaab D.F., Zhou J.N.** 2002. Increased p75(NTR) expression in hippocampal neurons containing hyperphosphorylated tau in Alzheimer patients. *Exp Neurol.* **178**:104-11
- Huang E.J., Reichardt L.F.** 2003. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem.* **72**:609-42
- Hughes W.F., McLoon S.C.** 1979. Ganglion cell death during normal retinal development in the chick: comparisons with cell death induced by early target field destruction. *Exp Neurol.* **66**:587-601
- Iglesias T., Cabrera-Poch N., Mitchell M.P., Naven T.J., Rozengurt E., Schiavo G.** 2000. Identification and cloning of Kidins220, a novel neuronal substrate of protein kinase D. *J Biol Chem.* **275**:40048-5
- Ip N.Y., Ibáñez C.F., Nye S.H., McClain J., Jones P.F., Gies D.R., Belluscio L., Le Beau M.M., Espinosa R. 3rd, Squinto S.P., Persson H., Yancopoulos G.D.** 1992. Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**:3060-4

- Irie S., Hachiya T., Rabizadeh S., Maruyama W., Mukai J., Li Y., Reed J.C., Bredesen D.E., Sato T.A.** 1999. Functional interaction of Fas-associated phosphatase-1 (FAP-1) with p75(NTR) and their effect on NF-kappaB activation. *FEBS Lett.* **460**:191-8
- Ito H., Morishita R., Iwamoto I., Mizuno M., Nagata K.I.** 2013. MAGI-1 acts as a scaffolding molecule for NGF receptor-mediated signaling pathway. *Biochim Biophys Acta.* **1833**: 2302-2310
- Ivanisevic L., Banerjee K., Saragovi H.U.** 2003. Differential cross-regulation of TrkA and TrkC tyrosine kinase receptors with p75. *Oncogene.* **22**:5677-5685
- Jackman M., Lindon C., Nigg E.A., Pines J.** 2003. Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nat Cell Biol.* **5**:143-8
- Jacoby R., Stafford D., Kouyama N., Marshak D.** 1996. Synaptic inputs to ON parasol ganglion cells in the primate retina. *J Neurosci.* **16**:8041-56
- Jansen P., Giehl K., Nyengaard J.R., Teng K., Lioubinski O., Sjoegaard S.S., Breiderhoff T., Gotthardt M., Lin F., Eilers A., Petersen C.M., Lewin G.R., Hempstead B.L., Willnow T.E., Nykjaer A.** 2007. Roles for the pro-neurotrophin receptor sortilin in neuronal development, aging and brain injury. *Nat Neurosci.* **10**:1449-57
- Jiang Y., Chen G., Zhang Y., Lu L., Liu S., Cao X.** 2007. Nerve growth factor promotes TLR4 signaling-induced maturation of human dendritic cells in vitro through inducible p75NTR 1. *J Immunol.* **179**:6297-304
- Johnson E.S., Kornbluth S.** 2012. Phosphatases driving mitosis: pushing the gas and lifting the brakes. *Prog Mol Biol Transl Sci.*; **106**:327-41
- Jones K.R., Reichardt L.F.** 1990. Molecular cloning of a human gene that is a member of the nerve growth factor family. *Proc Natl Acad Sci USA.* **87**:8060-8064
- Jordan-Sciutto K.L., Dorsey R., Chalovich E.M., Hammond R.R., Achim C.L.** 2003. Expression patterns of Rb protein in Parkinson disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* **62**:68-74
- Jordan-Sciutto K.L., Wang G., Murphey-Corb M., Wiley C.A.** 2002. Cell cycle proteins exhibit altered expression patterns in lentiviral-associated encephalitis. *J Neurosci.* **22**:2185-95
- Kaplan D.R., Martin-Zanca D., Parada L.F.** 1991. Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk proto-oncogene product induced by NGF. *Nature.* **350**:158-160
- Katsuno Y., Suzuki A., Sugimura K., Okumura K., Zineldeen D.H., Shimada M., Niida H., Mizuno T., Hanaoka F., Nakanishi M.** 2009. Cyclin A-Cdk1 regulates the origin firing program in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106**:3184-9
- Kawaguchi J., Kano K., Naito K.** 2009. Expression profiling of tetraploid mouse embryos in the developmental stages using a cDNA microarray analysis. *J Reprod Dev.* **55**: 670-675
- Kawauchi T., Chihama K., Nabeshima Y., Hoshino M.** 2006. Cdk5 phosphorylates and stabilizes p27Kip1 contributing to actin organization and cortical neuronal migration. *Nat Cell Biol.* **8**:17-26

- Kawauchi T., Shikanai M., Kosodo Y.** 2013. Extra-cell cycle regulatory functions of cyclin-dependent kinases (CDK) and CDK inhibitor proteins contribute to brain development and neurological disorders. *Genes Cells.* **18**:176-94
- Khursigara G., Bertin J., Yano H., Moffett H., DiStefano P.S., Chao M.V.** 2001. A prosurvival function for the p75 receptor death domain mediated via the caspase recruitment domain receptor-interacting protein 2. *J Neurosci.* **21**:5854-63
- Khursigara G., Orlinick J.R., Chao M.V.** 1999. Association of the p75 neurotrophin receptor with TRAF6. *J Biol Chem.* **274**:2597-600
- Kimpinski K., Jelinski S., Mearow K.** 1999. The anti-p75 antibody, MC192, and brain-derived neurotrophic factor inhibit nerve growth factor-dependent neurite growth from adult sensory neurons. *Neuroscience.* **93**:253-263
- Klein J.A., Longo-Guess C.M., Rossmann M.P., Seburn K.L., Hurd R.E., Frankel W.N., Bronson R.T., Ackerman S.L.** 2002. The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature.* **419**:367-74
- Klein R., Lamballe F., Bryant S., Barbacid M.** 1992. The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for neurotrophin-4. *Neuron.* **8**:947-56
- Klein R., Nanduri V., Jing S.A., Lamballe F., Tapley P., Bryant S., Cordon-Cardo C., Jones K.R., Reichardt L.F., Barbacid M.** 1991. The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell.* **66**:395-403
- Klein R., Parada L.F., Coulier F., Barbacid M.** 1989. trkB, a novel tyrosine protein kinase receptor expressed during mouse neural development. *EMBO J.* **8**:3701–3709
- Knüsel B., Hefti F.** 1992. K-252 compounds: modulators of neurotrophin signal transduction. *J Neurochem.* **6**:1987-96
- Kobayashi H., Stewart E., Poon R., Adamczewski J.P., Gannon J., Hunt T.** 1992. Identification of the domains in cyclin A required for binding to, and activation of, p34cdc2 and p32cdk2 protein kinase subunits. *Mol Biol Cell.* **3**:1279-94.
- Konishi Y., Bonni A.** 2003. The E2F-Cdc2 cell-cycle pathway specifically mediates activity deprivation-induced apoptosis of postmitotic neurons. *J Neurosci.* **23**:1649-1658
- Konishi, Y., Lehtinen M., Donovan N., Bonni A.** 2002. Cdc2 phosphorylation of BAD links the cell cycle to the cell death machinery. *Mol Cell.* **9**:1005-1016
- Krek W., Nigg E.A.** 1989. Structure and developmental expression of the chicken CDC2 kinase. *EMBO J.* **8**:3071-8
- Krek W., Nigg E.A.** 1991. Differential phosphorylation of vertebrate p34cdc2 kinase at the G1/S and G2/M transitions of the cell cycle: identification of major phosphorylation sites. *EMBO J.* **10**:305-16
- Kuan C.Y., Schloemer A.J., Lu A., Burns K.A., Weng W.L., Williams M.T., Strauss K.I., Vorhees C.V., Flavell R.A., Davis R.J., Sharp F.R., Rakic P.** 2004. Hypoxia-ischemia

induces DNA synthesis without cell proliferation in dying neurons in adult rodent brain. *J Neurosci.* **24**:10763-72

Lai K.O., Fu W.Y., Ip F.C., Ip N.Y. 1998. Cloning and expression of a novel neurotrophin, NT-7, from carp. *Mol Cell Neurosci.* **11**:64-76

Lamb T.D., Collin S.P., Pugh E.N. Jr. 2007. Evolution of the vertebrate eye: opsins, photoreceptors, retina and eye cup. *Nat Rev Neurosci.* **8**:960-76

Lamballe F., Klein R., Barbacid M. 1991. trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell.* **66**:967-79

Lapham L.W. 1968. Tetraploid DNA content of Purkinje neurons of human cerebellarcortex. *Science.* **159**:310-2

Larochelle S., Merrick K.A., Terret M.E., Wohlbold L., Barboza N.M., Zhang C., Shokat K.M., Jallepalli P.V., Fisher R.P. 2007. Requirements for Cdk7 in the assembly of Cdk1/cyclin B and activation of Cdk2 revealed by chemical genetics in human cells. *Mol Cell.* **25**:839-50

Lasek R.J., Dower W.J. 1971. *Aplysia californica*: analysis of nuclear DNA in individual nuclei of giant neurons. *Science.* **172**:278-280

Latasa M.J., Cisneros E., Frade J.M. 2009. Cell cycle control of Notch signaling and the functional regionalization of the neuroepithelium during vertebrate neurogenesis. *Int J Dev Biol.* **53**:895-908

Lee R., Kermani P., Teng K.K., Hempstead B.L. 2001. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science.* **294**:1945-8

Lees E.M. 1995. Cyclin dependent kinase regulation. *Curr Opin Cell Biol.* **7**:773-80

Lees E.M., Harlow E. 1993. Sequences within the conserved cyclin box of human cyclin A are sufficient for binding to and activation of cdc2 kinase. *Mol Cell Biol.* **13**:1194-201

Leggatt R.A., Iwama G. K. 2003. Occurrence of polyploidy in the fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries.* **13**:237–246

Levi-Montalcini R., Hamburger V.1951. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J Exp Zool.* **116**:321-61

Levine E.M., Close J., Fero M., Ostrovsky A., Reh T.A. 2000. p27(Kip1) regulates cell cycle withdrawal of late multipotent progenitor cells in the mammalian retina. *Dev Biol.* **219**:299-314

Li S., Yin L., Cole E.S, Udani R.A., Karrer K.M. 2006. Progeny of germ line knockouts of ASI2, a gene encoding a putative signal transduction receptor in *Tetrahymena thermophila*, fail to make the transition from sexual reproduction to vegetative growth. *Dev Biol.* **295**:633-4

Liu D.X., Biswas S.C., Greene L.A. 2004. B-myb and C-myb play required roles in neuronal apoptosis evoked by nerve growth factor deprivation and DNA damage. *J Neurosci.* **24**:8720-8725

- Liu D.X., Nath N., Chellappan S.P., Greene L.A.** 2005. Regulation of neuron survival and death by p130 and associated chromatin modifiers. *Genes Dev.* **19**:719-32
- Liu F., Stanton J.J., Wu Z., Piwnica-Worms H.** 1997. The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *Mol Cell Biol.* **17**:571-83
- Lopez-Sanchez E., Frances-Muñoz E., Chaques V., Sanchez-Benavent M.L., Menezo J.L.** 2007a. Optic nerve alterations in P27(Kip1) knockout mice. *Eur J Ophthalmol.* **17**:377-82
- López-Sánchez N., Frade J.M.** 2002. Control of the cell cycle by neurotrophins: lessons from the p75 neurotrophin receptor. *Histol Histopathol.* **17**:1227-1237
- López-Sánchez N., Frade J.M.** 2013. Genetic Evidence for p75NTR-Dependent Tetraploidy in Cortical Projection Neurons from Adult Mice. *J Neurosci.* **33**:7488-500
- López-Sánchez N., González-Fernández Z., Niinobe M., Yoshikawa K., Frade J.M.** 2007b. Single mage gene in the chicken genome encodes CMage, a protein with functional similarities to mammalian type II Mage proteins. *Physiol Genomics.* **30**:156-171
- López-Sánchez N., Ovejero-Benito M.C., Borreguero L., Frade J.M.** 2011. Control of neuronal ploidy during vertebrate development. *Results Probl Cell Differ.* **53**:547-63
- Love S.** 2003. Neuronal expression of cell cycle-related proteins after brain ischaemia in man. *Neurosci Lett.* **353**:29-32
- Lowry K.S., Murray S.S., McLean C.A., Talman P., Mathers S., Lopes E.C., Cheema S.S.** 2001. A potential role for the p75 low-affinity neurotrophin receptor in spinal motor neuron degeneration in murine and human amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* **2**:127-34.
- Luca F.C., Shibuya E.K., Dohrmann C.E., Ruderman J.V.** 1991. Both cyclin A delta 60 and B delta 97 are stable and arrest cells in M-phase, but only cyclin B delta 97 turns on cyclin destruction. *EMBO J.* **10**:4311-20
- MacPhee I.J., Barker P.A.** 1997. Brain-derived neurotrophic factor binding to the p75 neurotrophin receptor reduces TrkA signaling while increasing serine phosphorylation in the TrkA intracellular domain. *J Biol Chem.* **272**:23547-51
- Madej T., Address K.J., Fong J.H., Geer L.Y., Geer R.C., Lanczycki C.J., Liu C., Lu S., Marchler-Bauer A., Panchenko A.R., Chen J., Thiessen P.A., Wang Y., Zhang D., Bryant S.H.** 2012. MMDB: 3D structures and macromolecular interactions. *Nucleic Acids Res.* **40**:D461-4
- Madlung A., Wendel J.F.** 2013. Genetic and Epigenetic Aspects of Polyploid Evolution in Plants. *Cytogenet Genome Res.* 1-16
- Mahadeo D., Kaplan L., Chao M.V., Hempstead B.L.** 1994. High affinity nerve growth factor binding displays a faster rate of association than p140trk binding. Implications for multi-subunit polypeptide receptors. *J Biol Chem.* **269**:6884-9

- Maisonpierre P.C., Belluscio L., Squinto S., Ip N.Y., Furth M.E., Lindsay R.M., Yancopoulos G.D.** 1990. Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science*. **247**:1446-1451
- Malumbres M., Barbacid M.** 2009. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer*. **9**:153-66
- Marcote M.J., Knighton D.R., Basi G., Sowadski J.M., Brambilla P., Draetta G., Taylor S.S.** 1993. A three-dimensional model of the Cdc2 protein kinase: localization of cyclin-and Suc1-binding regions and phosphorylation sites. *Mol Cell Biol*. **13**:5122-31
- Martin-Zanca D., Hughes S.H., Barbacid M.** 1986. A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. *Nature*. **319**:743-8
- Meijer L., Azzi L., Wang J.Y.** 1991. Cyclin B targets p34cdc2 for tyrosine phosphorylation. *EMBO J*. **10**:1545-1554
- Merrick K.A., Fisher R.P.** 2010. Putting one step before the other: distinct activation pathways for Cdk1 and Cdk2 bring order to the mammalian cell cycle. *Cell Cycle*. **9**:706-14
- Merrick K.A., Fisher R.P.** 2012. Why minimal is not optimal: driving the mammalian cell cycle--and drug discovery--with a physiologic CDK control network. *Cell Cycle*. **11**:2600-5
- Min M., Lindon C.** 2012. Substrate targeting by the ubiquitin-proteasome system in mitosis. *Semin Cell Dev Biol*. **23**:482-91
- Moore J.D., Yang J., Truant R., Kornbluth S.** 1999. Nuclear import of Cdk/cyclin complexes: identification of distinct mechanisms for import of Cdk2/cyclin E and Cdc2/cyclin B1. *J Cell Biol*. **144**:213-24
- Morillo S.M., Abanto E.P., Román M.J., Frade J.M.** 2012. Nerve growth factor-induced cell cycle reentry in newborn neurons is triggered by p38MAPK-dependent E2F4 phosphorylation. *Mol Cell Biol*. **32**:2722-37
- Morillo S.M., Escoll P., de la Hera A., Frade J.M.** 2010. Somatic tetraploidy in specific chick retinal ganglion cells induced by nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **107**:109-14
- Mosch B., Morawski M., Mittag A., Lenz D., Tarnok A., Arendt T.** 2007. Aneuploidy and DNA replication in the normal human brain and Alzheimer's disease. *J Neurosci*. **27**:6859-67
- Mukai J., Hachiya T., Shoji-Hoshino S., Kimura M.T., Nadano D., Suvanto P., Hanaoka T., Li Y., Irie S., Greene L.A., Sato T.A.** 2000. NADE, a p75NTR-associated cell death executor, is involved in signal transduction mediated by the common neurotrophin receptor p75NTR. *J Biol Chem*. **275**:17566-70
- Müller M., Lutter D., Püschel A.W.** 2010. Persistence of the cell-cycle checkpoint kinase Wee1 in SadA- and SadB-deficient neurons disrupts neuronal polarity. *J Cell Sci*. **123**:286-94
- Murray A.W., Kirschner M.W.** 1989. Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature*. **339**:275-80

- Murray A.W., Solomon M.J., Kirschner M.W.** 1989. The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity. *Nature*. **339**:280-6
- Museridze D.P., Svanidze I.K., Macharashvili D.N.** 1975. Content of DNA and dry weight of the nuclei of neurons of the external geniculate body and retina of the eye in guinea pigs. *Sov J Dev Biol* **5**:269-272
- Nagata Y., Jones M.R., Nguyen H.G., McCrann D.J., St Hilaire C., Schreiber B.M., Hashimoto A., Inagaki M., Earnshaw W.C., Todokoro K., Ravid K.** 2005. Vascular smooth muscle cell polyploidization involves changes in chromosome passenger proteins and an endomitotic cell cycle. *Exp Cell Res*. **305**:277-91
- Nagy Z., Esiri M.M., Cato A.M., Smith A.D.** 1997. Cell cycle markers in the hippocampus in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. **94**:6-15
- Nakayama K., Ishida N., Shirane M., Inomata A., Inoue T., Shishido N., Horii I., Loh D.Y., Nakayama K.** 1996. Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell*. **85**:707-20
- Nallamshetty S., Crook M., Boehm M., Yoshimoto T., Olive M., Nabel E.G.** 2005. The cell cycle regulator p27Kip1 interacts with MCM7, a DNA replication licensing factor, to inhibit initiation of DNA replication. *FEBS Lett*. **579**:6529-36
- Nebreda A.R.** 2006. CDK activation by non-cyclin proteins. *Curr Opin Cell Biol*. **18**:192-8
- Nebreda A.R., Gannon J.V., Hunt T.** 1995. Newly synthesized protein(s) must associate with p34cdc2 to activate MAP kinase and MPF during progesterone-induced maturation of *Xenopus* oocytes. *EMBO J*. **14**:5597-5607
- Nguyen L., Besson A., Heng J.I., Schuurmans C., Teboul L., Parras C., Philpott A., Roberts J.M., Guillemot F.** 2006. p27Kip1 independently promotes neuronal differentiation and migration in the cerebral cortex. *Genes Dev*. **20**:1511-24
- Nguyen M.D., Boudreau M., Kriz J., Couillard-Després S., Kaplan D.R., Julien J.P.** 2003. Cell cycle regulators in the neuronal death pathway of amyotrophic lateral sclerosis caused by mutant superoxide dismutase 1. *J Neurosci*. **23**:2131-40
- Nigg E.A.** 2001. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **2**:21-32
- Nilsson A.S., Fainzilber M., Falck P., Ibáñez C.F.** 1998. Neurotrophin-7: a novel member of the neurotrophin family from the zebrafish. *FEBS Lett*. **424**:285-90
- Norbury C., Blow J., Nurse P.** 1991. Regulatory phosphorylation of the p34cdc2 protein kinase in vertebrates. *EMBO J*. **10**:3321-3329
- Nordman J., Orr-Weaver T.L.** 2012. Regulation of DNA replication during development. *Development*. **139**:455-64
- Nykjaer A., Lee R., Teng K.K., Jansen P., Madsen P., Nielsen M.S., Jacobsen C. Lee R., Kliemann M., Schwarz E., Willnow T.E., Hempstead B.L., Petersen C.M.** 2004. Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature*. **427**:843-848

- Ogawa O., Lee H.G., Zhu X., Raina A., Harris P.L., Castellani R.J., Perry G., Smith M.A.** 2003a. Increased p27, an essential component of cell cycle control, in Alzheimer's disease. *Aging Cell.* **2**:105-10
- Ogawa O., Zhu X., Lee H.G., Raina A., Obrenovich M.E., Bowser R., Ghanbari H.A., Castellani R.J., Perry G., Smith M.A.** 2003b. Ectopic localization of phosphorylated histone H3 in Alzheimer's disease: a mitotic catastrophe? *Acta Neuropathol.* **105**:524-528
- Osuga H., Osuga S., Wang F., Fetni R., Hogan M.J., Slack R.S., Hakim A.M., Ikeda J.-E., Park D.S.** 2000. Cyclin-dependent kinases as a therapeutic target for stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**:10254–10259
- Otto S.P.** 2007. The Evolutionary Consequences of Polyploidy. *Cell.* **131**:452-462
- Padgett C.S., Ivey W.D.** 1960. The normal embryology of the Coturnix quail. *Anat Rec.* **137**:1-11
- Park H., Poo M.M.** 2013. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci.* **14**:7-23
- Parker L.L., Atherton-Fessler S., Lee M.S., Ogg S., Falk J.L., Swenson K.I., Piwnica-Worms H.** 1991. Cyclin promotes the tyrosine phosphorylation of p34cdc2 in a wee1+ dependent manner. *EMBO J.* **10**:1255-63
- Parker L.L., Atherton-Fessler S., Piwnica-Worms H.** 1992. p107wee1 is a dual-specificity kinase that phosphorylates p34cdc2 on tyrosine 15. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**:2917-21
- Parker L.L., Piwnica-Worms H.** 1992. Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human Wee1 tyrosine kinase. *Science.* **257**:1955-1957
- Pei J.J., Braak H., Gong C.X., Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Winblad B., Cowburn R.F.** 2002. Up-regulation of cell division cycle (cdc) 2 kinase in neurons with early stage Alzheimer's disease neurofibrillary degeneration. *Acta Neuropathol.* **104**:369-376
- Pelegrí C., Duran-Vilaregut J., del Valle J., Crespo-Biel N., Ferrer I., Pallàs M., Camin A., Vilaplana J.** 2008. Cell cycle activation in striatal neurons from Huntington's disease patients and rats treated with 3-nitropropionic acid. *Int J Dev Neurosci.* **26**:665-71
- Pennisi E.** 2001. Molecular evolution. Genome duplications: the stuff of evolution? *Science.* **294**:2458-60
- Pérez P., Coll P.M., Hempstead B.L., Martín-Zanca D., Chao M.V.** 1995. NGF binding to the trk tyrosine kinase receptor requires the extracellular immunoglobulin-like domains. *Mol Cell Neurosci.* **6**:97-105
- Perry J.A., Kornbluth S.** 2007. Cdc25 and Wee1: analogous opposites? *Cell Div.* **2**:12
- Peter M., Nakagawa J., Dorée M., Labbé J.C., Nigg E.A.** 1990. In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamin by cdc2 kinase. *Cell.* **61**:591-602
- Petri E.T., Errico A., Escobedo L., Hunt T., Basavappa R.** 2007The crystal structure of human cyclin B. *Cell Cycle.* **6**:1342-9

- Pillai M.S., Sapna S., Shivakumar K.** 2011. p38 MAPK regulates G1-S transition in hypoxic cardiac fibroblasts. *Int J Biochem Cell Biol.* **43**:919-27
- Pincheira R., Baerwald M., Dunbar J.D., Donner D.B.** 2009. Sall2 is a novel p75NTR-interacting protein that links NGF signalling to cell cycle progression and neurite outgrowth. *EMBO J.* **28**:261-73
- Pines J.** 2006. Mitosis: a matter of getting rid of the right protein at the right time. *Trends Cell Biol.* **16**:55-63
- Pines J.** 2011. Cubism and the cell cycle: the many faces of the APC/C. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **12**:427-38
- Pines J., Hunter T.** 1991. Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport. *J Cell Biol.* **115**:1-17
- Pines J., Hunter T.** 1994. The differential localization of human cyclins A and B is due to a cytoplasmic retention signal in cyclin B. *EMBO J.* **13**:3772-81
- Poon R.Y., Toyoshima H., Hunter T.** 1995. Redistribution of the CDK inhibitor p27 between different cyclin CDK complexes in the mouse fibroblast cell cycle and in cells arrested with lovastatin or ultraviolet irradiation. *Mol Biol Cell.* **6**:1197-1213
- Poon R.Y., Yamashita K., Adamczewski J.P., Hunt T., Shuttleworth J.** 1993. The cdc2-related protein p40MO15 is the catalytic subunit of a protein kinase that can activate p33cdc2 and p34cdc2. *EMBO J.* **12**:3123-32
- Portugal L.C., Ventura A.L.** 2009. Localization of p27Kip1 in the developing avian retina: sustained expression in the mature tissue. *Neurosci Lett.* **466**:35-40
- Potapova T.A., Daum J.R., Pittman B.D., Hudson J.R., Jones T.N., Satinover D.L., Stukenberg P.T., Gorbsky G.J.** 2006. The reversibility of mitotic exit in vertebrate cells. *Nature.* **440**:954-8
- Prada C., Puga J., Pérez-Méndez L., López R., Ramírez G.** 1991. Spatial and Temporal Patterns of Neurogenesis in the Chick Retina. *Eur J Neurosci.* **3**:559-569
- Radeke M.J., Misko T.P., Hsu C., Herzenberg L.A., Shooter E.M.** 1987. Gene transfer and molecular cloning of the rat nerve growth factor receptor. *Nature.* **325**:593-7
- Rager G., Rager U.** 1978. Systems-matching by degeneration. I. A quantitative electron microscopic study of the generation and degeneration of retinal ganglion cells in the chicken. *Exp Brain Res.* **33**:65-78
- Ranganathan S., Bowser R.** 2003. Alterations in G(1) to S phase cell-cycle regulators during amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol.* **162**:823-35
- Ranganathan S., Scudiere S., Bowser R.** 2001. Hyperphosphorylation of the Rb gene product and altered subcellular distribution of E2F-1 during Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *J Alzheimers Dis.* **3**:377-385

- Rathjen F.G., Wolff J.M., Frank R., Bonhoeffer F., Rutishauser U.** 1987. Membrane glycoproteins involved in neurite fasciculation. *J Cell Biol.* **104**:343-53
- Ray G., Dhar G., Van Veldhuizen P.J., Banerjee S., Saxena N.K., Sengupta K., Banerjee S.K.** 2006. Modulation of cell-cycle regulatory signaling network by 2-methoxyestradiol in prostate cancer cells is mediated through multiple signal transduction pathways. *Biochemistry.* **45**:3703-13
- Reichardt L.F.** 2006. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **361**:1545-64
- Rodríguez-Tébar A., Barde Y.A.** 1988. Binding characteristics of brain-derived neurotrophic factor to its receptors on neurons from the chick embryo. *J Neurosci.* **8**:3337-3342
- Rodríguez-Tébar A., Dechant G., Barde Y.A.** 1990. Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. *Neuron.* **4**:487-92
- Rodríguez-Tébar A., Dechant G., Götz R., Barde Y.A.** 1992. Binding of neurotrophin-3 to its neuronal receptors and interactions with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *EMBO J.* **11**:917-22
- Rodríguez-Tébar A., Jeffrey P.L., Thoenen H., Barde Y.A.** 1989. The survival of chick retinal ganglion cells in response to brain derived neurotrophic factor depends on their embryonic age. *Dev Biol.* **136**:296-303
- Roux P.P., Barker P.A.** 2002. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol.* **67**:203-33
- Rubenstein J.L., Shimamura K., Martínez S., Puelles L.** 1998. Regionalization of the prosencephalic neural plate. *Annu Rev Neurosci.* **21**:445-77
- Santamaria D., Ortega S.** 2006. Cyclins and CDKS in development and cancer: lessons from genetically modified mice. *Front Biosci.* **11**:1164-88
- Santos A.M., López-Sánchez N., Martín-Oliva D., de la Villa P., Cuadros M.A., Frade J.M.** 2012a. Sortilin participates in light-dependent photoreceptor degeneration in vivo. *PLoS One* **7**:e36243
- Santos S.D., Wollman R., Meyer T., Ferrell J.E. Jr.** 2012b. Spatial positive feedback at the onset of mitosis. *Cell.* **149**:1500-13
- Saucedo L.J., Edgar B.A.** 2002. Why size matters: altering cell size. *Curr Opin Genet Dev.* **12**:565-71
- Sauer F.C.** 1935. Mitosis in the neural tube. *J Comp Neurol* **62**:377-405
- Schecterson L.C., Bothwell M.** 2010. Neurotrophin receptors: Old friends with new partners. *Dev Neurobiol.* **70**:332-8
- Schiel J.A., Park K., Morphew M.K., Reid E., Hoenger A., Prekeris R.** 2011. Endocytic membrane fusion and buckling-induced microtubule severing mediate cell abscission. *J Cell Sci.* **124**:1411-24

- Schneider R., Schweiger M.** 1991. A novel modular mosaic of cell adhesion motifs in the extracellular domains of the neurogenic trk and trkB tyrosine kinase receptors. *Oncogene*. **6**:1807-11
- Schor N.F.** 2005. The p75 neurotrophin receptor in human development and disease. *Prog Neurobiol*. **77**:201-14
- Schröpel A., von Schack D., Dechant G., Barde Y.A.** 1995. Early expression of the nerve growth factor receptor ctrkA in chick sympathetic and sensory ganglia. *Mol Cell Neurosci*. **6**:544-66
- Seidah N.G., Benjannet S., Pareek S., Chrétien M., Murphy R.A.** 1996. Cellular processing of the neurotrophin precursors of NT-3 and BDNF by the mammalian proprotein convertases. *FEBS Lett*. **379**:247-50
- Shelly M., Cancedda L., Heilshorn S., Sumbre G., Poo M.M.** 2007. LKB1/STRAD promotes axon initiation during neuronal polarization. *Cell*. **129**:565-77
- Sherr C.J., Roberts J.M.** 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*. **13**:1501-1512
- Skaper S.D.** 2008. The biology of neurotrophins, signalling pathways, and functional peptide mimetics of neurotrophins and their receptors. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. **7**:46-62
- Skaper S.D.** 2012. The neurotrophin family of neurotrophic factors: an overview. *Methods Mol Biol*. **846**:1-12
- Smith T.G. Jr., Futamachi K., Ehrenstein G.** 1982. Site of action potential generation in a giant neuron of *Aplysia californica*. *Brain Res*. **242**:184-9
- Snow M.H.** 1975. Embryonic development of tetraploid mice during the second half of gestation. *J Embryol Exp Morphol*. **34**:707-21
- Snow M.H.** 1976. The immediate postimplantation development of tetraploid mouse blastocysts. *J Embryol Exp Morphol*. **35**:81-6
- Solomon M.J., Lee T., Kirschner M.W.** 1992. Role of phosphorylation in p34cdc2 activation: identification of an activating kinase. *Mol Biol Cell*. **3**:13-27
- Stark G.R., Taylor W.R.** 2006. Control of the G2/M transition. *Mol Biotechnol*. **32**:227-48
- Stone J.G., Siedlak S.L., Tabaton M., Hirano A., Castellani R.J., Santocanale C., Perry G., Smith M.A., Zhu X., Lee H.G.** 2011. The cell cycle regulator phosphorylated Rb protein is associated with tau pathology in several tauopathies. *J Neuropathol Exp Neurol*. **70**:578-87
- Sugimoto-Shirasu K., Roberts K.** 2003. "Big it up": endoreduplication and cell-size control in plants. *Curr Opin Plant Biol*. **6**:544-53
- Susen K., Heumann R., Blöchl A.** 1999. Nerve growth factor stimulates MAPK via the low affinity receptor p75(LNTR). *FEBS Lett*. **463**:231-4

Suzuki S., Numakawa T., Shimazu K., Koshimizu H., Hara T., Hatanaka H., Mei L., Lu B., Kojima M. 2004. BDNF-induced recruitment of TrkB receptor into neuronal lipid rafts: roles in synaptic modulation. *J Cell Biol.* **167**:1205-15

Suzuki S., Tamai K., Yoshida S. 2002. Enzyme-linked immunosorbent assay for distinct cyclin-dependent kinase activities using phosphorylation-site-specific anti-pRB monoclonal antibodies. *Anal Biochem.* **301**:65-74

Swartz F.J., Bhatnagar K.P. 1981. Are CNS neurons polyploid? A critical analysis based upon cytophotometric study of the DNA content of cerebellar and olfactory bulbar neurons of the bat. *Brain Res.* **208**:267-81

Swift H. 1953. Quantitative aspects of nuclear nucleoproteins. *Int Rev Cytol.* **2**:1-76

Symeonidou I.E., Taraviras S., Lygerou Z. 2012. Control over DNA replication in time and space. *FEBS Lett.* **586**:2803-12

Szaro B.G., Tompkins R. 1987. Effect of tetraploidy on dendritic branching in neurons and glial cells of the frog, *Xenopus laevis*. *J Comp Neurol.* **258**:304-316.

Takizawa C.G., Weis K., Morgan D.O. 1999. Ran-independent nuclear import of cyclin B1-Cdc2 by importin beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**:7938-43

Tapley P., Lamballe F., Barbacid M. 1992. K252a is a selective inhibitor of the tyrosine protein kinase activity of the trk family of oncogenes and neurotrophin receptors. *Oncogene.* **7**:371-381

Teng K.K., Felice S., Kim T., Hempstead B.L. 2010. Understanding proneurotrophin actions: Recent advances and challenges. *Dev Neurobiol.* **70**:350-9

Thomas L., Clarke P.R., Pagano M., Gruenberg J. 1992. Inhibition of membrane fusion in vitro via cyclin B but not cyclin A. *J Biol Chem.* **267**:6183-7

Tomashevski A., Husseman J., Jin L.W., Nochlin D., Vincent I. 2001. Constitutive Wee1 activity in adult brain neurons with M phase-type alterations in Alzheimer neurodegeneration. *J Alzheimers Dis.* **3**:195-207

Toyoshima F., Moriguchi T., Wada A., Fukuda M., Nishida E. 1998. Nuclear export of cyclin B1 and its possible role in the DNA damage-induced G2 checkpoint. *EMBO J.* **17**:2728-35

Toyoshima-Morimoto F., Taniguchi E., Shinya N., Iwamatsu A., Nishida E. 2001. Polo-like kinase 1 phosphorylates cyclin B1 and targets it to the nucleus during prophase. *Nature.* **410**:215-20

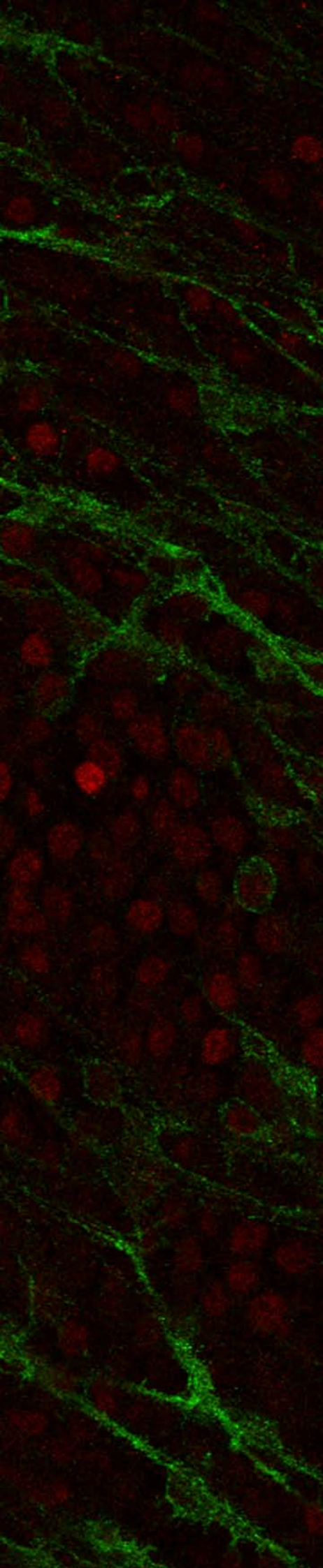
Tsujioka Y., Takahashi M., Tsuboi Y., Yamamoto T., Yamada T. 1999. Localization and expression of cdc2 and cdk4 in Alzheimer brain tissue. *Dement Geriatr Cogn Disord.* **10**:192-8

Tuomikoski T., Felix M.A., Dorée M., Gruenberg J. 1989. Inhibition of endocytic vesicle fusion in vitro by the cell-cycle control protein kinase cdc2. *Nature.* **342**:942-5

- Ubersax J.A., Woodbury E.L., Quang P.N., Paraz M., Blethrow J.D., Shah K., Shokat K.M., Morgan D.O.** 2003. Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature*. **425**:859-64
- Ullah Z., Kohn M.J., Yagi R., Vassilev L.T., DePamphilis M.L.** 2008. Differentiation of trophoblast stem cells into giant cells is triggered by p57/Kip2 inhibition of CDK1 activity. *Genes Dev*. **22**:3024-36
- Ullah Z., Lee C.Y., Depamphilis M.L.** 2009a. Cip/Kip cyclin-dependent protein kinase inhibitors and the road to polyploidy. *Cell Div*. **4**:10
- Ullah Z., Lee C-Y., Lilly M.A., DePhamphilis M.L.** 2009b. Developmentally programmed endoreduplication in animals. *Cell Cycle*. **15**:1501-9
- Umen J.G.** 2005. The elusive sizer. *Curr Opin Cell Biol*. **17**:435-41
- Urata Y., Parmelee S.J., Agard D.A., Sedat J.W.** 1995. A three-dimensional structural dissection of *Drosophila* polytene chromosomes. *J Cell Biol*. **131**:279-95
- Vaz R., Martins G.G., Thorsteinsdóttir S., Rodrigues G.** 2012. Fibronectin promotes migration, alignment and fusion in an in vitro myoblast cell model. *Cell Tissue Res*. **348**:569-78
- Verbeke S., Maignan S., Lagadec C., Germain E., Hondermarck H., Adriaenssens E., Le Bourhis X.** 2010 Overexpression of p75(NTR) increases survival of breast cancer cells through p21(waf1). *Cell Signal*. **22**:1864-73
- Verdaguer E., Jiménez A., Canudas A.M., Jordà E.G., Sureda F.X., Pallàs M., Camin A.** 2004. Inhibition of cell cycle pathway by flavopiridol promotes survival of cerebellar granule cells after an excitotoxic treatment. *J Pharmacol Exp Ther*. **308**:609-16
- Verde F., Dogterom M., Stelzer E., Karsenti E., Leibler S.** 1992. Control of microtubule dynamics and length by cyclin A- and cyclin B-dependent kinases in *Xenopus* egg extracts. *J Cell Biol*. **118**:1097-108
- Vermeulen K., Berneman Zwi N., Van Bockstaele D. R.** 2003a. Cell cycle and apoptosis *Cell Prolif*. **36**, 165–175
- Vermeulen K., Van Bockstaele D.R., Berneman Z.N.** 2003b. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*. **36**:131-49
- Vernon J.A., Butsch J.** 1957. Effect of tetraploidy on learning and retention in the salamander. *Science*. **125**:1033-4
- Vignery A.** 2000. Osteoclasts and giant cells: macrophagemacrophage fusion mechanism. *International Journal of Experimental Pathology*. **81**:291–304
- Vilar M., Murillo-Carretero M., Mira H., Magnusson K., Besset V., Ibáñez C.F.** 2006. Bex1, a novel interactor of the p75 neurotrophin receptor, links neurotrophin signaling to the cell cycle. *EMBO J*. **25**:1219-1230

- Vincent I., Jicha G., Rosado M., Dickson D.W.** 1997. Aberrant expression of mitotic cdc2/cyclin B1 kinase in degenerating neurons of Alzheimer's disease brain. *J Neurosci.* **17**:3588-3598.
- Vitrat N., Cohen-Solal K., Pique C., Le Couedic J.P., Norol F., Larsen A.K., Katz A., Vainchenker W., Debili N.** 1998. Endomitosis of human megakaryocytes are due to abortive mitosis. *Blood.* **91**:3711-23
- Volosin M., Song W., Almeida R.D., Kaplan D.R., Hempstead B.L., Friedman W.J.** 2006. Interaction of survival and death signaling in basal forebrain neurons: roles of neurotrophins and proneurotrophins. *J Neurosci.* **26**:7756-66
- von Bartheld C.S.** 1998. Neurotrophins in the developing and regenerating visual system. *Histol Histopathol.* **13**:437-59
- Wang F., Corbett D., Osuga H., Osuga S., Ikeda J.E., Slack R.S., Hogan M.J., Hakim A.M., Park D.S.** 2002. Inhibition of cyclin-dependent kinases improves CA1 neuronal survival and behavioral performance after global ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* **22**:171-82
- Wang W., Bu B., Xie M., Zhang M., Yu Z., Tao D.** 2009. Neural cell cycle dysregulation and central nervous system diseases. *Prog Neurobiol.* **89**:1-17
- Watanabe M., Rutishauser U., Silver J.** 1991. Formation of the retinal ganglion cell and optic fiber layers. *J Neurobiol.* **22**:85-96
- Wen Y., Yang S., Liu R., Brun-Zinkernagel A.M., Koulen P., Simpkins J.W.** 2004. Transient cerebral ischemia induces aberrant neuronal cell cycle re-entry and Alzheimer's disease-like tauopathy in female rats. *J Biol Chem.* **279**:22684-22692
- Wiesmann C., Ultsch M.H., Bass S.H., de Vos A.M.** 1999. Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the TrkA receptor. *Nature.* **9**:184-8
- Williams G.H., Stoeber K.** 2012. The cell cycle and cancer. *J Pathol.* **226**:352-64
- Woods J., Snape M., Smith M.A.** 2007. The cell cycle hypothesis of Alzheimer's disease: suggestions for drug development. *Biochim Biophys Acta.* **1772**:503-8
- Yamagishi M., Ito E., Matsuo R.** 2011. DNA endoreplication in the brain neurons during body growth of an adult slug. *J Neurosci.* **31**:5596-604
- Yamashiro S., Yamakita Y., Hosoya H., Matsumura F.** 1991. Phosphorylation of non-muscle caldesmon by p34cdc2 kinase during mitosis. *Nature.* **349**:169-72
- Yamashita T., Tucker K.L., Barde Y.A.** 1999. Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron.* **24**:585-93
- Yang J., Bardes E.S., Moore J.D., Brennan J., Powers M.A., Kornbluth S.** 1998. Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1. *Genes Dev.* **12**:2131-4

- Yang Y., Geldmacher D.S., Herrup K.** 2001. DNA replication precedes neuronal cell death in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* **21**:2661-8
- Yang Y., Herrup K.** 2005. Loss of neuronal cell cycle control in ataxia-telangiectasia: a unified disease mechanism. *J Neurosci.* **25**:2522–2529
- Yang Y., Mufson E.J., Herrup K.** 2003. Neuronal cell death is preceded by cell cycle events at all stages of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* **23**:2557-63
- Yasutis K.M., Kozminki K.G.** 2013. Cell cycle checkpoint regulators reach a zillion. *Cell Cycle.* **12**:1-9
- Yu T., Calvo L., Anta B., López-Benito S., Southon E., Chao M.V., Tessarollo L., Arévalo J.C.** 2011. Regulation of trafficking of activated TrkA is critical for NGF-mediated functions. *Traffic.* **12**:521-34
- Yuan Z., Becker E.B., Merlo P., Yamada T., DiBacco S., Konishi Y., Schaefer E.M., Bonni A.** 2008. Activation of FOXO1 by Cdk1 in cycling cells and postmitotic neurons. *Science.* **319**:1665-1668
- Zanet J., Freije A., Ruiz M., Coulon V., Sanz J.R., Chiesa J., Gandarillas A.** 2010. A mitosis block links active cell cycle with human epidermal differentiation and results in endoreplication. *PLoS One.* **5**:e15701
- Zhang B., Tan V.B.C., Lim K.M., Tay T.E.** 2007. The Activation and Inhibition of Cyclin Dependent Kinase-5 by Phosphorylation. *Biochemistry.* **46**:10841-10851
- Zhang J., Yu Z., Yu Z., Yang Z., Zhao H., Liu L., Zhao J.** 2011. rAAV-mediated delivery of brain-derived neurotrophic factor promotes neurite outgrowth and protects neurodegeneration in focal ischemic model. *Int J Clin Exp Pathol.* **4**:496-504
- Zhang L., Zhu H., Wang Q., Fang H., Xu W., Li M.** 2011 b. Homology modeling, molecular dynamic simulation and docking studies of cyclin dependent kinase 1. *J Mol Model.* **17**:219-26
- Zhang W., Liu H.T.** 2002. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res.* **12**:9-18
- Zuccato C., Cattaneo E.** 2009. Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurol.* **5**:311-322
- Zuccato C., Marullo M., Conforti P., MacDonald M.E., Tartari M., Cattaneo E.** 2008. Systematic assessment of BDNF and its receptor levels in human cortices affected by Huntington's disease. *Brain Pathol.* **18**:225-38



VIII. ANEXOS

1) Artículos publicados

- **Ovejero-Benito M.C., Frade J.M.** (2013) Brain-derived neurotrophic factor-dependent cdk1 inhibition prevents G2/M progression in differentiating tetraploid neurons. PLoS One.8:e64890. Disponible también en el CD adjunto.
- **López-Sánchez N., Ovejero-Benito M.C., Borreguero L., Frade J.M.** (2011) Control of neuronal ploidy during vertebrate development. Results Probl Cell Differ. 53:547-63. Review. A continuación se incluye el resumen de esta revisión. El artículo completo está disponible en el CD adjunto.

2) Capítulos de libro publicados

- **López-Sánchez N., Ovejero-Benito M.C., Rodríguez Ruíz C., Frade J.M.** (2013) NGF/p75^{NTR} in cell cycle and neuronal tetraploidy. Handbook of Neurotoxicity Springer. Aceptado para su publicación. A continuación se incluye el resumen del mismo. El capítulo completo está disponible en el CD adjunto.

3) Currículum vitae

Las actividades formativas realizadas durante el transcurso de esta tesis están recogidas en el CV disponible en el CD adjunto.

